

Tesis Doctoral

Regulación del factor de transcripción GATA3 por progestágenos y su participación en la proliferación de células de cáncer de mama

Izzo, Franco

2015-03-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Izzo, Franco. (2015-03-30). Regulación del factor de transcripción GATA3 por progestágenos y su participación en la proliferación de células de cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Izzo, Franco. "Regulación del factor de transcripción GATA3 por progestágenos y su participación en la proliferación de células de cáncer de mama". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-30.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES

**Regulación del factor de transcripción
GATA3 por progestágenos y su
participación en la proliferación de células
de cáncer de mama**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias
Biológicas

Autor: Lic. Franco Izzo

Director: Dra. Cecilia J. Proietti
Consejero de estudios: Dr. Omar Coso

**Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina
Experimental (IBYME)**

Buenos Aires, 2015

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | 6 |
| Abstract | 7 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 8 |
| Hipótesis | 9 |
| Objetivo principal | 9 |
| Objetivos específicos | 9 |
| INTRODUCCIÓN | 10 |
| Progesterona – Mecanismos moleculares y función en el desarrollo. | 11 |
| Cáncer de mama y progesterona | 14 |
| Funciones de los factores de transcripción GATA en el desarrollo y diferenciación celular | 17 |
| Funciones de GATA3 en cáncer de mama | 22 |
| Epigenética en el desarrollo de la glándula mamaria | 25 |
| Funciones de EZH2 en cáncer | 28 |
| Rol de la ciclina A2 en la progresión del ciclo celular | 29 |
| RESULTADOS | 32 |
| CAPÍTULO I | 33 |
| 1.1 - Regulación de la expresión de GATA3 por la activación del RP | 34 |
| 1.2 - Represión transcripcional de GATA3 mediante co-reclutamiento del RP y de EZH2 | 38 |
| CAPÍTULO II | 48 |
| 2.1 - Degradación post-traducciona l de GATA3 mediante el proteasoma 26S | 49 |
| 2.2 - Fosforilación de GATA3 inducida por MPA a través de la activación de la Proteína Kinasa A. | 52 |
| 2.3 - Fosforilación de GATA3 en serina 308 y su efecto sobre la estabilidad de la proteína. | 58 |
| CAPÍTULO III | 62 |
| 3.1 - Importancia de la regulación de GATA3 en la proliferación celular inducida por MPA | 63 |
| 3.2 - Relevancia de la regulación de GATA3 para el crecimiento tumoral in vivo inducido por progestágenos. | 71 |
| DISCUSIÓN | 77 |
| Relevancia de la participación del RP en cáncer de mama. | 78 |

| | |
|---|-----|
| Identificación de la activación del RP como evento que promueve la disminución de los niveles de GATA3. | 82 |
| Interacción entre el RP y EZH2. | 86 |
| Uso de pSer308-GATA3 como marcador pronóstico. | 90 |
| Regulación de ciclina A2 por progestágenos a través de GATA3. | 91 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 94 |
| Animales | 95 |
| Tumores C4HD | 95 |
| Reactivos | 96 |
| Soluciones utilizadas | 96 |
| Cultivos primarios de tumores C4HD | 97 |
| Líneas celulares y tratamientos | 98 |
| Medios de cultivo y suero fetal bovino | 100 |
| Preparación de extractos proteicos totales | 100 |
| Preparación de extractos citosólicos y nucleares | 101 |
| Anticuerpos utilizados | 101 |
| Primers y siRNA | 102 |
| Ensayos de Western Blot | 103 |
| Plásmidos | 104 |
| Mutagénesis sitio-dirigida | 104 |
| Transfecciones con ARN corto de interferencia (siRNA) | 105 |
| Ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal | 105 |
| Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y re-ChIP | 106 |
| Extracción de ARN y transcripción reversa | 109 |
| PCR cuantitativa en tiempo real | 109 |
| Citometría de flujo | 110 |
| Ensayo de sensibilidad a DNAsa I | 111 |
| Ensayo de fosforilación in vitro | 111 |
| Ensayos de proliferación | 112 |
| Experimentos in vivo | 113 |
| Inmunohistoquímica | 114 |
| BIBLIOGRAFÍA | 115 |

Agradecimientos

En primer lugar a mi directora, la Dra. Cecilia Proietti, por guiarme todos estos años en el camino de la investigación, por darme la libertad y el apoyo para perseguir mis ideas, así como la guía para mantener el foco de mi trabajo.

A la Dra. Patricia Elizalde, quien me brindó un lugar en su laboratorio y entre su excelente grupo de trabajo, así como su apoyo incondicional a nivel científico y económico. A la Dra. Roxana Schillaci, por su apoyo en el trabajo día a día, y por brindarme críticas constructivas que mejoraron tanto mi trabajo experimental como mis manuscritos.

Al Dr. Leandro Cerchietti y a la Dra. Katerina Hatzi, por leer y revisar el manuscrito publicado sobre este trabajo.

A mis actuales compañeros de laboratorio, Florencia Mercogliano, Leandro Venturutti, Mara De Martino, Florencia Chervo, Rosalía Cordo-Russo y Matías Pereyra, quienes contribuyeron a este trabajo con sus discusiones, ideas y trabajo en la mesada, además de hacer del laboratorio un lindo lugar de trabajo. A los compañeros con los que compartí tiempo y trabajo en el laboratorio: Wendy Beguelin, Celeste Díaz Flaqué, Martín Rivas, Mercedes Tkach, Florencia Cayrol y Lucía Romero. Todos ellos me brindaron valiosas enseñanzas sobre el trabajo de laboratorio.

A mis amigos de siempre, “La Muchachada”, Tomás Guillardoy, Silvio Temprana, Regi Scarpín, Julián Rodríguez-Vida, Agustina Pino-Martinez y Roxana Ballestrieri.

A toda la gente del IBYME-INGEBI, por el ambiente de intercambio y cooperación que permiten hacer mejor ciencia.

A Carlos Alberto Noval, Ana María Valiente y Diego Noval, por su ayuda y apoyo incondicional todos estos años.

A mis padres, Carlos Alberto Izzo y María Gabriela Gallo, que me brindaron todo su apoyo desde que tengo memoria e hicieron posible no solo este trabajo, sino toda mi formación académica y personal. A mi hermano, Federico Izzo, con el que compartimos horas de estudio, discusiones y música a lo largo de todos estos años.

A María Gabriela Noval, el amor de mi vida.

“Regulación del factor de transcripción GATA3 por progestágenos y su participación en la proliferación de células de cáncer de mama”

Resumen

El factor de transcripción maestro GATA3 se encuentra involucrado en el desarrollo de la glándula mamaria y es requerido para el mantenimiento del estado diferenciado de las células epiteliales lumbinales. El rol de GATA3 en cáncer de mama como supresor tumoral ha sido establecido, a pesar de que el mecanismo de la pérdida de expresión de GATA3 es no ha sido descrito hasta el momento. En el presente trabajo, demostramos que la activación del Receptor de Progesterona (RP) promueve el co-reclutamiento de la metiltransferasa de histonas Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) río arriba del *locus* de GATA3, incrementando los niveles de trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) e induciendo la compactación de la cromatina, lo cual resulta en la disminución de los niveles del ARNm de GATA3. Esta regulación se encuentra acoplada a una disminución de la estabilidad de la proteína GATA3, mediante la fosforilación inducida por progestágenos en el residuo serina 308 (pSer308-GATA3), seguida por degradación vía proteasoma 26S. Ambos mecanismos moleculares convergen para lograr reducir la expresión de GATA3 en células de cáncer de mama tras la activación del RP. Además, demostramos que la reducción en los niveles de GATA3 es requerida para lograr el incremento inducido por progestágenos de la ciclina A2, la cual media la transición de la fase G1 a S del ciclo celular, y se encuentra asociada a un peor pronóstico en pacientes de cáncer de mama. Finalmente, demostramos que la disminución de los niveles de GATA3 son necesarios para la proliferación celular *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo* inducidos por progestágenos.

Palabras clave: GATA3; Receptor de Progesterona; Cáncer de mama; EZH2; PKA.

“Progesterone-mediated regulation of the transcription factor GATA3, and its involvement in breast cancer cell proliferation”.

Abstract

The master transcription factor GATA3 is involved in the development of the mammary gland and is required for the maintenance of the differentiated status of luminal epithelial cells. The role of GATA3 as a tumor suppressor has been established, although the mechanism of GATA3 expression loss has not been described so far. In the present work, we demonstrated that Progesterone Receptor (PR) activation promotes the co-recruitment of the histone methyltransferase Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) upstream of the GATA3 locus, increasing the tri-methyl lysine 27 histone H3 (H3K27me₃) levels and inducing chromatin compaction, which results in GATA3 mRNA downregulation. This regulation is coupled with a decrease of GATA3 protein stability, through progesterone-induced GATA3 phosphorylation at serine 308 (pSer308-GATA3), followed by 26S-proteasome mediated degradation. Both molecular mechanisms converge to accomplish the reduction of GATA3 expression levels in breast cancer cells upon PR activation.

In addition, we demonstrate that GATA3 downregulation is required to accomplish progesterone-induced cyclin A2 upregulation, which mediates the G1 to S cell phase transition of the cell cycle, and is associated with a worst prognosis in breast cancer patients. Finally, we demonstrate that GATA3 downregulation is required for *in vitro* progesterone-driven breast cancer cell proliferation and for *in vivo* tumor growth.

Keywords: GATA3; Progesterone Receptor; Breast cancer; EZH2, PKA.

HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

Hipótesis:

La hipótesis principal de este trabajo es que la activación del Receptor de Progesterona por progestágenos modula la expresión del factor de transcripción GATA3, y que dicha modulación es requerida para la proliferación en células de cáncer de mama.

Objetivo principal:

Determinar la existencia de la regulación del factor de transcripción maestro GATA3 mediante la activación del RP, y la relevancia de dicha regulación en la proliferación celular y crecimiento de tumores de mama inducidos por progestágenos.

Objetivos específicos:

- Estudiar la regulación de GATA3 en líneas celulares de cáncer de mama por progestágenos y determinar la importancia del RP en dicha regulación.

- Identificar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de GATA3 mediada por el RP.

- Determinar la importancia de la regulación de GATA3 para la proliferación de células de cáncer de mama *in vitro* y del crecimiento tumoral *in vivo* inducidos por progestágenos.

INTRODUCCIÓN

Progesterona – Mecanismos moleculares y función en el desarrollo.

La progesterona (P4) es una hormona esteroidea ovárica esencial para el desarrollo de la glándula mamaria, cuya concentración en sangre es máxima durante la fase lútea del ciclo menstrual y es requerida para la proliferación y ramificación de la glándula mamaria durante la pubertad [1]. El receptor de progesterona (RP) media las acciones biológicas de la P4. El mismo pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y se encuentra dentro del subgrupo de receptores tipo I, cuyo ligando son hormonas de naturaleza esteroide. Dicho subgrupo está integrado también por el receptor de estrógenos α y β (RE α y RE β), el receptor de glucocorticoides, el receptor de mineralocorticoides y el receptor de andrógenos. A nivel estructural, el RP posee diversos dominios funcionales que han sido descritos en detalle: los dominios de transactivación (AF1-3), el dominio de unión al ligando (LBD) y el dominio de unión al ADN y dimerización (DBD). El dominio AF1 se encuentra en la región amino-terminal y es el responsable de mediar las interacciones con moléculas co-reguladoras de la transcripción. El dominio LBD conforma la superficie de reconocimiento del ligando, y define la especificidad por el mismo. El dominio DBD está constituido por dos motivos denominados “dedos de zinc”, que median la interacción con el ADN y el reconocimiento específico de secuencia. La secuencia consenso de unión al ADN es denominada elemento respondedor a progesterona (PRE, por sus siglas en inglés). Además, dentro del dominio DBD se encuentra la superficie responsable de la dimerización del receptor tras la unión al ligando. El RP existe principalmente como dos isoformas co-expresadas, la isoforma A (RP-A) y la isoforma B (RP-B), las cuales son transcritas a partir de

promotores alternativos de un mismo gen [2, 3]. La principal diferencia entre ambas isoformas radica en que el RP-A se encuentra truncado en el extremo amino terminal, lo que resulta en la carencia del dominio de transactivación AF1, el cual está presente en el RP-B. En la glándula mamaria, las isoformas del RP controlan subgrupos diferenciales de genes, así como genes en común. La isoforma RP-B es la de mayor expresión y actividad transcripcional en dicho tejido [4, 5]. Constitutivamente, el RP se localiza de forma ubicua dentro de la célula. Sin embargo, tras la unión con el ligando, el RP dimeriza y es capaz de actuar mediante diversos mecanismos moleculares. Por un lado, a través del mecanismo denominado *rápido* o *no genómico* es capaz de activar vías de transducción de señales [6-8]. Por otro lado, el RP es capaz de translocar al compartimento nuclear donde puede actuar mediante los mecanismos denominados *genómicos*. En el mecanismo *genómico* clásico, el RP se une directamente a su PRE presente en el ADN, mientras que en el mecanismo denominado *genómico no clásico* o "*tethering*" el RP interactúa con factores de transcripción que a su vez se encuentran unidos al ADN [9]. Estos mecanismos moleculares resultan en el reclutamiento de co-reguladores para activar o reprimir la transcripción de los genes blanco [10-12]. Los mecanismos descritos se esquematizan en la Figura 1.

Figura 1

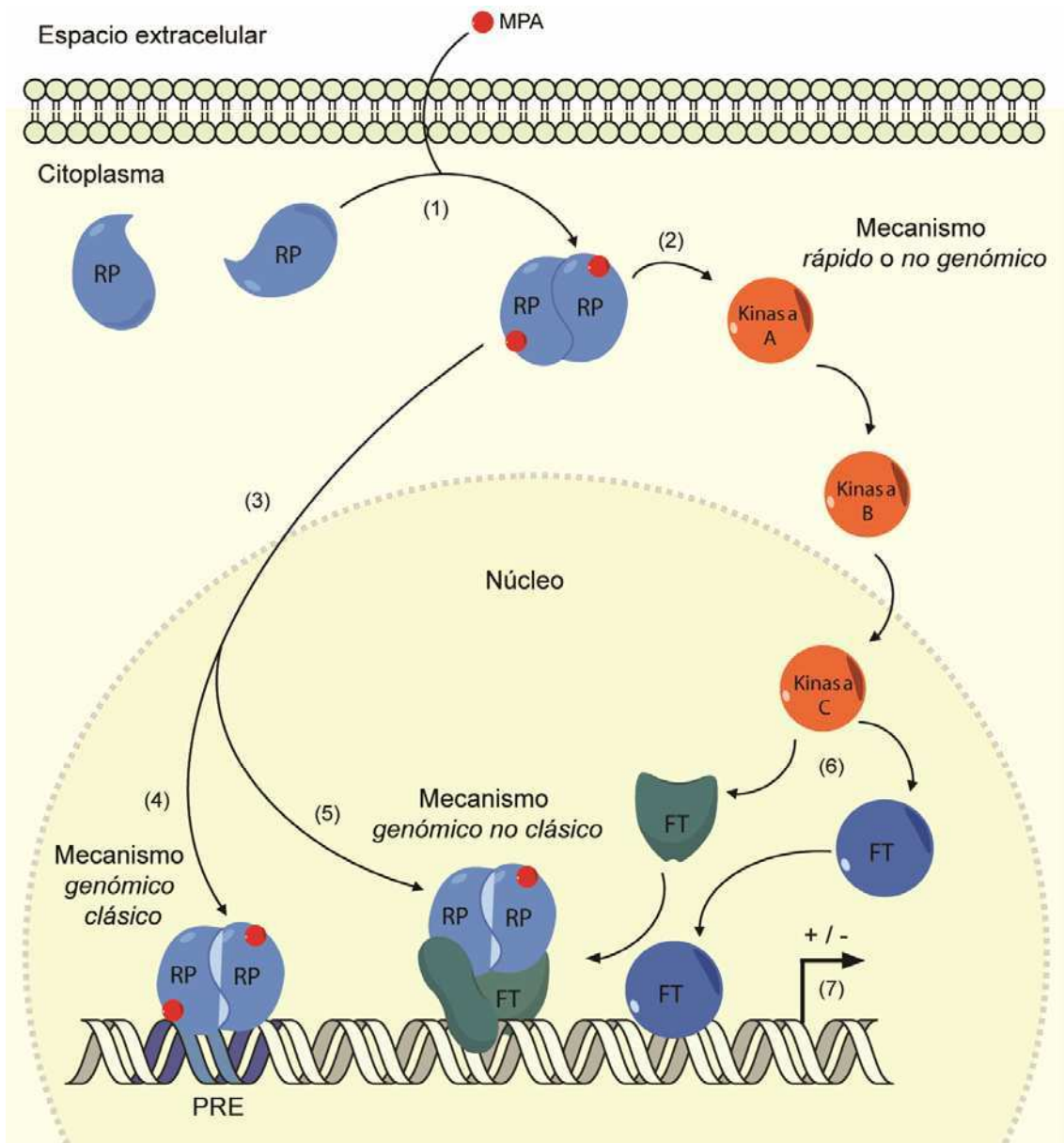


Figura 1. Representación esquemática de los mecanismos moleculares del RP: La unión al ligando, en este caso acetato de medroxiprogesterona (MPA) promueve la dimerización de receptor (1) que puede actuar mediante mecanismos *no genómicos* a través de la activación de vías de señalización (2) o translocar al núcleo (3) y actuar por los mecanismos *genómico clásico* (4) o *genómico no clásico* (5). La activación de las vías de señalización puede culminar con la activación de factores de transcripción (FT) (6). Estos procesos convergen para regular la transcripción de genes blanco (7).

La activación del RP por su ligando promueve diversos efectos fisiológicos.

Evidencias experimentales utilizando ratones hembra *knock-out* para el gen del

RP (*PgR*) demuestran la importancia del RP para el desarrollo normal de los órganos reproductivos. Dichos ratones muestran diversas anomalías, así como un impedimento del desarrollo y diferenciación de los ductos de la glándula mamaria, falta de ovulación, falta de inducción de decidualización uterina y falta de comportamiento sexual activo entre otros [13].

En humanos, el índice de proliferación del compartimento epitelial de la glándula mamaria es máximo durante la fase lútea del ciclo menstrual, cuando la P4 es la hormona dominante. Durante el embarazo, la P4 suprime la diferenciación celular inhibiendo la producción de proteínas de la leche así como el cierre de uniones estrechas de las células lumbinales del epitelio ductal [14]. En ratones, la caída de los niveles de P4 se produce previamente al parto, por lo que el proceso de lactogénesis comienza antes del nacimiento de las crías. De esta manera, la lactancia comienza inmediatamente tras el nacimiento [14]. De esta manera, la liberación de la inhibición de la P4 parece ser un mecanismo requerido para la activación secretoria de la glándula mamaria y la transición del estado de preñez a la lactancia [15].

Cáncer de mama y progesterona

Según la última estimación de la Agencia Internacional para la Investigación en cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) de la Organización Mundial de la Salud en 2012, la incidencia de cáncer de mama en Argentina se encuentra en un rango de 172.3 a 242.9 cada 100.000 habitantes, incidencia considerada como media-alta. Por otro lado, el cáncer de mama representa la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en Argentina (Fig. 2).

Figura 2

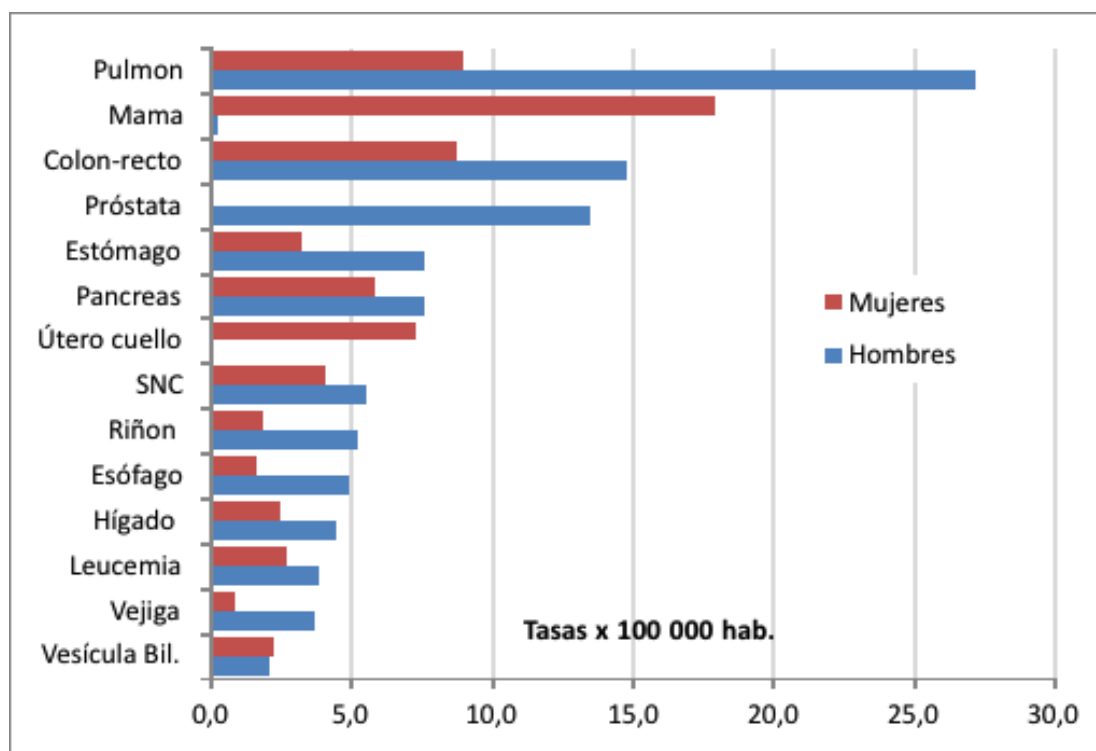


Figura 2: Mortalidad por cáncer según género en Argentina. Se muestra la tasa de mortalidad por los distintos tipos de cáncer en Argentina. Obsérvese que para mujeres la mayor tasa de mortalidad está dada por el cáncer de mama. Fuente: SIVER/INC – Ministerio de Salud de la Nación, en base a registros de mortalidad de la DEIS. Argentina, 2014.

El estudio pionero de Perou *et al* ha determinado la existencia de diversos subtipos intrínsecos de cáncer de mama a nivel molecular, cada uno con particularidades relevantes al tratamiento y pronóstico [16]. De esta manera, se han creado las siguientes categorías de clasificación basadas en el perfil de expresión de ARNm determinado mediante microarreglos para cáncer de mama: luminal A, luminal B, Her2+, fenotipo basal y triple negativo. El subgrupo luminal A se caracteriza por ser el que muestra mayor grado de diferenciación, es positivo para la expresión de RP, RE α y del receptor huérfano ErbB-2. Además es el subgrupo con mayor incidencia, comprendiendo aproximadamente el 75% de los casos de cáncer de mama. En general se ha

considerado que las acciones de los estrógenos a través del RE α son el principal factor en la estimulación de la proliferación y progresión dentro del subgrupo luminal A. En efecto, las terapias con compuestos con actividad anti-estrogénica han sido parcialmente exitosas en el tratamiento de este subgrupo de pacientes. Sin embargo, observaciones recientes indican que la P4, a su vez, tiene efectos proliferativos independientes de aquellos mediados por el RE α , y que representa un factor de riesgo en cáncer de mama. Dos estudios clínicos sobre los efectos de la terapia de reemplazo hormonal en pacientes menopáusicas (*Million Women Study* y *Women's Health Initiative*) [17, 18] han demostrado que la inclusión del progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) (Fig. 3) en terapias de reemplazo hormonal junto con β -estradiol, incrementa significativamente la incidencia de cáncer de mama. La presencia de MPA en la terapia de reemplazo hormonal está correlacionada con un aumento en la mortalidad por cáncer de mama, ya que pacientes que desarrollaron tumores mamarios y que habían recibido terapia de reemplazo hormonal combinada de MPA y β -estradiol, mostraron mayor tamaño tumoral y estadios más avanzados que aquellas que recibieron placebo solamente [18]. Notablemente, la combinación de β -estradiol y MPA en la terapia de reemplazo hormonal incrementa el riesgo de incidencia de cáncer de mama en comparación con la administración de β -estradiol exclusivamente [17].

Figura 3

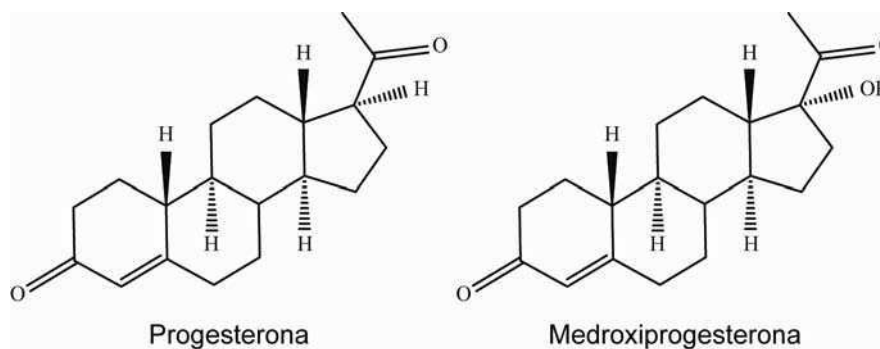


Figura 3: Estructura de los esteroides Progesterona y Medroxiprogesterona: Se muestra la estructura química de los compuestos detallados en la figura.

Por otro lado, evidencias experimentales obtenidas de estudios con ratones indican que la exposición prolongada a MPA induce adenocarcinomas mamarios en ratones Balb/c [19], reforzando las observaciones realizadas en pacientes. Notablemente ratones *knock-out* para el RP mostraron una marcada disminución de la incidencia de tumores inducidos por carcinógenos comparado con su contraparte salvaje, indicio de un rol del RP en el proceso de carcinogénesis y en la progresión tumoral [20]. Los estudios presentados evidencian que la P4 y la activación del RP están involucrados tanto en la proliferación y mantenimiento de la glándula mamaria normal así como en la carcinogénesis y la progresión tumoral.

Funciones de los factores de transcripción GATA en el desarrollo y diferenciación celular

El primer factor perteneciente a la familia actualmente definida como GATA fue descrito en 1988 como un factor específico de eritrocitos, capaz de unir la secuencia (A/T)GATA(A/G) localizada en el promotor del gen de la β -globina de

pollo [21]. Inicialmente definido como *erythroid factor 1* (Eryf1), este factor específico de eritrocitos fue el primer miembro de la actual familia GATA de factores de transcripción, posteriormente denominado GATA1.

Actualmente, se han descrito seis miembros de la familia de factores de transcripción GATA (GATA1-6), que deben su nombre a la secuencia consenso de unión al ADN inicialmente descrita para Eryf1/GATA1: (A/T)GATA(A/G). Los miembros de la familia GATA pertenecen a la clase de factores de transcripción denominados maestros, ya que regulan una plétora de procesos celulares, principalmente aquellos relacionados con la diferenciación celular. Esta familia de proteínas posee dos motivos de dedos de zinc altamente conservados (N y C) en la zona carboxilo-terminal. El motivo C es el principal responsable de la unión al ADN, mientras que el N media la interacción con co-reguladores, en especial con los co-represores denominados "*Friend of GATA*" (FOG, por sus siglas en inglés). Inmediatamente adyacente hacia la región carboxilo-terminal se encuentra la señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés), así como una serie de aminoácidos que sufren modificaciones post-traduccionales y regulan la actividad transcripcional del factor. La zona amino-terminal de la proteína posee el dominio de trans-activación, y corresponde a la zona que presenta mayor variabilidad de secuencia entre los distintos factores GATA.

Mientras que GATA1/2/3 se vinculan principalmente al proceso de diferenciación del compartimento hematopoyético, GATA4/5/6 están involucrados en el desarrollo de corazón, pulmones, sistema gastro-intestinal, músculo y sistema nervioso. Notablemente, esta distinción en la función durante el desarrollo se refleja en el grado de conservación evolutiva de la

secuencia aminoacídica entre los miembros de la familia GATA en humanos (Fig. 4).

Figura 4

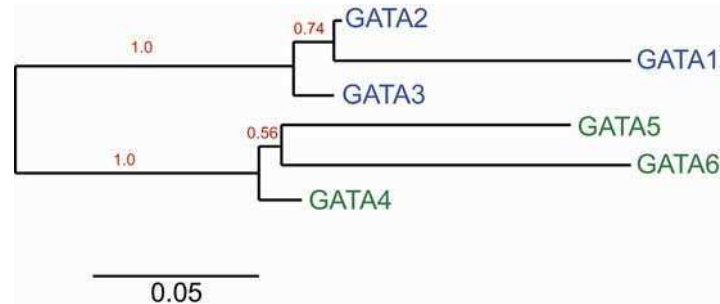


Figura 4: Conservación de secuencia aminoacídica de los miembros de la familia GATA. Árbol filogenético generado a partir de la secuencia aminoacídica de referencia del NCBI para cada miembro de la familia de GATA, mediante el software Phylogeny.fr [22]. La longitud de cada rama es proporcional a la cantidad de cambio evolutivo en la secuencia, la escala representa el número de sustituciones sobre el largo total de la secuencia. Los números a la izquierda de cada nodo (en rojo) indican la robustez estadística del mismo en una escala de 0 a 1. Esto es, indica la probabilidad de que las secuencias que se encuentran a la derecha de nodo se agrupen juntas, excluyendo al resto.

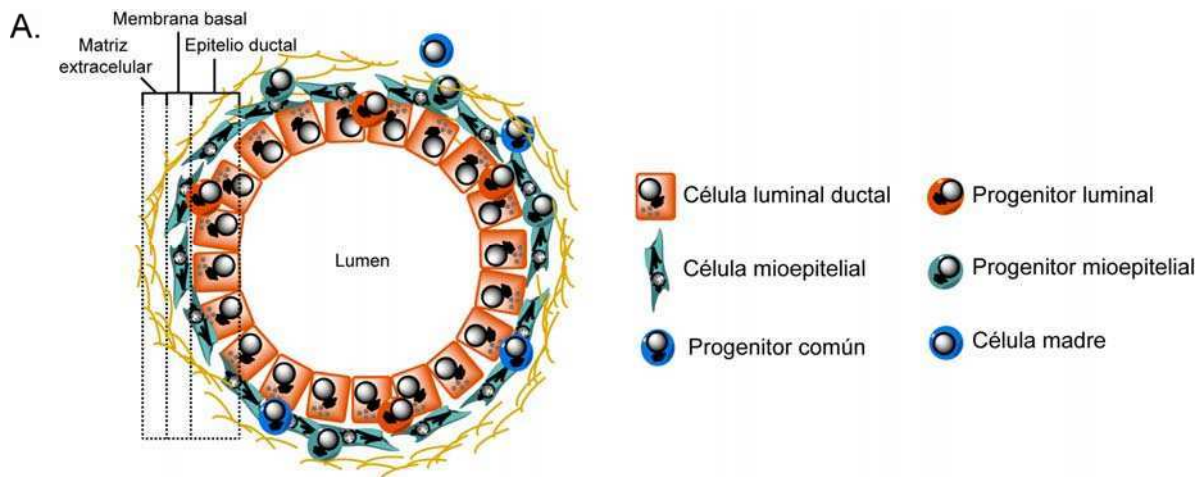
En particular, se ha descrito en detalle el rol de GATA1 en eritropoyesis, proceso durante el cual es esencial para determinar la diferenciación de precursores mielo-eritrocíticos a eritrocitos. En este caso, GATA1 antagoniza la acción del factor de transcripción PU.1, el cual promueve la diferenciación hacia células mieloides. Dicho antagonismo se observa a nivel transcripcional, ya que la expresión de uno de los factores promueve la represión de la expresión del otro, bloqueando la posibilidad de que una célula diferenciada adopte un destino alternativo y por lo tanto definiendo el destino celular. De esta manera, la pérdida de GATA1 promueve el paso de eritropoyesis a mielopoyesis, llevando a una deficiencia de eritrocitos y una expansión de la población de células mieloides por la liberación de la represión transcripcional de PU.1 [23].

Un proceso similar se ha observado en la especificación del destino celular de precursores linfoides a linfocitos T helper 1 (Th1) o 2 (Th2). Mientras que GATA3 define el proceso de diferenciación a Th2, el factor de transcripción T-bet promueve la diferenciación a Th1. De manera similar a la regulación observada entre GATA1 y PU.1, GATA3 y T-bet muestran un antagonismo transcripcional que resulta en la determinación de uno u otro destino celular [24].

Por otro lado, la glándula mamaria es un órgano epitelial ductal, que se encuentra compuesto por diversos tipos celulares principales: las células luminales ductales, que delimitan el lumen del ducto mamario, las células luminales alveolares y las células mioepiteliales que determinan la membrana basal de las células luminales (Fig. 5A). Estos tipos celulares surgen de una única población de células madre, y la expresión de GATA3 define la diferenciación al tipo luminal [25]. La importancia de GATA3 para la diferenciación y el desarrollo se ve reflejada en el hecho que el *knock-out* para este factor resulta en letalidad a nivel embrionario (día embrionario 11-12) [26]. Sin embargo, el desarrollo de ratones *knock-out* condicionales para el locus *GATA3* permitieron estudiar la relevancia de GATA3 en la génesis de diversos tejidos. En particular, los ratones *knock-out* condicionales para *GATA3* tejido-específicos permitieron determinar su rol en la morfogénesis de la glándula mamaria. Dichos ratones muestran un impedimento en el desarrollo de la glándula mamaria por falta de crecimiento y ramificación de los ductos mamarios, además de una expansión de la población de progenitores luminales debido a la incapacidad de los mismos de alcanzar la diferenciación terminal a células luminales [27]. Dado su rol fundamental en la diferenciación, en ratones

knock-out condicionales para GATA3 se observa una disminución de la expresión de proteínas asociadas a la producción de leche materna, como *whey acidic protein* (WAP) y β -caseína durante el período de lactancia [27]. Asimismo, la expresión forzada de GATA3 en una población enriquecida en células madre mamarias promueve la diferenciación hacia el linaje luminal, tanto hacia el destino alveolar como ductal [27]. Estas evidencias indican que GATA3 es requerido para el correcto desarrollo de los ductos mamarios y para la diferenciación terminal de progenitores luminales a células luminales. Este proceso se describe esquemáticamente en la Figura 5B.

Figura 5



B.

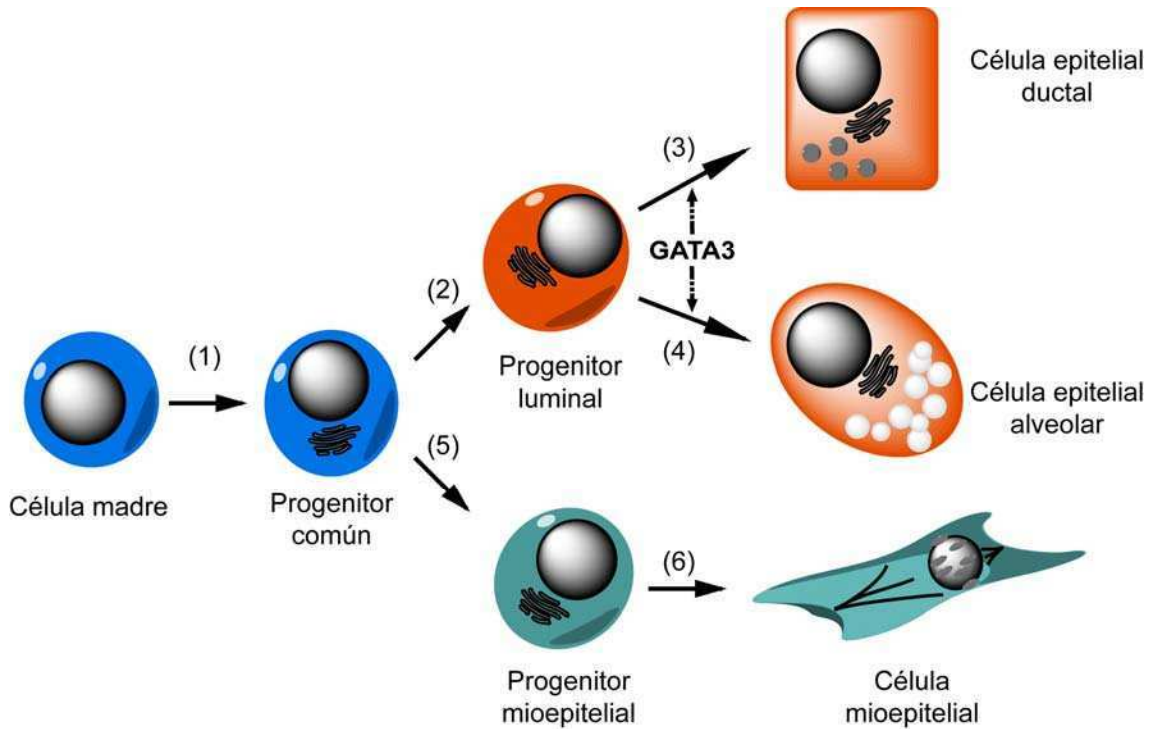


Figura 5: Representación esquemática de la glándula mamaria. A) Estructura de la glándula mamaria, se observa un corte transversal de un brote terminal detallando los distintos tipos celulares. B) Se esquematiza la diferenciación de una célula madre a los distintos tipos celulares presentes en la glándula mamaria. La generación de un progenitor común (1) permite la diferenciación de la misma ya sea a progenitores luminales (2), los cuales requieren la expresión de GATA3 para dar origen tanto a las células epiteliales ductales (3) como alveolares (4). La célula pluripotente puede a su vez generar progenitores mioepiteliales (5) que darán origen a células mioepiteliales (6). Basado en Asselin-Labat *et al* [27].

Funciones de GATA3 en cáncer de mama

El requerimiento de la expresión de GATA3 para el desarrollo de la glándula mamaria y el mantenimiento del estado diferenciado de las células luminales sugiere un rol potencial de este factor en la génesis y progresión del cáncer de mama. Mediante el uso de un modelo de progresión tumoral *in vivo*, Kouros-Mehr *et al* ha demostrado que la expresión de GATA3 se encuentra disminuida en carcinomas respecto a adenomas, y que GATA3 es el único miembro de la familia de factores de transcripción GATA diferencialmente regulado entre

estos dos estados de progresión tumoral [28]. Notablemente, se ha demostrado que la disminución de la expresión de GATA3 marca la pérdida de la diferenciación celular en tumores de mama, y determina el comienzo de la diseminación tumoral. Otra evidencia experimental que indica la relación causal entre la expresión de GATA3 y la progresión tumoral proviene de la reconstitución de la expresión de GATA3 mediante retro-transducción viral en tumores negativos para GATA3. Dicha restitución demostró ser condición suficiente para suprimir la diseminación tumoral e inducir la diferenciación de adenocarcinomas ductales mamarios [28]. En línea con estos estudios, la sobre-expresión de GATA3 en un modelo murino transgénico reduce el crecimiento tumoral, la capacidad de establecimiento de nuevos tumores y aumenta el grado de diferenciación del tumor [29]. Colectivamente, estos resultados resaltan la capacidad de GATA3 de lograr un mayor grado de diferenciación funcional de adenocarcinomas ductales mamarios y de reducir la capacidad de establecer nuevos tumores a partir de células tumorales transplantadas.

En pacientes de cáncer de mama, existe una correlación inversa entre el grado tumoral y el nivel de expresión de GATA3. De esta forma, la expresión de GATA3 disminuye con el aumento del grado tumoral. Asimismo, diversos estudios demostraron que la expresión de GATA3 posee valor pronóstico independiente, con una mayor expresión del factor asociada a un mejor pronóstico [30-32]. Sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que el silenciamiento del locus *GATA3* no es condición suficiente para promover la progresión tumoral, ya que la pérdida prematura de la expresión de GATA3 en

tumores diferenciados induce la pérdida de adhesión a la membrana basal de las células luminales, seguido de muerte celular por apoptosis [28].

Un estudio reciente ha identificado a *GATA3* como uno de los únicos tres genes que se encuentran mutados en más del 10% de los casos de cáncer de mama independientemente del subgrupo molecular. En total se han descrito 58 mutaciones somáticas en el locus *GATA3*, incluyendo una zona con alta frecuencia de mutación dentro del subtipo luminal A, la cual genera una deleción de 2 bases dentro del intrón 4 [33]. Efectivamente, las mutaciones frecuentes observadas en pacientes producen diversas alteraciones sobre la actividad de *GATA3*, la mayoría relacionadas con la pérdida de función. De esta manera, ciertas mutaciones generan variantes truncadas de *GATA3* que presentan una menor estabilidad, incapacidad de transactivar un gen reportero y pérdida de la localización nuclear. Además, aunque no se observan cambios en el índice proliferativo de células transfectadas con dichas mutantes, la capacidad de invasión se ve significativamente incrementada [34]. Estos estudios indican que las mutaciones frecuentemente observadas en cáncer de mama del subtipo luminal A generan principalmente pérdida de función del factor, e incluso sugieren que podrían actuar como dominantes negativos sobre el alelo salvaje.

En conjunto, la evidencia presentada identifica a *GATA3* como un supresor tumoral en cáncer de mama. Dado que la frecuencia de mutaciones no es suficiente para explicar por completo la pérdida de función de *GATA3*, y que se observa la pérdida de expresión de *GATA3* en tumores mamarios, es de vital importancia definir qué factores presentes en el microambiente tumoral son responsables de promover la disminución de los niveles de *GATA3* en tumores.

Dicho conocimiento podría proveer las bases para elaborar nuevas perspectivas terapéuticas a fin de prevenir el crecimiento, la progresión y diseminación del cáncer de mama evitando la pérdida de la expresión de GATA3.

Epigenética en el desarrollo de la glándula mamaria

Los mecanismos de regulación de la expresión génica son un campo de intenso estudio, en particular en lo referido a los cambios epigenéticos sobre la estructura y modificaciones post-traduccionales de las histonas y sus efectos en la regulación de la transcripción. El nucleosoma es la unidad funcional de la cromatina, y se encuentra compuesto por un octámero de histonas que interactúa con 146 bases del ADN. Cada una de estas histonas puede ser blanco de diversas modificaciones post-traduccionales (metilación, acetilación, ubiquitinación, sumoilación, etc.) de cuya combinación resulta la modulación de la tasa de transcripción génica. El estudio de la epigenética es de particular importancia en los procesos de diferenciación celular, dada la capacidad de generar diversos tipos celulares a partir de un mismo genoma.

Particularmente, la metil-transferasa de histonas *enhancer of zeste homolog 2* (EZH2) es la subunidad catalítica del Complejo Represor Polycomb 2 (PRC2, por sus siglas en inglés), y cataliza la tri-metilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) [35]. La actividad catalítica de EZH2 es mediada por el dominio SET, localizado en la región carboxilo-terminal. H3K27me3 es reconocida por el Complejo Represor Polycomb 1 (PRC1) [35], el cual promueve la mono-ubiquitinación de la lisina 119 de la histona H2A inhibiendo

la elongación por parte de la ARN polimerasa II (RNAPol II) [36] y promoviendo la compactación de la cromatina. Estos eventos se traducen en la represión transcripcional del gen blanco [37]. Otros componentes del PRC2 son *Embryonic Ectoderm Development* (EED) y *Suppressor of Zeste 12* (SUZ12). La interacción de EZH2 con EED y SUZ12 estabiliza a EZH2, y permite catalizar la formación de H3K27me3 utilizando S-adenosil-metionina (SAM) como intermediario de reacción. El proceso descrito se esquematiza en la Figura 6.

Figura 6

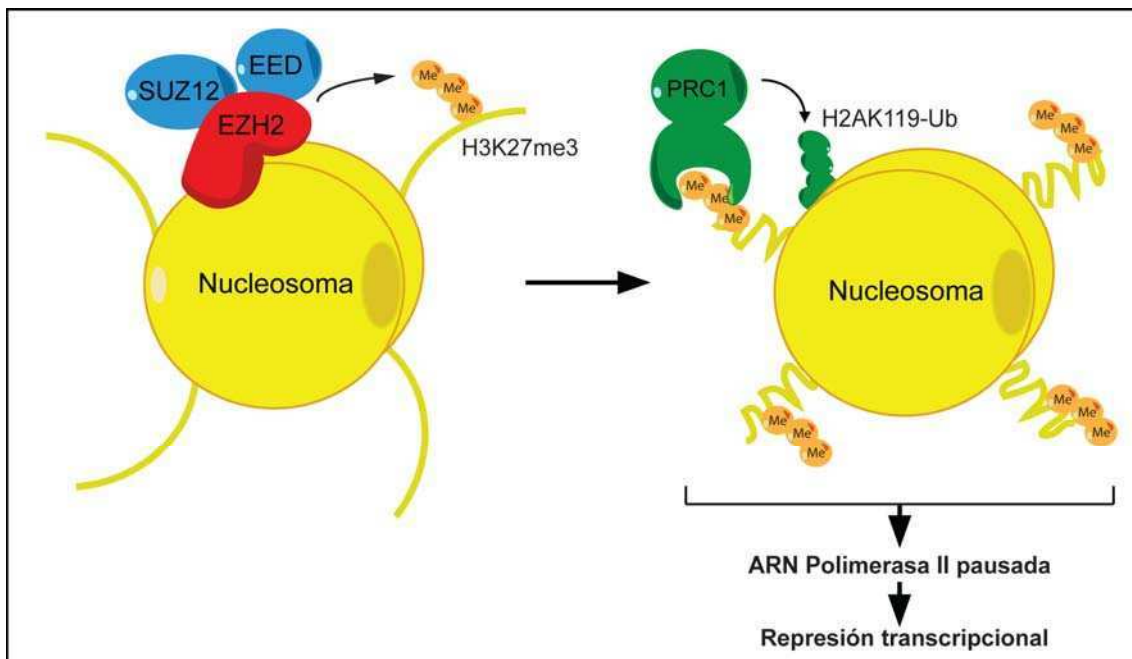


Figura 6: Representación esquemática del mecanismo de silenciamiento mediado por PRC1 y PRC2. Se muestra esquemáticamente el proceso de represión transcripcional mediado por PRC2 y PRC1. La H3K27me3 es catalizada por el PRC2, cuyos componentes son EZH2, EED y SUZ12. Esta marca epigenética es reconocida por el PRC1, el cual cataliza la mono-ubiquitinación de H2AK119 promoviendo la represión transcripcional.

Otra característica destacada del PRC2 es que si bien ciertas secuencias presentes en el genoma se encuentran asociadas a su actividad en *Drosophila*

melanogaster [38, 39], aún no se han encontrado sus homólogos en organismos vertebrados. Por lo tanto, un posible mecanismo por el cual el PRC2 es dirigido a sus genes blanco es mediante la interacción con otros factores de transcripción [39]. Notablemente, los genes blanco del PRC2 están principalmente relacionados con desarrollo embrionario y la diferenciación celular [40, 41]. Recientemente, se ha explorado en profundidad el rol del complejo PRC2 en el proceso de diferenciación celular durante el desarrollo embrionario, tomando como modelo el programa de desarrollo determinado por la regulación del locus *HOXA*. Se ha observado que el complejo PRC2 se encuentra unido en células pluripotentes a aquellos genes que serán reprimidos luego en la célula terminalmente diferenciada. Notablemente, en aquellos genes que son expresados en la célula diferenciada se pierde la unión del complejo PRC2 [42]. Estas observaciones demuestran que el PRC2 funciona como un componente de memoria transcripcional de genes involucrados en el desarrollo embrionario y en la diferenciación celular.

Por otro lado, se ha observado una correlación positiva entre los niveles de expresión de EZH2 en la glándula mamaria y los niveles circulantes de P4. En ratones, durante la preñez, se observa un incremento en la expresión de EZH2, en la fosforilación de EZH2 en la treonina 487 (pT487-EZH2) y en los niveles globales de H3K27me3. Los cambios a nivel genómico de la abundancia de H3K27me3 correlacionan con la represión de diversos grupos de genes durante la preñez. Estos eventos se observan durante el aumento de los niveles de progesterona y de expresión del RP [43], lo cual sugiere que la actividad de EZH2 es afectada por las hormonas dominantes durante dicho estadio. Este fenómeno afecta la abundancia de H3K27me3 a nivel genómico,

impactando en la expresión de genes clave para el proceso de desarrollo de la glándula mamaria.

Además de la capacidad de promover H3K27me3, el PRC2 es capaz de metilar proteínas no histónicas. Es de particular interés que el PRC2 es capaz de promover la metilación del factor de transcripción GATA4 en la lisina 299, lo cual reduce la capacidad del factor de interactuar con el coactivador p300, disminuyendo su capacidad de activar la transcripción. Este mecanismo resulta esencial para el correcto desarrollo y morfogénesis cardíaca [44].

Funciones de EZH2 en cáncer

Dado el rol central de EZH2 en la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario, su participación en la génesis y progresión tumoral ha sido ampliamente estudiada. La primera observación común a diversos estudios es que la expresión de EZH2 se encuentra aumentada en el tumor respecto del tejido normal. Además, el descubrimiento de una alta frecuencia de mutaciones somáticas de EZH2 en linfoma tipo B provee un indicio de su rol en este tipo de cáncer. La mutación que se encuentra en mayor frecuencia (22% en linfoma B de centro germinal y 7% en linfoma B difuso) genera el reemplazo de la tirosina 641 por asparagina (Y641N) dentro del dominio SET, generando una variante constitutivamente activa de EZH2 [45]. De esta manera, una mayor actividad metil-transferasa se relaciona con un mayor grado tumoral.

Por otro lado, se ha determinado el rol de EZH2 en cáncer de próstata. En este tipo de tumores, EZH2 se encuentra sobre-expresado en cáncer de próstata

metastático *versus* no metastático, y el silenciamiento de EZH2 previene el crecimiento tumoral así como su sobre-expresión aumenta la invasividad tumoral [46]. Otra característica que se ha descrito recientemente es la capacidad de EZH2 para actuar independientemente de los otros miembros del complejo PRC2, EED y SUZ12 en cáncer de próstata. En este tipo de tumor, la activación de la vía de la quinasa Akt promueve la fosforilación de EZH2 en el residuo serina 21, lo cual promueve la activación de genes por parte de EZH2 de forma independiente de los demás componentes del PCR2 [47].

En lo referido a la acción de EZH2 en cáncer de mama, se ha determinado que su sobre-expresión correlaciona positivamente con mayores tasas de proliferación, transformación neoplásica y subtipos tumorales agresivos [48-51]. Se ha sugerido una relación funcional entre la expresión de GATA3 y EZH2, ya que el silenciamiento de EZH2 promueve el aumento de GATA3 en células tumorales de mama de subtipo basal [52]. En la línea de cáncer de mama humano T47D, el silenciamiento del RP conlleva a la disminución de pT487-EZH2, sugiriendo un rol funcional del RP en la regulación de los niveles de fosforilación de EZH2 en dicho residuo.

Rol de la ciclina A2 en la progresión del ciclo celular

La progresión a través de las distintas fases del ciclo celular se encuentra coordinada por las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, por sus siglas en inglés), cuya subunidad regulatoria son las ciclinas. Las ciclinas deben su nombre a los patrones de expresión que muestran a lo largo del ciclo celular, ya que cada una aumenta su expresión en un estadio determinado, cumpliendo

una función particular. Este patrón de expresión se repite en cada uno de los ciclos de proliferación celular.

Se han caracterizado numerosas variantes dentro de la familia de las ciclinas en mamíferos, las cuales poseen un patrón de expresión particular durante las distintas fases del ciclo celular. Brevemente, la fase G1 esta caracterizada por el aumento de la ciclina D1 y ciclina E, mientras que el inicio de la síntesis de ADN y por lo tanto la entrada a la fase S coincide con el aumento de la ciclina A2. Finalmente, la transición S-G2 está marcada por el aumento de la ciclina B1 y de G2 a mitosis tanto por la ciclina B1 como por la ciclina A2.

En particular, se han descrito dos variantes de la ciclina A, denominadas ciclina A1 y ciclina A2. La ciclina A1 se expresa exclusivamente durante la meiosis de células germinales y en embriones tempranos, mientras que la ciclina A2 se expresa en todas las células somáticas proliferativas. Esta última se caracteriza por tener su máximo nivel de expresión durante el inicio de la síntesis de ADN, que marca el comienzo de la fase S, así como durante la división celular en la transición de G2 a M [53, 54]. Estudios recientes han sugerido un potencial rol para la ciclina A2 en cáncer de mama, ya que ratones transgénicos que sobre-expresan ciclina A2 generan anomalías nucleares, sugestivas de transformación neoplásica [55]. Además, la expresión de ciclina A2 ha demostrado poseer valor pronóstico independiente en pacientes de cáncer de mama, con un aumento en la expresión correlacionando con un mal pronóstico [56].

Por otro lado, la sobreexpresión de GATA3 en células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231) promueve la disminución a nivel transcripcional de la expresión de ciclina A2. Notablemente, el análisis de los patrones de

expresión global mediante *Ingenuity Pathway Analyses* demostró que la única ciclina diferencialmente regulada tras la sobreexpresión de GATA3 es la ciclina A2, la cual funciona como nodo de su red transcripcional [57]. Estos estudios sugieren una relación funcional, ya sea mediante un mecanismo de regulación directo o indirecto, entre GATA3 y la expresión de la ciclina A2.

RESULTADOS

CAPÍTULO I



REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE *GATA3* POR PROGESTÁGENOS

1.1 - Regulación de la expresión de GATA3 por la activación del RP

El primer objetivo del presente trabajo fue evaluar la regulación del factor de transcripción GATA3 por activación del RP en las líneas celulares de cáncer de mama humano T47D y BT474, las cuales son positivas para la expresión tanto del RP como de GATA3. Además, utilizamos el modelo de adenocarcinoma mamario murino progestágeno-dependiente C4HD. El mismo se generó en ratones hembra BALB/c tratados con 40 mg del progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) cada 3 meses durante 1 año, y ha sido mantenido por pasajes singeneicos en ratones tratados con MPA [58]. El MPA se administra en forma de depósito (40 mg) en el flanco contralateral al inóculo tumoral. A partir de estos tumores generamos cultivos primarios de células C4HD (ver sección materiales y métodos), sobre los cuales realizamos extractos proteicos para ensayos de Western Blot (WB).

Observamos que el tratamiento con MPA promueve la disminución de los niveles de GATA3 en células T47D, BT474 y C4HD en comparación con el control tratado con vehículo (etanol 1:1000) (Fig. 7A). A fin de probar si la disminución de los niveles de GATA3 por MPA se debe a la activación del RP clásico, utilizamos el inhibidor farmacológico RU486. El RU486 es un esteroide sintético que posee actividad como anti-progestágeno. Su mecanismo de acción se basa en la interacción con el sitio de unión al ligando del RP, y su principal característica estructural es la presencia de un grupo fenilaminodimetil en la posición 11- β del esteroide. La unión del RU486 al RP impide la interacción del RP con co-reguladores de la transcripción, dependiendo del contexto celular. En este trabajos, observamos que la pre-

incubación con el antiprogestágeno revierte el efecto del MPA en las líneas celulares T47D, BT474 y C4HD (Fig. 7A), lo cual indica el requerimiento de la activación del RP clásico para la regulación de GATA3.

A fin de descartar que la disminución de los niveles de GATA3 sea un efecto inespecífico debido al uso de un progestágeno sintético, realizamos ensayos de WB utilizando el ligando endógeno del RP, la progesterona (Pg). El tratamiento por 18 h con las concentraciones de Pg indicadas en la figura promueve la disminución de la expresión de GATA3 (Fig. 7B), a niveles similares a los observados al utilizar MPA en concentración 10 nM (Fig.7A). Este resultado demuestra que el ligando endógeno del RP es capaz de promover la regulación de GATA3 de forma similar a la observada con el progestágeno sintético MPA.

Figura 7

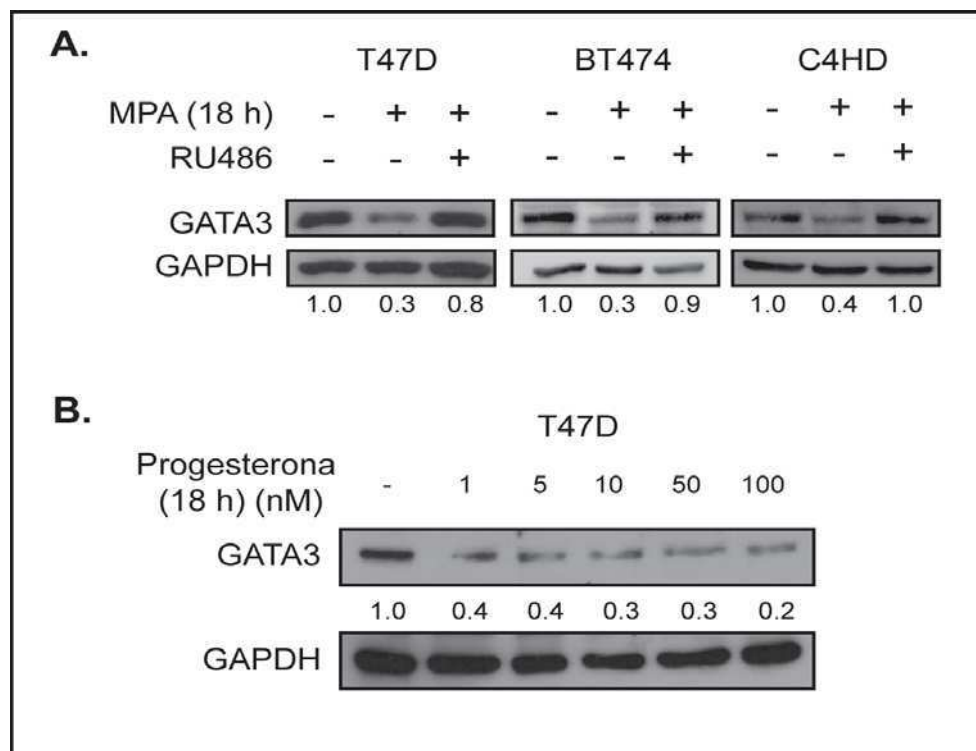


Figura 7. Regulación de GATA3 por progestágenos: A) Células T47D, BT474 o C4HD fueron pre-tratadas o no según lo indicado con el antiprogestágeno RU486 y luego coincubadas con MPA 10 nM o vehículo (etanol 1:1000) como control por el tiempo indicado. Se prepararon lisados de proteínas totales y la expresión de GATA3 fue medida por western blot (WB). Las bandas de GATA3 fueron densitometradas y los valores normalizados a las bandas correspondientes a GAPDH, utilizando 1.0 como valor de las células no tratadas. B) Células T47D fueron tratadas con las concentraciones indicadas de progesterona por 18 h. La expresión de GATA3 fue medida y analizada como se describe en A).

Para confirmar que el efecto del MPA sobre la expresión de GATA3 se debe a la activación del RP, utilizamos ARN corto de interferencia (siRNA) contra el RP y analizamos la regulación de GATA3. Observamos que la disminución de la expresión del RP mediante siRNA impide la regulación de GATA3 mediada por MPA (Fig. 8A), confirmando el requerimiento de dicho receptor para lograr el efecto del MPA sobre los niveles de GATA3, tanto en células T47D como en BT474 y C4HD.

El cambio observado en la movilidad electroforética de las isoformas del RP al incubar las células con el progestágeno se debe a la hiperfosforilación del receptor al unirse a su ligando, e indica el estado de activación del mismo [59]. Por otro lado, la disminución de los niveles de RP observados al tratar con MPA (Fig. 8A) se debe a que el RP activo e hiperfosforilado es degradado vía proteosoma 26S [59].

A fin de complementar los estudios del requerimiento del RP para la regulación de GATA3 mediada por progestágenos, utilizamos la línea celular T47D-Y. Las células T47D-Y fueron derivadas de las T47D, y carecen de la expresión del RP, por lo que sirven como modelo RP negativo [60]. Observamos mediante ensayos de WB que el tratamiento de células T47D-Y con MPA no produce la disminución de la expresión de GATA3 observada en T47D (Fig. 8B),

consistente con que dicha regulación se encuentre mediada por el RP. Por otro lado, cuando restituimos la expresión de la isoforma A (RP-A) o la isoforma B (RP-B) del RP en células T47D-Y, observamos la recuperación de la regulación de GATA3 por MPA (Fig. 8B). Estos resultados indican que el efecto del progestágeno sintético sobre los niveles de GATA3 es mediado por el RP, y que tanto el RP-A como el RP-B son capaces de mediar dicho proceso.

Figura 8

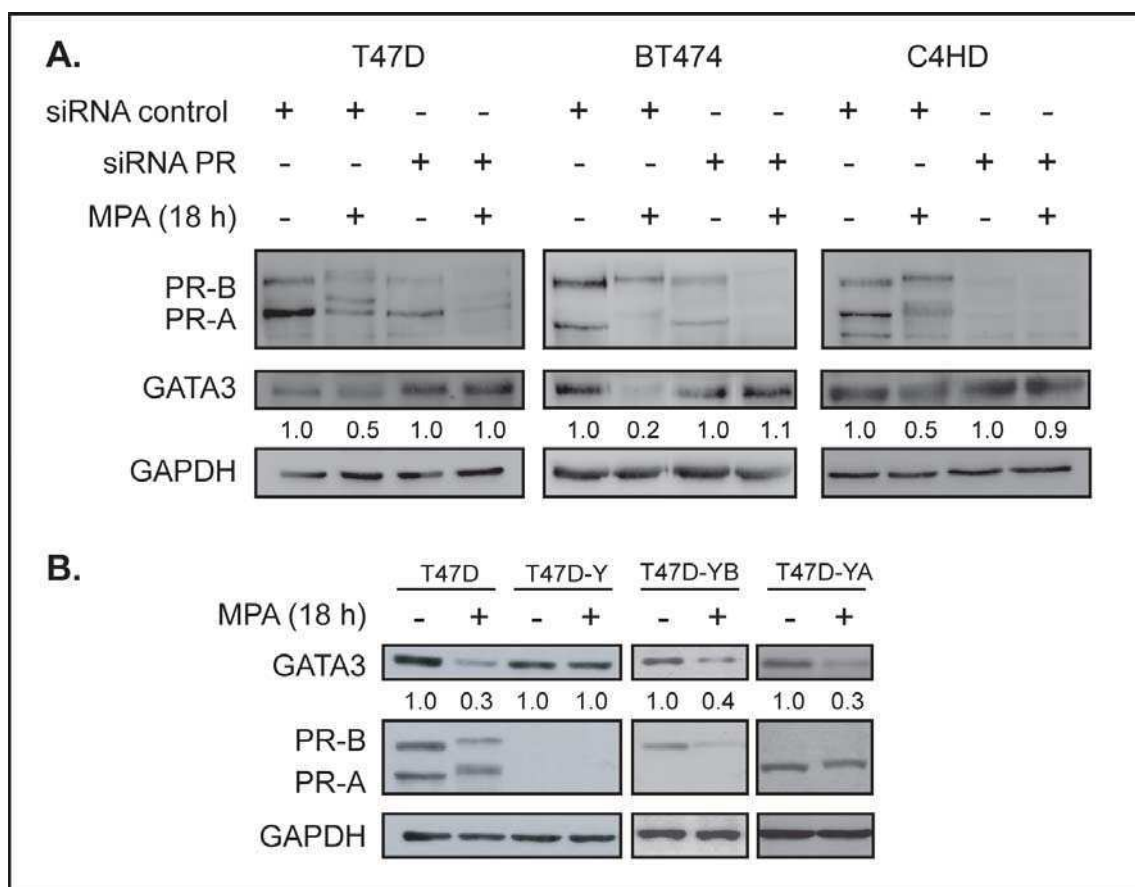
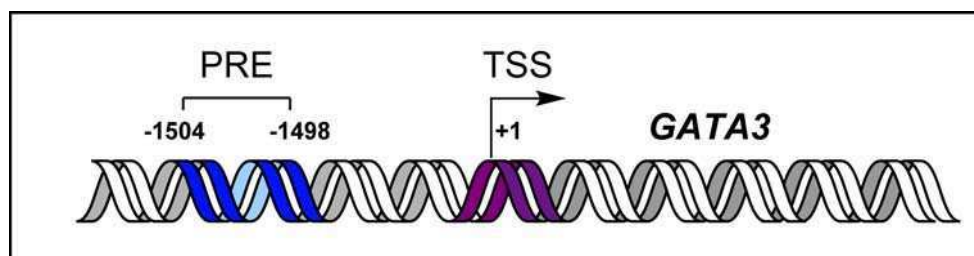


Figura 8. Requerimiento del RP para la regulación de GATA3 por MPA: A) Células T47D, BT474 o C4HD fueron transfectadas con siRNA control o con un siRNA que tiene como blanco el RP (siRNA PR). Las células fueron hambreadas por 24 h y tratadas con MPA o vehículo, se realizaron lisados de proteínas totales y se midió la expresión de GATA3 mediante WB. B) Células T47D o T47D-Y transfectadas ya sea con la isoforma RP-A (T47D-YA) o RP-B (T47D-YB) fueron tratadas con MPA por 18 h. Se midió la expresión de GATA3 como se describe en A).

En conjunto, los resultados expuestos hasta el momento demuestran que la activación del RP media la disminución de GATA3 por progestágenos en células de cáncer de mama.

1.2 - Represión transcripcional de GATA3 mediante co-reclutamiento del RP y de EZH2

Debido a la capacidad del RP de actuar como regulador de la transcripción al localizarse en el compartimento nuclear tras la unión al ligando, decidimos explorar si la disminución de la expresión de GATA3 por activación del RP involucra cambios a nivel transcripcional en el promotor del locus *GATA3*. Como primera aproximación, realizamos una búsqueda *in silico* de potenciales elementos de respuesta a progesterona (PREs) mediante el software MatInspector [61] abarcando 5 kpb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés) del locus *GATA3* humano. Este procedimiento nos permitió localizar un potencial PRE en la posición -1498 a -1504 pb río arriba del TSS como se demuestra en el esquema a continuación:



A fin de verificar la capacidad del RP de ser reclutado al sitio en estudio río arriba del locus *GATA3*, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de la

cromatina (ChIP) mediante el uso de anticuerpos específicos contra el RP, seguidos de PCR en tiempo real (q-PCR) utilizando primers flanqueando el sitio en estudio (Tabla 1, sección Materiales y Métodos). Observamos que al tratar con MPA, el RP es reclutado al PRE tanto en células T47D como en BT474 (Fig. 9A).

Ha sido descrito que la unión del RP al ADN promueve el reclutamiento de enzimas modificadoras de la cromatina denominadas co-reguladores, resultando en la adición o remoción de modificaciones post-traduccionales en los distintos residuos de las histonas que componen la cromatina (revisado en [62]). La combinación de dichas modificaciones post-traduccionales puede modular la tasa de transcripción del gen en cuestión [62]. Por lo tanto, decidimos explorar los cambios en el enriquecimiento de marcas epigenéticas asociadas ya sea con la disminución de la transcripción: tri-metilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), o con su aumento: acetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4Ac) y acetilación total de la histona H4 (H4Ac).

Al incubar las células con el progestágeno, observamos un aumento en el enriquecimiento de H3K27me3 en comparación con el vehículo, tanto en células T47D como en BT474 (Fig. 9A). En línea con este resultado, observamos una disminución de los niveles de H3K4Ac y H4Ac en células T47D (Fig. 9B). El enriquecimiento en una marca asociada con la represión transcripcional (H3K27me3) y la pérdida de marcas asociadas a la activación transcripcional (H3K4Ac y H4Ac) indican que la activación del RP por MPA promueve un entorno represivo de la transcripción río arriba del locus *GATA3*.

A continuación, evaluamos el reclutamiento de la ARN Polimerasa II (Pol II) tanto en el sitio conteniendo el potencial PRE como en la zona del TSS. Sin

embargo, no detectamos diferencias significativas en el reclutamiento de la Pol II a estos sitios en los tiempos analizados (Fig. 9C). Esto indica que los cambios observados en las modificaciones post-traduccionales de histonas no redundan en la disminución del reclutamiento de la Pol II. Una característica ampliamente estudiada de la Pol II son las modificaciones post-traduccionales del dominio carboxilo terminal (CTD, por sus siglas en inglés), las cuales han sido relacionadas con el estado transcripcional de la Pol II. De esta manera, la fosforilación en el residuo serina 5 del CTD (pSer5-Pol II) indica que la Pol II se encuentra transcripcionalmente activa [63]. A fin de evaluar los cambios en el estado de activación de la RNA Pol II, realizamos ensayos de CHIP contra pSer5-Pol II, y analizamos tanto el PRE como el TSS. Observamos que al tratar con MPA 1 h, a pesar de no haber detectado previamente cambios en el reclutamiento de la Pol II, hay una disminución significativa de los niveles de pSer5-Pol II (Fig. 9D). Esto indica que aunque el tratamiento con MPA no afecta el reclutamiento de la Pol II a los sitios estudiados, disminuye la cantidad de pSer5-Pol II, lo cual sugiere que la misma se encuentra pausada en el promotor de *GATA3* al tratar las células con el progestágeno.

Figura 9

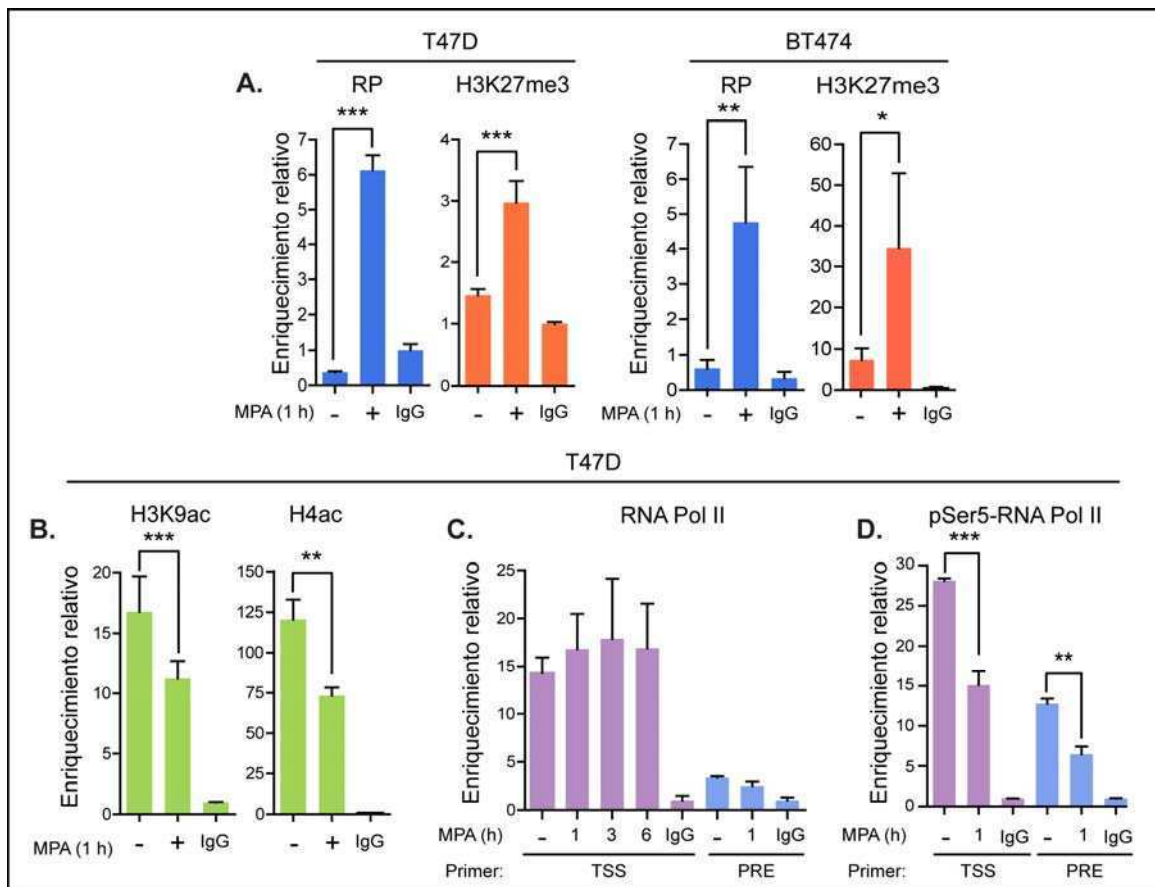


Figura 9. Cambios en el reclutamiento y modificaciones de histonas inducidos por MPA río arriba de GATA3: A) Cromatina de células tratadas con MPA o vehículo fueron inmunoprecipitadas con los anticuerpos detallados. El ADN inmunoprecipitado fue amplificado por q-PCR utilizando primers que flanquean el sitio PRE o el TSS según lo indicado. El valor obtenido para cada muestra fue normalizada a los *inputs* correspondientes. Los datos son expresados como el enriquecimiento relativo al control de isotipo. B) Se muestra el enriquecimiento relativo de las modificaciones post-traduccionales de histonas o de la Pol II como se describe en A). *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$; ANOVA de una vía.

Debido a que la marca epigenética H3K27me3 es catalizada por la metiltransferasa de histonas EZH2, y que se ha reportado previamente una correlación entre los niveles de expresión de EZH2 y los niveles de progesterona en la glándula mamaria normal [43], especulamos que EZH2 podría estar involucrada en el mecanismo de represión transcripcional de

GATA3. Mediante ensayos de ChIP realizados con anticuerpos contra EZH2, demostramos que la misma es reclutada río arriba de *GATA3* al tratar células T47D con MPA (Fig. 10A).

A continuación, decidimos estudiar el requerimiento de la unión del RP al potencial PRE para lograr el reclutamiento de EZH2 río arriba de *GATA3*. Para tal fin, utilizamos la línea celular T47D-Y-C587A, la cual expresa exclusivamente un RP que posee una mutación que genera la sustitución de la cisteína 587 por alanina. Esta modificación interrumpe la formación de un puente disulfuro esencial presente en el dominio de unión al ADN, lo cual resulta en un RP incapaz de unirse directamente al ADN o de interactuar con otros factores de transcripción unidos al ADN [7]. Ensayos de ChIP realizados en dicha línea celular resultan en la falta de reclutamiento de EZH2 al tratar con MPA, en comparación con la línea T47D (Fig. 10A), lo cual demuestra que el reclutamiento de EZH2 mediado por MPA río arriba de *GATA3* depende de la capacidad de unión del RP al ADN.

Con el propósito de confirmar el reclutamiento simultáneo del RP y EZH2, realizamos ensayos de ChIP secuencial. Este ensayo permite detectar el reclutamiento simultáneo de dos factores, ya que sólo en el caso en que ambas proteínas se encuentren reclutadas en el mismo momento al sitio en estudio se obtendrá producto de amplificación de q-PCR (ver sección materiales y métodos). En efecto, ensayos de ChIP secuencial nos permitieron demostrar que el RP y EZH2 se encuentran co-reclutados río arriba de *GATA3* al tratar células T47D con MPA (Fig. 10B). Se muestran los resultados obtenidos para ambos órdenes de inmunoprecipitación.

Para estudiar la posible existencia de una interacción entre el RP y EZH2, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación seguidos de WB. Notablemente, mientras que en presencia del vehículo no detectamos co-inmunoprecipitación del RP con EZH2, observamos una inducción de la interacción entre el RP y EZH2 al tratar con MPA (Fig. 10C), lo cual implica que ambos factores se encuentran interactuando y formando parte de un mismo complejo ante el estímulo con MPA. Dicha interacción podría darse directamente entre el RP y EZH2 o por interacción indirecta mediada por otros componentes, no descritos en el presente trabajo.

Dado que la H3K27me3 está asociada a represión transcripcional mediada por compactación de la cromatina [37], realizamos ensayos de sensibilidad a digestión mediada por DNAsa I. Dicho ensayo permite determinar si la accesibilidad a la cromatina en esta zona es afectada por el tratamiento con MPA en la zona en estudio. Al incubar las células con el progestágeno, se observa una disminución significativa de la sensibilidad a DNAsa I (Fig. 10D), lo cual indica un mayor grado de compactación de la cromatina, generalmente asociado a un estado de menor permisividad transcripcional.

Figura 10

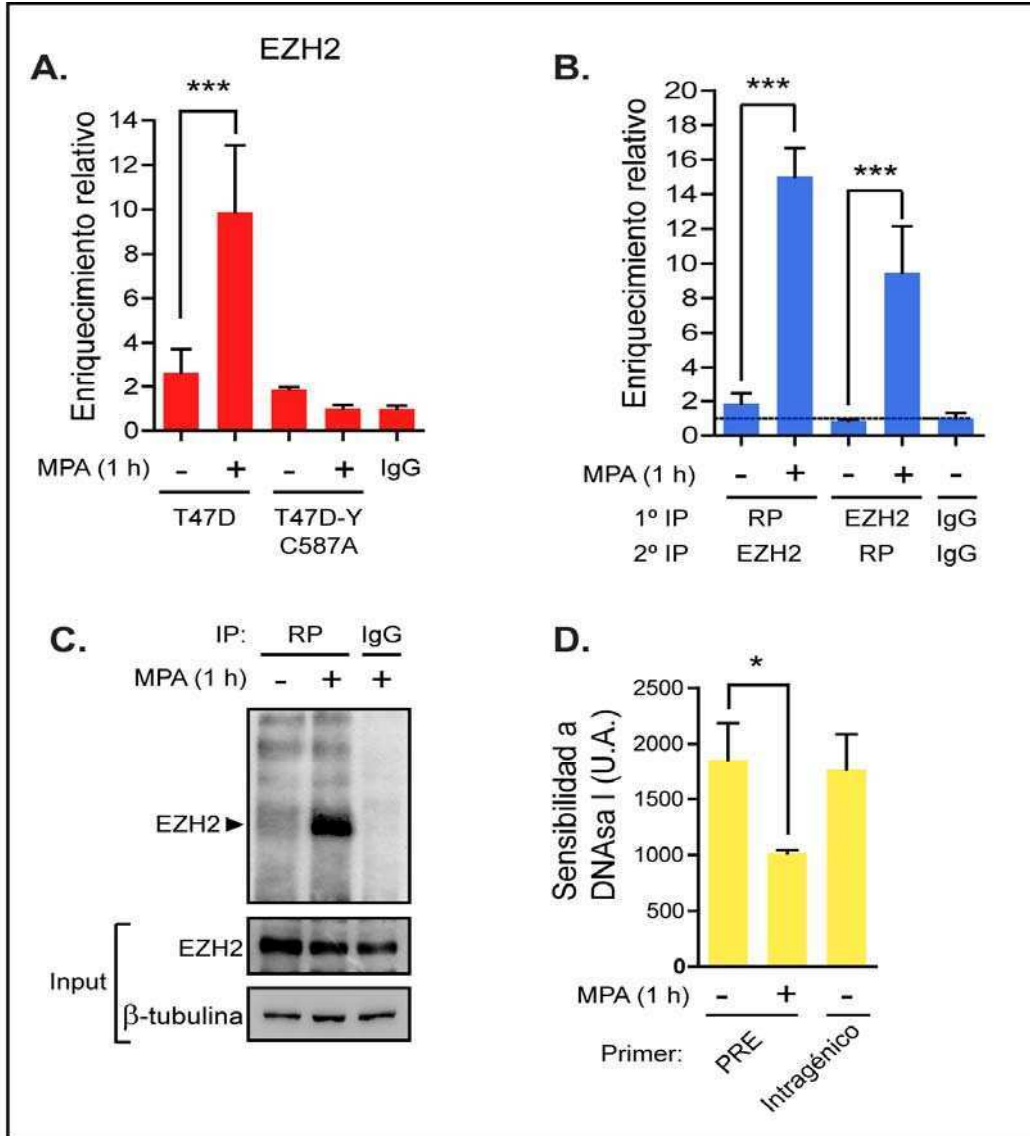


Figura 10. Co-reclutamiento e interacción del RP y EZH2 y compactación de la cromatina:

A) Células T47D o T47D-Y-C587A fueron tratadas con MPA o vehículo y se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, por sus siglas en inglés). El ADN inmunoprecipitado fue amplificado por q-PCR utilizando primers que flanquean el sitio de interés. Cada muestra fue normalizada a los *inputs* correspondientes. Los datos son expresados como el enriquecimiento relativo al control de isotipo. B) Cromatinas de células T47D tratadas con vehículo o con MPA fueron inmunoprecipitadas en primer lugar con un anticuerpo específico contra el RP y luego re-inmunoprecipitadas utilizando un anticuerpo contra EZH2 o un control de isotipo. También se muestra la inmunoprecipitación en el orden inverso. La cuantificación y el análisis mediante q-PCR del ADN inmunoprecipitado fue

realizado como se detalla en A). C) Extractos nucleares de células T47D previamente tratadas con MPA o vehículo (etanol 1:1000) fueron inmunoprecipitados (IP) con un anticuerpo específico para el RP. El inmunoprecipitado fue analizado por WB con los anticuerpos indicados. Como control de especificidad, los extractos nucleares fueron inmunoprecipitados con un control de isotipo. El *input* de los lisados celulares fue analizado en paralelo. D) El ensayo de sensibilidad a la DNAsa I fue realizado como se describe en materiales y métodos. La sensibilidad fue calculada como $2^{(Ct_{cortado} - Ct_{no_cortado})}$ para cada tratamiento. *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$; ANOVA de una vía.

En línea con los resultados anteriores, el tratamiento de células con MPA promueve la disminución de los niveles de expresión del ARNm de GATA3, y dicha regulación es prevenida al pre-incubar las células con RU486, tanto en la línea celular humana T47D (Fig. 11A) como en el modelo murino C4HD (Fig. 11B). A fin de verificar el requerimiento de la capacidad de unión al ADN del RP para la regulación del ARNm de GATA3, evaluamos los cambios en la expresión del mismo en la línea celular T47D-Y-C587A, previamente descrita. Verificamos la alteración de la respuesta transcripcional mediada por el RP en dicha línea en comparación con la línea T47D mediante un ensayo de gen reportero. Para ello utilizamos una construcción conteniendo el promotor del virus del tumor mamario murino (MMTV) clonado río arriba del gen de la luciferasa. El promotor del MMTV contiene PREs [64], y por tal motivo es utilizado para evaluar la activación transcripcional del RP. Observamos que las células T47D-Y-C587A poseen una capacidad significativamente menor (aproximadamente 10 veces) de transactivar el gen reportero en comparación con la línea T47D (Fig. 11C), lo cual verifica la incapacidad de transactivación de la forma mutante.

Una vez verificada la interrupción de la actividad transcripcional mediada por el RP en la línea celular T47D-Y-C587A, observamos que la incubación con el

progestágeno MPA no es capaz de inducir la disminución de los niveles del ARNm de GATA3 en estas células (Fig. 11D). Este resultado es consistente con la falta de reclutamiento de EZH2 río arriba del locus *GATA3* en esta línea celular previamente demostrada (Fig 10A).

Figura 11

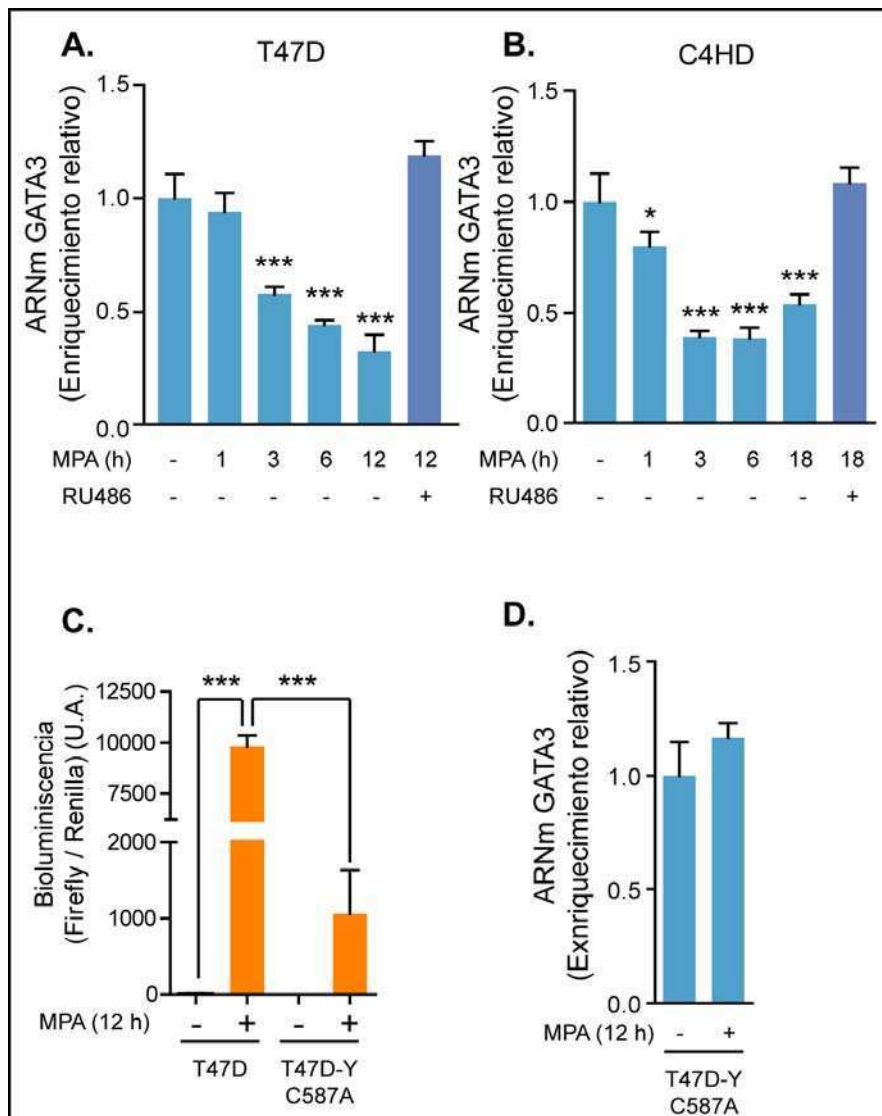


Figura 11. Regulación transcripcional de GATA3 por MPA: A) Células T47D fueron tratadas como se indica en la figura, y los niveles de expresión del ARNm de GATA3 fueron determinados por q-PCR. Los valores obtenidos de la normalización respecto a la expresión de GAPDH se expresan definiendo el control no tratado como 1.0. B) Los niveles de ARNm de GATA3 fueron determinados en células C4HD como se describe en A). C) Células T47D o T47D-Y-C587A fueron transfectadas con un vector conteniendo el promotor MMTV

conteniendo PREs canónicos río arriba del gen de la luciferasa *Firefly*. Como control interno se utilizó un vector conteniendo el gen de la luciferasa *Renilla* bajo un promotor de expresión constitutiva. Las células fueron tratadas o no con MPA por 12 h. La actividad transcripcional se determinó mediante la medición de bioluminiscencia correspondiente a la actividad de *Firefly* relativo a la bioluminiscencia correspondiente a la actividad *Renilla*. D) Células T47D-Y-C587A fueron tratadas con MPA o vehículo (etanol 1:1000) por 12 h y se determinaron los niveles de ARNm de GATA3 como se describe en A). *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$; ANOVA de una vía.

Los resultados presentados demuestran que el efecto de la disminución de GATA3 por MPA se debe, al menos en parte, a la represión transcripcional de su promotor.

En esta sección se demuestra la capacidad del RP de co-reclutar la metiltransferasa de histonas EZH2 río arriba del locus *GATA3*. Además, demostramos que la incubación con MPA promueve el aumento de los niveles de H3K27me3 y la disminución de H3K4Ac y H4Ac, lo que representa una combinación de modificaciones de histonas asociado con represión transcripcional. Estos eventos se encuentran en línea con la inducción de la compactación de la cromatina en la zona estudiada, así como con la disminución de los niveles de ARNm de GATA3 mediada por la activación del RP por MPA. Mediante el uso de la línea mutante T47D-Y-C587A demostramos el requerimiento de la capacidad del RP de unirse al ADN para lograr el reclutamiento de EZH2 río arriba del locus *GATA3* y para lograr la disminución de los niveles de ARNm de GATA3 mediada por el progestágeno MPA.

CAPÍTULO II



REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DE GATA3 POR PROGESTÁGENOS

2.1 - Degradación post-traducciona de GATA3 mediante el proteasoma

26S

Con el fin de continuar con el estudio de la dependencia de la regulación de la expresión de GATA3 por el RP, analizamos la regulación de GATA3 a nivel de su expresión proteica en la línea T47D-Y-C587A. Observamos que a pesar de que dicha línea celular es incapaz de regular la expresión del ARNm de GATA3 en presencia de MPA (Fig. 11D), los niveles totales de GATA3 a nivel de la proteína disminuyen al tratar con el progestágeno (Fig. 12A). Este resultado provee indicios de la existencia de niveles adicionales de regulación de la expresión de GATA3.

Debido a la existencia de reportes previos que indican que la estabilidad post-transcripcional del ARNm de GATA3 puede ser modulada por proteínas de unión a ARN [65], analizamos si el tratamiento con MPA afecta dicho parámetro. Para tal fin, incubamos células T47D con el inhibidor de la transcripción actinomicina D (ActD), y medimos la abundancia del ARNm de GATA3 en ausencia o presencia de MPA. El uso de un inhibidor de la transcripción nos permite evaluar los niveles de ARNm remanentes a distintos tiempos tras la interrupción de la transcripción, como medida de la estabilidad del transcripto. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la estabilidad del ARNm de GATA3 en los tiempos de tratamiento evaluados (Fig. 12B), descartando la posibilidad de una regulación a nivel de la estabilidad del ARNm.

Con el propósito de evaluar otro posible nivel de regulación de la expresión de GATA3, estudiamos la estabilidad de la proteína GATA3 mediante el uso de

cicloheximida (CHX), el cual actúa como inhibidor de la traducción. La inhibición de la traducción con CHX nos permite analizar la estabilidad de la proteína remanente mediante WB, determinando la abundancia relativa respecto a la cantidad inicial de GATA3. En concordancia con reportes previos, observamos el decaimiento de GATA3 a las 6 h de tratamiento con CHX (Fig. 12C) [66]. Sin embargo, también observamos que el tratamiento con MPA disminuye la estabilidad de GATA3 respecto al control (etanol 1:1000) (Fig. 12C, calle 2 vs. calle 4, análisis densitométrico en el panel derecho). Dado que estudios previos han demostrado la participación del proteosoma 26S en la degradación de GATA3 en células del sistema inmune [67], especulamos que dicha vía podría estar involucrada en la disminución de la estabilidad de GATA3 mediada por MPA en células de cáncer de mama. Para determinar el requerimiento de la actividad del proteosoma 26S para la degradación de GATA3 por MPA, tratamos células T47D con CHX en combinación con Bortezomib (Btz), compuesto que actúa como inhibidor farmacológico del proteosoma 26S. El Btz es un dipéptido modificado, el cual contiene ácido bórico en reemplazo del ácido carboxílico en el c-terminal. El átomo de boro interactúa de forma específica con el sitio catalítico del proteosoma 26S, bloqueando su actividad.

La inhibición de la actividad del proteosoma 26S evita la degradación de GATA3 en presencia de MPA y CHX (Fig. 12C, calles 4 y 5 vs. calles 6 y 7), demostrando el requerimiento de la actividad del proteosoma 26S para la degradación post-traducciona l de GATA3.

Figura 12

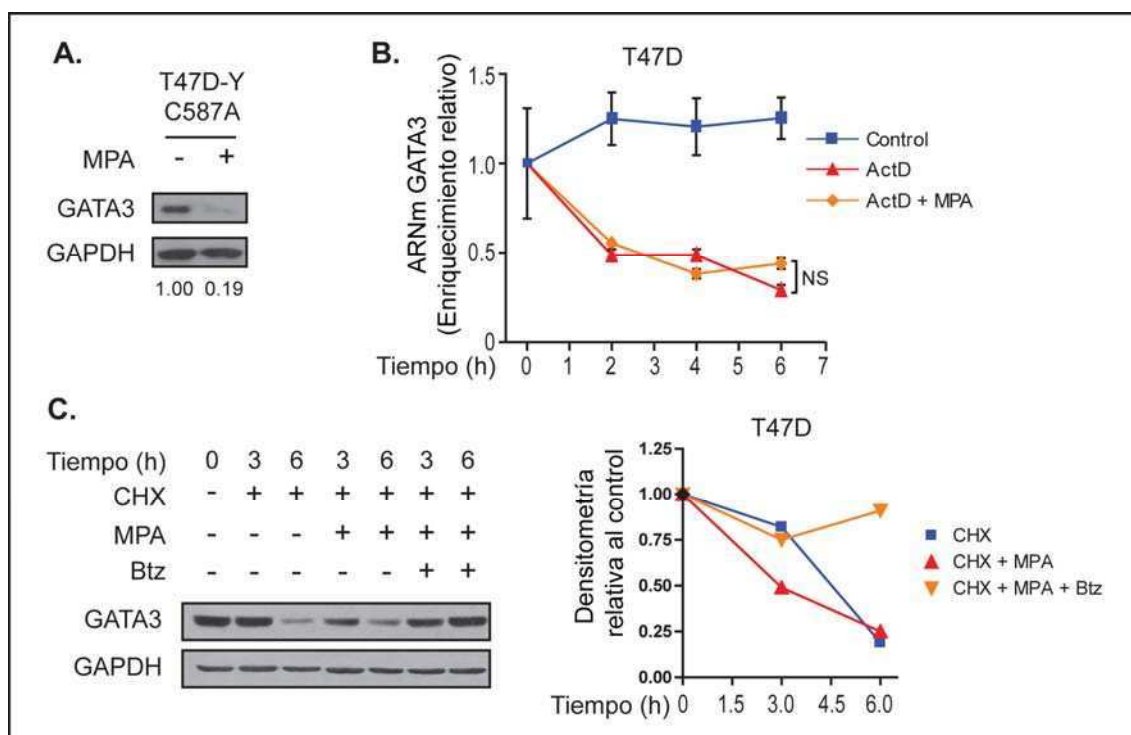


Figura 12. Regulación post-traduccional de GATA3 vía proteosoma 26S: A) Células T47D-Y-C587A fueron tratadas con vehículo o MPA por 18 h, se prepararon lisados celulares y se determinó la expresión de GATA3 por WB, normalizando los valores a GAPDH y expresándolos respecto al control (1.00). B) Células T47D fueron tratadas o no con Actinomicina D (ActD) por los tiempos indicados. Los cambios en la expresión del ARNm de GATA3 relativos al ARNm de GAPDH fueron determinados por q-PCR y expresados respecto al control (1.0). C) Las células fueron tratadas o no con CHX y/o con MPA o Bortezomib (Btz) por los tiempos indicados. Se prepararon lisados celulares y la expresión de GATA3 se determinó por WB como se indica en A) (NS = No significativo).

Dado que la degradación del RP por el proteosoma 26S se encuentra asociada a su activación transcripcional [68], especulamos que la disminución de GATA3 por progestágenos podría evitarse tanto a nivel transcripcional como post-traduccional mediante la inhibición del proteosoma 26S. En efecto, observamos que la inhibición del proteosoma 26S mediante el uso de Btz evita la disminución de los niveles de GATA3 tanto a nivel transcripcional en T47D (Fig. 13A) como post-traduccional en T47D (Fig. 13B) y C4HD (Fig. 13C).

Figura 13

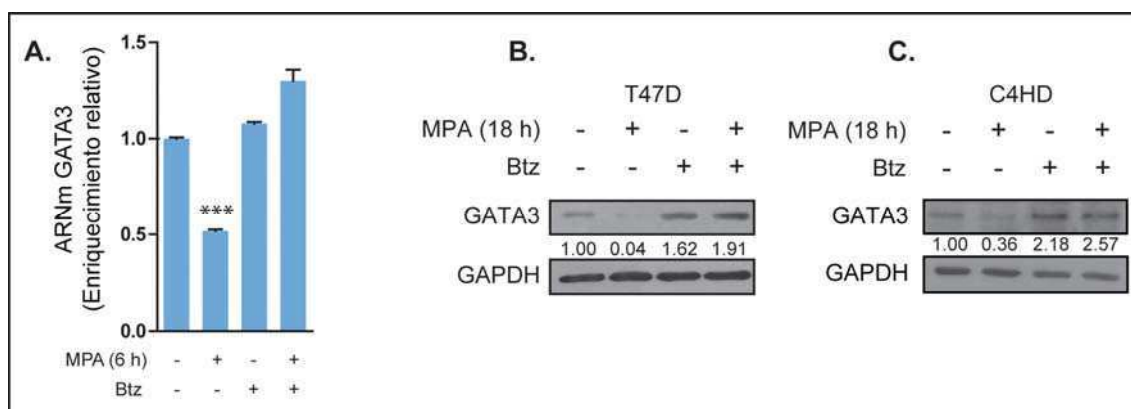


Figura 13. Inhibición de la regulación de GATA3 por Btz: A) Las células fueron pre-tratadas o no con Btz por 30 min y luego co-incubadas con vehículo o MPA según lo indicado. Se determinaron los niveles del ARNm de GATA3 por q-PCR y se expresaron respecto al control (1.0). *** $p < 0.001$; ANOVA de una vía. B) Células T47D fueron tratadas con vehículo o MPA o Btz como se indica, se prepararon lisados celulares y la expresión de GATA3 se determinó como se describe en A). C). Células C4HD fueron tratadas con vehículo o MPA o Btz como se indica, se prepararon lisados celulares y la expresión de GATA3 se determinó como se describe en A).

Los resultados presentados en esta sección demuestran la existencia de un nivel de regulación post-traducciona de GATA3 mediado por progestágenos, y que la disminución de los niveles de GATA3 tanto a nivel transcripcional como post-traducciona puede ser evitado mediante la inhibición de la actividad del proteosoma 26S.

2.2 - Fosforilación de GATA3 inducida por MPA a través de la activación de la Proteína Kinasa A.

La actividad de diversos factores de transcripción puede ser modulada a través de modificaciones post-traduccionales. Respecto al factor de transcripción GATA3, el residuo serina 308 se encuentra en una secuencia consenso de

fosforilación por Proteína Kinasa A dependiente de AMP cíclico (PKA), y ha sido demostrado que es blanco de fosforilación por PKA *in vitro* [69]. A continuación, estudiamos si el tratamiento con MPA induce el aumento de pSer308-GATA3.

En primer lugar, exploramos la activación de la vía de PKA mediante la incubación de células T47D en presencia de MPA. Análisis por microscopía confocal revelaron un incremento en los niveles de sustratos de PKA fosforilados al tratar con MPA (Fig. 14A), lo cual indica que el progestágeno es capaz de activar dicha vía en el sistema en estudio. Para verificar la especificidad de activación de esta vía, utilizamos el inhibidor miristoilado de PKA (PKI). El diseño de este inhibidor se basa en un péptido endógeno que posee propiedades inhibitorias de PKA. El mismo actúa mediante la unión a la subunidad catalítica de PKA, una vez que la misma se disocia de la subunidad regulatoria. Dicha unión impide la fosforilación de los sustratos de PKA.

Efectivamente, la pre-incubación con PKI previene el aumento de sustratos fosforilados por PKA inducido por MPA (Fig. 14A), demostrando la efectividad del inhibidor y la especificidad del anticuerpo utilizado para determinar la fosforilación de los sustratos de PKA.

A fin de verificar la especificidad del anticuerpo a ser utilizado para la detección de pSer308-GATA3 mediante inmunofluorescencia, procedimos a silenciar la expresión de GATA3 y realizamos la detección simultánea de GATA3 total y de pSer308-GATA3 en células T47D. Observamos en primer lugar la co-localización de ambas señales (Fig. 14B), lo cual provee una evidencia parcial de la especificidad de detección de pSer308-GATA3. Además, observamos la pérdida de señal de GATA3 total o pSer308-GATA3 en aquellas células

tratadas con el siRNA específico contra GATA3 (Fig. 14B), descartando la posible detección de blancos inespecíficos. Mediante este ensayo se valida el uso del anticuerpo en cuestión para la detección de pSer308-GATA3 mediante inmunofluorescencia.

Figura 14

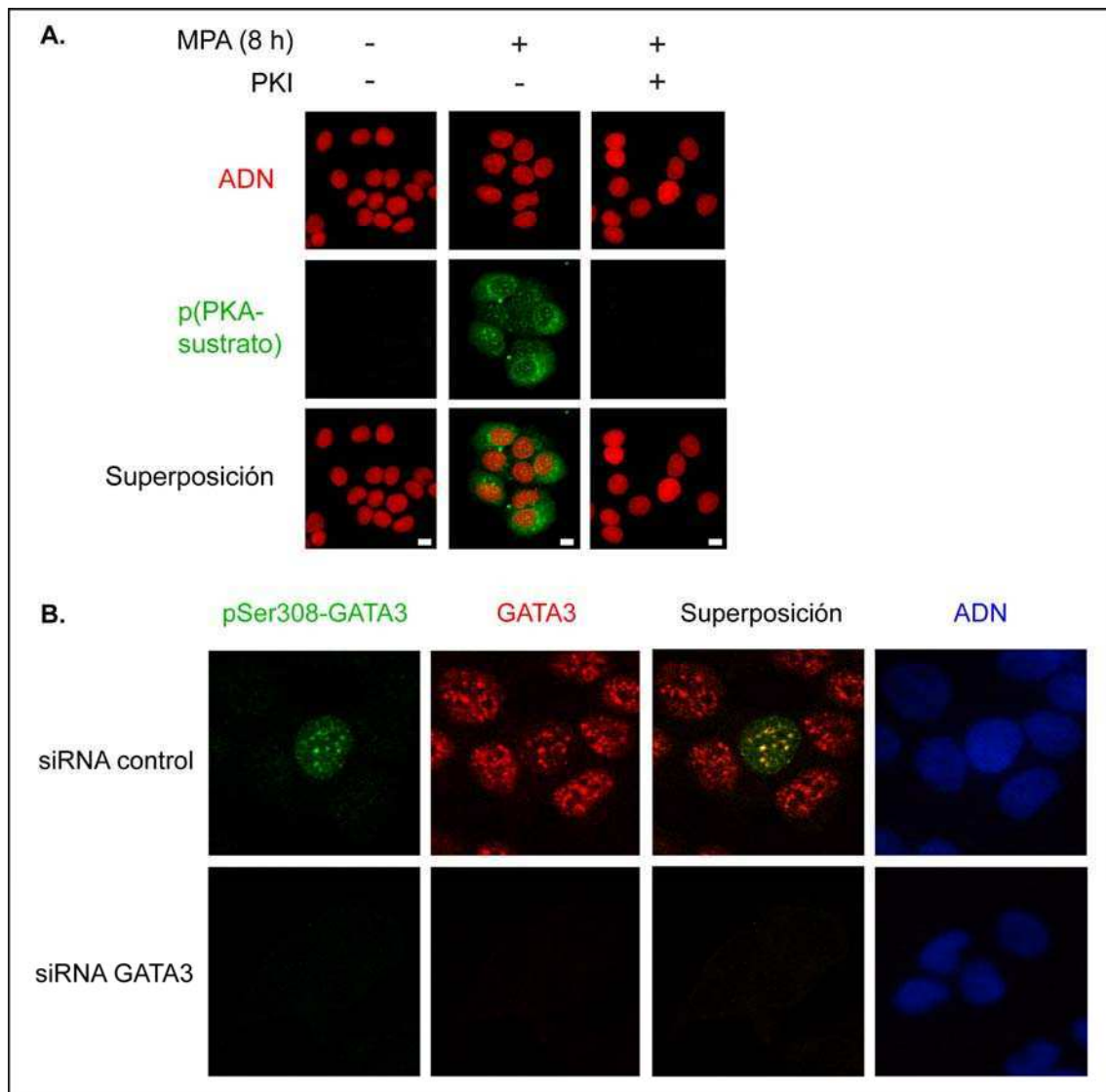


Figura 14. Actividad de PKA y especificidad de detección de pSer308-GATA3: A) Células T47D fueron tratadas con vehículo o MPA y con PKI por 8 h, luego fueron fijadas e incubadas con los anticuerpos indicados. Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio y se realizó un análisis por microscopía confocal. Escala = 10 μ m. B) Células T47D fueron transfectadas con siRNA control o siRNA dirigido contra GATA3 según lo indicado. Las células fueron fijadas

e incubadas con los anticuerpos indicados. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y se realizó un análisis por microscopía confocal.

A continuación, analizamos los niveles de pSer308-GATA3 mediante microscopía confocal en células T47D. Observamos un incremento significativo en los niveles de pSer308-GATA3 ante el tratamiento con MPA (Fig. 15A). Por otra parte, la pre-incubación con PKI previno el aumento de pSer308-GATA3 de forma significativa (Fig. 15A, cuantificación en Fig. 15B), indicando el requerimiento de la activación de PKA para lograr el aumento de pSer308-GATA3.

Para demostrar que la fosforilación de GATA3 en serina 308 es mediada por PKA, realizamos un ensayo de fosforilación *in vitro*. En primer lugar, inmunoprecipitamos GATA3 de células T47D en situación control, el cual fue utilizado como sustrato de fosforilación. Por otro lado, realizamos la inmunoprecipitación de la subunidad catalítica de PKA (PKA-C) de células T47D tratadas o no con MPA por 8 h y en ausencia o presencia de PKI. Se utilizó como control de especificidad de la inmunoprecipitación un control de isotipo. Observamos la ausencia de pSer308-GATA3 al incubar GATA3 con PKA-C proveniente de células en situación control, mientras que la incubación con PKA-C proveniente de células tratadas con MPA por 8 h es capaz de inducir el aumento de pSer308-GATA3 (Fig. 15C). Notablemente, la incubación de PKA-C proveniente de células tratadas con MPA en presencia del PKI es incapaz de promover la fosforilación de GATA3 en serina 308 (Fig. 15C), demostrando el requerimiento de la actividad de PKA para lograr el aumento de los niveles de pSer308-GATA3 inducido por el progestágeno.

Figura 15

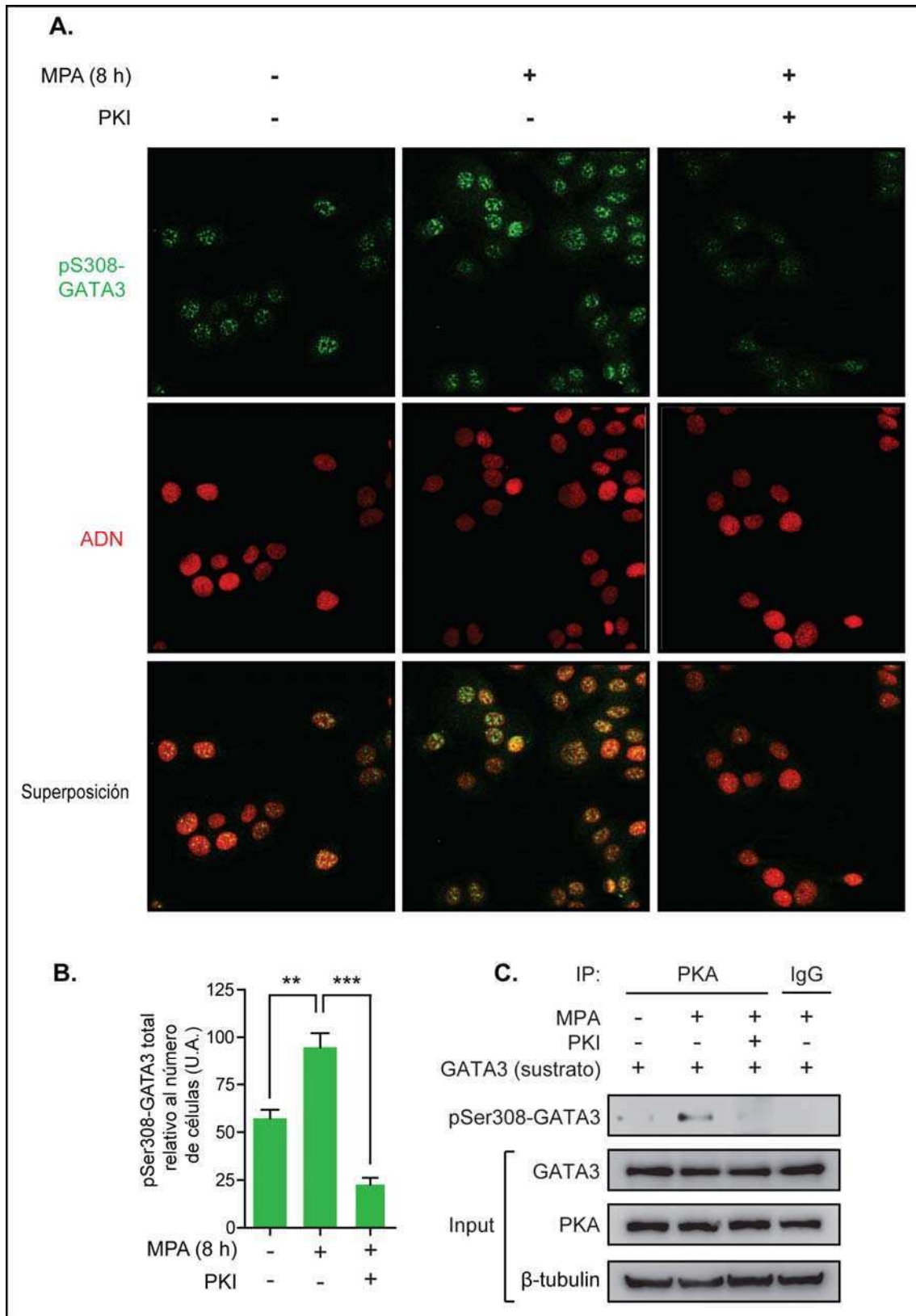


Figura 15. Fosforilación de GATA3 en serina 308 inducida por MPA: A) Células T47D fueron tratadas con vehículo o MPA y con PKI por 8 h, luego fueron fijadas e incubadas con los anticuerpos indicados. Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio y se realizó un análisis por microscopía confocal. Escala = 10 μ m. B) Cuantificación de la fluorescencia

correspondiente a pSer308-GATA3 para los tratamientos realizados en A). La fluorescencia total fue relativizada al número de células por campo, para un mínimo de 150 células por tratamiento (N = 6); *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; ANOVA de una vía. C) Ensayo de fosforilación *in vitro*. Se inmunoprecipitó GATA3 total a partir de extractos nucleares de células creciendo en situación control (medio DMEM sin aditivos) para utilizar como sustrato de fosforilación. En paralelo, se inmunoprecipitó PKA-C de extractos nucleares de células tratadas según lo indicado en la figura. Ambos inmunoprecipitados fueron incubados en presencia de ATP. El producto de reacción fue resuelto mediante SDS-PAGE y se determinaron los niveles de pSer308-GATA3 mediante WB. Los *inputs* de la reacción fueron corridos en paralelo.

Una observación proveniente de los ensayos de microscopía confocal muestra que aquellas células que presentan la mayor intensidad para la marcación de pSer308-GATA3 se encuentran en estadios de progresión del ciclo celular determinados, como se evidencia cualitativamente por la observación de la tinción del ADN con ioduro de propidio (Fig. 16A). Para confirmar si la variación de los niveles de pSer308-GATA3 se encuentra asociada a una fase determinada del ciclo celular, realizamos ensayos de citometría de flujo. En los mismos observamos un incremento de la señal de pSer308-GATA3 en relación con el contenido de ADN, medido por tinción con ioduro de propidio (Fig. 16B). En particular, detectamos un incremento de pSer308-GATA3 en aquellas células en fase S o G2 de ciclo celular. Nótese la presencia de una población minoritaria con alto contenido de pSer308-GATA3 dentro de la subpoblación G2 (Fig. 16B, indicado con una punta de flecha). A fin de cuantificar la diferencia en los niveles de pSer308-GATA3 en las distintas poblaciones, tomamos como medida la intensidad de fluorescencia media (IFM). Detectamos un aumento significativo de pSer308-GATA3 en aquellas células que se encuentran en fase S o G2 en comparación con aquellas que se encuentran en G1 (Fig. 16C). Este resultado sugiere que la fosforilación de GATA3 podría ser un paso necesario para la progresión del ciclo celular inducida por MPA.

Figura 16

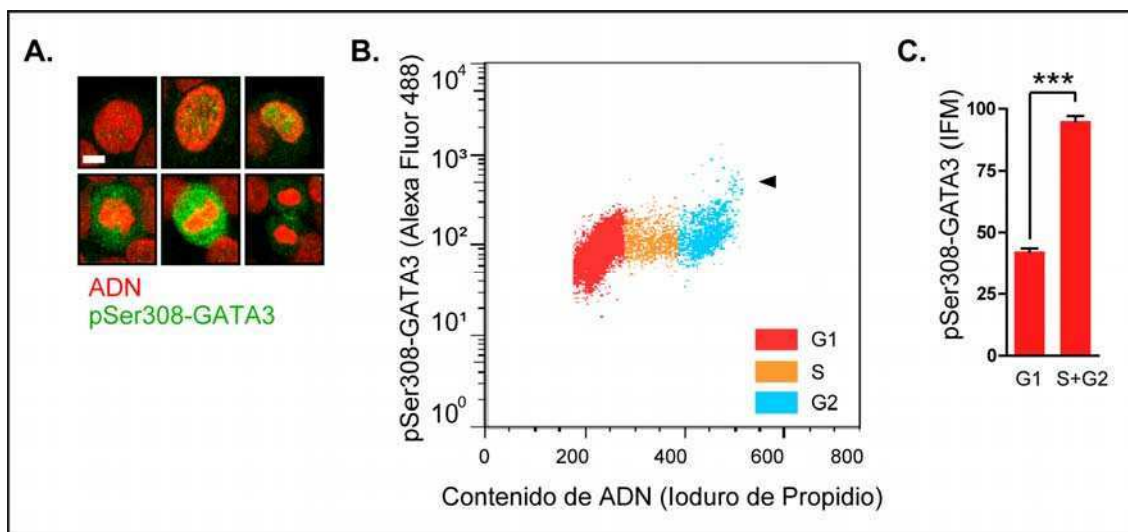


Figura 16. Aumento de la fosforilación de GATA3 en serina 308 a lo largo del ciclo celular: A) Imágenes de microscopía confocal para pSer308-GATA3 de células en diferentes etapas del ciclo celular determinadas por ioduro de propidio (escala = 10 μ m). B) Resultado representativo de los niveles de pSer308-GATA3 respecto al contenido de ADN, determinado mediante el contenido de ioduro de propidio. Células T47D fueron tratadas con MPA por 8 h, tripsinizadas y fijadas para realizar la tinción intracitoplasmática según lo indicado en la sección materiales y métodos. La fluorescencia para cada parámetro fue determinada mediante citometría de flujo. C) Se representa la intensidad de fluorescencia media (IFM) de un análisis por citometría de flujo para pSer308-GATA3 (N = 3; *** p < 0.001; T de Student). Las diferentes etapas del ciclo celular fueron determinadas por el contenido de ADN mediante ioduro de propidio.

2.3 - Fosforilación de GATA3 en serina 308 y su efecto sobre la estabilidad de la proteína.

Dados los efectos de la activación del RP por progestágenos sobre los niveles de expresión de GATA3 y de pSer308-GATA3, exploramos la posibilidad de que dicha modificación post-traducciona estuviera vinculada con la regulación de la estabilidad de la proteína. Para ello, pre-tratamos células T47D con H89, un inhibidor farmacológico de PKA, e incubamos las mismas con CHX en ausencia o en presencia de MPA. Observamos que la inhibición de PKA en

presencia de MPA restituye la estabilidad de GATA3 a niveles similares que aquellas tratadas exclusivamente con CHX (Fig. 17A, valores densitométricos mostrados en el panel derecho). Este resultado indica que la activación de la vía de PKA es necesaria para la disminución de la estabilidad de GATA3 mediada por MPA.

Para determinar la importancia de pSer308-GATA3 en la estabilidad de la proteína, realizamos un ensayo de mutagénesis dirigida, utilizando como molde un vector que expresa la forma salvaje de GATA3 fusionada a GFP (GFP-GATA3-WT) bajo el control de un promotor constitutivo. A partir del mismo se generó un vector conteniendo una mutación que resulta en la sustitución del residuo serina 308 por alanina (GFP-GATA3-S308A), un aminoácido estructuralmente similar a la serina pero que carece del grupo hidroxilo, por lo que no puede ser fosforilado. A continuación transfectamos células T47D con el vector GFP-GATA3-WT o con GFP-GATA3-S308A, y medimos la estabilidad de las dos variantes en ausencia o presencia de CHX y/o de MPA. Observamos un incremento en la estabilidad de la variante mutante respecto a la salvaje, incluso en presencia de MPA (Fig. 17B, valores densitométricos mostrados en el panel derecho). Este experimento demuestra el requerimiento de la fosforilación de GATA3 en serina 308 para la disminución de la estabilidad de GATA3 mediada por MPA.

Notablemente, cuando realizamos la transfección de dichos vectores en ausencia de CHX, el tratamiento con MPA disminuye la expresión tanto de GATA3 endógeno como de GFP-GATA3-WT, mientras que no es capaz de reducir los niveles de GFP-GATA3-S308A en igual medida (Fig. 17C). Dado que los vectores utilizados poseen promotores de expresión constitutiva, este

experimento es independiente de la regulación transcripcional asociada al promotor endógeno, y por lo tanto confirma la existencia de una regulación a nivel post-traduccional inducida por MPA. Por otro lado, demuestra el requerimiento de la fosforilación de GATA3 en serina 308 para lograr la degradación post-traduccional de la proteína.

Figura 17

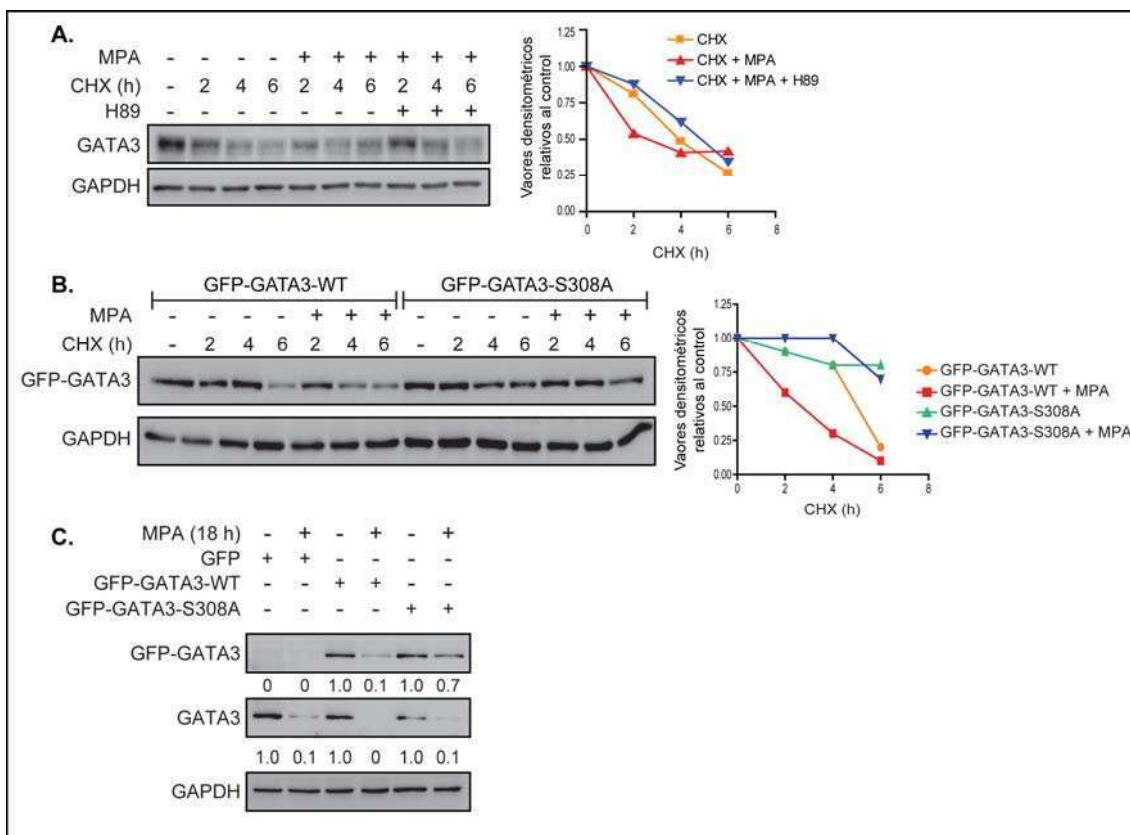


Figura 17. Efecto de la fosforilación de GATA3 en serina 308 sobre la estabilidad del factor: A) Células fueron tratadas con CHX y/o MPA o H89 por el tiempo indicado. Se realizaron lisados celulares y los niveles de GATA3 fueron determinados por WB. Los valores de GATA3 relativos a GAPDH definiendo el control como 1.0 se muestran en el panel derecho. B) Células T47D fueron transfectadas con los vectores indicados por 48 h, hambreadas por 24 h y tratadas según lo indicado. La expresión de las proteínas detalladas se determinó mediante WB. El análisis densitométrico fue realizado como en A y se muestra en el panel derecho. C) Células T47D fueron transfectadas con los vectores indicados por 48 h, hambreadas por 24 h y tratadas con vehículo o MPA por el tiempo indicado. La expresión de las distintas proteínas fue determinada por WB. El análisis densitométrico fue realizado como en A).

Los resultados presentados en esta sección demuestran en primer lugar la activación de PKA mediante el tratamiento de células de cáncer de mama con progestágenos. En segundo lugar, proveen una relación causal entre la fosforilación de GATA3 mediada por PKA y la regulación de los niveles de la proteína a través de la modulación de la estabilidad de la misma por la activación del RP.

CAPÍTULO III



PARTICIPACIÓN DE GATA3 EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y EL CRECIMIENTO TUMORAL INDUCIDOS POR PROGESTÁGENOS

3.1 - Importancia de la regulación de GATA3 en la proliferación celular inducida por MPA

La estimulación de la proliferación celular tanto *in vitro* como *in vivo* por progestágenos en células de cáncer de mama ha sido previamente descrita tanto por nuestro laboratorio como por otros grupos de investigación [70-73]. Dados los resultados obtenidos que muestran el aumento de pSer308-GATA3 en etapas específicas de la división celular (Fig. 16A, Fig. 16B y Fig.16C) y que el impedimento de dicha modificación previene la disminución de los niveles de GATA3 por MPA (Fig. 17C), investigamos la existencia de una asociación entre la disminución de los niveles de GATA3 y la estimulación de la proliferación celular inducida por MPA.

A fin de determinar el efecto de GATA3 sobre la proliferación inducida por MPA, transfectamos células T47D con distintas cantidades (25 o 50 ng) de los vectores de expresión GFP-GATA3-WT, GFP-GATA3-S308A o el correspondiente vector control (GFP), y luego tratamos las células transfectadas con MPA o vehículo (etanol 1:1000). Realizamos ensayos de incorporación de [³H]timidina al ADN como medida de la proliferación celular.

Notablemente, no se observaron efectos sobre la inducción de la proliferación por MPA al transfectar células T47D con 25 ng de GFP-GATA3-WT (Fig. 18A). Sin embargo, la transfección de la forma mutante GFP-GATA3-S308A impide la inducción de la proliferación celular mediada por progestágenos (Fig. 18A). Este resultado podría estar relacionado con el incremento previamente demostrado en la estabilidad de la forma mutante respecto a la salvaje, incluso en presencia del progestágeno (Fig. 17C). A fin de determinar si la forma

salvaje de GATA3 también es capaz de prevenir la proliferación celular inducida por MPA, transfectamos 50 ng de los vectores correspondientes. Observamos que tanto la transfección de GFP-GATA3-WT como de GFP-GATA3-S308A impide la proliferación inducida por MPA en la línea T47D (Fig. 18B) en estas condiciones. Particularmente, la transfección de la mutante GFP-GATA3-S308A resultó en una inhibición significativamente mayor de la proliferación respecto a la forma salvaje GFP-GATA3-WT, lo cual es coherente con los resultados previos que demuestran una mayor estabilidad de la forma mutante en presencia del progestágeno y con un rol anti-proliferativo de GATA3 en células de cáncer de mama.

Por otro lado, la transfección de GFP-GATA3-WT o GFP-GATA3-S308A en células BT474 o C4HD tuvo efectos similares. Tanto la expresión de la forma salvaje como la mutante previnieron la proliferación inducida por MPA (Fig. 18C y 18D respectivamente). Sin embargo, a pesar de observarse una tendencia de la forma mutante a reprimir en mayor medida la proliferación en células BT474 tratadas con MPA, dicha tendencia no alcanzó a ser estadísticamente significativa (Fig. 18C).

Estos resultados implican que la disminución de GATA3 es necesaria para la proliferación inducida por MPA en las células de cáncer de mama T47D, BT474 y C4HD.

Figura 18

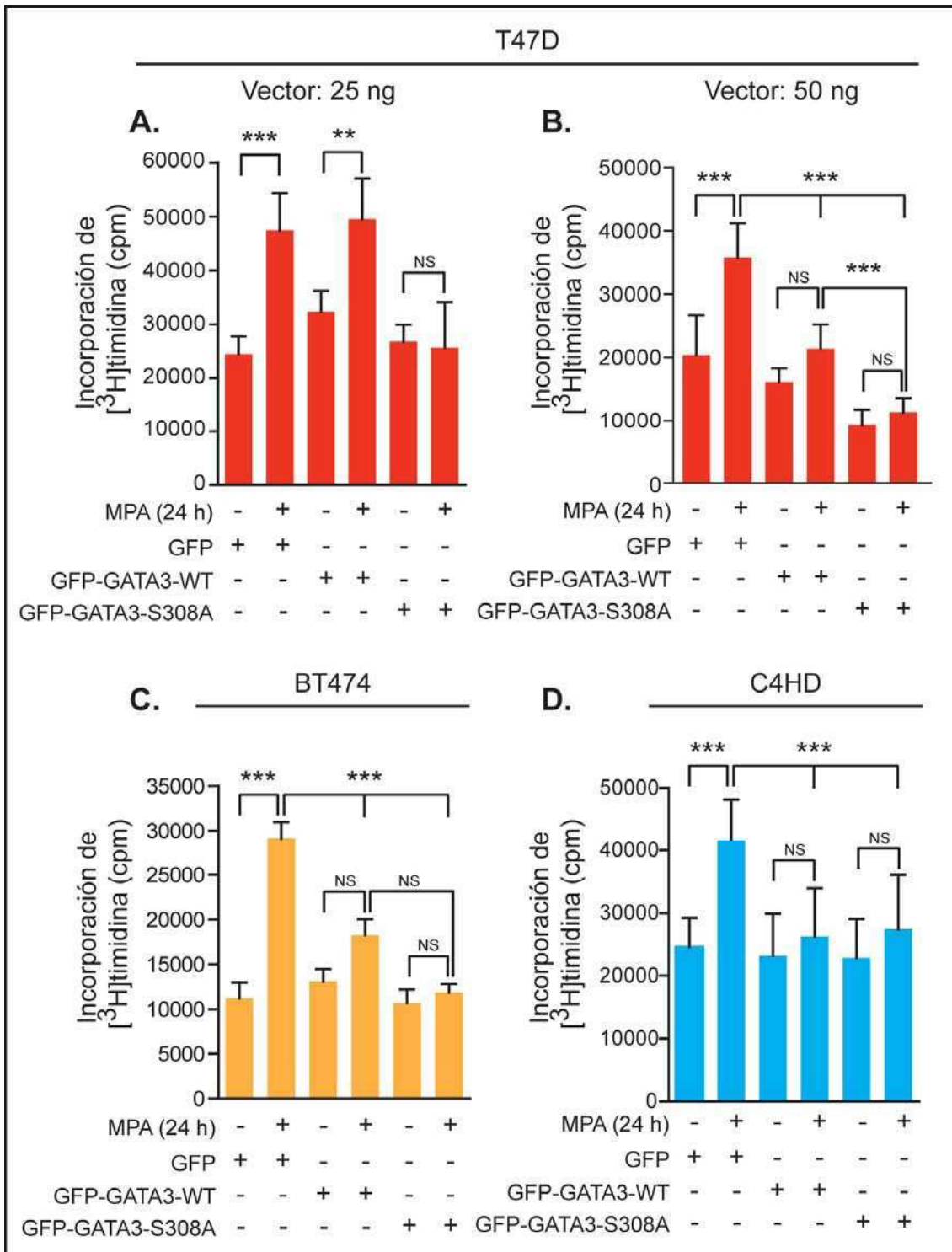


Figura 18. Requerimiento de la regulación de GATA3 para la proliferación inducida por MPA: Las células fueron transfectadas con las cantidades indicadas de los vectores correspondientes por 48 h, y se determinó la proliferación celular inducida por MPA mediante incorporación de $[^3\text{H}]$ timidina según lo indicado en la sección de materiales y métodos, para la línea celular T47D (A y B), BT474 (C) o C4HD (D). (***) $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; NS = No significativo; ANOVA de una vía seguido de Test de Tukey).

Debido a la existencia de reportes previos que indican que la expresión de GATA3 es requerida para la expresión de ciclina D1, un oncogén ampliamente estudiado en cáncer de mama e inducible por MPA [74], estudiamos los efectos de la disminución de los niveles de GATA3 mediante siRNA sobre la proliferación inducida por MPA. Efectivamente, observamos que las células transfectadas con el siRNA específico contra GATA3 poseen menores niveles de expresión de ciclina D1 (Fig. 19A). Además, el bloqueo de la expresión de GATA3 mediante siRNA inhibe tanto la proliferación basal como la inducida por MPA en células T47D (Fig. 19B). Estos resultados aparentemente contradictorios con las observaciones anteriores sugieren una participación compleja de GATA3 en la regulación del ciclo celular, ya que indican que la expresión de GATA3 es necesaria para la expresión de ciclina D1, pero que los niveles de GATA3 deben disminuir para permitir la proliferación inducida por MPA.

Figura 19

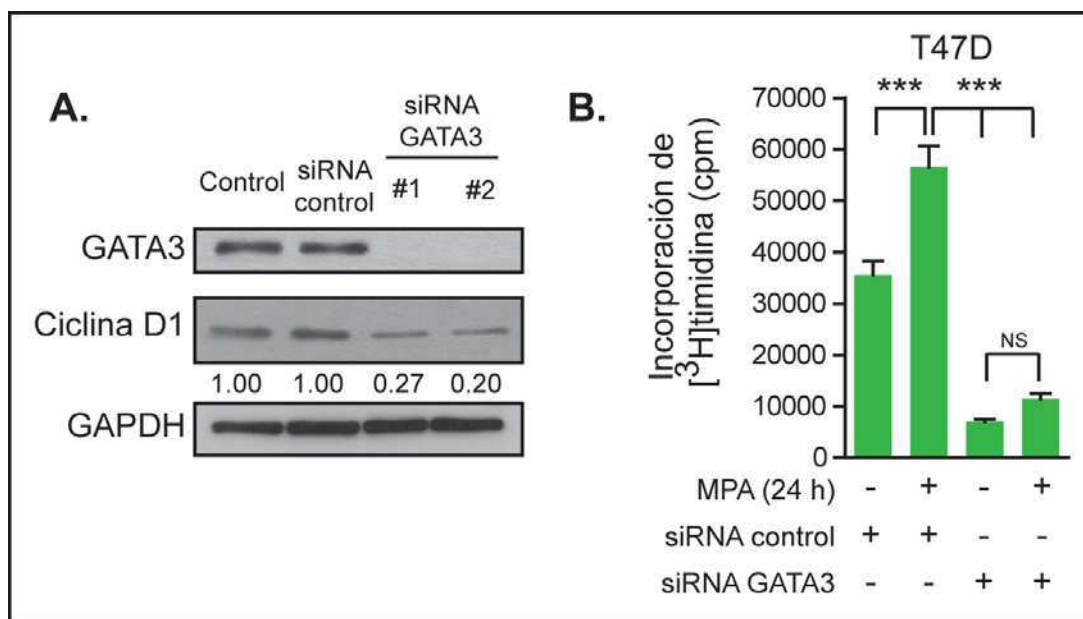


Figura 19. Requerimiento de la expresión de GATA3 para la expresión de ciclina D1 y para la proliferación celular: A) Células T47D fueron transfectadas con siRNA control o un siRNA específico para el silenciamiento de GATA3 por 48 h. Se realizaron extractos proteicos de los distintos tratamientos, y se analizó la expresión de las proteínas indicadas mediante WB. Se muestran los valores densitométricos obtenidos relativos a GAPDH, determinando el control como 1.0. B) Células T47D fueron transfectadas con los siRNAs detallados en la figura, y tratadas con vehículo (etanol 1:1000) o MPA según lo indicado. Se determinó la proliferación mediante incorporación de [³H]timidina como se detalla en la sección de materiales y métodos. (***) $p < 0.001$; ANOVA de una vía seguido de Test de Tukey).

A fin de describir en mayor profundidad el mecanismo molecular involucrado en la represión por parte de GATA3 de la proliferación inducida por MPA en células de cáncer de mama, recurrimos al análisis *in silico*. Mediante el estudio de bases de datos públicas de microarreglos de expresión, observamos que en la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, la cual es además negativa para la expresión de GATA3, la ciclina A2 es el único miembro de la familia de las ciclinas cuya expresión se encuentra significativamente reducida al reconstituir la expresión de GATA3 mediante la transfección de un vector de expresión de GATA3 salvaje [57] (Fig. 20). Estos estudios sugieren una regulación por parte de GATA3 de la expresión de la ciclina A2, ya sea de forma directa mediante unión a zonas regulatorias en el ADN o indirecta a través de la regulación de otros factores.

Figura 20

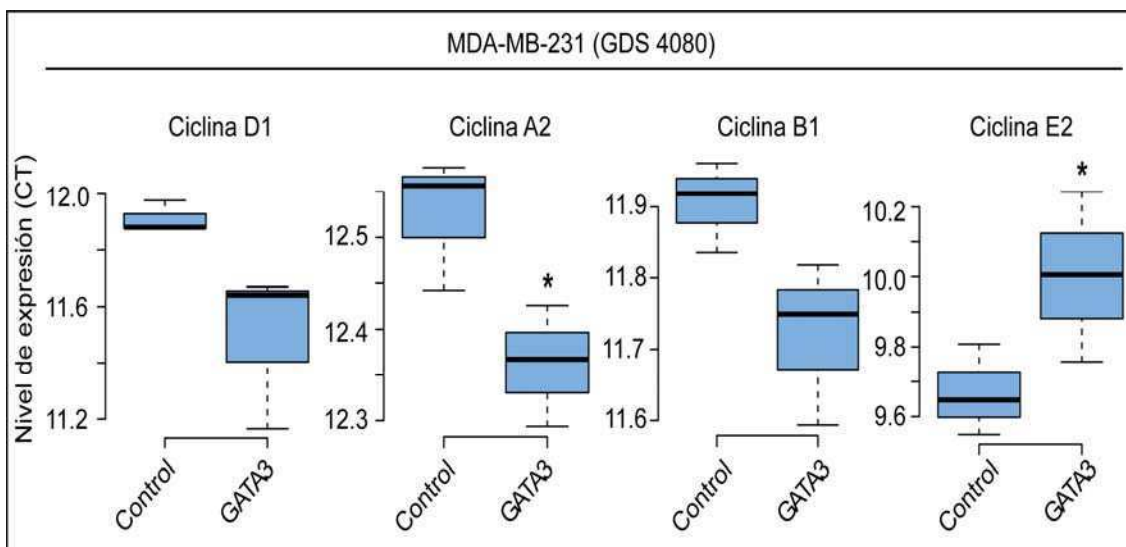


Figura 14. Regulación de los niveles de las distintas ciclinas por la expresión de GATA3 en células triple negativo: Datos obtenidos de la base de datos pública de expresión Gene Expression Omnibus (GEO). Los valores de expresión para cada uno de los ARNm de interés se obtuvieron del set de datos GEO GDS 4080, expresados como cuentas transcripcionales (CT). Los mismos fueron graficados para ilustrar las diferencias en la expresión al transfectar las células MDA-MB-231 con un vector de expresión de GATA3 (N = 3; * p < 0.05, T de Student).

En línea con el estudio anterior, verificamos que la sobreexpresión de GATA3 en la línea MDA-MB-231 produjo una disminución en la expresión de ciclina A2 (Fig. 21A) y una reducción significativa de la proliferación celular, medida por incorporación de [³H]timidina en condiciones de crecimiento en medio rico (Fig. 21B).

A fin de analizar la regulación de la expresión de ciclina A2 en nuestro modelo de estudio, como primera aproximación tratamos células T47D con MPA durante distintos tiempos y medimos la expresión de ciclina A2 mediante ensayos de WB. Al tratar las células T47D con MPA, detectamos un incremento de la expresión de ciclina A2 a las 12 y 18 h de tratamiento (Fig. 21C). Para analizar la dependencia entre la inducción de ciclina A2 por MPA y la reducción

de la expresión de GATA3, transfectamos células T47D con GFP-GATA3-WT, GFP-GATA3-S308A o el vector control GFP y luego tratamos las mismas con vehículo o MPA por 18 h, tiempo al cual se observaron previamente tanto la inducción de la expresión de ciclina A2 como la reducción de los niveles de GATA3. La expresión tanto de GFP-GATA3-WT como de GFP-GATA3-S308A impide el aumento en la expresión de ciclina A2 inducido por el progestágeno (Fig. 21D). Notablemente, el impedimento de la inducción de la expresión de ciclina A2 se da incluso al transfectar con el vector GFP-GATA3-WT, a pesar de que al tiempo de la medición ambas formas, tanto GATA3 endógeno como el transfectado, se encuentran en bajos niveles. Este fenómeno posee dos posibles explicaciones: el aumento de la expresión de ciclina A2 no se observa debido a que GATA3 regularía dicho proceso de manera indirecta, o el exceso de GATA3 a tiempos previos a la detección prevendría el aumento de la ciclina A2 en el tiempo medido. De esta manera, la disminución de la expresión de GATA3 es necesaria para el aumento de la expresión de la ciclina A2 y la progresión del ciclo celular.

Figura 21

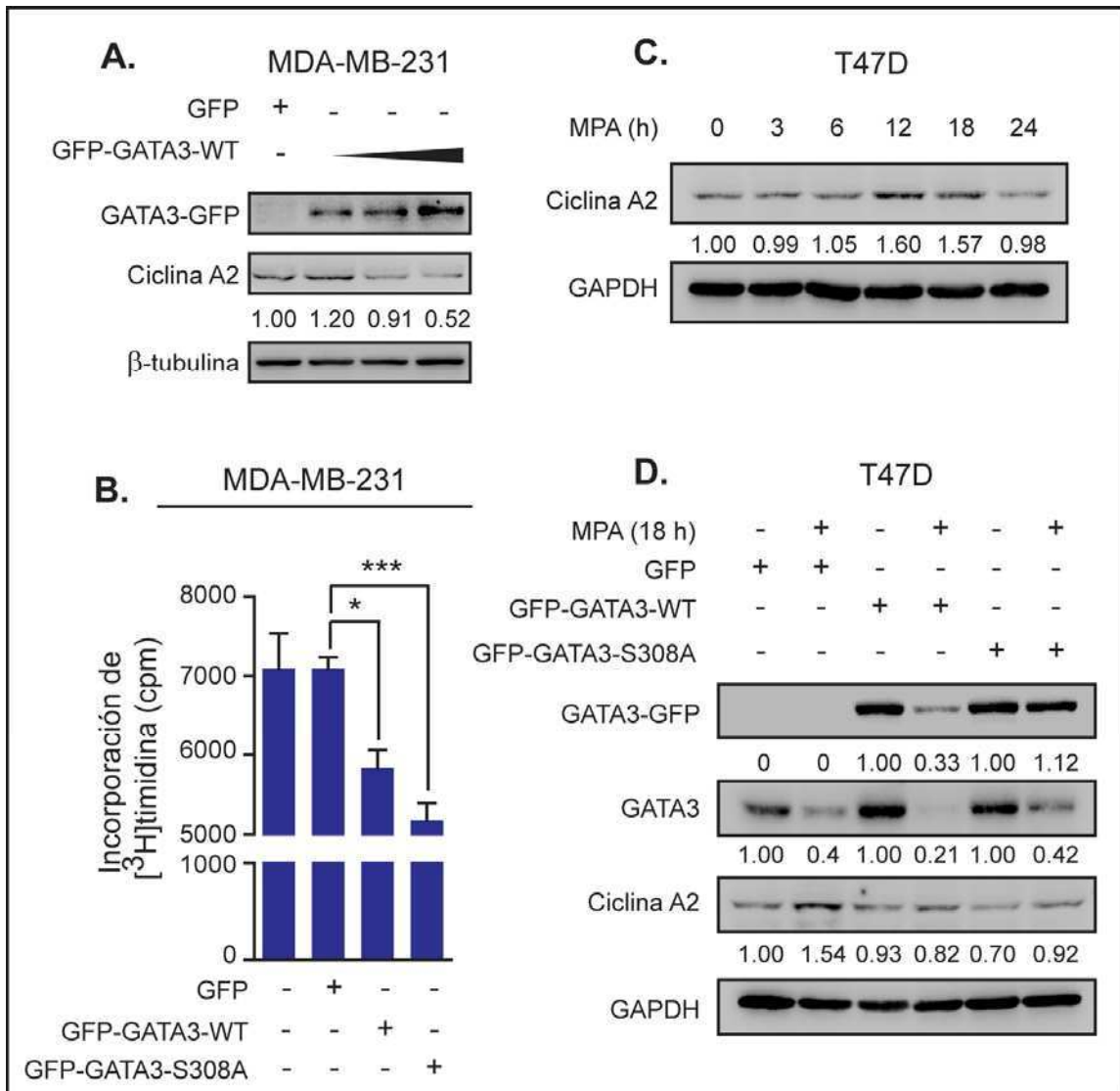


Figura 21. Regulación de ciclina A2 por sobre-expresión de GATA3: A) Células MDA-MB-231 fueron transfectadas con cantidades crecientes del vector de expresión GFP-GATA3-WT. Se determinó mediante WB la expresión de GATA3, ciclina A2 y β -tubulina como control de carga. Se muestran los valores densitométricos para la expresión de ciclina A2 relativo a GAPDH, asignando el valor de 1.0 para el vector GFP control. B) Células MDA-MB-231 fueron transfectadas con los vectores indicados por 48 h y se determinó la proliferación celular en medio rico (DMEM 10%) como se detalla en materiales y métodos (** $p < 0.001$; * $p < 0.05$; ANOVA de una vía seguido de Test de Tukey). C) Células T47D fueron tratadas con MPA por los tiempos indicados, y se determinó la expresión de las proteínas indicadas mediante WB. Los valores de densitometría se obtuvieron mediante la normalización de los valores de ciclina A2 respecto a GAPDH y determinando el valor del control como 1.00. D) Células T47D fueron transfectadas con los vectores indicados por 48 h, y se determinó la expresión de las proteínas indicadas mediante WB como se describe en C).

Los resultados presentados en esta sección resaltan el requerimiento de la disminución de los niveles de GATA3 para permitir la progresión del ciclo celular inducido por el progestágeno MPA. Este fenómeno, sumado a la necesidad de la expresión de GATA3 para la expresión de ciclina D1 brinda nueva información sobre la participación de GATA3 en la regulación del ciclo celular. Hemos demostrado que la reducción de los niveles de GATA3 es necesaria para la progresión del ciclo celular, y que dicho requerimiento condice con la necesidad de la regulación de GATA3 para el aumento de los niveles de ciclina A2. De esta forma, hemos profundizado el entendimiento sobre la participación de GATA3 en la progresión del ciclo celular en células de cáncer de mama.

3.2 - Relevancia de la regulación de GATA3 para el crecimiento tumoral *in vivo* inducido por progestágenos.

Finalmente, exploramos los efectos de la expresión de GATA3 en el crecimiento tumoral *in vivo*. Para este fin utilizamos el modelo murino C4HD, cuyo crecimiento es progestágeno-dependiente [58]. Realizamos cultivos primarios de tumores C4HD, los cuales fueron transfectados con vectores de expresión de GFP, GFP-GATA3-WT o GFP-GATA3-S308A por 48 h. Luego, 1×10^6 células fueron inyectadas de forma subcutánea en ratones hembra BALB/C, previamente inoculados con un depósito de MPA o control. Observamos un aumento en el crecimiento tumoral progestágeno-dependiente, como se ha reportado previamente [58], ya que la inoculación del depósito de MPA fue necesario para lograr el crecimiento tumoral (Fig. 22A y Fig. 22B). En línea con los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación *in vitro*,

observamos que la transfección tanto de GFP-GATA3-WT como de GFP-GATA-S308A redujo el crecimiento tumoral respecto al vector GFP (Fig. 22A y Fig. 22B). Asimismo observamos que la transfección de GFP-GATA3-S308A resulta en una reducción del crecimiento tumoral significativamente mayor a la de la forma salvaje, a pesar de que este fenómeno particular no fue observado en los ensayos de proliferación *in vitro* en células C4HD (Fig.18D). Dicha diferencia puede deberse a la naturaleza del ensayo en cuestión, ya que en el ensayo *in vivo* el tiempo de exposición al progestágeno es mayor, lo que puede resultar en un incremento de las diferencias observadas entre la forma salvaje de GATA3 y la forma mutante.

Figura 22

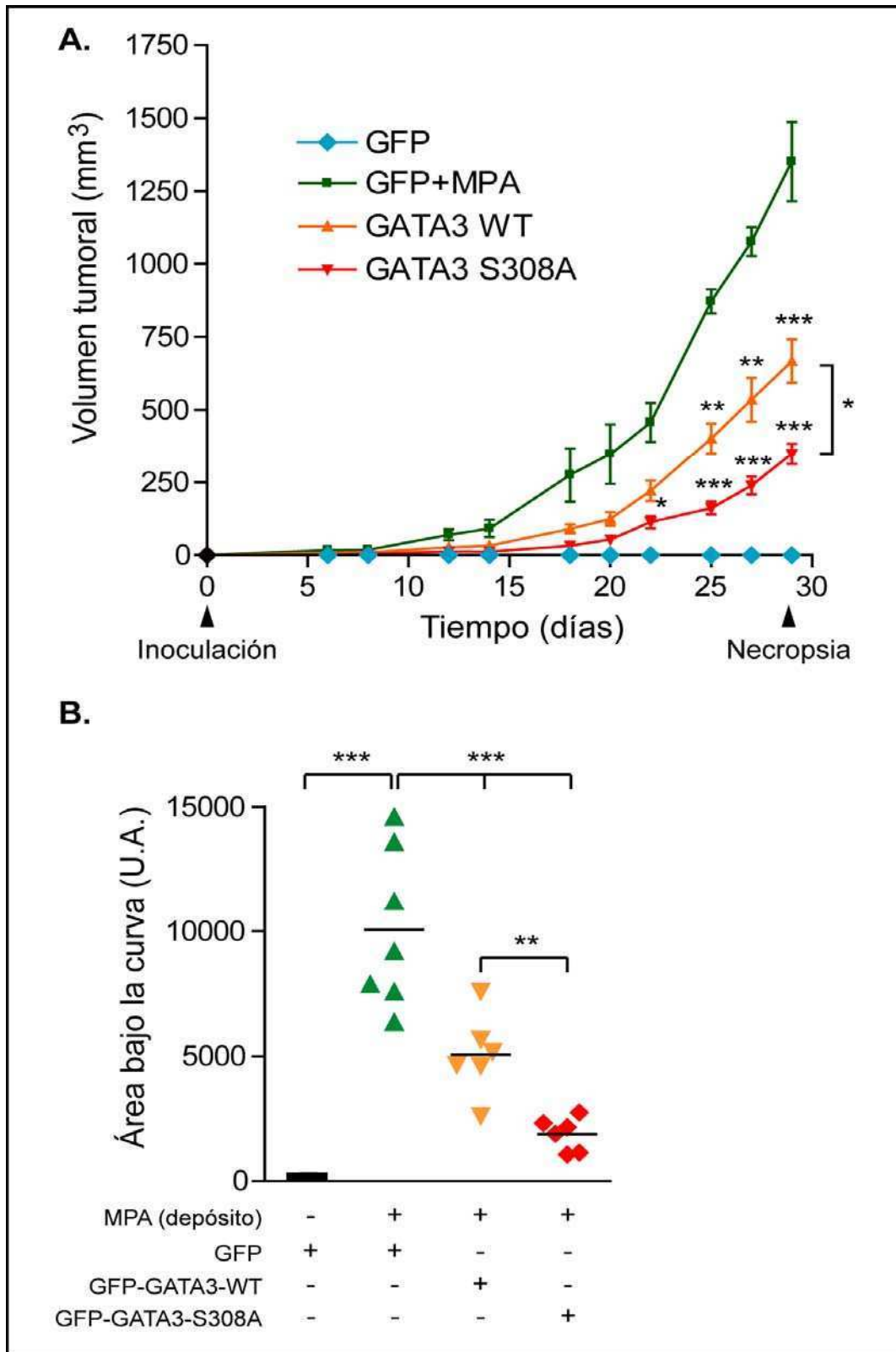


Figura 22. Efecto de la expresión de *GATA3* sobre el crecimiento tumoral inducido por *MPA*: A) Se realizaron cultivos primarios de células provenientes de tumores C4HD, se transfectaron con los vectores indicados y se inocularon de forma subcutánea 1×10^6 células

en ratones BALB/c hembra tratados o no con un depósito de MPA, y el volumen tumoral fue calculado utilizando la fórmula $W^2 \times L / 2$, donde W = ancho y L = largo. Los valores fueron graficados como una curva de crecimiento. *** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05; ANOVA de dos vías. B) Representación gráfica de la mediana de los valores del área bajo la curva de crecimiento obtenida para cada grupo experimental. *** p < 0.001; ** p < 0.01; ANOVA de una vía seguido de Test de Tukey.

Por otra parte, analizamos la expresión de ciclina A2 en células tumorales mediante ensayos de inmunohistoquímica, para detectar la expresión y localización de ciclina A2 en cortes de tejido obtenido de los tumores C4HD. Observamos que mientras que el grupo control muestra una elevada marcación de ciclina A2 en las células tumorales, esta se ve levemente disminuida en el grupo GFP-GATA3-WT, en forma coherente con los resultados observados por WB (Fig. 23A). Sin embargo, la expresión de ciclina A2 se encuentra reducida en el grupo GFP-GATA-S308A, consistente con una regulación por parte de GATA3 de la expresión de ciclina A2 y con el incremento en la estabilidad observado en la forma mutante incluso en presencia de MPA en los ensayos *in vitro* en células T47D. La especificidad del anticuerpo utilizado fue comprobada por el uso de un tejido negativo para la expresión de ciclina A2, en este caso una muestra de glándula mamaria normal humana (Fig. 23A). Mediante ensayos de WB de los extractos proteicos obtenidos de los tumores, detectamos una marcada disminución de los niveles de expresión de ciclina A2 en el grupo experimental GFP-GATA3-S308A en comparación con el grupo GFP-GATA3-WT o el grupo control, mientras que los niveles de ciclina D1 y ciclina E no muestran diferencias evidentes entre grupos (Fig. 23B).

Figura 23

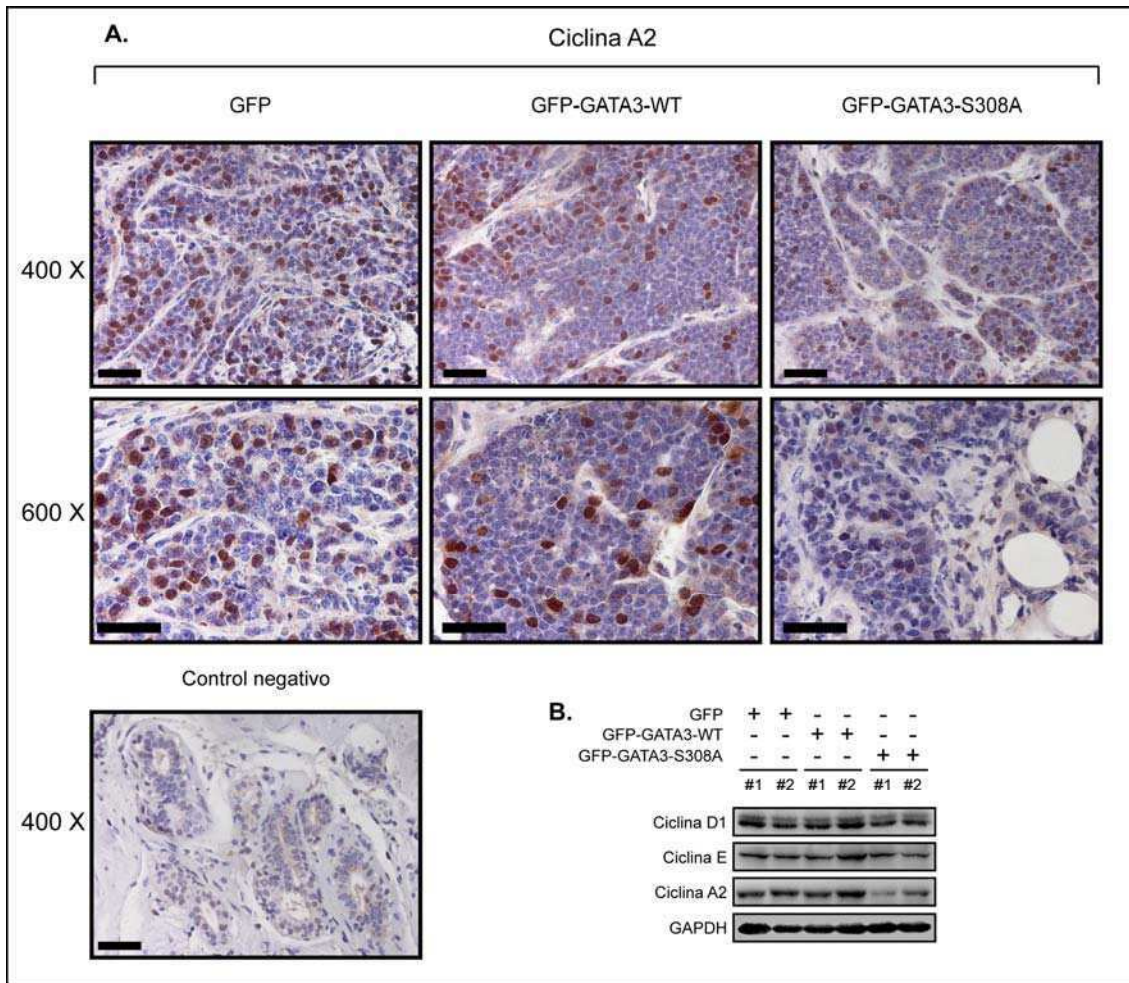


Figura 23. Expresión de ciclina A2 en tumores expresando GATA3: A) Inmunohistoquímica para ciclina A2 para los distintos grupos experimentales (escala = 20 µm). Se muestra un control negativo como prueba de la especificidad del anticuerpo. B) Extractos proteicos preparados a partir de las muestras tumorales fueron analizados mediante WB para la expresión de las proteínas indicadas.

A fin de obtener otra línea de evidencia independiente de la relación entre la expresión de GATA3 y ciclina A2, analizamos la correlación entre ambos factores utilizando bases de datos públicas conteniendo mediciones de ARNm de pacientes de cáncer de mama. En las dos cohortes analizadas observamos la existencia de una correlación negativa entre la expresión de GATA3 y de ciclina A2 (Fig. 24A y Fig. 24B), lo cual sugiere una relevancia de los

mecanismos moleculares descritos en el presente trabajo sobre la patología en humanos.

Figura 24

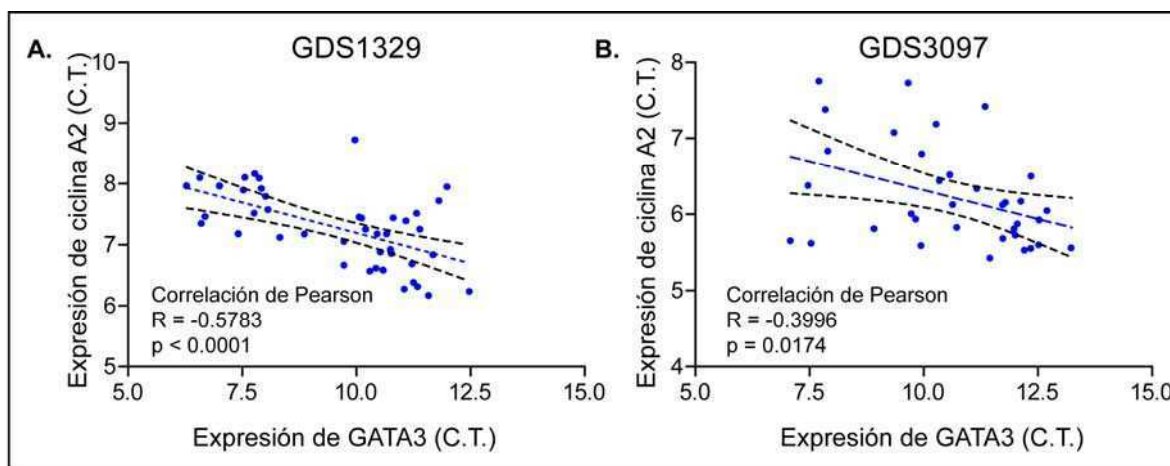


Figura 24. Correlación entre GATA3 y ciclina A2 en pacientes de cáncer de mama: A) Correlación entre los valores de expresión de ARNm de GATA3 y ciclina A2 para dos cohortes independientes, obtenidos de la base de datos GEO. Se utilizaron dos conjuntos de datos: GEO 1329 (N = 43) y GEO 3097 (N = 35); C.T. = Cuentas transcripcionales. Los valores del análisis estadístico por correlación de Pearson se detallan en la figura.

Los resultados presentados en esta sección demuestran la capacidad de GATA3 de suprimir la proliferación celular *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo* inducido por progestágenos, mediante la prevención del aumento de los niveles de expresión de ciclina A2. Además, demostramos la existencia de una correlación negativa entre los niveles de GATA3 y de ciclina A2 en pacientes de cáncer de mama utilizando bases de datos de dominio público. Las evidencias presentadas proveen indicios de la relevancia fisiopatológica de la regulación de GATA3 en cáncer de mama.

DISCUSIÓN

Relevancia de la participación del RP en cáncer de mama.

Históricamente, el estudio del cáncer de mama como tumor de origen endocrino se ha centrado principalmente en los efectos del β -estradiol y la activación del RE. Debido al éxito de las terapias endocrinas a través del uso de moduladores selectivos del RE, principalmente el tamoxifeno, antagonistas totales del RE como Fulvestran o inhibidores de aromatasas, gran parte de la investigación en el área se ha centrado en el estudio de los efectos mediados por el RE. Sin embargo, existen diversas evidencias que indican que los factores endocrinos que participan tanto en el proceso de carcinogénesis así como en la progresión tumoral son diversos. Además, la existencia de interacciones cruzadas entre los receptores a diversos niveles, tanto transcripcional como a través de vías de transducción de señales, agrega una complejidad adicional al sistema en estudio.

La importancia de la participación del RP en el proceso de carcinogénesis así como en la progresión tumoral en cáncer de mama es fundamentada por diversas observaciones. En primer lugar, aproximadamente un tercio de los pacientes tratados con tamoxifeno no responden a la terapia o desarrollan resistencia a la misma (revisado en [75]), lo cual implica la dependencia de otros factores inductores del crecimiento tumoral. El estudio de los mecanismos de resistencia a tamoxifeno así como el uso de terapias combinadas ha sido un campo de intenso estudio debido a la importancia clínica de este fenómeno. A pesar de existir una gran variedad de potenciales mecanismos de resistencia a terapias endocrinas, una observación reciente sugiere que la inhibición de la vía del RE podría seleccionar una subpoblación de células cuya proliferación

sea inducida por la presencia de progestágenos (revisado en [76]). Esto resultaría en el desarrollo de tumores independientes de la actividad del RE, y cuya proliferación sería inducida mediante la activación del RP.

En segundo lugar, la adición de MPA a terapias de reemplazo hormonal resulta en un incremento en la incidencia del cáncer de mama [18]. Además, tanto una menarca temprana así como una menopausia tardía correlacionan con el aumento de la incidencia de cáncer de mama [77]. Dicho aumento es adjudicado a la prolongación del período de fluctuaciones hormonales propias del ciclo menstrual femenino, y su efecto sobre la fisiología del tejido mamario.

En tercer lugar, se ha observado que un embarazo a término a temprana edad (20-25 años) tiene un efecto protector sobre la incidencia del cáncer de mama. Este efecto se ha relacionado con la diferenciación terminal de las células de la glándula mamaria tras la involución post-lactancia, lo cual coincide con la disminución de los niveles de P4 [78]. A nivel molecular, se observa que los lobulillos presentes en mujeres que tuvieron un embarazo a término a temprana edad presentan diferencias con aquellas mujeres que no han tenido embarazo. Notablemente, se ha observado el aumento en la expresión de GATA3 en los lobulillos mamarios de aquellas mujeres que tuvieron un embarazo a término, lo cual se asocia con la diferenciación terminal de células madre debido a la caída de los niveles de P4 post-parto [79-81]. Ha sido sugerido que esta disminución en el número de células madre disminuye la probabilidad de que éstas se conviertan a células madre tumorales por los efectos de compuestos carcinogénicos [78].

Según nuestros resultados obtenidos en células de cáncer de mama, podemos especular que los mayores niveles de GATA3 observados en los lobulillos de

aquellas mujeres que tuvieron un embarazo a término estarían relacionados con la caída de los niveles de P4 sérica post-parto, lo cual permitiría el restablecimiento de la expresión de GATA3. Estas evidencias, junto con reportes epidemiológicos y clínicos [82] apuntan a la participación de la P4 y la activación del RP en la tumorigénesis mamaria y la progresión tumoral.

El trabajo presentado en esta tesis, en el cual se describen los mecanismos moleculares a través de los cuales la activación del RP promueve la disminución de la expresión del supresor tumoral GATA3 en células de cáncer de mama, podría brindar una explicación parcial de los efectos observados en pacientes por la activación del receptor. De esta forma, la presencia de estímulos que promuevan la activación del RP resultarían en la pérdida de expresión de GATA3 en células tumorales, con el concomitante aumento proliferativo.

Los resultados presentados proveen bases racionales para la utilización de inhibidores del RP como parte del tratamiento endocrino de tumores mamarios. En este aspecto, las pruebas clínicas iniciales del antiprogéstágeno mifepristona (RU486), el cual bloquea la actividad transcripcional del RP de forma dependiente del contexto celular [83], no fueron concluyentes en cuanto a los beneficios del uso de RU486 como agente único, además de mostrar efectos adversos debido a la inhibición inespecífica del receptor de glucocorticoides [84, 85]. Sin embargo, se han desarrollado nuevas generaciones de inhibidores del RP que muestran una mayor especificidad respecto al RU486. Uno de ellos, el compuesto Onapristona, tuvo efectos beneficiosos en el tratamiento de pacientes de cáncer de mama. Sin embargo, los ensayos clínicos fueron suspendidos por sus efectos adversos de hepato-

toxicidad [86]. Otro compuesto desarrollado recientemente, el EC304, posee una alta potencia como antiprogéstágeno. El mismo bloquea la actividad transcripcional del RP sin efectos inespecíficos sobre el receptor de glucocorticoides, además de bloquear la proliferación de células de cáncer de mama [87]. Es de esperar que el uso de EC304 en la clínica provea beneficios a los pacientes de cáncer de mama. Según los resultados del presente trabajo, podemos especular que el bloqueo del RP mediante EC304 prevendría la disminución de GATA3, resultando en la disminución del tamaño tumoral y un aumento del grado de diferenciación del mismo, características relacionadas con una mayor sobrevida.

Debido a la complejidad del mecanismo molecular descrito en el presente trabajo, el cual involucra regulaciones tanto a nivel transcripcional como post-traducciona l y en donde participan diversos factores, además de la regulación de la fosforilación en serina 308 de GATA3, es complejo el diseño de una estrategia terapéutica que prevenga la disminución de los niveles de GATA3 específicamente. Hemos demostrado que el uso de Btz, un inhibidor del proteosoma 26S, previene la disminución del ARNm de GATA3 y promueve la acumulación de la proteína. Dicho compuesto es utilizado en la clínica, pero la inhibición de una vía central para la homeostasis celular como estrategia terapéutica genera efectos secundarios no deseados en pacientes, además de haber demostrado eficacia reducida en el tratamiento de cáncer de mama metastático [88, 89], por lo que el diseño de estrategias terapéuticas de mayor especificidad asegurará resultados más efectivos.

Sin embargo, diversos pasos del mecanismo detallado en este trabajo pueden ser potencialmente utilizados como base para el desarrollo de nuevas

alternativas terapéuticas o de diagnóstico. En primer lugar, la participación de EZH2 en la regulación de GATA3 en cáncer de mama abre la posibilidad de utilizar inhibidores ya existentes de la metil-transferasa para el tratamiento de pacientes de cáncer de mama. Además, la determinación de los niveles de pSer308-GATA3 podría ser útil como factor diagnóstico en pacientes de cáncer de mama. Las potenciales aplicaciones serán discutidas en las secciones subsiguientes.

Identificación de la activación del RP como evento que promueve la disminución de los niveles de GATA3.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la activación del RP por progestágenos es un evento causal de la pérdida de la expresión del factor de transcripción maestro y supresor tumoral GATA3 en cáncer de mama. La relevancia a nivel patológico de la pérdida de función de GATA3 es remarcada por los diversos estudios que han demostrado la alta frecuencia de mutaciones en el locus *GATA3* en tumores mamarios [33]. Los efectos funcionales de algunas de dichas mutaciones han sido descritos en detalle *in vitro*, atribuyendo a las mismas la pérdida de función de GATA3 en células tumorales [34]. A pesar de la alta frecuencia en que se encuentran las diversas mutaciones reportadas para GATA3, este fenómeno brinda una explicación parcial para la pérdida de función de GATA3 observada en pacientes.

La importancia de describir los estímulos o agentes causales de la pérdida de GATA3 se ve reflejada en el estudio de Kourhos *et al*, en el cual se describe por primera vez la correlación entre la progresión tumoral y la pérdida de la

expresión de GATA3, además de demostrar que la reconstitución de la misma revierte la progresión tumoral a un estado de mayor diferenciación [28].

En dicho estudio, una de las principales observaciones es que en tumores diferenciados, la disminución de GATA3 mediante vectores lentivirales conteniendo ARN cortos en horquilla (shRNAs) produce la pérdida de adhesión de las células tumorales a la membrana basal, seguida de muerte celular mediada por apoptosis. Esto implica que la disminución forzada de la expresión de GATA3 en tumores diferenciados promueve la muerte celular, razón por la cual se deduce que deben existir estímulos que resultan en la pérdida de la expresión de GATA3 promoviendo la progresión tumoral, sin inducir la muerte celular por apoptosis.

Sin embargo, los agentes causales de la pérdida de expresión de GATA3 durante la progresión tumoral no habían sido identificados hasta el momento.

En nuestro trabajo, se describe la activación del RP como un evento que promueve la pérdida de la expresión de GATA3 en células tumorales mamarias, lo cual permite la proliferación inducida por progestágenos de las mismas [70]. Por lo tanto, hemos identificado uno de los potenciales agentes responsables de la pérdida de GATA3 en pacientes de cáncer de mama, evento que se ha reportado correlaciona con una menor sobrevida libre de enfermedad y un mayor grado tumoral [90].

Además, hemos descrito los mecanismos moleculares involucrados, demostrando la importancia de la actividad de la metil-transferasa EZH2 para la represión transcripcional de *GATA3*, así como la participación de la vía de PKA en la fosforilación de GATA3 en serina 308, la cual resulta en la disminución de la estabilidad de la proteína (Fig. 25).

Figura 25

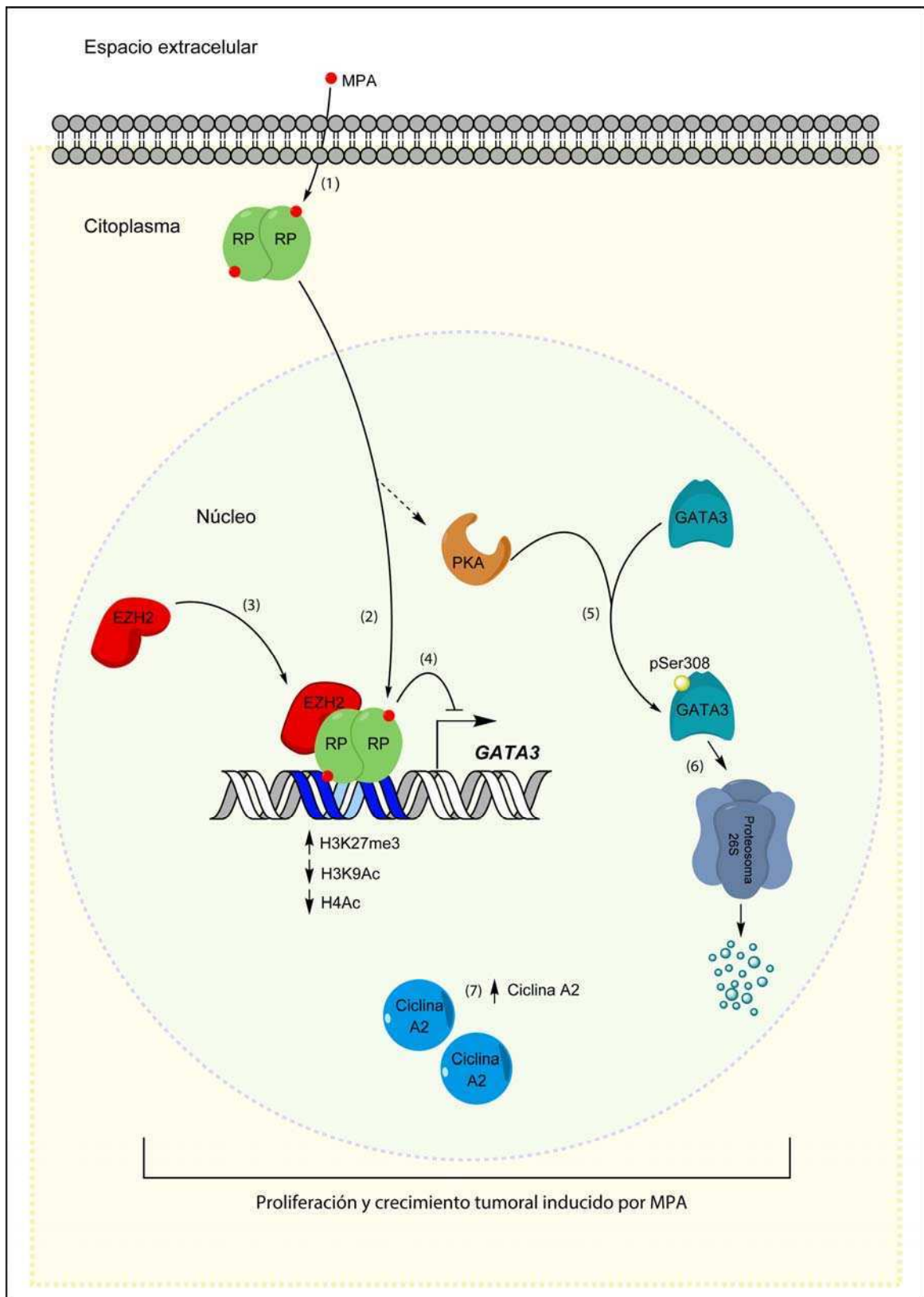


Figura 25. Esquema del mecanismo molecular propuesto. Tras la unión al ligando, el RP transloca al compartimento nuclear (1), donde se une río arriba del gen *GATA3* a un potencial PRE (2). Esto resulta en el reclutamiento de EZH2 (2), con el concomitante aumento de los niveles de H3K27me3, además de la disminución de H3K9Ac y H4Ac. Estos eventos promueven la represión transcripcional de *GATA3* (4). Por otro lado, la activación del RP promueve la activación de PKA (la línea de puntos indica que este proceso puede darse de forma directa o indirecta) lo cual resulta en la fosforilación de *GATA3* en el residuo serina 308 (5). Esta fosforilación reduce la estabilidad de *GATA3*, resultando en su degradación vía proteosoma 26S (6). Estos eventos resultan en el aumento de la proliferación celular inducida por MPA, permitiendo el aumento de los niveles de ciclina A2 (7).

Otro de los principales aportes del presente trabajo implica la descripción del rol de *GATA3* en la regulación de ciclo celular. A pesar de que diversos reportes demuestran la importancia de *GATA3* para la expresión de ciclina D1 y para la promoción de la progresión del ciclo celular, estos resultados se muestran en aparente contradicción con el hecho de que existe una correlación inversa entre el tamaño tumoral y la expresión de *GATA3* [90]. Además, la disminución de *GATA3* en células tumorales tras el tratamiento con P4 o MPA, estímulos que han sido ampliamente descritos como inductores de la proliferación celular en cáncer de mama luminal [71-73], indica que podría haber otras funciones desconocidas de *GATA3* durante la progresión del ciclo celular.

Nuestras observaciones indican que *GATA3* juega un papel complejo en la modulación del ciclo celular, ya que posee dos funciones en apariencia contrapuestas: es requerido para la inducción de la expresión de la ciclina D1, y sin embargo su expresión previene el aumento de la ciclina A2. Nuestros resultados relacionados a la fosforilación de *GATA3* en serina 308 durante las

distintas fases del ciclo y la relación de dicha modificación post-traducciona con la estabilidad de la proteína, indican otro punto de regulación de GATA3 relacionado con el ciclo celular. La convergencia de dos mecanismos funcionalmente redundantes, uno de represión transcripcional y otro de degradación post-traducciona para lograr la disminución de la expresión de GATA3, indican la relevancia biológica de la misma. Podemos especular que GATA3 participaría en la coordinación temporal de la expresión de las ciclinas D1 y A2, aunque el mecanismo detallado de la regulación de ciclina A2 por GATA3 aún queda por investigar. Los mecanismos moleculares descritos en el presente trabajo podrían proveer una modulación fina de los niveles de expresión de GATA3, coordinando la expresión de las ciclinas D1 y A2, de esta manera permitiendo la progresión del ciclo celular.

Interacción entre el RP y EZH2.

Estudios preliminares realizados en ratones han provisto evidencias de la modulación de la metil-transferasa de histonas EZH2 por hormonas esteroideas. Durante la preñez, se observa un aumento de los niveles de expresión de EZH2, los cuales correlacionan con el aumento de los niveles séricos de P4 [43]. Otra observación es el aumento tanto de los niveles de fosforilación de EZH2 en treonina 487 (pT487-EZH2) así como de los niveles de H3K27me3 globales [43]. Estas evidencias sugieren fuertemente la existencia de un vínculo entre los niveles de P4 y la actividad metil-transferasa de EZH2.

Adicionalmente, otro estudio provee evidencias de una relación causal entre los niveles de expresión de GATA3 y la expresión de EZH2 mediante el estudio de células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231, las cuales son negativas para la expresión de GATA3. Se observó que el silenciamiento de la expresión de EZH2 en este tipo celular promueve un aumento de los niveles de expresión del ARNm de GATA3 [52]. Dicho estudio demuestra la existencia de una regulación de la expresión de GATA3 por parte de EZH2, manteniendo el silenciamiento del locus en células de cáncer de mama triple negativo. Sin embargo, en dicho trabajo no se describen los mecanismos moleculares involucrados y no se identifica la naturaleza de la regulación. En base a los resultados presentados en dicho estudio surgen dos posibilidades: una regulación directa por unión de EZH2 al promotor de *GATA3*, o una regulación de forma indirecta a través de otros factores, que a su vez controlan la expresión de *GATA3*.

Durante la investigación de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la transcripción de *GATA3* por progestágenos en el presente trabajo, demostramos la inducción del co-reclutamiento de la metil-transferasa de histonas EZH2 y el RP río arriba de *GATA3* a través de la activación del receptor por MPA. Además, demostramos el requerimiento de la unión del RP al ADN a fin de lograr el reclutamiento de EZH2 al sitio en estudio. Estos experimentos demuestran la existencia de una cooperación entre ambos factores para lograr la represión transcripcional del locus *GATA3*.

Hasta el momento, se desconocen las secuencias del ADN asociadas a la unión de EZH2 al ADN en vertebrados. Si bien se han descrito secuencias que correlacionan con la unión de EZH2 y otros miembros del PRC2 en células

de *Drosophila melanogaster* [39], se ha reportado que la unión de EZH2 al ADN depende de la cooperación con otros factores de transcripción [39]. Nuestro trabajo demuestra por primera vez la capacidad del RP de direccionar el reclutamiento de EZH2 río arriba de *GATA3*, además de poner en evidencia el requerimiento de la unión del RP al sitio para lograr el reclutamiento de EZH2. Estos resultados implican que la unión de EZH2 a sus genes blanco puede ser mediada por la unión de receptores nucleares, en este caso el RP, para lograr el silenciamiento de genes específicos dependiendo del contexto celular y de señales extracelulares. De esta manera, EZH2 funcionaría como co-represor de la regulación transcripcional mediada por el RP. Por lo tanto, esta evidencia particular sugiere un potencial mecanismo de acción para el reclutamiento de EZH2 en vertebrados, mediante su interacción con el RP.

Por otro lado, también demostramos que ante el estímulo con el progestágeno sintético MPA, el RP y EZH2 co-inmunoprecipitan, lo cual muestra que estos factores son capaces de formar parte de un mismo complejo molecular, ya sea mediante una interacción directa o a través de otros componentes no descritos en el presente trabajo. La determinación de los dominios requeridos para dicha interacción así como de la superficie de interacción en sí misma podría facilitar el desarrollo de inhibidores de la interacción entre el RP y EZH2 (Fig. 26). De esta manera, sería posible bloquear específicamente la actividad de represión transcripcional del RP en células tumorales, disminuyendo los efectos secundarios observados por el uso de inhibidores del RP. Además, se proveen las bases teóricas para el futuro uso de inhibidores de EZH2 para el tratamiento de pacientes de cáncer de mama. Es de especial interés la

continuación de la investigación relacionada a la interacción entre el RP y EZH2, a fin de explotar el potencial terapéutico de la misma.

Figura 26

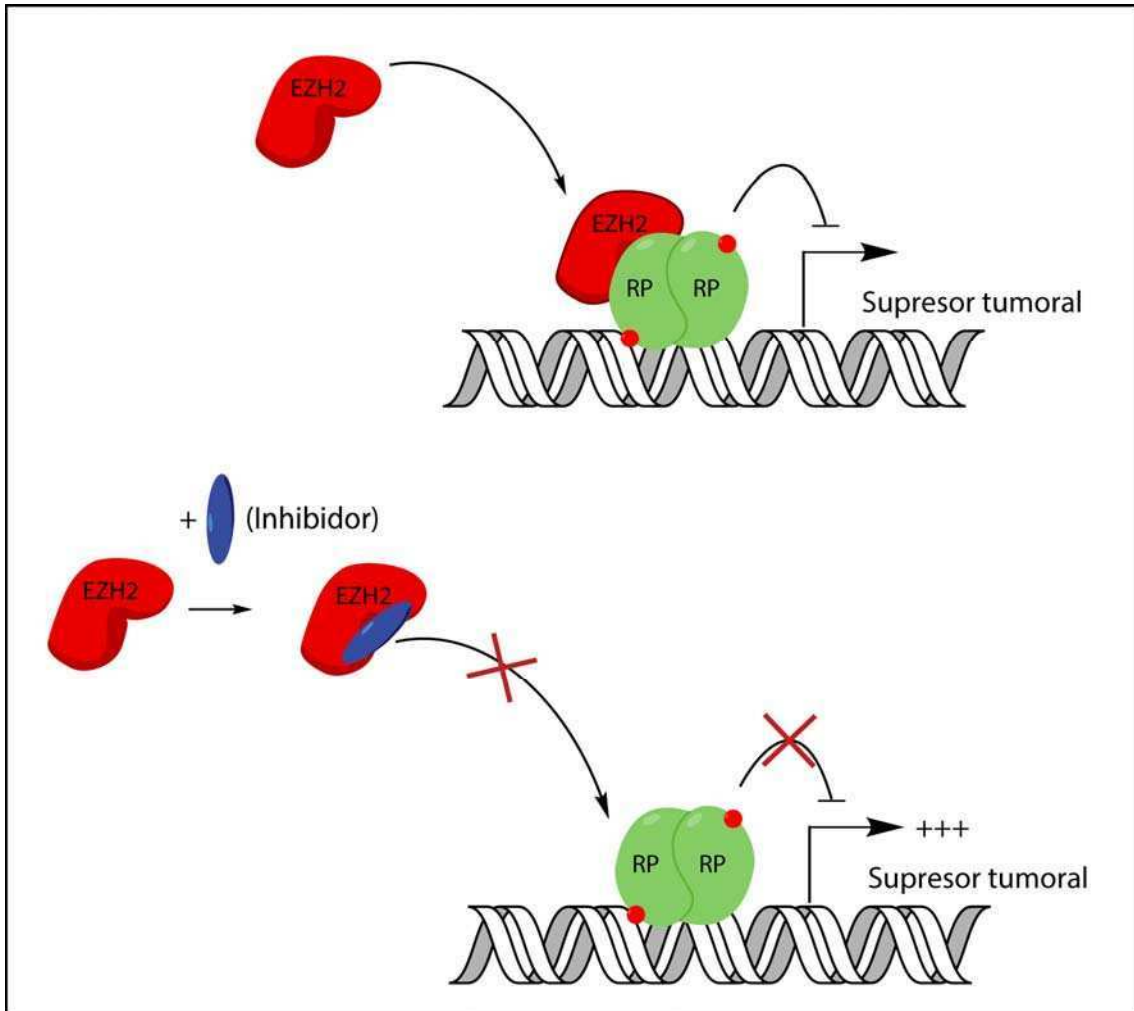


Figura 26. Esquema del potencial terapéutico de la inhibición de la interacción entre el RP y EZH2: El desarrollo de un inhibidor de la superficie de interacción entre el RP y EZH2 podría potencialmente prevenir la represión transcripcional de genes supresores de tumores por acción del RP.

Uso de pSer308-GATA3 como marcador pronóstico.

Las modificaciones post-traduccionales de factores de transcripción (acetilación, ubiquitinación, fosforilación, metilación, etc.) tienen diversos efectos sobre la actividad transcripcional, estabilidad, interacciones y unión al ADN por parte del factor, entre otras características. En el presente trabajo, describimos la fosforilación de GATA3 en el residuo serina 308 inducido por la incubación de las células tumorales con MPA. El efecto particular de esta modificación post-traducciona no había sido determinado hasta el momento. Mediante mutagénesis sitio-dirigida, demostramos la importancia de la fosforilación en serina 308 para la disminución de la estabilidad de GATA3 mediada por progestágenos en células de cáncer de mama. Otros parámetros, como capacidad de transactivación o capacidad de unión al ADN de la forma mutante no fueron evaluados en este trabajo en particular, aunque sería de interés la caracterización de los mismos.

Sin embargo, observamos que la inducción de la fosforilación en serina 308 y la degradación de GATA3 mediada por MPA son requeridas para la estimulación de la proliferación por parte del RP. La importancia de esta modificación en particular se ve reflejada en la reducción significativa del crecimiento tumoral *in vivo* inducido por MPA en el modelo murino C4HD (Fig. 22A y Fig. 22B) y los resultados presentados de las proliferaciones *in vitro*, particularmente en la línea celular T47D (Fig. 18A y Fig. 18B).

Ha sido previamente reportado que los niveles de expresión de GATA3 en pacientes pueden ser utilizados como factor pronóstico independiente, y que una mayor expresión de GATA3 correlaciona con un menor grado tumoral y

una mejor supervivencia libre de enfermedad [90]. Dados los resultados obtenidos *in vitro* con el uso de la mutante GFP-GATA3-S308A tanto en lo referido a la estabilidad de la proteína como a la capacidad de suprimir la proliferación, proponemos el uso de los niveles de pSer308-GATA3 en conjunto con la expresión de GATA3 total como un índice compuesto de pronóstico para pacientes de cáncer de mama. De esta manera, se esperaría que altos niveles de pSer308-GATA3 dentro del grupo GATA3 positivo prediga la pérdida de la expresión de GATA3 en dicho grupo de pacientes. Este enfoque permitiría dividir los pacientes GATA3 positivos en dos subgrupos: pSer308 positivos / pSer308 negativos. Aquellos pacientes negativos para pSer308-GATA3 tendrían un mejor pronóstico que aquellos con altos niveles de la forma modificada. La aplicación de dicho método diagnóstico requiere previamente la validación técnica de los anticuerpos utilizados para la detección de pSer308-GATA3, así como estudios retrospectivos en cohortes de pacientes de cáncer de mama.

Regulación de ciclina A2 por progestágenos a través de GATA3.

La principal función adjudicada al factor de transcripción maestro GATA3 se relaciona con el proceso de diferenciación celular. De esta manera, GATA3 se encuentra involucrado en la toma de decisiones que definen uno de dos posibles destinos celulares alternativos. Una de las principales características de este proceso es la existencia de una autorregulación de GATA3 por retroalimentación positiva a nivel transcripcional. Este mecanismo asegura la continuidad de identidad celular y previene la reversión del proceso de

diferenciación a estados anteriores. Por otro lado, se observa que GATA3 es capaz de reprimir la expresión de otros factores maestros que determinan destinos celulares alternativos, en un proceso denominado represión transcripcional cruzada.

Un ejemplo ampliamente estudiado de la acción de GATA3 es el proceso de polarización de los linfocitos vírgenes hacia Th1 o Th2. La vía de diferenciación hacia Th1 es mediada por el factor de transcripción T-bet, mientras que la diferenciación hacia Th2 es mediada por GATA3. Tanto las citoquinas presentes en el medio extracelular, en particular la presencia de interleuquina 2 (IL-2), como la activación del receptor de célula T (TCR) por interacción con el antígeno definen la polarización hacia Th2. Un evento temprano en este proceso es el incremento de la expresión de GATA3, el cual se une al promotor de T-bet y promueve la represión transcripcional del mismo. Esta represión transcripcional cruzada, sumada a la retroalimentación positiva de GATA3, define la diferenciación terminal a Th2 a partir de linfocitos vírgenes [91].

Sin embargo, la participación de GATA3 en la progresión del ciclo celular en general y de células de cáncer de mama en particular sólo se ha comenzado a describir recientemente. Las principales contribuciones en el campo fueron provistas por trabajos pioneros que describen el requerimiento de GATA3 para la expresión de la ciclina D1, y por lo tanto para el inicio y progresión del ciclo celular. Se ha observado que GATA3 interactúa físicamente con la poli-ADP ribosa Polimerasa-1 (PARP1), una enzima capaz de modificar proteínas nucleares mediante ADP-ribosilación. PARP1 compite con la histona linker H1, actuando como co-activador de GATA3, promoviendo la expresión del gen que codifica para la ciclina D1 [74].

Por otro lado, un estudio previo demuestra que la disminución de los niveles de GATA3 correlaciona con la progresión tumoral, marcada por una pérdida de la diferenciación celular y un incremento en la tasa proliferativa y el crecimiento tumoral [90]. Estos resultados aparentemente contradictorios reflejan una participación compleja de GATA3 en la regulación de la progresión del ciclo celular.

Los resultados presentados en este trabajo, aportan nueva información sobre los patrones de expresión y modificaciones post-traduccionales de GATA3, inducidos mediante la activación del RP. Hemos demostrado que la disminución de la expresión de GATA3 es necesaria para el aumento de la ciclina A2, la cual marca el inicio de la fase de síntesis del ADN y en humanos es además requerida para la transición de G2 a M [53, 54]. Además hemos confirmado que la reducción de los niveles de GATA3 mediante siRNA promueve una disminución de la ciclina D1 en células de cáncer de mama humano ([74] y Fig. 19A), y que previene la proliferación inducida por MPA (Fig. 19B). Sin embargo, también demostramos que la incubación con MPA promueve la pérdida de GATA3, y que la sobre-expresión de GATA3 previene el aumento proliferativo inducido por MPA (Fig. 18).

Por lo tanto, hemos definido que GATA3 posee una participación dual y en apariencia contrapuesta en la progresión del ciclo celular, siendo necesaria para la expresión de ciclina D1 y potencialmente reprimiendo la expresión de ciclina A2. Por lo tanto, GATA3 es capaz de coordinar la expresión de ambas ciclinas, y de presentar la función de promotor del ciclo celular o represor del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembras vírgenes de las cepas BALB/c de dos meses de edad criadas en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Los ratones provenían de reproductores sanos y fueron criados en un ambiente controlado y de entrada restringida, con agua y comida *ad libitum*, con doce horas de luz y doce de oscuridad. Todos los estudios se realizaron de acuerdo a los estándares de cuidado de animales de laboratorio del NIH y fueron, a su vez, aprobados por el comité de ética del IBYME.

Tumores C4HD

Se utilizó el adenocarcinoma mamario murino C4HD perteneciente al modelo experimental desarrollado por la Dra. Lanari [58]. Los tumores se originaron en ratones hembra vírgenes de la cepa BALB/c tratados con 40 mg del progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona cada 3 meses durante 1 año y han sido mantenidos por pasajes singeneicos en ratones tratados con MPA [58]. El MPA se administra en forma de *depot* (40 mg/ratón) en el flanco contralateral al inóculo tumoral. El adenocarcinoma mamario C4HD es de histología ductal, con muy baja capacidad metastásica, de crecimiento hormono-dependiente, requiriendo la administración de MPA para proliferar tanto *in vivo* como *in vitro* [92]. El tumor C4HD expresa receptores de progesterona y de estrógeno, expresa altos niveles de ErbB2 y ErbB3, bajos niveles de ErbB4 y carece de receptores de glucocorticoides y de EGF (de sus siglas en inglés *Epidermal Growth Factor*) [93, 94].

Reactivos

El MPA, RU486, “Dulbecco’s Modified Tagle médium” (DMEM) y progesterona fueron adquiridos de Sigma Aldrich (Saint Luis, MO, USA). Los reactivos de transfección Fugene HD y XtremeGENE HP fueron adquiridos de Roche Biochemicals y fueron utilizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cicloheximida (CHX) fue utilizada a una concentración final de 1 μ M; el Bortezomib (Velcade) fue utilizado a una concentración final de 100 nM; la actinomicina D (ActD) fue utilizada a una concentración final de 5 μ g/ml; el inhibidor miristoilado de la PKA (PKI) fue adquirido de Enzo Life Sciences (Exeter, UK) y utilizado a una concentración final de 1 μ M. El inhibidor de PKA H89 (Sigma Aldrich) fue utilizado a una concentración final de 1 μ M. En los tratamientos in vivo, se utilizó MPA (Medrosterona, Laboratorios Craveri) en forma de depot (40 mg/ratón) gentilmente donado por laboratorios Craveri.

Soluciones utilizadas

- Buffer fosfato salino (PBS): Na Cl 8 g/l; KCl 0.2 g/l; Na₂HPO₄ 1.44 g/l; KH₂PO₄ 0.24 g/l.
- Buffer Tris salino (TBS): Tris.Cl 1 M pH 7.4 500 ml/l; NaCl 5M 300 ml/l
- Buffer Hank’s Modificado (MHB): MgSO₄.7H₂O 0.2006 g/l, KCl 0.4 g/l, KH₂PO₄ 0.06 g/l, NaCl 8 g/l, Na₂HPO₄ 0.0478 g/l, glucosa 1 g/l, NaHCO₃ 0.35 g/l, EGTA 0.5 M 4 ml/l, MES 0.25 M 20 ml/l, NaN₃ 0.05 g Se llevó a pH 6.2 y se esterilizó por filtración.

- Solución enzimática para disgregar los tumores: tripsina (Invitrogen) 0.25% p/v; colagenasa tipo II (Invitrogen) 0.25% p/v o tipo IV (Sigma) (AE: 485 U/mg); BSA (Sigma) 0.5% p/v; PBS. Se esterilizó por filtración.
- Solución de tripsina-EDTA: para obtener células en suspensión a partir de los cultivos primarios o para el repique de las líneas celulares, se utilizó una solución de tripsina (Invitrogen) 0.25% p/v más EDTA 0.02% p/v en PBS. Se esterilizó por filtración.

Cultivos primarios de tumores C4HD

Para realizar los cultivos primarios de células epiteliales, los tumores C4HD se extirparon de los ratones en flujo laminar aproximadamente a los 30 días de haber sido inoculados. Se procedió a la disgregación mecánica seguida de disgregación enzimática (2 ml de solución enzimática por tumor), agitando durante 40 minutos a 37°C y luego agregando DMEM-F12 (*Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12*, 1:1) (Sigma-Aldrich) + 10% de suero fetal bovino (SFB). De esta forma se obtuvo una suspensión compuesta por una población de estirpe epitelial y otra fibroblástica, las cuales se separaron según la técnica de Pandis *et al* [95] con algunas modificaciones. Brevemente, esta técnica se basa en que la velocidad de sedimentación de las células epiteliales que forman agregados celulares es mayor que la de los fibroblastos, permitiendo su separación mediante decantaciones diferenciales. Para comenzar la purificación, las células obtenidas luego de la disgregación se centrifugaron a 400 x g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en una solución de DMEM-F12 + SFB 2 % v/v dejando sedimentar durante 20 minutos. El sedimento constituye la fracción enriquecida en células

epiteliales que se encuentran habitualmente en agregados. El sobrenadante se descartó luego de cada decantación. Este procedimiento se repitió aproximadamente 12 veces, hasta que el sobrenadante se torna traslúcido. En la decantación final, las células epiteliales se resuspendieron en DMEM-F12 + SFB 10 % v/v y se sembraron en placas de cultivo. Las células epiteliales de los cultivos primarios mantuvieron las características del tumor parental en cuanto a expresión de receptores y crecimiento progestágeno dependiente [93].

Los cultivos primarios de células epiteliales se dejaron durante 48 h en DMEM-F12 + SFB 10% v/v para favorecer la adhesión, luego de lo cual se reemplazó el medio de cultivo por DMEM-F12 + SFB deprivado de esteroides por tratamiento con carbón activado (SFBch) 2.5% v/v + MPA 10 nM, dejándolas durante otras 48 h. Este medio de cultivo se cambió luego por DMEM-F12 para ayunar las células y se dejó 48 h más. Los tratamientos de las células epiteliales C4HD se realizaron en DMEM-F12 (2.5% v/v SFBCh).

Líneas celulares y tratamientos

Las líneas celulares de cáncer de mama humano T47D y BT474 fueron adquiridas de la *American Type Culture Collection*.y mantenidas en DMEM-F12 + SFB 10% v/v o RPMI + SFB 10% v/v respectivamente. Ambas líneas expresan el RP y GATA3. La línea celular T47D-Y, que no expresa RP [60], fue donada por la Dra. Horwitz (University of Colorado, Denver, CO, USA) y se obtuvo mediante clonación por dilución límite a partir de la línea T47D [96]. La línea celular T47D-Y-RP-B es el resultado de la transfección estable de las células T47D-Y con la isoforma B del RP [60], y fue también donada por la Dra. Horwitz. La línea celular T47D-Y-C587A-RP, donada por la Dra. Lange, se

logró transfectando establemente las células T47D-Y con una mutante de la isoforma B del RP que contiene una mutación puntual en una cisteína conservada en el primer dedo de zinc del dominio de unión al ADN [5]. Esta mutante no es capaz de unirse al ADN ni de reclutarse a otros factores de transcripción unidos al ADN, pero es capaz de activar vías rápidas de señalización como la inducción de Src, p42/44 MAPKs y Akt en respuesta a progestágenos [7, 8].

La línea celular T47D-Y y sus derivadas fueron cultivadas en las mismas condiciones que la línea T47D. Para mantener las líneas T47D-Y-B, T47D-Y-A y T47D-Y-C587A-RP se agregó al medio de cultivo el antibiótico análogo de la neomicina, G418 (500 µg/ml, Sigma).

Las células BT474, T47D, T47D-Y y sus derivadas se mantuvieron por repiques sucesivos una vez llegadas al 80-90% de confluencia aproximadamente. Para repicarlas, las células se lavaron con solución de tripsina-EDTA estéril y se incubaron entre 2-10 minutos a 37°C con la cantidad de tripsina necesaria para cubrir la placa de cultivo (aproximadamente 3 ml). Una vez en suspensión, se las transfirió a un tubo con 10 ml de medio + 10% SFB que se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en medio suplementado con 10% SFB. Finalmente, se sembraron en las placas correspondientes.

Las líneas celulares se ayunaron durante 24 h y los experimentos se llevaron a cabo en DMEM-F12 sin rojo fenol. En los casos en los que se utilizaron inhibidores, los mismos fueron preincubados durante 90 minutos antes del tratamiento con MPA y luego se mantuvieron en el medio de cultivo junto con el mitógeno.

Medios de cultivo y suero fetal bovino

Para el cultivo de células epiteliales C4HD y de las líneas celulares T47D, T47D-Y y sus derivadas, se utilizó DMEM-F12 sin rojo fenol con el agregado de sulfato de gentamicina en una concentración de 50 mg/l y bicarbonato de sodio 1.2 g/l. El medio de cultivo se preparó según las instrucciones del fabricante con agua hexadestilada. Se esterilizaron por presión negativa utilizando filtros de acetato de celulosa de 0.22 μm de poro (Corning).

El SFB fue adquirido a Gen S.A. y se deplementó calentándolo a 56°C durante 30 minutos. Para obtener el SFBch, se incubó el SFB ya deplementado con 5% p/v de carbón activado durante 1 hora a 4°C en permanente agitación. Luego de la adsorción, el suero se centrifugó 2 veces a 12000 rpm durante 20 minutos. Al sobrenadante se le adicionó 5% p/v de carbón activado, se lo incubó durante toda la noche (O.N.) a 4°C con agitación y se realizaron centrifugaciones sucesivas hasta eliminar completamente el carbón. Una vez diluido al 10% v/v en el medio de cultivo, se esterilizó por filtración.

Preparación de extractos proteicos totales

Las células tratadas como se indica en cada experimento, se recolectaron de las placas de cultivo utilizando un *scraper* y se homogeneizaron en presencia del buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM [pH 7.4], NaCl 150 mM, EDTA 1 M, EGTA 1 mM, glicerol 10% v/v, NP-40 1% v/v, MgCl₂ 1 mM, SDS, 0.1% v/v, e inhibidores de proteasas y fosfatasas: PMSF 0.4 mM, NaF 25 mM, leupeptina 5

$\mu\text{g/ml}$, pepstatina 5 $\mu\text{g/ml}$, aprotinina 5 $\mu\text{g/ml}$, espermina 0.15 mM, espermidina 0.5 mM, β -glicerofosfato 10 mM, Na_3VO_4 0.2 mg/ml). El homogenato celular se completó mediante ruptura física con una jeringa 25G (Terumo) en frío. El homogenato celular se centrifugó a 13400 x g a 4°C durante 30 minutos. Se descartó el *pellet* y el contenido proteico del sobrenadante fue determinado por ensayos de Bradford (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de extractos citosólicos y nucleares

Las células T47D tratadas como se indica en cada experimento, fueron recolectadas de las placas de cultivo utilizando un *scraper*. Se utilizó el kit NE-PER para la obtención de las fracciones nucleares y citoplasmáticas según las indicaciones del fabricante (Pierce Biotechnology). La cuantificación proteica fue determinada por ensayos de Bradford (BioRad).

Anticuerpos utilizados

- GATA3 (HG3-31, sc-268, Santa Cruz Biotechnology) – WB (1:1.000)
- GATA3 (5852S, Cell Signaling) – IP (1:100)
- GAPDH (D16H11, Cell Signaling) – WB (1:200.000)
- β -tubulina (Sigma Aldrich) – WB (1:100.000)
- RP (Ab7, Neomarkers) – WB (1:2.000)
- H3K27me3 (ab6002, Abcam) – ChIP (8 μg)
- H3K9ac (ab4441, Abcam) – ChIP (8 μg)
- H4Ac (#06-866, Millipore) – ChIP (8 μg)
- EZH2 (#39933, Active Motif) – WB (1:1.000) – ChIP (1:100).
- ARN Polimerasa II (H224, sc-9001, Santa Cruz Biotechnology,) – ChIP (8 μg)

- pSer5-ARN Polimerasa II (H14, MMS-134R, Covance) – ChIP (1:100).
- pPKA-sustrato ((RRXS*/T*)(100G7E), Cell Signaling) – IP (1:100) – WB (1:1.000)
- pSer308-GATA3 (ab61052, Abcam) – Inmunofluorescencia (1:50) – WB (1:500)
- PKA-C α (4782, Cell Signaling) – IP (1:100) – WB (1:1.000)
- Ciclina D1 (9041-P1, Neomarkers) – WB (1:2.000)
- Ciclina E (HE12, sc-247 Santa Cruz Biotechnology) – WB (1:2.000)
- Ciclina A2 (C-19, sc-596 Santa Cruz Biotechnology) – WB (1:1.000) – IHQ (1:100).

Primers y siRNA

Las secuencias de los primers utilizados (Tabla 1) así como de los siRNA (Tabla 2) se detallan a continuación.

Tabla 1

| Primer | Secuencia (5' - 3') |
|-----------------------------|-------------------------------|
| PRE Forward | GACGACCCTCACACACCAAG |
| PRE Reverse | TCTTCGCTCCTCTACCCCAT |
| GATA3 Intragénico Forward | GGGAGAGCTCGTGGTATCTG |
| GATA3 Intragénico Reverse | TTTCTCCCCTCCATGTTTCA |
| GATA3 ARNm (humano) Forward | CAGACCACCACAACCACACTCT |
| GATA3 ARNm (humano) Reverse | GGATGCCTTCCTTCTCATAGTCA |
| GATA3 ARNm (murino) Forward | CTACCGGGTTCGGATGTAAGTC |
| GATA3 ARNm (murino) Reverse | GTTTACACACTCCCTGCCTTCT |
| GAPDH ARNm Forward | CCAGAACATCATCCCTGCAT |
| GAPDH ARNm Reverse | GTTTACAGCTCTGGGATGACCTT |
| Mutagénesis S308A Forward | CAAGCGAAGGGCTGGCTGCAGCCAGGAG |
| Mutagénesis S308A Reverse | CTCCTGTGGCTGCAGCCAGCCTTCGCTTG |

Tabla 2

| siRNA | Secuencia (5' - 3') |
|-------------------|-----------------------|
| PR (humano) | CUAACAAUUAUCGACUUA |
| PR (murino) | CTCCACCTGTACTGCTTGAAT |
| GATA3 #1 (humano) | AUAUCCAUCGCGUUUAGGCUU |
| GATA3 #2 (humano) | GUUGCCUUGACCGUCGAUGUU |

Ensayos de Western Blot

Los extractos proteicos se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturizante con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). El extracto proteico (25 a 50 μg de proteínas) se diluyó en buffer de siembra 3X (Tris-HCl 60 mM [pH 6.8], SDS 2% p/v, glicerol 10% v/v, 0.7 M 2- β mercaptoetanol y azul de bromofenol 0.1% p/v) y se hirvió durante 5 minutos. Las muestras se corrieron en geles de 7.5-15% acrilamida-bisacrilamida según el peso molecular de la proteína a evaluar. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.2 μm , BioRad) y se bloquearon 2 h a temperatura ambiente con leche descremada 5% p/v o BSA 5% o 3% p/v, según el caso, en PBS + tween 20 0.1% v/v. Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos diluidos en PBS + tween 20 0.1% v/v, O.N. a 4°C con agitación o bien O.N. con BSA 5% o 1% p/v con agitación, según el anticuerpo.

Luego de 3 lavados de 10 minutos en PBS + tween 20, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) anti ratón o anti conejo, todos de Vector Laboratories. Las membranas se revelaron utilizando el reactivo de quimioluminiscencia ECL plus (General Electric) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la primera revelada, las membranas se incubaron 30 minutos a 50°C con solución de *stripping* (2- β mercaptoetanol 100 mM, SDS 2% v/v, Tris-HCl 62.5 mM pH 6.7) en agitación para extraer los anticuerpos unidos a la misma. Luego de dos lavados con PBS + tween 20, las membranas se bloquearon O.N. en leche 5% p/v y se incubaron al día siguiente con el anticuerpo contra la proteína total correspondiente.

Plásmidos

El plásmido pEGFP-N1 fue obtenido de BD Biosciences-Clontech (Palo Alto, CA). El vector de expresión que codifica para GATA3 como proteína de fusión de GFP en el vector pEGFP-C1 fue un generoso regalo del Dr. Nakayama (Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University). Sobre el mismo se realizó una reacción de mutagénesis dirigida para generar el reemplazo de la serina en posición 308 por alanina (GFP-GATA3-S308A). Dicho vector se generó utilizando los primers cuya secuencia se muestra en la Tabla 1. El éxito de la mutagénesis dirigida fue verificado mediante secuenciación en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

El plásmido MMTV-Luc fue donado gentilmente por el Dr. Beato. El mismo contiene el promotor del virus tumoral mamario murino (MMTV, por sus siglas en inglés), el cual presenta 5 PREs canónicos, clonado río arriba del gen reportero luciferasa [64, 97].

Mutagénesis sitio-dirigida

Las reacciones de PCR fueron realizadas con ADN Polimerasa Pfu Turbo (Agilent, cat # 600252-52), utilizando el buffer correspondiente. Se prepararon las siguientes reacciones por separado para cada primer:

| | Volumen |
|---------------------------|---------|
| H ₂ O | 18.5 µl |
| Buffer de reacción 10X | 2.5 µl |
| Primer (20 µM) | 1.0 µl |
| dNTP (10 mM) | 0.5 µl |
| Pfu turbo | 0.5 µl |
| GFP-GATA3-WT (40 ng / µl) | 2 µl |

La misma fue sometida a los siguientes ciclos de PCR: 94°C por 5 minutos, seguido de dos ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C y 8 minutos a 68°C. El producto de ambas reacciones fue mezclado y luego sometido a 18 ciclos idénticos a los anteriores, con un paso final de 10 minutos a 68°C.

Con el fin de digerir específicamente el vector parental GFP-GATA3-WT, el producto final fue incubado con 1 µl de la enzima de restricción sensible a metilación Dpn I (New England Biolabs, cat # 120176L) por 2 h a 37°C. Este paso permite digerir el vector parental cuyo ADN se encuentra metilado, sin afectar el vector generado por PCR que se encuentra libre de metilación. El producto de reacción fue utilizado para transformar bacterias de la cepa DH5α.

Transfecciones con ARN corto de interferencia (siRNA)

Los siRNAs dirigidos contra GATA3 o RP humano fueron sintetizados por Dharmacon y el dirigido contra RP murino fue sintetizado por SABioscience (Tabla 2).

Como siRNA control, se utilizó un siRNA, que no corresponde a ninguna secuencia conocida de genes de mamíferos, también adquirido en Dharmacon. Las células fueron transfectadas durante 48 h con la masa de siRNA indicada, utilizando el reactivo de transfección DharmaFECT (Dharmacon) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células T47D crecidas sobre cubreobjetos fueron transfectadas o no, según el experimento, y luego incubadas en DMEM-F12 con los tratamientos que se

indican en cada ensayo. Las células fueron fijadas y permeabilizadas en metanol a -20°C y luego bloqueadas con PBS + BSA 1% a temperatura ambiente durante 30 minutos. La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo en PBS + BSA 1% O.N. a 4°C, utilizando una dilución del anticuerpo de 1:100.

Luego de 3 lavados de 10 minutos con PBS + BSA 1%, los cubreobjetos con células fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos. Para detectar pSer308-GATA3 se utilizó un anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen); y para detectar GATA3 se empleó un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con rodamina (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Los controles negativos se realizaron incubando las células con PBS + BSA 1% en lugar del anticuerpo. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (5µg/ml) o DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) (Sigma) (2 ng/ml) según lo indicado en las figuras. Para cada tratamiento se analizaron entre 100 y 200 células mediante el *software* ImageJ. Las fotos que se muestran en los Resultados ilustran algunas células representativas de las examinadas. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments), cuyo límite de resolución es de 300 nm.

Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y re-ChIP

Se sembraron 3 millones de células por placa de 100 mm de diámetro, se transfectaron o no, según el experimento, se mantuvieron en el medio de ayuno correspondiente a cada tipo celular durante 24 h y se trataron o no con MPA.

Se realizó un *crosslinking* incubando las células con formaldehído en una concentración final de 1% durante 10 minutos a 37°C, y la reacción se detuvo agregando glicina en una concentración final de 140 mM. Luego las células se lavaron con PBS frío dos veces, se recolectaron de las placas de cultivo en 1.5 ml de PBS con inhibidores de proteasas (descritos previamente) utilizando un *scraper*, y fueron precipitadas por centrifugación y resuspendidas en 1 ml de buffer hipotónico (HEPES 20 mM [pH 7.9], EDTA 1 mM, EGTA 1 mM). Se centrifugó 1 minuto a 16.000 x g para obtener los núcleos en el *pellet*, que se resuspendió en 300 µl de buffer de lisis (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM [pH 8.1]). Después de la lisis los extractos celulares fueron sonicados en hielo con un sonicador Bioruptor® UCD-200 X (Diagenode). Recibieron 4 a 6 pulsos de 30 segundos de potencia media del sonicador. Se centrifugaron durante 10 minutos a 16000 x g a 4°C, el sobrenadante se llevó a un volumen final de 500 µl y la cuantificación de proteínas fue determinada por un ensayo de Lowry. Entre 250 y 500 µg de proteína fueron pre-clareados con 40 µl de esferas de agarosa conjugadas a proteína A o G según el caso, bloqueadas con ADN de esperma de salmón (Millipore). El 5% de esta cromatina se reservó como *input* (ADN total) y se procesó luego junto con los inmunoprecipitados en el paso de reversión del *crosslinking* (ver a continuación). La cromatina remanente fue incubada O.N. a 4°C con 4 µg de anticuerpo contra la proteína de interés o con IgG de conejo (Sigma) o IgG de ratón, según corresponda, como control de especificidad.

El complejo proteína-ADN-anticuerpo fue precipitado incubando durante 2 h a 4°C con 80 µl de bolitas de agarosa conjugadas a proteína A bloqueadas con ADN de esperma de salmón (Millipore). Las partículas de agarosa asociadas al

complejo fueron precipitadas por una centrifugación de 1 minuto a 4000 x g. Se lavaron con dos buffer de lavado diferentes de alta concentración salina (SDS 0.1%, Tritón X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM [pH 8.1], NaCl 150 mM, y el otro buffer: SDS 0.1%, Tritón X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM [pH 8.1], NaCl 500 mM), luego con un tercer buffer de lavado de baja concentración salina (LiCl 0.25 M, NP-40 1%, deoxicolato 1%, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM [pH 8.1]), y dos lavados con Tris-EDTA (TE). El complejo proteína-ADN se obtuvo extrayendo las partículas de agarosa con 200 μ l de buffer de elución (SDS 1%, NaHCO₃ 0.1 M). La reversión del *crosslinking* del complejo proteína-ADN se realizó incubando con NaCl 0.2 M a 65°C O.N. Las proteínas de las muestras fueron digeridas por incubación con 50 μ g de proteinasa K durante 1 hora a 45°C. El ADN se extrajo mediante el *QIAquick PCR purification kit* (QIAGEN, cat # 28106) según las instrucciones del fabricante. El ADN fue resuspendido en 30 μ l de H₂O hexadestilada libre de DNAsas (Promega). Para cada PCR se utilizaron 2 μ l. Los controles provenientes del *input* se usaron en una dilución de 1:10.

Para los ensayos de re-ChIP, se utilizó 1 mg de cromatina y 12 μ g del anticuerpo correspondiente para la primera incubación. Los inmunocomplejos fueron eluidos del ChIP primario incubándolos con ditioneitol (DTT) 10 mM a 37°C durante 30 minutos. Luego se diluyeron 40 veces con buffer de inmunoprecipitación y se re-inmunoprecipitaron con 12 μ g del segundo anticuerpo, incubando O.N. a 4°C. El re-ChIP de los sobrenadantes se llevó a cabo de manera análoga a la del ChIP primario.

Extracción de ARN y transcripción reversa

El ARN total fue aislado de las células C4HD, T47D o T47D-Y-C587A crecidas en placas de 6 hoyos previamente, ayunadas durante 24 h y tratadas o no con MPA, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó mediante Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y 1 μ g de ARN se sometió a transcripción reversa mediante el uso de la enzima retrotranscriptasa SuperScript III de Invitrogen, según las indicaciones del fabricante.

El ADNc obtenido fue amplificado por PCR en tiempo real según se indica en la sección siguiente. Los *primers* utilizados para amplificar el ADNc se detallan en Tabla 1. Las veces de inducción de la expresión del ARNm de ciclina D1 se calcularon dividiendo los números arbitrarios obtenidos para cada muestra en la PCR cuantitativa por las cantidades obtenidas del control interno GAPDH, estableciendo en 1 los valores de las muestras sin tratar y determinando las veces de incremento o disminución de ARNm relativo a las muestras sin tratar.

PCR cuantitativa en tiempo real

El ADN obtenido de los ensayos de ChIP y re-ChIP o el ADNc obtenido a partir del ARN fue amplificado por reacciones de PCR en tiempo real, que se realizaron con el equipo detector ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) utilizando *SYBR green PCR master mix* de Applied Biosystems. Los *primers* utilizados en cada caso se detallan en la Tabla 1. El programa de PCR en tiempo real utilizado fue el siguiente: 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Los números de los ejes de las ordenadas de los histogramas se calcularon dividiendo los números arbitrarios obtenidos para cada muestra en la PCR cuantitativa por el *input* (ADN total), o

sobre el control de carga GAPDH para los ensayos de ARNm, estableciendo en 1 los valores de las muestras inmunoprecipitadas con IgG o de las muestras control, y determinando las veces de incremento relativo a ese punto. La significancia de las diferencias entre los tratamientos se analizó realizando un ANOVA de una vía.

Citometría de flujo

Células T47D fueron tratadas con MPA por los períodos indicados, cosechadas mediante tratamiento con tripsina y fijadas en 1% paraformaldehído. A fin de determinar la fosforilación de la serina 308 de GATA3, las células fueron permeabilizadas con bufer de permeabilización (PB) (PBS 10% SFB 0,5% saponina) y marcadas con el anticuerpo anti-pSer308-GATA3 (1 µg de anti-pSer308-GATA3 cada 1×10^6 células), seguido de incubación con un anticuerpo anti- IgG de conejo conjugado al fluoróforo Alexa 488. La señal inespecífica fue determinada mediante la incubación con un control de isotipo en reemplazo del anticuerpo primario anti-pSer308-GATA3. Las células fueron lavadas dos veces con PB, seguido de digestión con ARNasa (ARNasa A 50 U/ml) e incubación con ioduro de propidio (20 µg/ml) durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. El análisis del ciclo celular por contenido de ioduro de propidio y la determinación de los niveles de pSer308-GATA3 por fluorescencia de Alexa 488 fue realizado utilizando el citómetro de flujo Canto II (Becton–Dickinson, La Jolla, CA, USA). Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa FlowJo v5.7.2. La variación de la intensidad de fluorescencia media (MFI) fueron obtenidos mediante la substracción de la MFI

de las células incubadas con el control de isotipo a la MFI de las células incubadas con el anticuerpo anti-pSer308-GATA3.

Ensayo de sensibilidad a DNAsa I

Las células fueron cosechadas en bufer de lisis (10 mM Tris-Cl, pH 7.5; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 0.05% NP40) e incubadas en hielo por 1 minuto. Los núcleos fueron aislados mediante centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C. El pellet fue lavado con bufer de digestión (40 mM Tris-Cl pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂) y centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C. Los pellets fueron resuspendidos en 200 µl de bufer de digestión y cada tratamiento fue dividido en dos tubos (cortado y no cortado como control). Las muestras fueron incubadas o no con DNAsa I (QR1, Promega) por 5 minutos a 37°C. La reacción fue interrumpida por la adición de 50 µg de Proteinasa K e incubando 2 h a 65°C. El ADN fue aislado mediante extracción con fenol y precipitación con etanol absoluto. La sensibilidad fue calculada como $2^{(Ct_{cortado} - Ct_{no-cortado})}$.

Ensayo de fosforilación *in vitro*

Células T47D fueron cosechadas en buffer de lisis quinasa (20 mM Hepes, 10 mM EGTA, 1% NP-40, 2.5 mM MgCl₂). El lisado celular fue centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Lowry. Se procedió a realizar la inmunoprecipitación de las proteínas de interés a partir de 500 µg de proteína total para cada tratamiento en un volumen final de 300 µl. Los extractos fueron pre-clareados utilizando agarosa acoplada a proteína A durante 30 minutos, luego fueron centrifugados a 4000 rpm por 2 minutos y el sobrenadante fue

transferido a un nuevo tubo. El mismo fue incubado 2 h a 4°C con una dilución 1:100 de anticuerpo contra GATA3 (5852S, Cell Signaling), PKA-C α (4782, Cell Signaling) o IgG como control de isotipo. Luego, se incubaron los extractos con proteína A acoplada a agarosa (Millipore) durante 2 h a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar las muestras a 12000 rpm por 2 minutos. El precipitado fue lavado y centrifugado con las siguientes soluciones: una vez con solución de lavado I (PBS, 1% NP-40, 2 mM NaVO₄), una vez con solución de lavado II (100 mM Tris [ph 7.5], 0.5 M LiCl) y tres veces con buffer de reacción quinasa (12.5 mM MOPS [ph 7.5], 7.5 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 12.5 mM β -glicerofosfato, 0.5 mM NaF, 0.5 mM NaVO₄). Tras la última centrifugación, el precipitado fue resuspendido en 30 μ l de buffer de reacción quinasa, al cual se adicionó DTT a una concentración final de 3 mM y rATP a una concentración final de 100 μ M. Se co-incubaron 30 μ l del precipitado de la quinasa con 15 μ l del precipitado del sustrato durante 30 minutos a 30°C. Al finalizar la reacción, se agregó buffer de siembra (Tris-HCl 60 mM [pH 6.8], SDS 2% p/v, glicerol 10% v/v, 0.7 M 2- β mercaptoetanol y azul de bromofenol 0.1% p/v) y se resolvió mediante SDS-PAGE. Se resolvieron en paralelo 25 μ g de los extractos proteicos iniciales como control de carga.

Ensayos de proliferación

Para realizar los ensayos de proliferación con las células C4HD, se repicaron las células creciendo en DMEM-F12 + SFBch 2.5% v/v + MPA 10 nM y se sembraron 4 x 10⁴ células por hoyo en placas de 96 hoyos de fondo plano. Las células repicadas se dejaron adherir durante 24 h en DMEM-F12 + SFB 10% v/v. Dicho medio fue luego reemplazado por medio de transfección

suplementado con los diferentes vectores de expresión. Luego de 24 h, las células se incubaron durante 24 h con DMEM-F12 con o sin MPA. Todos los ensayos se realizaron por octuplicado. Se empleó el método de incorporación de timidina tritiada para evaluar la síntesis de ADN como medida de la proliferación celular. Durante las últimas 12 h de incubación de todos los tipos celulares, se aplicó un pulso de 1 μ Ci de timidina tritiada (NEN, actividad específica: 20 Ci/mmol) en cada hoyo. Los cultivos se tripsinizaron (50 μ l/hoyo) y se cosecharon en un cosechador de células Nunc. La radioactividad incorporada se midió en un contador beta de centelleo líquido (Tri-Carb2800TR, Perkin Elmer) durante 1 minuto por métodos estándar de centelleo líquido. Previamente se demostró que la incorporación de timidina tritiada se correlaciona con el número de células [98] siendo de este modo, un método apropiado para medir proliferación celular. La incorporación de timidina tritiada se muestra como cuentas por minuto (cpm).

Análisis estadístico

En cada experimento individual se promediaron los octuplicados, se calcularon las cpm \pm SD (desviación estándar) y se evaluó la significancia estadística mediante un test de ANOVA. Para la comparación de distintos tratamientos entre sí, se usó el test de Tukey después del ANOVA.

Experimentos *in vivo*

Células C4HD fueron transfectadas con los plásmidos indicados. Luego de 48 h de transfección se reemplazó el medio de transfección por PBS + EDTA 1mM que se mantuvo durante 30 minutos para obtener las células en suspensión. Después de una breve centrifugación, las células fueron resuspendidas en

DMEM-F12. Un millón de células C4HD de cada grupo experimental fue inyectado subcutáneamente (s.c.) en ratones hembras vírgenes de la cepa BALB/c. Simultáneamente, los ratones fueron inyectados s.c. con un depósito de 40 mg de MPA en el flanco de la región tóraco-ventral opuesto al inóculo de células. Los tumores de todos los grupos fueron medidos tres veces por semana con un calibre vernier. El volumen tumoral (mm^3) fue calculado como $(L \times A^2)/2$, donde L=largo (mm) y A=ancho (mm). El área bajo la curva de crecimiento para cada tumor fue calculada utilizando el *software* GraphPad Prism.

Inmunohistoquímica

Los tejidos fijados en formol durante 16-20 h y luego embebidos en parafina. Posteriormente fueron cortados en secciones de 4 μm , y luego desparafinados en xileno y alcoholes de distinta gradación. Las tinciones fueron realizadas manualmente, las peroxidasas endógenas fueron bloqueadas con peróxido de hidrógeno 2% durante 30 min, y la recuperación de antígenos se realizó durante 50 minutos a 92° C con buffer citrato pH 6 (10 mM Sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0). Los cortes fueron bloqueados con 2.5% BSA en PBS 1X por 30 minutos. . Se incubó con el anticuerpo secundario 1/400 en 2.5% BSA en PBS 1X por 30 minutos, y tras lavar 3 veces con PBS se incubó con la solución de desarrollo (DAB + DAB buffer, Cell Marque). La reacción fue detenida mediante lavado con H₂O destilada, tras lo cual se procedió a la tinción con hematoxilina durante 5 minutos. Luego las muestras fueron deshidratadas y montadas en portaobjetos. Las fotos fueron adquiridas mediante un microscopio confocal Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments).

BIBLIOGRAFÍA

1. Brisken, C., et al., *A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5076-81.
2. Kraus, W.L., M.M. Montano, and B.S. Katzenellenbogen, *Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(12): p. 1603-16.
3. Kastner, P., et al., *Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B*. EMBO J, 1990. **9**(5): p. 1603-14.
4. Tung, L., et al., *Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(11): p. 2656-70.
5. Tung, L., et al., *Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(10): p. 1256-65.
6. Ballare, C., et al., *Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 1994-2008.
7. Boonyaratanakornkit, V., et al., *Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases*. Mol Cell, 2001. **8**(2): p. 269-80.
8. Carnevale, R.P., et al., *Progestin effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(6): p. 1335-58.
9. Proietti, C., et al., *Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(12): p. 4826-40.
10. Diaz Flaque, M.C., et al., *Progesterone receptor assembly of a transcriptional complex along with activator protein 1, signal transducer and activator of transcription 3 and ErbB-2 governs breast cancer growth and predicts response to endocrine therapy*. Breast Cancer Res, 2013. **15**(6): p. R118.
11. Diaz Flaque, M.C., et al., *Progestin drives breast cancer growth by inducing p21(CIP1) expression through the assembly of a transcriptional*

- complex among Stat3, progesterone receptor and ErbB-2*. Steroids, 2013. **78**(6): p. 559-67.
12. Proietti, C.J., et al., *Novel role of signal transducer and activator of transcription 3 as a progesterone receptor coactivator in breast cancer*. Steroids, 2011. **76**(4): p. 381-92.
 13. Lydon, J.P., et al., *Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities*. Genes Dev, 1995. **9**(18): p. 2266-78.
 14. Neville, M.C., T.B. McFadden, and I. Forsyth, *Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002. **7**(1): p. 49-66.
 15. Nguyen, D.A., A.F. Parlow, and M.C. Neville, *Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation*. J Endocrinol, 2001. **170**(2): p. 347-56.
 16. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
 17. Beral, V., *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 419-27.
 18. Chlebowski, R.T., et al., *Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial*. JAMA, 2003. **289**(24): p. 3243-53.
 19. Lanari, C., et al., *Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines*. Int J Cancer, 1989. **43**(5): p. 845-50.
 20. Lydon, J.P., et al., *Murine mammary gland carcinogenesis is critically dependent on progesterone receptor function*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4276-84.
 21. Evans, T., M. Reitman, and G. Felsenfeld, *An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(16): p. 5976-80.
 22. Dereeper, A., et al., *Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Web Server issue): p. W465-9.
 23. Rekhtman, N., et al., *Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells*. Genes Dev, 1999. **13**(11): p. 1398-411.
 24. Sundrud, M.S., et al., *Genetic reprogramming of primary human T cells reveals functional plasticity in Th cell differentiation*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3542-9.

25. Kouros-Mehr, H., et al., *GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland*. Cell, 2006. **127**(5): p. 1041-55.
26. Pandolfi, P.P., et al., *Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis*. Nat Genet, 1995. **11**(1): p. 40-4.
27. Asselin-Labat, M.L., et al., *Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(2): p. 201-9.
28. Kouros-Mehr, H., et al., *GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model*. Cancer Cell, 2008. **13**(2): p. 141-52.
29. Asselin-Labat, M.L., et al., *Gata-3 negatively regulates the tumor-initiating capacity of mammary luminal progenitor cells and targets the putative tumor suppressor caspase-14*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(22): p. 4609-22.
30. Ciocca, V., et al., *The significance of GATA3 expression in breast cancer: a 10-year follow-up study*. Hum Pathol, 2009. **40**(4): p. 489-95.
31. Mehra, R., et al., *Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11259-64.
32. Yoon, N.K., et al., *Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer*. Hum Pathol, 2010. **41**(12): p. 1794-801.
33. *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
34. Gaynor, K.U., et al., *GATA3 mutations found in breast cancers may be associated with aberrant nuclear localization, reduced transactivation and cell invasiveness*. Horm Cancer, 2013. **4**(3): p. 123-39.
35. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1039-43.
36. Cao, R., Y. Tsukada, and Y. Zhang, *Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 845-54.
37. Francis, N.J., R.E. Kingston, and C.L. Woodcock, *Chromatin compaction by a polycomb group protein complex*. Science, 2004. **306**(5701): p. 1574-7.
38. Simon, J., et al., *Elements of the Drosophila bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products*. Dev Biol, 1993. **158**(1): p. 131-44.

39. Orsi, G.A., et al., *High-resolution mapping defines the cooperative architecture of Polycomb response elements*. *Genome Res*, 2014. **24**(5): p. 809-20.
40. Chen, Y.H., M.C. Hung, and L.Y. Li, *EZH2: a pivotal regulator in controlling cell differentiation*. *Am J Transl Res*, 2012. **4**(4): p. 364-75.
41. Shin, D.M., et al., *Global gene expression analysis of very small embryonic-like stem cells reveals that the Ezh2-dependent bivalent domain mechanism contributes to their pluripotent state*. *Stem Cells Dev*, 2012. **21**(10): p. 1639-52.
42. Bracken, A.P., et al., *Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions*. *Genes Dev*, 2006. **20**(9): p. 1123-36.
43. Pal, B., et al., *Global changes in the mammary epigenome are induced by hormonal cues and coordinated by Ezh2*. *Cell Rep*, 2013. **3**(2): p. 411-26.
44. He, A., et al., *PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity*. *Genes Dev*, 2012. **26**(1): p. 37-42.
45. Morin, R.D., et al., *Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin*. *Nat Genet*, 2010. **42**(2): p. 181-5.
46. Varambally, S., et al., *The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer*. *Nature*, 2002. **419**(6907): p. 624-9.
47. Xu, K., et al., *EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent*. *Science*, 2012. **338**(6113): p. 1465-9.
48. Bachmann, I.M., et al., *EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(2): p. 268-73.
49. Alford, S.H., et al., *Increased risk for distant metastasis in patients with familial early-stage breast cancer and high EZH2 expression*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **132**(2): p. 429-37.
50. Cao, Q., et al., *Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer*. *Oncogene*, 2008. **27**(58): p. 7274-84.
51. Holm, K., et al., *Global H3K27 trimethylation and EZH2 abundance in breast tumor subtypes*. *Mol Oncol*, 2012. **6**(5): p. 494-506.
52. Granit, R.Z., et al., *EZH2 promotes a bi-lineage identity in basal-like breast cancer cells*. *Oncogene*, 2013. **32**(33): p. 3886-95.

53. Pagano, M., et al., *Cyclin A is required at two points in the human cell cycle*. EMBO J, 1992. **11**(3): p. 961-71.
54. Girard, F., et al., *Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1169-79.
55. Bortner, D.M. and M.P. Rosenberg, *Overexpression of cyclin A in the mammary glands of transgenic mice results in the induction of nuclear abnormalities and increased apoptosis*. Cell Growth Differ, 1995. **6**(12): p. 1579-89.
56. Klintman, M., et al., *The prognostic value of mitotic activity index (MAI), phosphohistone H3 (PPH3), cyclin B1, cyclin A, and Ki67, alone and in combinations, in node-negative premenopausal breast cancer*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e81902.
57. Chu, I.M., et al., *Expression of GATA3 in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells induces a growth inhibitory response to TGFss*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61125.
58. Lanari, C., A.A. Molinolo, and C.D. Pasqualini, *Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice*. Cancer Lett, 1986. **33**(2): p. 215-23.
59. Lange, C.A., T. Shen, and K.B. Horwitz, *Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1032-7.
60. Sartorius, C.A., et al., *New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogestin-occupied B-receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP*. Cancer Res, 1994. **54**(14): p. 3868-77.
61. Quandt, K., et al., *MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(23): p. 4878-84.
62. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Res, 2011. **21**(3): p. 381-95.
63. Phatnani, H.P. and A.L. Greenleaf, *Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD*. Genes Dev, 2006. **20**(21): p. 2922-36.
64. Truss, M., et al., *Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo*. EMBO J, 1995. **14**(8): p. 1737-51.
65. Licata, L.A., et al., *The RNA-binding protein HuR regulates GATA3 mRNA stability in human breast cancer cell lines*. Breast Cancer Res Treat. **122**(1): p. 55-63.

66. Adomas, A.B., et al., *Breast tumor specific mutation in GATA3 affects physiological mechanisms regulating transcription factor turnover*. BMC Cancer, 2014. **14**(1): p. 278.
67. Yamashita, M., et al., *Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2 differentiation through ubiquitin-proteasome pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29409-19.
68. Shen, T., K.B. Horwitz, and C.A. Lange, *Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(18): p. 6122-31.
69. Bouchard, M.F., H. Taniguchi, and R.S. Viger, *Protein kinase A-dependent synergism between GATA factors and the nuclear receptor, liver receptor homolog-1, regulates human aromatase (CYP19) PII promoter activity in breast cancer cells*. Endocrinology, 2005. **146**(11): p. 4905-16.
70. Izzo, F., et al., *Progesterone receptor activation downregulates GATA3 by transcriptional repression and increased protein turnover promoting breast tumor growth*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(6): p. 491.
71. Groshong, S.D., et al., *Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1)*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(11): p. 1593-607.
72. Skildum, A., E. Faivre, and C.A. Lange, *Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(2): p. 327-39.
73. Diaz Flaque, M.C., et al., *Progesterone receptor assembly of a transcriptional complex along with activator protein 1, signal transducer and activator of transcription 3 and ErbB-2 governs breast cancer growth and predicts response to endocrine therapy*. Breast Cancer Res, 2013. **15**(6): p. R118.
74. Shan, L., et al., *GATA3 cooperates with PARP1 to regulate CCND1 transcription through modulating histone H1 incorporation*. Oncogene, 2014. **33**(24): p. 3205-16.
75. Musgrove, E.A. and R.L. Sutherland, *Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(9): p. 631-43.
76. Knutson, T.P. and C.A. Lange, *Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer*. Pharmacol Ther, 2014. **142**(1): p. 114-25.
77. Titus-Ernstoff, L., et al., *Menstrual factors in relation to breast cancer risk*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1998. **7**(9): p. 783-9.

78. Barton, M., J. Santucci-Pereira, and J. Russo, *Molecular pathways involved in pregnancy-induced prevention against breast cancer*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014. **5**: p. 213.
79. Belitskaya-Levy, I., et al., *Characterization of a genomic signature of pregnancy identified in the breast*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011. **4**(9): p. 1457-64.
80. Peri, S., et al., *Defining the genomic signature of the parous breast*. *BMC Med Genomics*, 2012. **5**: p. 46.
81. Russo, J., et al., *Pregnancy-induced chromatin remodeling in the breast of postmenopausal women*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(5): p. 1059-70.
82. Henderson, B.E. and H.S. Feigelson, *Hormonal carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(3): p. 427-33.
83. Han, S.J., et al., *Distinct temporal and spatial activities of RU486 on progesterone receptor function in reproductive organs of ovariectomized mice*. *Endocrinology*, 2007. **148**(5): p. 2471-86.
84. Perrault, D., et al., *Phase II study of the progesterone antagonist mifepristone in patients with untreated metastatic breast carcinoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study*. *J Clin Oncol*, 1996. **14**(10): p. 2709-12.
85. Clark, R.D., *Glucocorticoid receptor antagonists*. *Curr Top Med Chem*, 2008. **8**(9): p. 813-38.
86. Robertson, J.F., et al., *Onapristone, a progesterone receptor antagonist, as first-line therapy in primary breast cancer*. *Eur J Cancer*, 1999. **35**(2): p. 214-8.
87. Nickisch, K., et al., *Synthesis and antiprogestational properties of novel 17-fluorinated steroids*. *Steroids*, 2013. **78**(9): p. 909-19.
88. Yang, C.H., et al., *Bortezomib (VELCADE) in metastatic breast cancer: pharmacodynamics, biological effects, and prediction of clinical benefits*. *Ann Oncol*, 2006. **17**(5): p. 813-7.
89. Engel, R.H., et al., *A phase II study of single agent bortezomib in patients with metastatic breast cancer: a single institution experience*. *Cancer Invest*, 2007. **25**(8): p. 733-7.
90. Yoon, N.K., et al., *Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer*. *Hum Pathol*. **41**(12): p. 1794-801.
91. Yamane, H., J. Zhu, and W.E. Paul, *Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4+ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment*. *J Exp Med*, 2005. **202**(6): p. 793-804.

92. Molinolo, A.A., et al., *Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors*. J Natl Cancer Inst, 1987. **79**(6): p. 1341-50.
93. Balana, M.E., et al., *Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas*. Oncogene, 1999. **18**(46): p. 6370-9.
94. Labriola, L., et al., *Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(3): p. 1095-111.
95. Pandis, N., et al., *Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 1992. **5**(1): p. 14-20.
96. Keydar, I., et al., *Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin*. Eur J Cancer, 1979. **15**(5): p. 659-70.
97. Lee, F., et al., *Glucocorticoids regulate expression of dihydrofolate reductase cDNA in mouse mammary tumour virus chimaeric plasmids*. Nature, 1981. **294**(5838): p. 228-32.
98. Dran, G., et al., *Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma*. Breast Cancer Res Treat, 1995. **35**(2): p. 173-86.