



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

## **Mecanismos de regulación de la expresión de ZFP36/TTP en células tumorales mamarias**

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área  
Química Biológica

**Lic. Emilia Soledad Bogni**

Directora de Tesis: Dra. Edith Kordon

Consejera de Estudios: Dra. Virginia Dansey

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias  
(IFIBYNE) UBA-CONICET

Buenos Aires, 2025

# ÍNDICE

---

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	12
LA GLÁNDULA MAMARIA.....	12
CÁNCER DE MAMA.....	19
TRISTETRAPROLINA (TTP).....	24
POLIMORFISMOS DEL GEN ZFP36/TTP.....	27
MECANISMOS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICOS.....	28
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
ASPECTOS ÉTICOS.....	30
REACTIVOS UTILIZADOS.....	30
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	32
GENOTIPIFICACIÓN DE MUESTRAS MEDIANTE PCR-RFLP.....	32
CULTIVO CELULAR.....	33
CLONADO DEL PROMOTOR HUMANO DE ZFP36.....	34
PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.....	35
AMPLIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS - TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.....	35
MAXI-PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS.....	36
TRANSFECCIONES TRANSITORIAS.....	37
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA Y DE $\beta$ -GALACTOSIDASA.....	37
ANÁLISIS DE PROTEÍNAS – PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS Y WESTERN BLOT.....	38
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.....	39
PREPARACIÓN DE ARN TOTAL.....	41
TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR EN TIEMPO REAL.....	41
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
RESULTADOS.....	44
LA PRESENCIA DE GUANINA (G) EN EL POLIMORFISMO (SNP) RS251864 ESTÁ ASOCIADA A UNA MENOR EXPRESIÓN DE TTP EN TUMORES Y LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA LUMINAL.....	44

INDUCCIÓN DIFERENCIAL DE ZFP36/TTP EN CÉLULAS MCF7 Y T-47D EN RESPUESTA AL SUERO.....	52
AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE ZFP36/TTP DE CÉLULAS MCF7 Y T-47D.....	54
LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE ZFP36/TTP EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS ESTÁ REGULADA POR MECANISMOS EPIGENÉTICOS.....	61
LA DISMINUCIÓN EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE TTP CONFIERE CARACTERÍSTICAS PRO-TUMORALES A LAS CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS.....	67
DISCUSIÓN.....	74
CONCLUSIONES.....	82
BIBLIOGRAFÍA.....	83

# ABREVIATURAS

---

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AP-1: Proteína Activadora -1

ARE: Adenine-uracil Rich Element

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

AUBP: Adenine-Uracil Binding Protein

AzaC: 5-Azaciditina

BSA: Albúmina Sérica Bovina

DMNT: DNA methyltransferase

ECM: Matriz extracelular

EGF: Epidermal Growth Factor

ER: Receptor de Estrógenos

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor2

HRP: horseradish peroxidase

IHQ: Inmunohistoquímica

IL-6: Interleuquina 6

JAK: Janus Kinase

KO: Knock-Out

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MMP: Metaloproteinasas

NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor-kappa B

OSM: Oncostatina M

PG: Progesterona

PGR o PR: Receptor de progesterona

PRL: Prolactina

PRLR: Receptor de prolactina

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

RNAseq: Secuenciación del ARN

SEM: Error estándar de la media

SFB: Suero Fetal Bovino

shRNA: Short Hairpin RNA

SNP: single nucleotide polymorphism

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TEB: Terminal End Buds

TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor

TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

TTP: Tristetraprolina

UTR: Untranslated Region

WB: Western Blot

Zfp36: Zinc Finger Protein 36

# Mecanismos de regulación de la expresión de ZFP36/TTP en células tumorales mamarias

## RESUMEN

---

Tristetraprolina (TTP) es una proteína, codificada por el gen ZFP36, que induce la degradación de ARNs mensajeros (ARNm) que contienen secuencias blanco específicas en sus 3'UTRs. Particularmente, ha sido reportado que presenta actividad sobre citoquinas proinflamatorias ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, LIF, CSF2, IL-10), sobre ARNm que codifican para oncogenes como c-Myc y Ciclina D, factores angiogénicos como VEGF y proteínas que degradan la matriz extracelular, entre otras. Debido a la regulación negativa que ejerce sobre estos blancos, TTP también actúa como supresor tumoral inhibiendo el crecimiento e invasividad de las células malignas. Resultados propios y de otros grupos muestran que un déficit en la expresión de ZFP36 está asociado a tumores mamarios de peor pronóstico. Asimismo, entre los factores de transcripción que han sido descritos como reguladores de la expresión de TTP en la glándula mamaria se encuentran P-STAT5, NF- $\kappa$ B, AP-1 y LXR, entre otros.

Por otro lado, se ha reportado un SNP (single nucleotide polymorphism) localizado en el promotor de ZFP36, que presenta las variantes A, G o T. Ha sido reportado que el genotipo AG ó GG, comparado con el genotipo AA, está asociado a un peor pronóstico para pacientes caucásicas con cáncer de mama en EEUU. Datos provenientes de proyectos genómicos internacionales indican que dicha mutación presenta una frecuencia de alrededor del 50% en la población del continente americano, pero se desconocía este dato para nuestro país. A su vez, está reportado por otros autores que la presencia del polimorfismo afectaría particularmente a secuencias regulatorias que interactúan con factores de

transcripción como AP-1, LXR y otros, pero se desconocían los mecanismos moleculares específicos, así como el efecto de posibles reguladores epigenéticos. Basados en estos antecedentes, en este trabajo de Tesis nos propusimos analizar los mecanismos involucrados en la asociación del polimorfismo rs251864 A>G con la prognosis del cáncer de mama luminal.

En primer lugar, elaboramos un protocolo experimental que nos permitiera verificar el genotipo del polimorfismo rs251864, en muestras de pacientes y en líneas celulares de cáncer de mama humano. Para ello pusimos a punto una técnica de RFLP a partir de cebadores de diseño propio que permiten la genotipificación de muestras humanas con una efectividad del 100% y de una manera sencilla y económica. En particular, logramos genotipar una cohorte de 20 pacientes de cáncer de mama ER+PR+ provenientes del hospital "Magdalena V de Martinez" de Pacheco en la Provincia de Buenos Aires. Si bien necesitaríamos aumentar el número de muestras analizadas, pudimos constatar que la incidencia del alelo G en dicha cohorte es de aproximadamente un 75%, y que este genotipo se encontró asociado a una menor expresión de TTP medida por inmunohistoquímica (IHQ). A su vez, determinamos el genotipo de dos líneas celulares tumorales de amplio uso en la investigación en cáncer de mama: la línea T-47D, que presenta genotipo G/G y la línea MCF-7 que presenta genotipo A/A, las cuales utilizamos para realizar ensayos *in vitro*. Determinamos que la línea celular T-47D presenta una expresión basal de TTP significativamente menor que la línea MCF7.

En la región proximal al polimorfismo, identificamos sitios de unión para varios factores de transcripción: AP-1, LXR, ER y STAT3, entre otros. Sin embargo, realizando análisis de ChIP-seq, determinamos que STAT3 fosforilado es el factor que se une con mayor probabilidad a nuestra región de interés en el promotor de ZFP36. Ensayos realizados con estímulos con Suero Fetal Bovino (SFB), un inductor rápido de la expresión de ZFP36/TTP, revelaron que la línea celular MCF7 presenta un aumento significativo de la transcripción de dicho gen, mientras que las células T-47D se inducen en un nivel significativamente menor, y a tiempos posteriores. Hipotetizamos que estos efectos podrían estar regulados por mecanismos epigenéticos de represión asociados a la presencia del alelo G, y para comprobarlo realizamos ensayos con 5-Azacidina (AzaC) un inhibidor de las ADN metiltransferasas (DNMTs). Nuestros resultados indican que el tratamiento con

AzaC aumenta la sensibilidad de las células T-47D al estímulo con suero, que presentan una inducción equivalente a la observada en la línea MCF7 sin tratar con AzaC.

El análisis de datos bioinformáticos de metilación del ADN en pacientes de cáncer de mama con distintos subtipos, indica que no existe una asociación significativa entre la metilación de la región proximal al polimorfismo y la disminución en la expresión de TTP, pero que esta correlación sí es significativa cuando se considera al promotor de ZFP36/TTP en su conjunto. Estos resultados sugieren que la metilación del ADN es un mecanismo regulatorio relevante de la expresión de TTP en el contexto tumoral mamario.

A partir de nuestros experimentos utilizando plásmidos reporteros conteniendo las dos variantes del polimorfismo, pudimos determinar que los factores de transcripción STAT3 fosforilado y AP-1 son los principales efectores de la respuesta a suero. A su vez, observamos que el rol de cada uno es diferente según si está presente la variante A o G del SNP rs251864.

Finalmente, realizamos una secuenciación del ARN total (RNA-seq) de un modelo de sub-expresión de TTP previamente puesto a punto en nuestro laboratorio. Los resultados de nuestros análisis indican que la disminución en la expresión de TTP produce un aumento en las vías de señalización vinculadas a la transcripción global del ARN, la represión de la diferenciación celular epitelial, la proliferación celular, la transducción de señales y el remodelado de la matriz extracelular, entre otras características pro-tumorales.

Basado en estos resultados proponemos al SNP rs251864 como un biomarcador genético que puede ser efectivo en la toma de decisiones terapéuticas para pacientes con cáncer de mama luminal.

Palabras clave: Tristetraprolina, Polimorfismo, Metilación del ADN, Cáncer de mama luminal

# Mechanisms regulating ZFP36/TTP expression in breast tumor cells

## ABSTRACT

---

Tristetraprolin (TTP) is a protein, encoded by the ZFP36 gene, which induces the degradation of messenger RNAs (mRNAs) containing specific target sequences in their 3'UTRs. Particularly, it has been reported to have activity on proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-6, LIF, CSF2, IL-10), on mRNAs encoding oncogenes such as c-Myc and Cyclin D, angiogenic factors such as VEGF and proteins that degrade the extracellular matrix, among others. Due to the negative regulation it exerts on these targets, TTP also acts as a tumor suppressor by inhibiting the growth and invasiveness of malignant cells. Our own results and those of other groups show that a deficit in ZFP36 expression is associated with breast tumors of poorer prognosis. Likewise, among the transcription factors that have been described as regulators of TTP expression in the mammary gland are P-STAT5, NF- $\kappa$ B, AP-1 and LXR, among others.

On the other hand, a SNP (single nucleotide polymorphism) located in the ZFP36 promoter has been reported, which presents the variants A, G or T. It has been reported that the AG or GG genotype, compared to the AA genotype, is associated with a poorer prognosis for Caucasian patients with breast cancer in the USA. Data from international genomic projects indicate that this mutation has a frequency of around 50% in the population of the American continent, but this data was unknown for our country. In turn, it is reported by other authors that the presence of the polymorphism would particularly affect regulatory sequences that

interact with transcription factors such as AP-1, LXR and others, but the specific molecular mechanisms, as well as the effect of possible epigenetic regulators, were unknown. Based on this background, in this Thesis work we set out to analyze the mechanisms involved in the association of the rs251864 A>G polymorphism with the prognosis of luminal breast cancer.

First, we developed an experimental protocol that allowed us to verify the genotype of the rs251864 polymorphism in patient samples and in human breast cancer cell lines. To do this, we set up an RFLP technique from our own design primers that allow the genotyping of human samples with 100% effectiveness and in a simple and economical way. In particular, we were able to genotype a cohort of 20 ER+PR+ breast cancer patients from the "Magdalena V de Martinez" hospital in Pacheco in the Province of Buenos Aires. Although we would need to increase the number of samples analyzed, we were able to verify that the incidence of the G allele in this cohort is approximately 75%, and that this genotype was associated with a lower expression of TTP measured by immunohistochemistry (IHC). In turn, we determined the genotype of two tumor cell lines widely used in breast cancer research: the T-47D line, which has a G/G genotype, and the MCF-7 line, which has an A/A genotype, which we used to perform in vitro assays. We determined that the T-47D cell line has a significantly lower basal expression of TTP than the MCF7 line.

In the region proximal to the polymorphism, we identified binding sites for various transcription factors: AP-1, LXR, ER and STAT3, among others. However, by performing ChIP-seq analyzes, we determined that phosphorylated STAT3 is the factor that is most likely to bind to our region of interest in the ZFP36 promoter. Assays performed with stimuli with Fetal Bovine Serum (FBS), a rapid inducer of ZFP36/TTP expression, revealed that the MCF7 cell line presents a significant increase in the transcription of said gene, while T-47D cells are induced at a significantly lower level, and at later times. We hypothesize that these effects could be regulated by epigenetic repression mechanisms associated with the presence of the G allele, and to verify this we performed assays with 5-Azacytidine (AzaC), an inhibitor of DNA methyltransferases (DNMTs). Our results indicate that treatment with AzaC increases the sensitivity of T-47D cells to serum stimulus, which show an induction equivalent to that observed in the MCF7 line without AzaC treatment.

The analysis of bioinformatic data of DNA methylation in breast cancer patients with different subtypes indicates that there is no significant association between the methylation of the region proximal to the polymorphism and the decrease in TTP expression, but that this correlation is significant when the ZFP36/TTP promoter is considered as a whole. These results suggest that DNA methylation is a relevant regulatory mechanism of TTP expression in the mammary tumor context.

From our experiments with reporter plasmids containing the two variants of the polymorphism, we were able to determine that the phosphorylated STAT3 and AP-1 transcription factors are the main effectors of the serum response. In turn, we observed that the role of each one is different depending on whether the A or G variant of the rs251864 SNP is present.

Finally, we performed a total RNA sequencing (RNA-seq) of a TTP sub-expression model previously set up in our laboratory. The results of our analyzes indicate that the decrease in TTP expression produces an increase in the signaling pathways linked to global RNA transcription, repression of epithelial cell differentiation, cell proliferation, signal transduction and remodeling of the extracellular matrix, among other pro-tumor characteristics.

Based on these results, we propose the rs251864 SNP as a genetic biomarker that can be effective in making therapeutic decisions for patients with luminal breast cancer.

Keywords: Tristetraprolin, Polymorphism, DNA Methylation, Luminal breast cancer

# INTRODUCCIÓN

---

## LA GLÁNDULA MAMARIA

Los mamíferos (clase Mammalia) se caracterizan de manera única por la aparición evolutiva de la glándula mamaria, órgano secretorio cuya principal función fisiológica consiste en la producción de leche, alimento primordial del neonato. La glándula mamaria contiene un epitelio que a lo largo de la vida de las hembras atraviesa ciclos de morfogénesis de ramificación (*branching* en inglés) y lobulillar, diferenciación secretora y regresión correspondientes con la preñez, la lactancia y la involución (Masso-Welch et al., 2000). En el ratón hay 5 pares de mamas ubicadas en la región ventral, desde el tórax hasta la ingle, que contienen dos compartimentos: el epitelial (o parénquima) y el estromal (o mesénquima), un pezón exterior (al que se libera la leche durante la lactancia) y un nódulo linfático (Andrechek, Mori et al., 2008). En los humanos se observa el desarrollo de un solo par de glándulas mamarias, aunque los conductos de ambas especies contienen células epiteliales similares y sufren procesos de diferenciación muy parecidos, que describiremos a continuación.

### Desarrollo de la glándula mamaria

#### Desde el embrión hasta la pubertad

El desarrollo mamario ocurre fundamentalmente después del nacimiento de la hembra. Sin embargo, durante la etapa embrionaria se produce la especificación de la línea mamaria a partir del ectodermo, que deriva en placodas. Reguladas por interacciones epitelio-mesenquimales, las placodas descienden al mesénquima subyacente, formando una estructura ductal rudimentaria, que invade las almohadillas de grasa subcutáneas (*fat pads* en inglés) (Macias & Hinck 2012) (Figura I1 A). Esta estructura epitelial permanece quiescente hasta el advenimiento

de la pubertad, momento en el que aumentan los niveles circulantes de Hormona de crecimiento, Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1, en inglés) y Estrógeno (Macias & Hinck, 2012), generando un proceso de elongación ductal, que continúa hasta que los denominados botones terminales de los conductos mamarios o TEBs (del inglés *terminal end buds*), alcanzan el límite de la almohadilla.

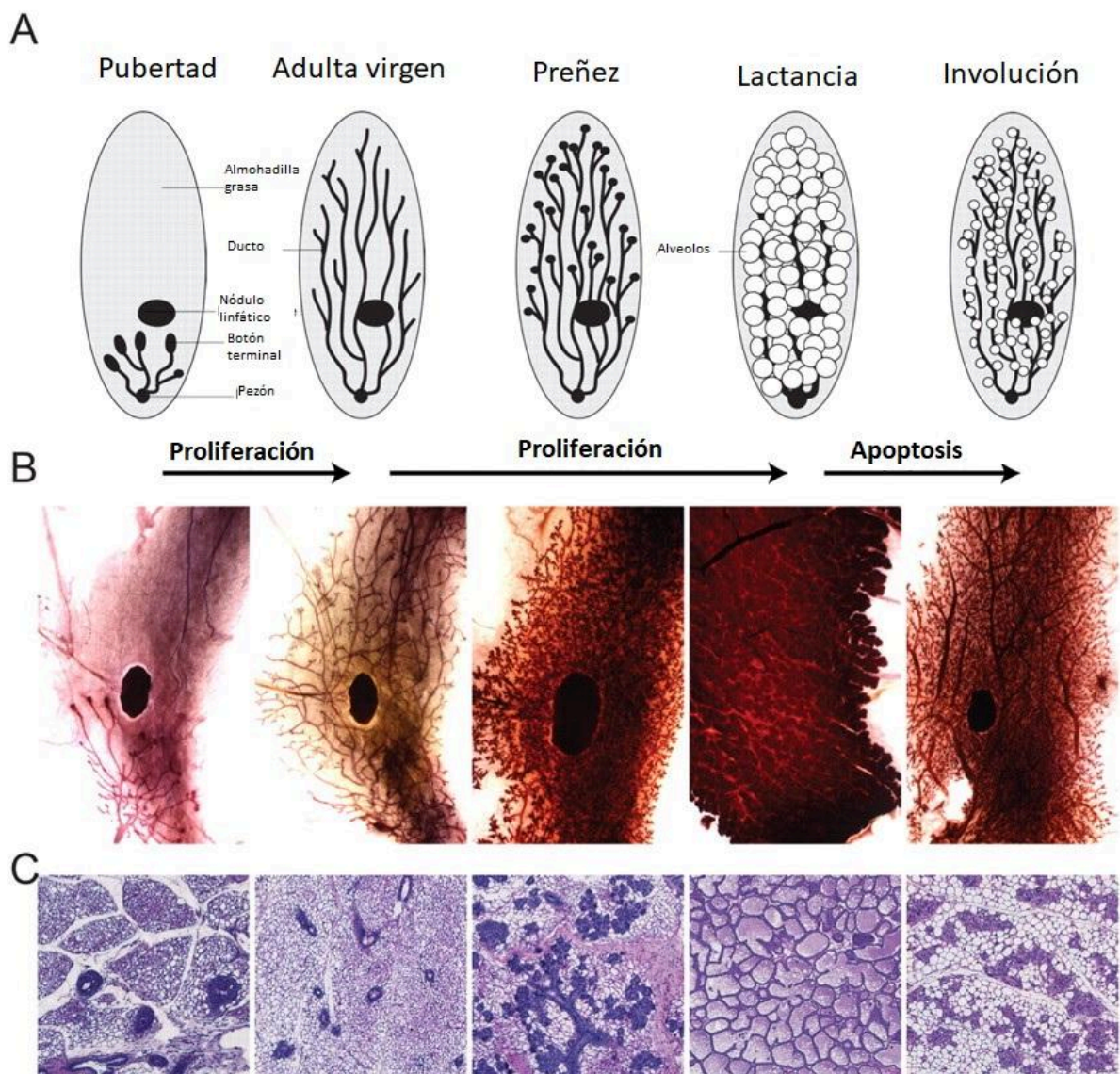


Figura 11. Desarrollo de la glándula mamaria. A. Esquema ilustrando el desarrollo de la glándula mamaria del ratón. Cada estadio del esquema está acompañado por (B) fotografías de montaje completo (*whole mounts* en inglés) de mamas en cada estadio correspondiente e (C) imágenes histológicas representativas. Modificado de Andrechek et. al. (2008).

El estrógeno, un ligando soluble en la membrana plasmática, es secretado por los ovarios y activa la expresión génica a través de receptores intracelulares. El estrógeno estimula el crecimiento ductal mamario y su actividad puede ser bloqueada por la administración de tamoxifeno, antagonista de su receptor (ER) (Silberstein et al., 1994). Este compuesto sigue siendo hoy en día la principal terapia utilizada en el tratamiento del cáncer de mama luminal, subtipo que se caracteriza por la expresión del ER (Yu, Iftimi et al. 2019).

### La lactancia

La glándula mamaria debe experimentar numerosos cambios para prepararse para la lactancia. Estas transformaciones requieren tanto de un incremento de las ramificaciones ductales como de la alveologénesis, y están principalmente bajo el control de las hormonas prolactina y progesterona (Traurig et al. 1967). La progesterona, al igual que el estrógeno, es una hormona ovárica soluble en membrana que señala a través de receptores intracelulares para posibilitar el crecimiento epitelial en la glándula mamaria (Lydon et al., 1995). La progesterona es la responsable del extenso *branching* lateral y la alveologénesis necesarias para crear una glándula competente para la lactancia. En combinación con la prolactina, también promueve la diferenciación de estructuras especializadas, los alvéolos, que sintetizan y secretan leche durante la lactancia (Briskin et al. 1998).

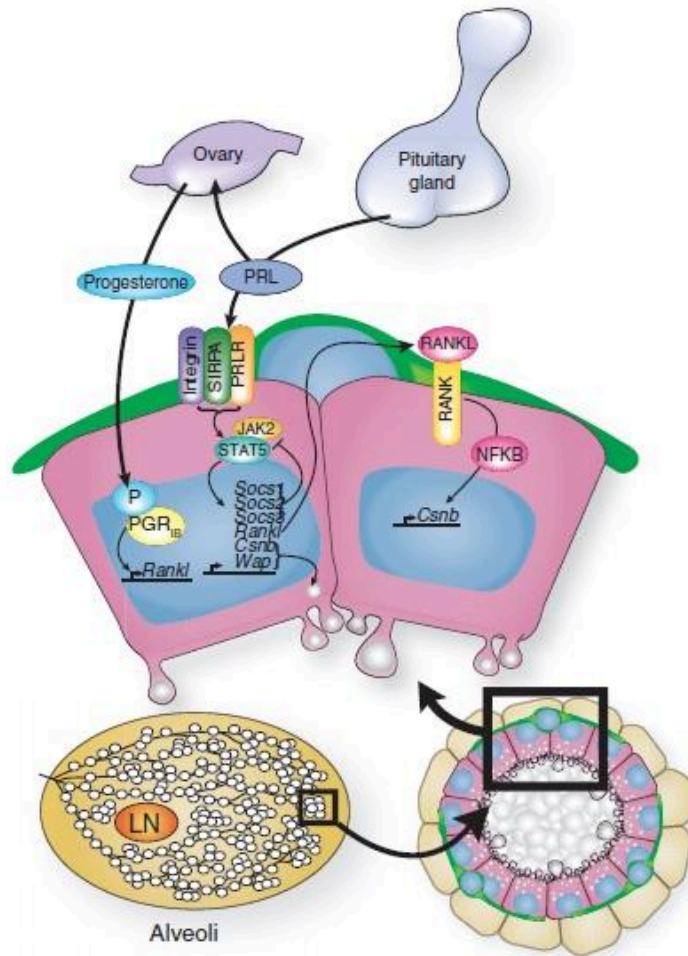


Figura 12. Esquema de las vías de señalización responsables de la generación del epitelio mamario secretor. Los alveolos se desarrollan en lobulillos productores de leche regulados por la prolactina (PRL), mediante una señalización en conjunto con la progesterona. Ambas hormonas regulan programas transcripcionales que incluyen el control de Rankl (TNFSF11), el cual señala de manera paracrina para estimular la proliferación a través del receptor RANK en células vecinas. La progesterona estimula la ramificación ductal secundaria y terciaria, mientras que la PRL integra muchas señales, incluyendo las de la matriz extracelular (MEC) al interactuar con la integrina a través de la proteína transmembrana reguladora de señales alfa (SIRPA). La PRL transduce esta información a través de vías, como las mediadas por JAK2/STAT5, cuyos objetivos río abajo incluyen los genes de la leche caseína beta (Csnb) y proteína ácida del suero (Wap). Adaptado de Macias & Hinck 2012.

La unión de la progesterona a su receptor (PGR) genera una señalización río abajo caracterizada por la presencia de RANKL (ligando activador del receptor de NFκB1), mediador paracrina clave de la proliferación celular inducida por progesterona (Macias & Hinck 2012). Numerosos estudios han demostrado que

RANKL es inducido por la progesterona, específicamente en las células epiteliales luminales PGR-positivas. Datos recientes sugieren que es la señal paracrina que indica a las células vecinas PGR-negativas que proliferen (Figura I2). Este papel central de RANKL en la estimulación del crecimiento celular en respuesta a progesterona se evidencia al evaluar su responsabilidad en impulsar la proliferación celular en cánceres de mama dependientes de progestágenos (Fata et al., 2000; Schramek et al., 2010). Esto ha llevado a la idea de que los inhibidores de RANKL podrían ser blancos terapéuticos promisorios para el tratamiento del cáncer de mama (Gonzalez-Suarez et al., 2010).

La prolactina es una hormona polipeptídica producida principalmente por la hipófisis, pero también por otros tejidos, como el epitelio mamario. Su señalización es esencial para la proliferación y la diferenciación de las estructuras lóbulo-alveolares de la glándula mamaria durante la preñez (Topper & Freeman, 1980). La unión a su receptor (PRLR) resulta en la activación de varias vías de señalización, incluyendo Jak/Stat, Map Kinasa y fosfoinosítido (PI) 3 kinasa (Figura I2). En particular, se activa la vía de señalización JAK2/STAT5, que desempeña un papel esencial en el establecimiento de la alveologénesis, en un mecanismo molecular que incluye la expresión de TTP, como veremos más adelante (Goddio et al., 2012). A su vez, dentro de los genes blanco de STAT5 en la glándula mamaria se incluyen aquellos que codifican para proteínas de la leche, como  $\beta$ -caseína y Whey Acidic Protein (WAP) (Haricharan & Li, 2014). Río abajo de la señalización por prolactina se encuentran también RANKL (que responde de manera paracrina, igual que en presencia de progesterona) (Srivastava et al., 2010) y miembros de la familia SOCS (Oakes et al., 2008). Esta red de vías resulta en un programa transcripcional finamente regulado que, en última instancia, controla la diferenciación de las células alveolares y su producción de leche.

En consecuencia de estos procesos, el tejido adiposo intersticial de la glándula va desapareciendo a medida que las células epiteliales ocupan los espacios interductales y aumenta considerablemente la vascularización (Djonov et al. 2001). Hacia el final de la preñez, los alvéolos se encuentran completamente diferenciados y ya presentan actividad secretora de leche (Figura I1 B) (McManaman et al. 2004). Las células mioepiteliales localizadas alrededor de cada

alvéolo se contraen en respuesta a la Oxitocina, lo cual fuerza la salida de la leche del alvéolo hacia los conductos exteriores (Dulbecco et al., 1986). A medida que la lactancia se establece, la grasa de los adipocitos se metaboliza y los alvéolos se expanden hasta llenar completamente la almohadilla. La lactancia continúa durante aproximadamente 3 semanas o hasta que las crías son destetadas (Richert et al. 2000). En este momento, la estasis de la leche en los alvéolos induce la involución de la glándula, caracterizada por un proceso de apoptosis masiva de las células epiteliales y el remodelado del tejido a su estado original adulto, previo a la preñez (Figura I1 C) (Walker, Bennet & Kerr 1989, Strange et al. 1995).

### Involución

La involución se divide en 2 fases: la primera, reversible si se repone el estímulo de succión, está acompañada por apoptosis, desprendimiento de las células alveolares y, al cabo de 12 horas, la acumulación de células desprendidas en el lumen. Llamativamente, no ocurren cambios morfológicos importantes en esta fase de la involución, aparte de las alteraciones en la forma alveolar debido a la acumulación de leche (Li M. et al., 1997). Sin embargo, a las 48 horas, comienza una transición a la fase 2 de la involución y los alvéolos empiezan a colapsar. Esta fase es irreversible y el suministro de leche se pierde, independientemente de si se reinicia o no la succión. Durante esta fase, la degradación de la matriz extracelular (MEC) y la activación de proteasas inducen una segunda oleada de apoptosis. Esto resulta en un período masivo de remodelación tisular que, a los 6 días, conduce a la eliminación de la mayor parte del epitelio secretor y su posterior reemplazo por adipocitos. Aunque pueden persistir algunos alvéolos remanentes, la glándula remodelada es morfológicamente muy similar a la glándula virgen, a pesar de ser molecularmente distinta con respecto a la expresión génica (Balogh et al., 2006).

El inicio de la involución mamaria se caracteriza a nivel molecular por un marcado aumento de STAT3 fosforilado (p-STAT3), acompañado de una disminución en la fosforilación de STAT5, característico de la lactancia (Li M. et al., 1997; Liu X. et al., 1997). STAT5 se une a secuencias consenso dentro del locus Akt1 de manera dependiente de prolactina e inicia la transcripción de Akt1 desde un

promotor específico de la glándula mamaria, generando una fuerte señal de supervivencia celular (Creamer et al., 2010). En contraste, STAT3 antagoniza la señalización pro-supervivencia de STAT5 y promueve vías pro-apoptóticas (Clarkson et al., 2010), como lo demuestra la delección condicional de Stat3 en la glándula mamaria, que resulta en una disminución de la apoptosis y un marcado retraso en la involución (Chapman et al., 1999). El activador principal de STAT3 en la glándula mamaria es una citoquina: factor inhibidor de la leucemia (LIF) y en menor medida IL-6 (Kritikou et al., 2003; Schere-Levy et al., 2003). Una vez activado, STAT3 promueve la apoptosis mediante la regulación transcripcional de numerosos genes, entre los que se encuentran las proteasas lisosomales, catepsina B y L, características de la muerte celular programada de la primera fase de la involución (Kreuzaler 2011).

La segunda fase de la involución es controlada por factores circulantes extracelulares y está acompañada por profundos cambios estructurales en la glándula mamaria, incluyendo el remodelado de la membrana basal, el colapso de los alvéolos y la diferenciación de los adipocitos. Reguladores importantes de estos procesos son los miembros de las familias de proteasas de serinas y metaloproteasas (Sympson et al., 1995; Witty et al., 1995).

## **INVOLUCIÓN Y CÁNCER DE MAMA**

Existe un gran interés en comprender los procesos de señalización involucrados en la involución posterior a la lactancia, y el vínculo entre estos procesos y el cáncer. Estudios de perfiles transcripcionales muestran que el tejido mamario en involución presenta características de cicatrización de heridas (*wound healing*, en inglés) y un aumento de la inflamación que favorecen la tumorigénesis (Clarkson et al., 2003). Esto plantea la posibilidad de que la involución cree un microambiente tumoral que promueve una mayor transformación de las células mamarias preneoplásicas. A su vez, se ha observado un aumento transitorio en el riesgo de cáncer de mama en los primeros años posteriores al parto (Schedin P., 2006).

## CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el tipo más común de tumores malignos diagnosticados en mujeres, y numerosos factores contribuyen a su alta tasa de mortalidad (Duggan et al., 2021). La clasificación de los tumores de mama en diversos grupos se ha logrado gracias a la identificación de sus características intrínsecas, que incluyen tanto las determinadas por histología clásica y las clasificaciones inmunopatológicas, como los subtipos moleculares de descripción más reciente (Perou et al., 2010). Además, las características extrínsecas del tumor, como su microambiente, también son de importancia pronóstica y expanden la lista de variables relevantes a considerar.

El cáncer de mama se presenta predominantemente en dos tipos histológicos, que en conjunto representan la gran mayoría de los casos. El carcinoma ductal invasivo no especificado es el más comúnmente reportado, constituyendo aproximadamente el 75% de los diagnósticos. El siguiente en importancia es el carcinoma lobular invasivo, que abarca cerca del 10% de los casos. En total, estas dos categorías, o sus combinaciones, comprenden alrededor del 90% de todos los cánceres de mama (Li et al., 2005; Weigelt et al., 2010). A su vez, se han identificado marcadores moleculares específicos de los tumores, que se utilizan tanto para definir subtipos con pronóstico global diferencial como para identificar blancos susceptibles a tratamientos dirigidos. Los principales marcadores que se evalúan en la actualidad son: el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR), y el receptor epidérmico humano 2 (HER2). Los niveles de expresión de estos marcadores en todas sus combinaciones permiten la clasificación de los tumores en las siguientes categorías: ER+ (ER+/HER2-, pueden incluir PR+), HER2+ (ER-/HER2+, pueden incluir PR+), triple negativo (ER-/PR-/HER2-), y triple positivo (ER+/PR+/HER2+).

Los tumores ER+ son los que presentan el mejor pronóstico global, si bien esto depende también de otros marcadores, como veremos a continuación. En segundo lugar se encuentran los tumores HER2+, que mejoraron su pronóstico en

los últimos años a partir del desarrollo de terapias específicas, como el trastuzumab (Slamon et al., 2001; Smith et al., 2007). En los casos de triple positivos el pronóstico depende del grado histológico del tumor (Parise et al., 2010; Parise & Caggiano, 2014). Finalmente, los tumores triple negativos están vinculados al peor pronóstico entre todos los subtipos, principalmente debido a la falta de terapias específicas ante la ausencia de expresión de los receptores (Nishimura & Arima, 2008).

Con el objetivo de caracterizar más precisamente los tumores, en vistas a una terapéutica más efectiva, se han desarrollado también clasificaciones basadas en la expresión génica de otros marcadores (Sørlie et al., 2001). Esto define la existencia de los subtipos moleculares intrínsecos: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched y Basal-like, que describiremos a continuación. (Figura 13) (Perou et al., 2000, Eroles et al., 2012). Cabe destacar que la clasificación original incluía además los subtipos normal-like y claudin-low, que con la investigación posterior fueron asimilados a los demás subtipos (Schettini et al., 2022).

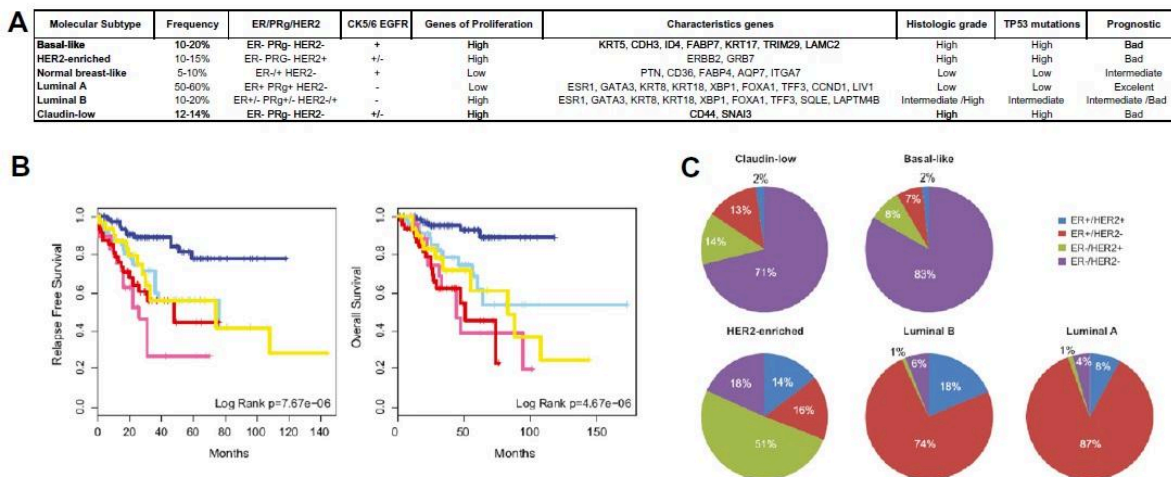


Figura 13. (A) Características de los subtipos moleculares del cáncer de mama. (B) Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia general basadas en la base de datos UNC337. Azul oscuro, luminal A; azul claro, luminal B; rojo, basal-like; rosa, HER2-enriched; amarillo, Claudin-low (C) Distribución de ER y HER2 en los diferentes subtipos de cáncer de mama según la expresión de ARNm. Tomado de Eroles et al., 2012.

## Luminal A

El cáncer de mama Luminal A es el subtipo más frecuente, abarcando entre el 50% y el 60% del total de casos. Se distingue por la expresión de genes activados por el receptor de estrógenos (ER), típicamente presentes en el epitelio luminal que recubre los conductos mamarios. Además, presenta una baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Todos los casos de carcinoma lobulillar in situ son tumores Luminal A en su perfil molecular, al igual que la mayoría de los carcinomas lobulillares infiltrantes. El perfil inmunohistoquímico (IHQ) del Luminal A se caracteriza por la expresión de ER, PR, Bcl-2 y citoqueratina CK8/18, la ausencia de expresión de HER2, una baja tasa de proliferación medida por Ki67 y un grado histológico bajo (Figura I3). Adicionalmente, el marcador GATA3 alcanza su nivel más alto en el subtipo Luminal A. Las pacientes con este tipo de cáncer presentan un buen pronóstico; la tasa de recaída (*relapse* en inglés) es del 27.8%, significativamente menor que la de otros subtipos (Kenecke et al., 2010). Muestran un patrón de recurrencia característico, con una mayor incidencia de metástasis óseas (18.7%), mientras que otras localizaciones como el sistema nervioso central, el hígado y el pulmón representan menos del 10%. El tratamiento principal para este subtipo de cáncer de mama se basa en inhibidores de aromatasa en pacientes postmenopáusicas, moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs, según su sigla en inglés) como el tamoxifeno, y reguladores puros selectivos del ER como el fulvestrant (Guarneri et al., 2009).

## Luminal B

Los tumores Luminal B constituyen entre el 10% y el 20% de todos los cánceres de mama. En comparación con los Luminal A, estos tumores muestran un fenotipo más agresivo, con un grado histológico y un índice proliferativo más elevados, lo que se traduce en un peor pronóstico. El patrón de recurrencia a distancia (*pattern of distant relapse*, en inglés) también es distinto: aunque el óseo sigue siendo el tejido más común de recurrencia (30%), este subtipo presenta una mayor tasa de recurrencia en sitios alternativos, como el hígado (13.8%) (Kenecke et al., 2010). Tanto los tumores Luminal A como los Luminal B expresan ER, pero debido a las grandes diferencias en el pronóstico del Luminal B, se han realizado numerosos estudios con el objetivo de encontrar biomarcadores que permitan

distinguirlos. La principal diferencia radica en una mayor expresión de genes de proliferación en el subtipo Luminal B, como MKI67 y ciclina B1. Este subtipo también suele expresar el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y HER2 (Figura I3).

Desde el punto de vista inmunohistoquímico, se ha intentado diferenciar los subtipos Luminal A y B utilizando la expresión de la proteína Ki67 como marcador (Cheang et al., 2009). El subtipo Luminal A se ha definido como ER+/HER2- y Ki67 bajo, mientras que el Luminal B incluye tumores ER+/HER2- y Ki67 alto, o ER+/HER2+. Cabe destacar que esta definición no abarca todos los tumores Luminal B (hasta un 6% de ellos son clínicamente ER-/HER2-).

Los tumores Luminal B tienen un peor pronóstico que los Luminal A, incluso en casos de tratamiento con tamoxifeno e inhibidores de aromatasa (Paik et al., 2004). No obstante, responden mejor a la quimioterapia neoadyuvante, logrando una respuesta patológica completa en el 17% de los casos (frente al 7% en Luminal A). Aun así, esta tasa es marcadamente inferior a la observada en los tumores HER2+ y basal-like, con valores del 36% y 43%, respectivamente (Parker et al., 2009). Por estas razones, el tratamiento de este subtipo de cáncer de mama sigue representando un enorme desafío, lo cual subraya la importancia en la investigación para lograr dilucidar los mecanismos que rigen su supervivencia, proliferación y metástasis (Tabor et al., 2020; Eroles et al., 2012).

### HER2-enriched

El subtipo molecular HER2+ representa entre el 15% y el 20% de todos los cánceres de mama. Se caracteriza por una elevada expresión de HER2 y por una sobreexpresión de genes relacionados con la proliferación celular. Aunque este subtipo no expresa caracteres de tipo basal-like, puede presentar una baja expresión de genes luminales característicos. Morfológicamente, estos tumores son altamente proliferativos; el 75% presenta un alto grado histológico y más del 40% tiene mutaciones en p53 (Parker et al., 2009). Cabe destacar que el perfil de inmunohistoquímica ER-/HER2+ no se corresponde exactamente con el subtipo intrínseco HER2 positivo. Solo el 70% de los tumores HER2+ muestran sobreexpresión de la proteína por IHQ. A su vez, no todos los tumores con

amplificación o sobreexpresión de HER2 se incluyen en el subtipo HER2 positivo en el análisis de expresión (Prat & Perou, 2011). Además, un número significativo de tumores clínicamente ER+/HER2+ se clasifican molecularmente como Luminal B (Figura I3).

Desde el punto de vista clínico, el subtipo HER2+ se caracteriza por un mal pronóstico. Sin embargo, el desarrollo del tratamiento anti-HER2 ha mejorado sustancialmente la supervivencia, tanto en las etapas iniciales como en la metástasis, y sigue siendo objeto de intensa investigación en ensayos clínicos (Gianni et al., 2011; Wynn & Tang, 2022). Este subtipo, al igual que el subgrupo basal-like, presenta una alta sensibilidad a la quimioterapia, con tasas de respuesta más elevadas que los tumores Luminal A y B en los estudios neoadyuvantes (43% y 36% de respuesta patológica completa versus 7% y 17%, respectivamente) (Parker et al., 2009).

### Basal-like

El subtipo basal-like comprende entre el 10% y el 20% de todos los carcinomas mamarios. Su nombre se debe a que expresan genes característicos de las células mioepiteliales mamarias normales, incluyendo citoqueratinas de alto peso molecular (CK5 y CK17), P-cadherina, CD44 y EGFR (Figura I3). También pueden expresar, aunque en niveles significativamente más bajos que los carcinomas luminales, genes propios del epitelio luminal como CK8/18 y Kit (Eroles et al., 2012). Clínicamente, se distinguen por su aparición a edad temprana, predominancia en mujeres de ascendencia africana, gran tamaño tumoral al momento del diagnóstico, alto grado histológico y una elevada frecuencia de afectación de ganglios linfáticos (Bosch et al., 2010). Presenta gran invasividad y un pronóstico desfavorable. Estos tumores suelen ser carcinomas ductales infiltrantes con un alto índice mitótico, necrosis tumoral, márgenes expansivos y una clara respuesta linfocitaria estromal. El patrón de recaída metastásica es agresivo, con predominio en órganos viscerales, principalmente pulmón, sistema nervioso central y ganglios linfáticos (Smid et al., 2008). Una de sus características más relevantes es la ausencia de expresión de los tres receptores clave en cáncer de mama: ER, PR y HER2 (Figura I3). Por esta razón, en la práctica clínica los términos basal-like y Triple Negativo suelen usarse indistintamente. Sin embargo, no son

completamente equivalentes, ya que se ha descrito una discordancia de hasta el 30% entre ambos grupos (Kreike et al., 2007).

Los tumores basal-like se caracterizan por una limitada respuesta a la terapia. Una de las estrategias aprobadas para uso clínico son los inhibidores de la poli-ADP ribosa polimerasa-1 (PARP-1), que han resultado especialmente beneficiosas en casos de cáncer de mama asociado a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 (Fong et al., 2009). También, se han reportado terapias dirigidas, con foco en los inhibidores de puntos de control inmunitario (*immune checkpoints* en inglés) (Bando et al., 2021).

## **TRISTETRAPROLINA (TTP)**

### Características generales

Tristetraprolina (TTP), también conocida como TIS11, Nup475, RNF162A y G0S24, es una proteína codificada por el gen ZFP36, localizado en hg38 chr19:39,406,847-39,409,407 en el genoma de *Homo sapiens*. Pertenece a una familia de proteínas con dedos de zinc capaz de reconocer y unirse específicamente a elementos ricos en adenilato-uridilato (AU-rich: ARE) en la región 3' no traducible (3'UTR) de ARNs mensajeros (ARNm) blanco (Deleault et al., 2008; Lai et al., 2003).

Desempeña un importante papel en las respuestas antiinflamatorias: suprime la traducción del factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  al estimular la degradación de su ARNm mediada por ARE y de varios otros ARNm de citoquinas inflamatorias que contienen ARE en macrófagos inducidos por interferón (IFN) y/o lipopolisacárido (LPS) (Emmons et al., 2008). También participa, en asociación con los componentes catalíticos de la proteína argonauta RISC, en el mecanismo de degradación de ARNm mediada por ARE, interactuando con los microARN específicos (Jing et al., 2005). Además de su función de degradación del ARNm en el citosol, afecta el procesamiento nuclear del pre-ARNm (Su, Wang et al., 2012) y actúa como un correpressor de numerosos receptores nucleares esteroideos (Barrios-García et al., 2016). TTP es susceptible de ser fosforilada, principalmente a través de la MAPK

p38, lo cual modula su capacidad de unión al ARNm, influye en su localización subcelular y afecta su interacción con otras proteínas (Brook et al., 2006).

### Regulación de la expresión y actividad de TTP en la glándula mamaria

TTP regula su propia expresión post-transcripcionalmente, ya que puede unirse a las secuencias ARE presentes en el 3'UTR de su propio ARNm regulando su estabilidad negativamente (Brooks & Blackshear, 2013; Tchen et al., 2004). Por otro lado, ha sido reportado que TTP se co-expresa con componentes del complejo AP-1 (Jun, Junb, Fos y Fosb) y que el promotor de ZFP36 posee sitios de unión para este factor de transcripción, el cual regula su expresión. Esta red transcripcional también está integrada por Egr1, Dusp1 y otros genes de respuesta temprana (*early-responsive genes*, en inglés) (Canzoneri et al., 2020). Asimismo, el promotor de ZFP36 contiene sitios de unión para STAT5, lo que permite el incremento en la expresión de TTP durante la lactancia en respuesta a la fosforilación de ese factor de transcripción inducida por prolactina (Goddio et al., 2012). Este hecho es fundamental para la supervivencia y el desarrollo del epitelio mamario secretor (Goddio et al., 2018). Hacia el final de la lactancia, con el cambio en el patrón de activación de STAT5 por STAT3 y el comienzo de la involución, se registra una marcada disminución en la expresión de TTP, y un consecuente aumento en los niveles de TNF $\alpha$  y de la muerte por apoptosis del epitelio mamario (Stedile et al., 2024).

Se ha reportado que en el promotor de ZFP36, aproximadamente 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS), existen sitios de unión para STAT1, el cual es estimulado por interferón  $\gamma$ , aumentando la expresión de ZFP36 (Sauer et al., 2006). En relación a la respuesta inflamatoria, también se estableció que el promotor ZFP36 contiene sitios de unión para NF- $\kappa$ B, identificados entre las bases -1859 a -1850 respecto del TSS (Y. L. Chen et al., 2013).

La expresión de TTP es inducible por diversos mitógenos y factores de crecimiento. En particular, el promotor de ZFP36 contiene una secuencia palindrómica de 10 pares de bases conservada entre ratón, humano y vaca, denominada TTP promoter element 1 (TPE1), localizada entre el -99 y el -89

respecto al TSS. Esta secuencia es responsable del 75% de la expresión de TTP señalizada por suero en el ratón. A su vez, esta región del promotor incluye secuencias consenso para la unión de los factores de transcripción EGR-1, AP2 y Sp1 (Lai et al., 1995).

### Rol de TTP en la glándula mamaria en el contexto tumoral

Se han acumulado múltiples evidencias de que existen diversos ARNm codificantes para oncoproteínas cuya expresión es regulada de manera ARE-dependiente y, en particular, por TTP (Guhaniyogi & Brewer, 2001). Dentro de dichos mensajeros, se destacan aquellos que codifican para MYC, c-JUN, c-FOS, ciclina D1, COX2 y VEGF entre muchos otros (Park et al., 2018). A pesar de que el contexto en el cual la actividad de TTP ha sido más estudiada es en la respuesta inflamatoria, actualmente existen claras evidencias de que esta proteína previene la progresión tumoral. Se ha demostrado que la expresión de TTP está significativamente disminuida en muchos tipos de cáncer, incluyendo el de mama, y que su inducción suprime características invasivas en líneas celulares tumorales (Brennan et al., 2009; Goddio et al., 2012) (Figura I4).

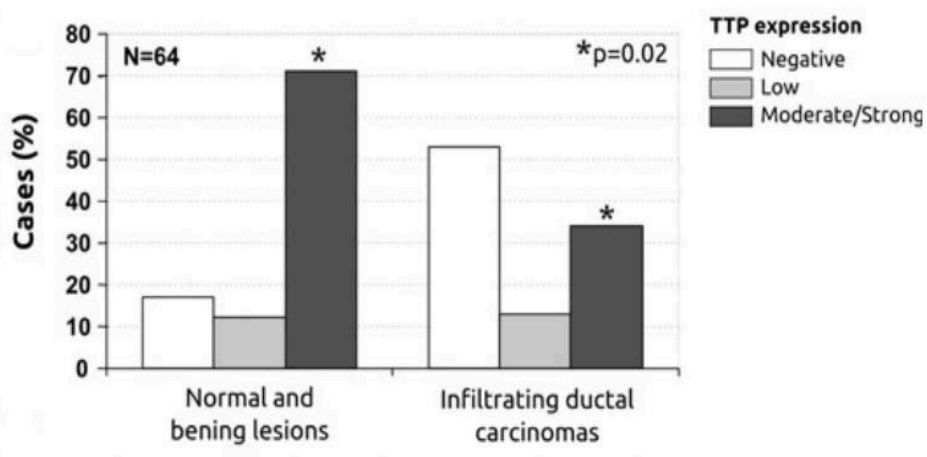
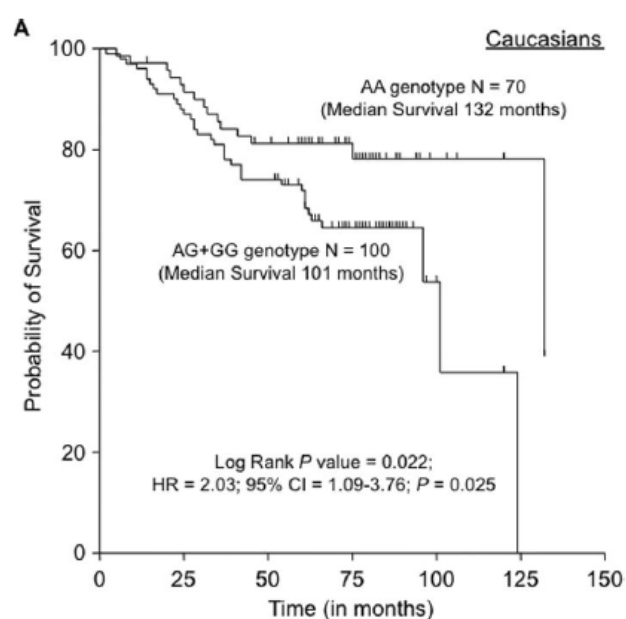


Figura I4. Expresión de la proteína TTP en muestras de mama humana medida mediante tinción por inmunohistoquímica (IHC) en tejido mamario normal, lesión benigna (hiperplasia atípica) y carcinoma invasivo indiferenciado (Goddio et al. 2012).

## POLIMORFISMOS DEL GEN ZFP36/TTP

Debido a la función regulatoria clave que desempeña TTP en la estabilidad del ARNm de citoquinas inflamatorias, las diferencias en la expresión del gen ZFP36/TTP dadas por mutaciones en las regiones pueden afectar la gravedad de las enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoidea (AR) o los tumores mamarios. Entre todas las mutaciones no codificantes del gen ZFP36, Suzuki et al han identificado un Single Nucleotide Polymorphism (SNP) que afecta significativamente la actividad del promotor (Suzuki et al 2008). Posteriormente, otros autores realizaron la genotipificación de 10 SNPs en el gen ZFP36 y 7 en el gen ELAVL1 (que codifica para la proteína desestabilizadora de ARNm HuR). Analizaron la influencia de los polimorfismos en la supervivencia de las pacientes (en seguimiento durante 10 años) mediante las correspondientes regresiones de Cox, análisis de Kaplan-Meier y pruebas de log-rank. Los análisis demostraron que el polimorfismo ZFP36\*2 A>G (luego anotado como rs251864), localizado en la posición chr19:39,406,653 (Genoma humano versión GRCh38.p14), correspondiente a la región promotora del gen ZFP36/TTP, se encuentra significativamente asociado a un peor pronóstico para las pacientes caucásicas con cáncer de mama (Upadhyay 2013) (Figura I5).



*Figura 15. Probabilidad de supervivencia en función del tiempo (en meses) de pacientes caucásicas con cáncer de mama agrupadas según genotipo (Upadhyay et al. 2013).*

Respecto a los efectos de la presencia de dicho polimorfismo, está demostrado que la expresión de TTP es menor en el tejido tumoral de las pacientes que poseen al menos un alelo G. Dada la actividad supresora tumoral de TTP, esto explica, al menos parcialmente, el impacto observado en la supervivencia a largo plazo. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares específicos involucrados en la regulación de la actividad del promotor de ZFP36, en presencia de estas alteraciones genéticas. Basados en estos antecedentes, en este trabajo de Tesis nos propusimos, entre otros objetivos, analizar los mecanismos involucrados en la asociación del polimorfismo rs251864 con la prognosis del cáncer de mama luminal.

## **MECANISMOS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICOS**

### Metilación

Ha sido reportado que el promotor de ZFP36 es susceptible de ser metilado. En particular, en el cáncer de hígado, la metilación de un único sitio CpG se vio asociado significativamente con la disminución en la expresión de TTP y un aumento en la vida media de c-Myc (Sohn et al., 2010). A su vez, la metilación de sitios CpG en el promotor y la región codificante de ZFP36 en fibroblastos genera un aumento en los niveles del ARNm de NLRP3, empeorando los síntomas de psoriasis en la piel (Bertesi et al., 2021). Los efectos de la metilación de ZFP36 en la glándula mamaria no han sido estudiados hasta la fecha.

# HIPÓTESIS

---

La presencia del polimorfismo rs251864 en el promotor de ZFP36 afecta la regulación de la expresión de TTP en células tumorales mamarias, lo cual modula las características oncogénicas de las mismas.

## OBJETIVO GENERAL

---

Estudiar los mecanismos moleculares responsables de la regulación de la expresión de ZFP36/TTP en células tumorales mamarias y verificar las consecuencias de disminuir los niveles de esta proteína en el fenotipo celular.

## OBJETIVOS PARTICULARES

---

- Determinar la presencia del polimorfismo rs251864 A>G en tumores y líneas celulares de cáncer de mama que expresan receptores de estrógenos y progesterona (ER+PR+) y describir sus efectos sobre la regulación de la expresión de ZFP36/TTP.
- Estudiar los efectos de mecanismos de regulación epigenéticos sobre la expresión de ZFP36/TTP en células tumorales mamarias.
- Caracterizar los efectos de la disminución en la expresión de TTP sobre el fenotipo de las células mamarias.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## ASPECTOS ÉTICOS

Las muestras humanas utilizadas en esta Tesis doctoral provienen de una colaboración de nuestro grupo con el de la Dra Claudia Lanari, en el marco del proyecto “Estudios de las isoformas de los receptores de progesterona y respuesta al tratamiento hormonal en cáncer de mama humano” aprobado por el Comité de Ética de la Fundación Instituto Biología y Medicina Experimental FIBYME-CONICET. Las muestras provienen del Hospital “Magdalena V de Martínez” de General Pacheco, Provincia de Buenos Aires y el proyecto cuenta con el consentimiento informado de todas las pacientes debidamente anonimizadas.

## REACTIVOS UTILIZADOS

Las soluciones utilizadas para la extracción de ADN genómico de las muestras de pacientes y las líneas celulares fueron elaboradas en el IFIBYNE utilizando las sales NaCl, Tris y EDTA adquiridas a la empresa Biopack (Zárate, Buenos Aires, Argentina). Los dNTPs, buffers y Taq polimerasa utilizadas para la genotipificación de dichas muestras fueron adquiridos a la empresa Inbio Highway, Argentina. La agarosa empleada para correr los amplicones de genotipificación fue comprada a la empresa Genbiotech.

Los medios RPMI 1640 con HEPES (Cat. 23400021) y DMEM (Cat. 12800017), la tripsina (Cat. 25200072) y el antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomina, Cat. 25200-072) son producidos por la empresa Thermo Fisher Scientific (Cat. PHG0311). El suero fetal bovino (SFB) fue adquirido a la empresa Internegocios (Mercedes, Pcia. de Buenos Aires, Argentina). La Insulina aspártica es de Novo Nordisk (NovoRapid) y la Proteinasa K es de Roche

(RPROTKSOL-RO). El GW3965 (GW) fue adquirido en Medchem Express (Cat. HY10627A). Los inhibidores utilizados fueron SP600125 (inhibidor de JNK1/2), BP-1-102 (inhibidor de la fosforilación de STAT3), ambos adquiridos de Calbiochem, y 5-Azacidina (inhibidor de las DNMTs), que fue adquirido a Sigma-Aldrich (A1287). Para las incubaciones de los ensayos *in vitro* se prepararon soluciones stock 10 mM de los inhibidores en dimetilsulfóxido (DMSO).

Para la extracción de proteínas, se utilizó ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), fluoruro de sodio (NaF) y cocktail inhibidor de proteasas (IP) obtenidos de Calbiochem (San Diego, CA, USA). Los detergentes SDS, Tween 20 y Tritón X100 fueron comprados a Biopack (Zárate, Buenos Aires, Argentina). Los reactivos,  $\beta$ -mercaptoetanol y TEMED fueron obtenidos de la empresa Biodynamics (Promega, Madison, WI, USA). El marcador de peso molecular para proteínas (All Blue, # 1610373) y la acrilamida 30%/Bis fueron adquiridos de la empresa BioRad. El revelador que se utilizó en los Western Blots fue ECL+Plus System de GE Health Care, UK, en el equipo Amersham Imager (FUJI).

Para las transfecciones transitorias se utilizó Polietilamina (PEI) de elaboración institucional. Para los ensayos de genes reporteros donde se midió la actividad de Luciferasa, se cosecharon las células con el Reporter Lysis Buffer de Promega (#E1531) y se añadió la Luciferina de Promega (#V8930).

Las extracciones de ARN fueron realizadas con Alcohol Iso-propílico, Cloroformo y Etanol Absoluto de la empresa Cicarelli (San Lorenzo, Santa Fe, Argentina). El ARN-PrepZOL (# R0010) fue obtenido de Inbio Highway, Argentina. Todos los reactivos para la transcripción reversa y las PCRs en tiempo real – Buffers, Taq-polimerasa,  $\text{MgCl}_2$ , Nucleótidos y OligodT- fueron comprados a Inbio Highway Argentina, excepto el SYBR Green (Roche). Las PCRs en tiempo real fueron corridas en el equipo CFX Maestro BioRad.

## **EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO**

A partir de tejido mamario congelado o células en cultivo se realizó la extracción de ADN genómico con el mismo protocolo. Se homogeneizaron aproximadamente  $8 \times 10^6$  células o un pequeño fragmento de tejido en buffer de cosecha: 2 ml buffer TEN (NaCl 0.1M, Tris 0.01M, EDTA 0.01M) + 140  $\mu$ l de SDS al 10% + 28  $\mu$ l de proteinasa K (10mg/ml). Se dejaron en baño termostático a 55°C, O.N. Se agregaron 600  $\mu$ l de NaCl sobresaturado ("6 M") y se agitó vigorosamente. Se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 2800 rpm. El sobrenadante se trasvasó a un tubo limpio y estéril y se agregaron 2 volúmenes de etanol al 100%. Se mezclaron suavemente por inversión hasta observar la precipitación ADN, el cual fue trasvasado a otro tubo y lavado con etanol al 70%. Se dejó secar y se resuspendió en agua estéril. Se realizaron las diluciones necesarias y se cuantificó el ADN purificado utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

## **GENOTIPIFICACIÓN DE MUESTRAS MEDIANTE PCR-RFLP**

A partir de ADN genómico purificado de tejido tumoral o de las líneas celulares T47D y MCF-7, se realizó la amplificación por PCR de punto final de un fragmento de 394 pb correspondiente a una región del promotor de ZFP36 que abarca desde el -261 hasta el +133 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS) e incluye el polimorfismo rs251864 (-194). Los "primers" utilizados fueron los siguientes:

Prom\_1 (diseñados en nuestro laboratorio)

Prom1\_Fw: 5' TTGAAAACTGGGCAGGCGTCCC 3'

Prom1\_Rv: 5' ACTCGGACTCAGGCATGCAGGT 3'

A continuación, se realizó el genotipado de las líneas celulares a partir de dos métodos: a) se utilizó la técnica de PCR-RFLP: en el sitio del polimorfismo se encuentra un sitio de corte de la enzima de restricción Tsp45I, que se anula en presencia de la variante G. Así, realizando la digestión del fragmento de PCR de 394 pb, en caso de genotipo AA, se obtienen 2 fragmentos: uno de 330 pb y otro de 64 pb, en caso de genotipo GG, se obtiene sólo uno de 394 pb y, en caso de presentar heterocigosis AG, se obtienen 3 fragmentos, uno de 394 pb, otro de 330 pb y otro de 64 pb. Luego de dicha digestión, los fragmentos pueden visualizarse separados por tamaño en un gel de agarosa b) se purificaron los fragmentos de PCR y se les realizó secuenciación de Sanger (Macrogen, Corea del Sur), luego, las secuencias obtenidas, fueron alineadas con la secuencia correspondiente a la región amplificada según el genoma de referencia de *Homo sapiens* (versión GRCh38.p14), utilizando las herramientas de alineamiento de Benchling. Ambos métodos presentaron una concordancia del 100%.

## **CULTIVO CELULAR**

En esta tesis se utilizaron las líneas celulares humanas HEK293T, T-47D, MDA-MB-231 y MCF7, y la línea celular murina HC11, transfectada de manera estable con shRNAscrambled (HC11 Sh-control) o shRNA específico contra Zfp36 (HC11 TTP-KD), utilizando un modelo de sub-expresión de TTP ya puesto a punto en nuestro laboratorio (Stedile et al, 2024). Las HEK293T son células derivadas de riñón embrionario humano y se utilizaron por su rápido crecimiento y alta capacidad de transfección. La línea T-47D fue aislada a partir de un carcinoma ductal infiltrante de mama, son células epiteliales y expresan los receptores de estrógenos (ER+) y progesterona (PR+). A su vez, la línea MCF-7 también deriva de un adenocarcinoma mamario ER+ PR+ . Las tres líneas se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y Penicilina (100 IU/ml) - Estreptomina (100 µg/ml). Por otro lado, la líneas derivadas de HC11 fueron crecidas en medio RPMI 1640 con HEPES suplementado con 10 % SFB más Insulina (5 µg/ml), Penicilina (100 IU/ml) y Estreptomina (100 µg/ml). Todas las células fueron mantenidas en estufa a 37°C en una atmósfera húmeda y condiciones reductoras con 5% CO<sub>2</sub>.

## CLONADO DEL PROMOTOR HUMANO DE ZFP36

Con el objetivo de determinar el efecto del polimorfismo rs251864 sobre la actividad del promotor de ZFP36/TTP, nos propusimos clonar la región incluyendo el sitio del polimorfismo, en un plásmido reportero con luciferasa. Para ello se diseñaron primers que amplifican una secuencia de 641 pb desde -566 hasta +75 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS) de dicho gen. A partir de PCRs de punto final realizadas con ADN genómico de células T-47D y MCF-7, se generaron amplicones conteniendo las dos variantes del polimorfismo en homocigosis (corroborado por secuenciación de Sanger) que luego fueron subclonados en plásmidos pJET. A continuación, se realizó la digestión de los plásmidos con las enzimas de restricción XhoI y BglII y se ligaron los amplicones en el vector reportero con luciferasa pGI3 Basic (Promega). Los vectores obtenidos fueron denominados *pGI3-ZFP36PromAA-luc* y *pGI3-ZFP36PromGG-luc*.

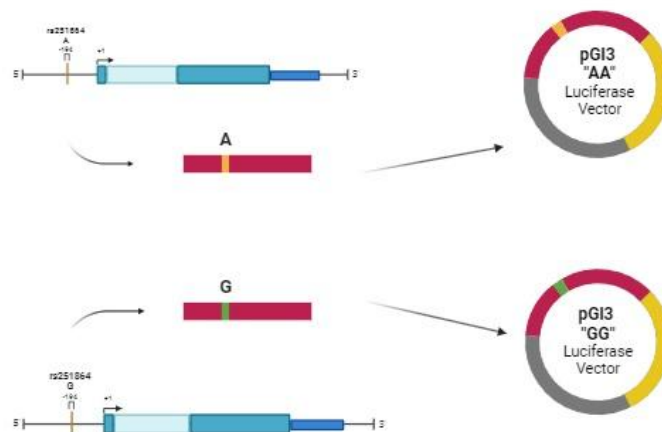


Figura M1. Esquema de clonado de los plásmidos *pGI3-ZFP36PromAA-luc* y *pGI3-ZFP36PromGG-luc*.

Los cebadores (“primers”) utilizados fueron los siguientes:

Prom2\_Fw: 5' TGTCTCCCCGTCTTCCCTCCCT 3'

Prom2\_Rv: 5' ACTCGGACTCAGGCATGCAGGT 3'

## **PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES**

Bacterias de la especie *Escherichia coli*, cepa DH5 $\alpha$ , fueron cultivadas en medio LB (10 g/l peptona; 5 g/l extracto de levadura; 5 g/l NaCl) a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD) = 0.3. A 5 ml de ese cultivo se le agregaron 100 ml de LB y se creció hasta una OD= 0.5. Posteriormente, se incubó el cultivo durante 10 minutos a 0°C y se centrifugó por 10 minutos a 3000 g a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* se resuspendió en 40 ml de la solución TFB I (30 mM Acetato de potasio; 100 mM KCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 15% Glicerol; pH = 5.2). Se dejó en hielo por 5 minutos y se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 3000g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 4 ml de la solución TFB II (10 mM MOPS; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 15% Glicerol; pH = 6,5). Luego, se dejó reposar las células en hielo durante 15 minutos para luego guardarlas a -70°C en alícuotas de 200  $\mu$ l.

## **AMPLIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS - TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS**

### **COMPETENTES**

Con 1  $\mu$ l de cada plásmido a amplificar, se transformaron bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5 $\alpha$  mediante shock térmico a 42°C durante 90 segundos. A continuación se incubó en medio LB líquido, sin antibiótico, a 37°C durante 30 minutos en agitación permanente. Las bacterias se plaquearon en placas de Petri p100, de LB-agar (LB + 15 g/L de agar) con ampicilina 100  $\mu$ g/ml, y se dejaron en estufa a 37°C durante 18 horas. Posteriormente, se picaron colonias

y se realizaron minicultivos en LB-Ampicilina a 37°C durante 16 horas, en agitación permanente.

## MAXI-PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS

Los minicultivos obtenidos fueron crecidos durante 24 hs en 400 ml de medio TB (5,33 g de Peptona; 10,7 g de extracto de lavadura; 4 ml de Glicerol; 1,03 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 5,57 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) con 100  $\mu\text{g/ml}$  de Ampicilina (Bagó). Las bacterias se centrifugaron durante 15 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante. Éstas fueron luego resuspendidas en 10 ml de Solución I (25 mM Tris-HCl pH = 8; 10 mM EDTA pH = 8), se agitaron fuertemente durante 5 minutos y se les agregó 20 ml de Solución II (0,2 N NaOH; 1% SDS). Se mezcló por inversión y se dejó a 0°C por 20 minutos. Posteriormente, se colocaron 15 ml de solución III (3 M Acetato de potasio; 11,5 % Acético glacial), se mezcló por inversión por 5 minutos a 0°C, y se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm a 4°C. Al sobrenadante se le agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol, se mezcló, y dejó 20 min. a -20°C. Se centrifugó 1 hora a 5000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 3 ml de TE, se agregó igual volumen de  $\text{LiCl}_5$  M (a 4°C), se mezcló y centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos en agua/hielo. Se colectó el sobrenadante, se le agregó igual volumen de isopropanol, se mezcló y centrifugó 5 min. a 10000 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó, el *pellet* fue resuspendido en 0,5 ml de TE y se agregaron 20 mg/ml de ARNasa A durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se agregó igual volumen de 13% polietilenglicol (PEG) en 1,6 M NaCl, se mezcló y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm. El *pellet* obtenido se resuspendió en 400 ml de TE. Se realizaron extracciones con 1 volumen de fenol saturado en TE (una vez), 1 volumen fenol (saturado en TE): cloroformo (1:1) (2 veces), y 1 volumen cloroformo (una vez). Se agregó 0,1 volumen de Acetato de sodio 3 M pH = 5,2 y 2,5 volúmenes de ETOH 100 %. Se dejó 20 min a -20°C. Por último, se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm, se lavó con 70 % ETOH y se resuspendió el *pellet* en 250  $\mu\text{l}$  de TE. La concentración de ADN se determinó utilizando el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

## **TRANSFECCIONES TRANSITORIAS**

Células HEK293T ( $4 \times 10^5$ ) fueron transfectadas en forma transitoria utilizando polietilenimina (PEI) en placas de 6 pocillos. El medio completo de las células se reemplazó por 1 ml de medio sin suero ni antibióticos y, por otro lado, se preparó la mezcla de PEI y del ADN a transfectar de la siguiente manera: en un tubo (Tubo 1) se colocaron 0,1 ml de medio junto con las cantidades de ADN a transfectar en cada caso. En otro tubo (Tubo 2) se agregó 0,1 ml de medio de cultivo junto con el PEI. Luego de 5 minutos se mezclaron en igual proporción los tubos 1 y 2, se esperó 20 minutos y se agregó gota a gota dicha mezcla a las células. La mezcla se dejó incubando toda la noche a 37°C en atmósfera húmeda que contenía 5 % CO<sub>2</sub> y luego se reemplazó el medio por el indicado en cada experimento.

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA Y DE $\beta$ -GALACTOSIDASA**

Las células se cosecharon en 250  $\mu$ l de Buffer de Lisis 1X (*Reporter Lysis Buffer*, Promega). A continuación se trasvasaron los lisados a tubos eppendorf y se centrifugaron 5 minutos a 10000 x g. En los sobrenadantes se ensayaron las distintas actividades enzimáticas.

Para determinar los niveles de actividad de la luciferasa, se utilizó el kit Luciferase Assay System de Promega. A 20  $\mu$ l de la muestra se le agregaron 80  $\mu$ l de Luciferina (Luciferase Assay Buffer, Promega) en condiciones de oscuridad e inmediatamente se cuantificó la luminiscencia utilizando un luminómetro Varioskan (Thermo Fisher Scientific).

Con el fin de evaluar la eficiencia de la transfección en cada pocillo y normalizar los datos, se incubó una porción del lisado celular con Buffer Z (compuesto por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,04M, KCl 0,01M, MgSO<sub>4</sub> 0,001M y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,05M, ajustado a pH 7,0) y con o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosido (ONPG) a una concentración de 4 mg/mL. La absorbancia resultante de la reacción de clivado de la  $\beta$ -galactosidasa sobre el

ONPG se midió en el lector de placas Varioskan, utilizando una longitud de onda de 415 nm. Los valores de luminiscencia obtenidos para cada condición experimental fueron relativizados a los resultados del ensayo de  $\beta$ -galactosidasa.

## **ANÁLISIS DE PROTEÍNAS – PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS Y**

### ***WESTERN BLOT***

Los extractos de proteínas totales fueron obtenidos de células en cultivo. Se utilizó la solución de extracción de proteínas RIPA suplementado con inhibidores de proteasas. Los extractos se incubaron 10 minutos en hielo y luego se centrifugaron 10 minutos a 4°C a 12000 x g. Las proteínas presentes en el sobrenadante se cuantificaron por el método de Bradford.

A 30  $\mu$ g de proteínas se les agregó solución de siembra y se las trató 5 minutos a 100°C para completar el proceso de desnaturalización. Posteriormente las proteínas se separaron electroforéticamente por *SDS-PAGE* en un gel de 10 o 15% según las proteínas a cuantificar, durante aproximadamente 2 hs a 100 Volts. Luego, las muestras se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (GE HealthCare) a 4°C durante 1,5 h a 300 mA o durante 18 hs a 30 mA y temperatura ambiente. Finalizada la electrotransferencia, se realizó la tinción de proteínas durante 5 minutos con una solución de rojo Ponceau-S al 0,1% en ácido acético 5% para verificar la eficiencia de la transferencia. Posteriormente, se bloqueó la membrana durante 1 h a temperatura ambiente en solución TBS (20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 500 mM NaCl) más el agregado de 5% de leche descremada (“Purísima”, La Sibila S. A.) y 0,1% de Tween 20. La membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos según la dilución correspondientemente indicada, preparados en TTBS (TBS + 0,1% de Tween 20) conteniendo 1% de leche descremada. Luego se realizaron 2 lavados de 5 minutos y 1 lavado de 20 minutos en TTBS. Seguidamente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario en la dilución correspondientemente indicada, preparado en TTBS conteniendo 1% de

leche descremada durante 1 h, y se realizaron 2 lavados de 5 minutos y 1 lavado de 20 minutos con TTBS 0,1%. Finalmente, el *western blot* se reveló por quimioluminiscencia utilizando reactivo ECL+PlusSystem (GE HealthCare) en un detector de quimioluminiscencia Amersham Imager (FUJI). La intensidad de las bandas presentes en las imágenes fue cuantificada por densitometría utilizando el programa ImageJ.

En la tabla 1 se describen los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis doctoral:

ANTICUERPO	PROCEDENCIA	NRO CATÁLOGO	DILUCIÓN UTILIZADA	ESPECIE
TTP ratón	Dr Perry Blakshear	-	1/1000	Conejo
GAPDH ratón	Santa Cruz	Sc-322233	1/5000	Ratón
TTP humano	LS-BIO	LS-C431045	1/1000	Conejo
HSP90 humano	Santa Cruz	sc-515081	1/1000	Ratón

Tabla M1. Listado de anticuerpos primarios utilizados.

## ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

### *Preparación y secuenciación de la biblioteca de RNA-seq*

Se cultivaron las líneas HC11 sh-ctrl y HC11 TTP KD en medio completo en placas de 6 pocillos, 400.000 células por pocillo con 3 réplicas cada una. Cuando llegaron hasta subconfluencia, se las hambreadó en medio con SFB 1% durante 18 hs y luego se cosecharon las células. Se extrajo el ARN total utilizando Prepzol (Inbio Highway). El ARN se purificó con dos tratamientos de fenol-cloroformo y se agregó RQ1 DNase (Promega) para eliminar el ADN. La calidad y cantidad del ARN purificado se evaluó midiendo la absorbancia a 260 nm/280 nm (A260/A280) utilizando Nanodrop. La integridad del ARN se verificó además mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. La preparación de la biblioteca y la secuenciación fue encargada a la empresa Novogene (San Diego, EEUU). Para

cada muestra, se utilizó 1 µg del ARN total con depleción de rRNA y se secuenciaron 12Gb raw data (40M P150 reads) en la plataforma Novaseq Xplus.

### *Análisis estadístico*

Los adaptadores y las bases de baja calidad se eliminaron de las lecturas crudas de secuenciación utilizando Trimmomatic v0.032. Luego, las lecturas filtradas se alinearon utilizando el paquete Rsubreads. Se utilizaron los algoritmos DESeq2 y edgeR-QL (quasi-likelihood) para detectar DEG, según el factor de cambio (fold change)  $FC \geq 2.00$  y la tasa de descubrimiento falso (False Discovery Rate)  $FDR < 0,05$ . Para predecir la función de los genes y calcular la frecuencia de distribución de categorías funcionales, se identificaron los términos enriquecidos de la vía KEGG y de la ontología genética (GO). Se utilizaron la prueba hipergeométrica y el procedimiento de control FDR de Benjamini-Hochberg para definir la significancia enriquecida de cada vía (valor p corregido  $< 0,05$ ).

## **ENSAYOS CON INHIBIDORES**

Los tratamientos con inhibidores de factores de transcripción se llevaron a cabo en células HEK293T transfectadas y células T-47D WT y MCF-7 WT, en medio con SFB 1% durante dos horas en las siguientes concentraciones: SP600125 10 µM y BP-1-102 7 µM, seguidas de los estímulos correspondientes. Respecto a la 5-Azacitidina, se diseñó un protocolo adaptando las condiciones utilizadas por otros autores en líneas celulares no mamarias (Sohn 2010). Brevemente, se cultivaron células T-47D en medio completo hasta 80% confluencia, luego se incubaron durante 48 hs en medio con SFB 1% y distintas concentraciones de 5-Azacitidina (1 µM, 2 µM y 5 µM), recibiendo renovación del medio celular cada 12 h para compensar el decaimiento del fármaco. Finalmente, las células recibieron estímulos de SFB 10% durante 0 h, 30 minutos, 1 hora y 2 horas. Luego se cosecharon las proteínas y el RNA para realizar distintas determinaciones.

## **PREPARACIÓN DE ARN TOTAL**

Se obtuvieron muestras de ARN provenientes de líneas celulares crecidas en placas de cultivo. Para extraer el ARN total, se utilizó el kit ARN-PrepZOL (Inbiohighway, # R0010), empleando 0,3 mL para placas de 6 pocillos y 1 mL para placas de 10 cm. Posteriormente, se realizó en todos los casos una extracción con cloroformo, seguida de una precipitación del ARN con isopropanol (1 vol), dos lavados con etanol 75 % y finalmente una resuspensión en agua libre de ribonucleasas. Las muestras de ARN totales fueron cuantificadas en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y fueron conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se verificó también que la relación OD260/OD280 fuese de entre 1,7 y 2 lo que indica una pureza aceptable del ARN total obtenido. Cuando fue posible, se realizó una dilución de 200 ng/ $\mu\text{l}$  final de ARN total en agua libre de ribonucleasas y re-cuantificó la muestra.

## **TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR EN TIEMPO REAL**

Para realizar la transcripción reversa se utilizó 1  $\mu\text{g}$  de ARN total, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de una mezcla de oligonucleótidos al azar (Thermo Fisher Scientific, cat. 48190011) y oligo dT en relación 3:1, 1 mM de dNTPs (Thermo Fisher Scientific), 200 U de la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega), y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, se llevó el ARN a 10,9  $\mu\text{l}$  final con agua destilada libre de ARNasas y se desnaturalizó junto con la mezcla de oligonucleótidos al azar y oligo dT (3:1) por calentamiento a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos en termocicladora. Luego, para evitar la renaturalización, la muestra se colocó inmediatamente en hielo. Finalmente se agregó la mezcla que contenía el resto de los reactivos mencionados anteriormente resultando en 20  $\mu\text{l}$  finales y se llevó a cabo la reacción utilizando el siguiente programa en termocicladora: 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Todas las PCRs en tiempo real en este trabajo se realizaron en 12.5  $\mu\text{l}$  de volumen final con 4 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de dNTPs, 0.625 U de la enzima Taq

polimerasa (Inbio Highway) y 1  $\mu$ M de cada par de oligonucleótidos específicos para la secuencia a amplificar. Se utilizó el método Sybr Green (Roche) incorporando 1:30000 a la mezcla de reacción y las reacciones se realizaron en la termocicladora CFX Maestro (BioRad). Cada muestra a analizar fue determinada por duplicado. Los oligonucleótidos utilizados fueron nombrados con prefijos según la especie correspondiente, en la cual hsa corresponde a Homo sapiens y mm a Mus musculus, y son los siguientes:

<b>Nombre del primer</b>	<b>Secuencia (5' -&gt; 3')</b>
hsa_TTP_Fw	<b>AGCCTGACTTCAGCGCTCC</b>
hsa_TTP_Rv	<b>GCGACAGGAGGCTCTCGTA</b>
hsa_rRNA18s_Fw	<b>GTAACCCGTTGAACC</b>
hsa_rRNA18s_Rv	<b>CCATCCAATCGGTAGTAGCG</b>
mm_TTP_Fw	<b>CCACCTCCTCTCGATACA</b>
mm_TTP_Rv	<b>GCTTGGCGAAGTTCACCCA</b>
mm_Tnfa_Fw	<b>CCACCACGCTCTTCTGTCTACT</b>
mm_Tnfa_Rv	<b>GGGTCTGGGCCATAGAACTGAT</b>

*Tabla M2. Listado de cebadores utilizados.*

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los resultados están expresados como media  $\pm$  error estándar. Para determinar diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) se hicieron test de t de Student o ANOVA de uno o dos factores, seguidas de pruebas de comparación múltiple de Tukey. Los análisis estadísticos se hicieron con el programa GraphPad 10.5. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas en los casos en que  $p < 0,05$  y los resultados se expresaron con uno o varios asteriscos (en cada pie de figura se indica el P valor asociado a cada uno) y corchetes indicando qué conjuntos de datos se comparan en cada caso, o letras en cuyo caso,

aquellos grupos de datos que no compartieran una misma letra, se consideran diferentes estadísticamente.

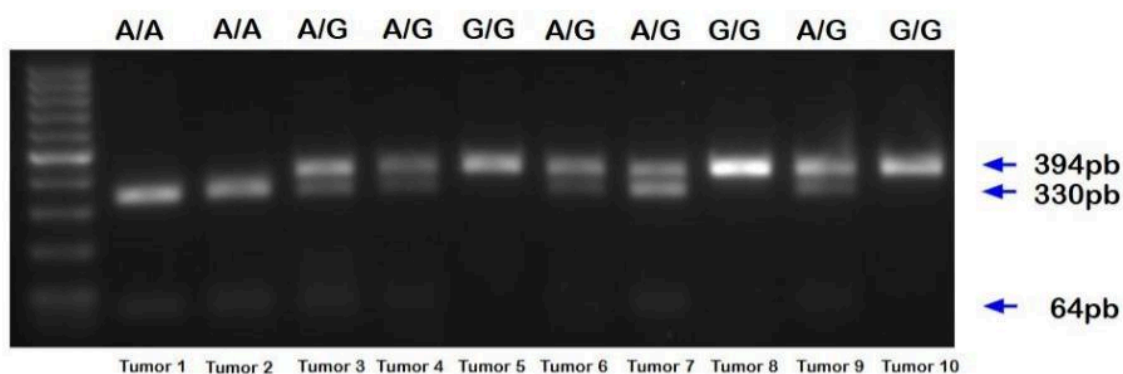
# RESULTADOS

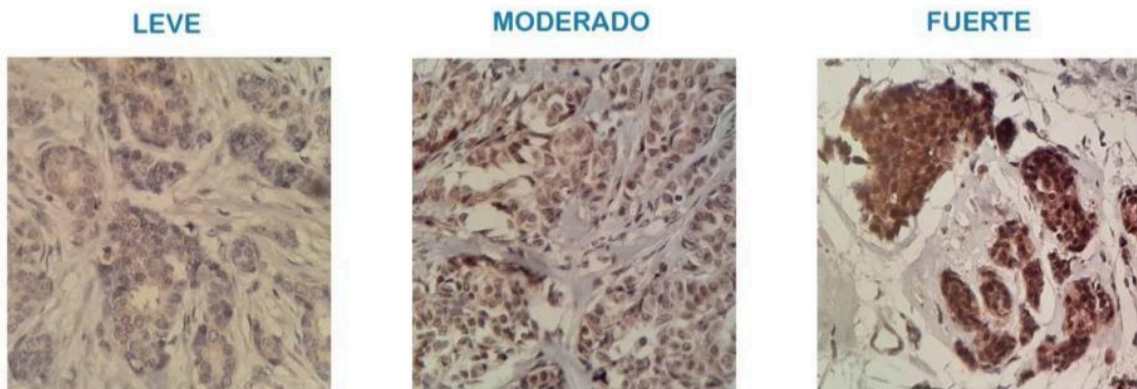
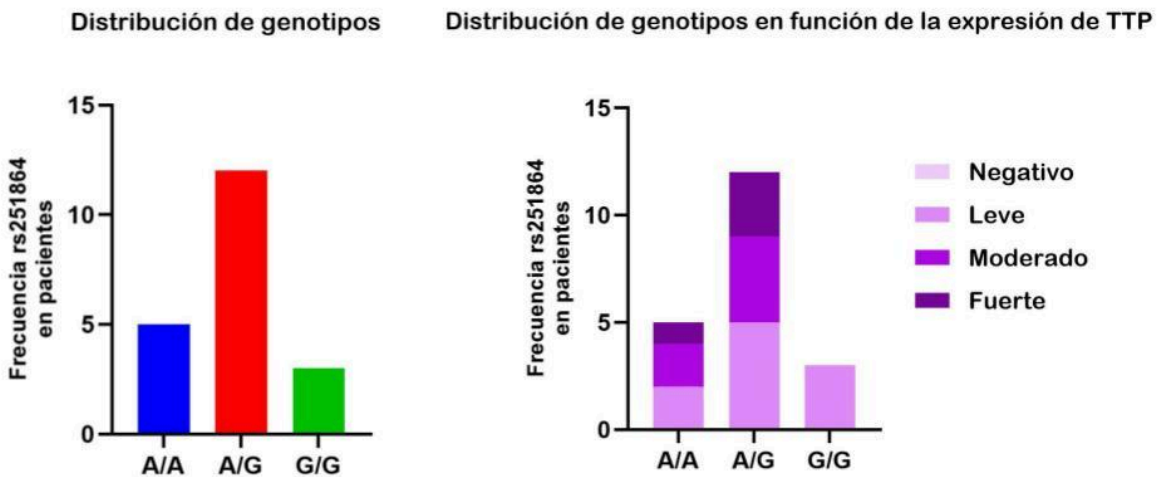
---

## LA PRESENCIA DE GUANINA (G) EN EL POLIMORFISMO (SNP) RS251864 ESTÁ ASOCIADA A UNA MENOR EXPRESIÓN DE TTP EN TUMORES Y LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA LUMINAL

Con el objetivo de desarrollar un método sencillo y eficaz para la genotipificación del rs251864 en tumores de pacientes y en líneas celulares establecidas, pusimos a punto una técnica de PCR-RFLP (ver detalles en Materiales y Métodos) para detectar la presencia de A ó G en ese SNP. Realizamos este procedimiento con las muestras de tumores mamarios de una cohorte de 20 pacientes con cáncer de mama del subtipo Luminal del Hospital “Magdalena V de Martínez” de General Pacheco, Pcia de Buenos Aires, Argentina (Figura R1) y en las líneas celulares de cáncer de mama luminal MCF7, MDA-MB-231 y T-47D (Figura R2).

**A**



**B****C**

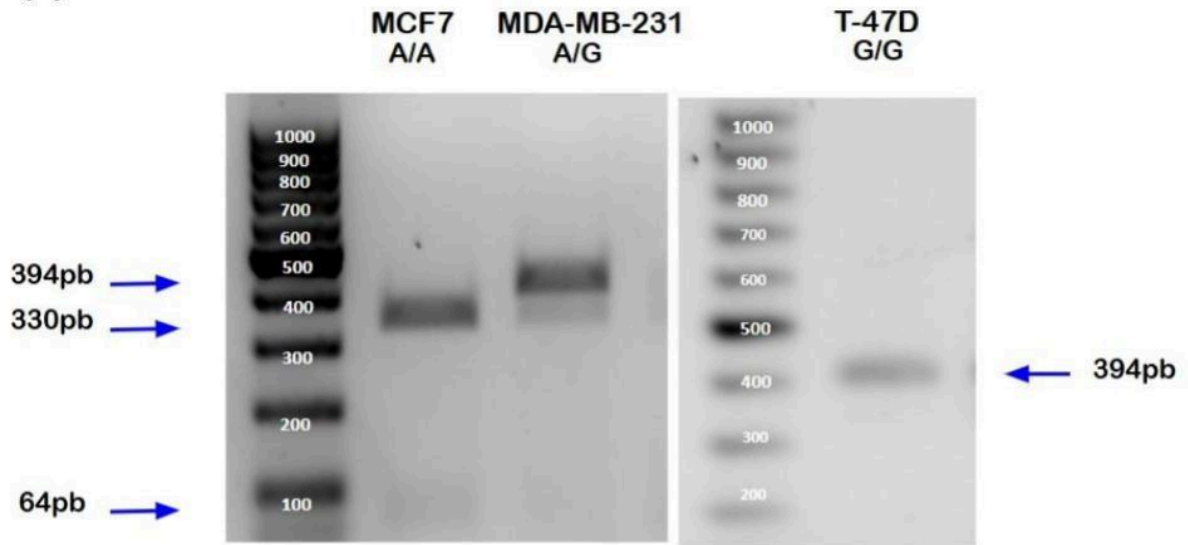
**Figura R1. Genotipificación, análisis de distribución del genotipo y frecuencia de las variantes de rs251864 en una población de pacientes de la Pcia de Buenos Aires con carcinomas mamarios.** **A.** Imagen representativa de la determinación de la presencia de las variantes de rs251864 en tumores de las pacientes mediante PCR seguida de digestión con enzimas de restricción (RFLP). Los tamaños de los fragmentos obtenidos están señalados con flechas. **B.** Imagen representativa de los niveles de expresión de TTP analizados por inmunohistoquímica (IHQ) en preparados de biopsias de carcinomas mamarios de pacientes. **C.** Frecuencia de las variantes de rs251864 en la población analizada ( $n = 20$ ) (izquierda). Asociación de los niveles de TTP, por IHQ, con la distribución de las variantes de rs251864 en las mismas muestras de pacientes (derecha).

Estos resultados indican que el alelo G está presente en alrededor del 75%, considerando homocigosidad y heterocigosidad en conjunto, de la población de pacientes analizada. Además, observamos que las mujeres con genotipo GG

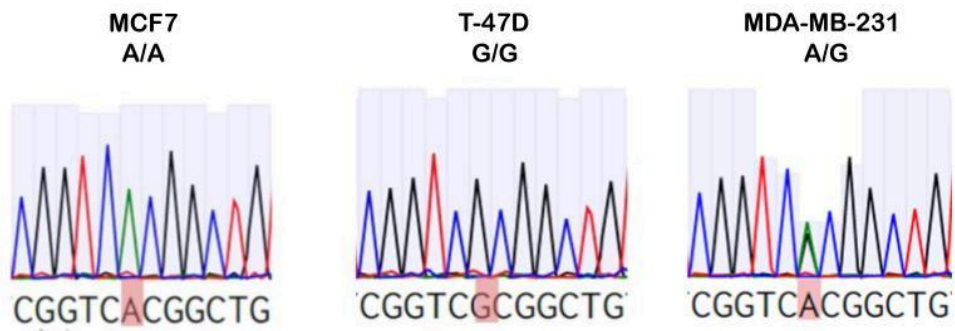
muestran bajos niveles de expresión de la proteína TTP, analizada por IHQ, en comparación con las muestras homocigotas para la variante A que presentan, en su mayoría, intensidad de tinción moderada o fuerte utilizando esta técnica de detección. Consideramos que este dato es particularmente relevante, dado que estudios epidemiológicos previos señalan que la presencia de un alelo G en el polimorfismo rs251864 (AG + GG vs AA) presenta una asociación estadísticamente significativa con un mal pronóstico en pacientes caucásicas de cáncer de mama de los EEUU (Upadhyay 2013).

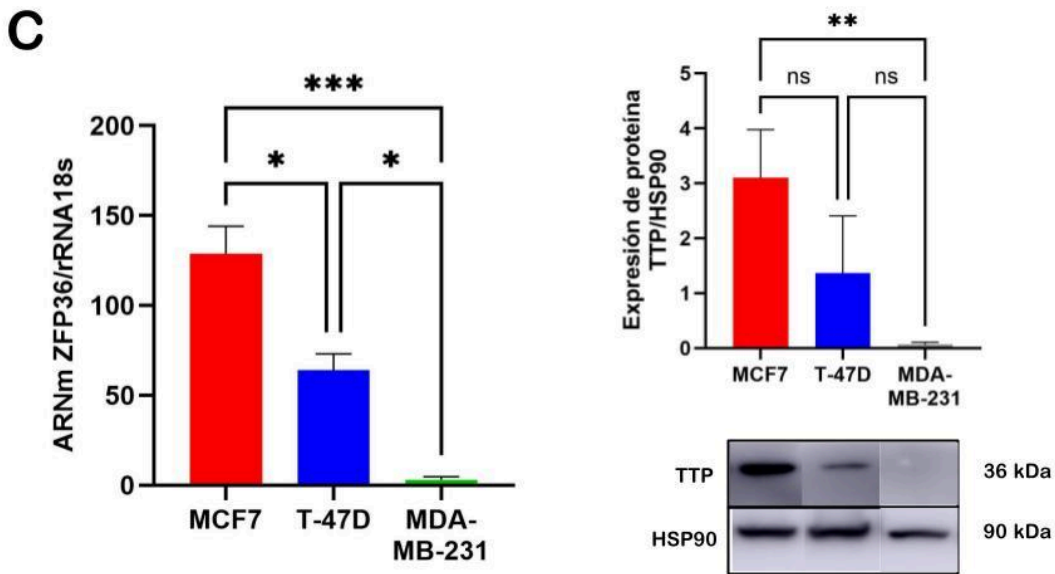
Luego evaluamos la presencia de las variantes alélicas en MCF7, MDA-MB-231 y T-47D, líneas celulares humanas de uso generalizado en investigación en cáncer de mama. Los resultados obtenidos nos permitieron determinar que las MCF7 presentan homocigosis del alelo A, las MDA-MB-231 heterocigosis A/G y que las T-47D presentan homocigosis del alelo G para el polimorfismo rs251864. En el caso de las MDA-MB-231, dado que presentan trisomía del cromosoma 19 donde se localiza ZFP36, no nos resultó posible por nuestro método determinar cuántos alelos de A o G presenta, pero sí podemos asegurar que presenta al menos 1 copia de A y 1 copia de G (Figura R2). Realizamos estas determinaciones tanto por la amplificación de la región del polimorfismo por PCR y digestión de los fragmentos generados mediante una enzima de restricción (RFLP), como por la secuenciación de la región promotora por el método de Sanger. Este último abordaje nos permitió determinar que el genotipo AA vs GG en rs251864 es la única diferencia genética que presentan las líneas celulares T-47D y MCF7 en la región de 640 pb analizada (Figura R2 A y B). Respecto a la secuenciación del mismo fragmento correspondiente a MDA-MB-231, se observa una superposición de dos picos, uno correspondiente a una A y otro a una G, sobre el sitio de la variante, lo cual confirma la presencia de los dos alelos que ya habíamos detectado por PCR-RFLP (Figura R2 B).

**A**



**B**

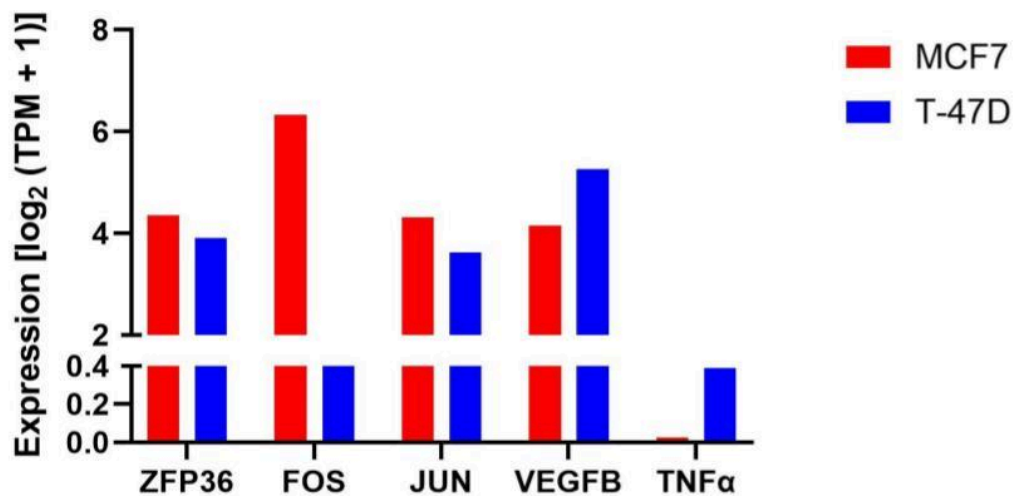




**Figura R2. Genotipificación de rs251864 y determinación de los niveles basales de expresión del ARNm y la proteína de TTP en las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y T-47D. A.** Determinación del genotipo de rs251864 mediante PCR-RFLP. **B.** Secuenciación Sanger de un amplicón de 640 pb correspondiente a la región del promotor de ZFP36 en las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y T-47D. El sitio de la variante se indica con un recuadro rojo. **C.** Cuantificación de la expresión del ARNm de ZFP36 relativizado a rRNA18s en células MCF7, MDA-MB-231 y T-47D (izquierda). Se grafica la media de 3 réplicas biológicas  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de un factor y un análisis de comparación múltiple de Tukey (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,01$ ). Niveles de proteína TTP medidos por Western Blot en las células MCF7, MDA-MB-231 y T-47D. Se cuantificaron las bandas de TTP en relación al control de carga HSP90 y se grafica la media de los niveles de expresión relativos de 3 réplicas biológicas  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de un factor y un análisis de comparación múltiple de Tukey (ns= no significativo, \*\*  $p < 0,01$ ).

A continuación, analizamos la expresión de ZFP36/TTP en las tres líneas celulares mencionadas, mediante la determinación de los niveles de ARNm y proteína. Constatamos que las células T-47D presentan una expresión menor de ZFP36/TTP que las células MCF7, aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa cuando analizamos los niveles de proteína de TTP mediante Western blot (Figura R2 C). En el caso de las células MDA-MB-231, la expresión de TTP es prácticamente indetectable, tanto a nivel de ARNm como de proteína (Figura R2 C). Debido a esto, decidimos establecer a MCF7 y T-47D como nuestros modelos de estudio, y no continuaremos con la caracterización de MDA-MB-231 a mayores niveles.

Teniendo en cuenta estos resultados, evaluamos por análisis bioinformático a partir de datos públicos de RNAseq de las líneas celulares MCF7 y T-47D los niveles de ARNm de blancos de degradación de TTP y de proteínas como JUN y FOS, que se co-expresan con TTP en distintos tipos celulares, incluyendo células de cáncer de mama (Canzoneri 2020). Por este análisis encontramos que el ARNm de FOS presenta, como el de TTP/ZFP36, niveles mucho más elevados en MCF7 que en T-47D. JUN muestra un patrón similar pero la diferencia es más modesta. Por otro lado, mensajeros blanco de la actividad degradativa de TTP como VEGFB y TNF $\alpha$  (Heping Cao, Joseph F. Urban et al. Obesity, 2008; Sohei Makita, Hiroaki Takatori et al. Frontiers in Immunology, 12, 7 2021) presentan niveles aumentados en la línea T-47D con respecto a MCF7 (Figura R3).



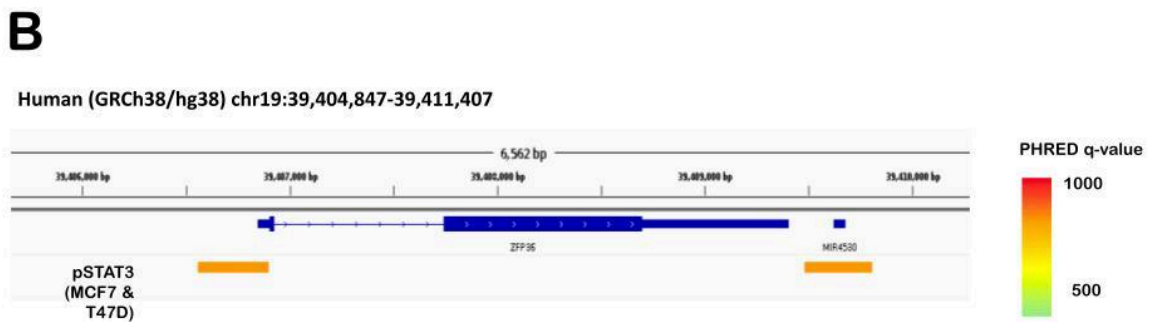
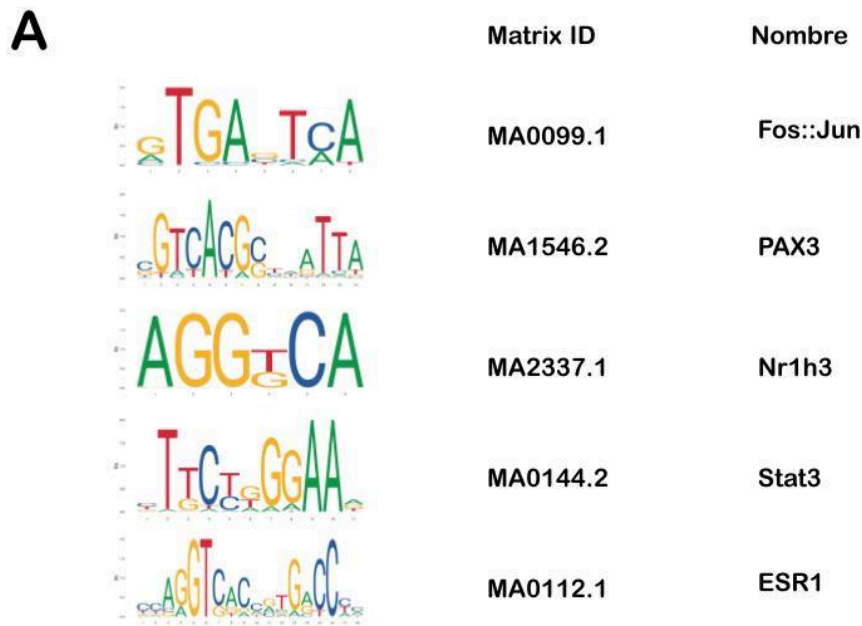
**Figura R3. Expresión de factores co-regulados con TTP y blancos de degradación.** Cuantificación de la expresión de ARNm de factores que se co-expresan con ZFP36 (FOS y JUN) y ARNm blancos de TTP (VEGFB y TNF $\alpha$ ). Datos públicos normalizados a las condiciones de lote, obtenidos a partir de experimentos de RNAseq pertenecientes a la base de datos Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE).

Estos resultados confirman resultados previos acerca de la regulación de la expresión de TTP en células epiteliales mamarias, así como los efectos sobre sus

genes blanco. Estas características son coherentes con el perfil de expresión de TTP hallado en las células T-47D y MCF7.

## **LA AFINIDAD DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CON EL PROMOTOR DE ZFP36/TTP SE VE AFECTADA POR LAS VARIANTES DE RS251864**

A continuación, quisimos determinar qué factores de transcripción podrían ser afectados en su actividad por la presencia del polimorfismo en el promotor de ZFP36. Para ello, realizamos un análisis bioinformático de enriquecimiento de motivos de unión de factores de transcripción (SEA - Simple Enrichment Analysis) en dicha región utilizando la base de datos *JASPAR CORE (2022) vertebrates* en el entorno *MEME Suite*. Analizamos una región de 192 pb de longitud perteneciente al promotor de *ZFP36* y que contiene al SNP rs251864 en posición central, con el objetivo de incluir la mayor cantidad de motivos cercanos al sitio de la variante y poder, a su vez, focalizar en la región proximal a la misma (ver más detalles en Materiales y métodos). Obtuvimos un set de 1205 motivos, de longitud entre 5 y 35 bases, asociados a diferentes probabilidades y distancias respecto al SNP. Aquellos que nos resultaron más relevantes se muestran en la Figura R4A. El análisis muestra, en concordancia con lo reportado por otros autores (Upadhyay 2013), que AP-1 y Nr1h3 (gen que codifica para LXR $\alpha$ ) son factores de transcripción con alta probabilidad de unión al ADN en esta región. Asimismo, hallamos motivos de unión correspondientes a otros factores de transcripción que no habían sido señalados como reguladores de la expresión de ZFP36/TTP, como STAT3 y ESR1 (gen codificante del Receptor de estrógenos  $\alpha$ ). Por último, el sitio del polimorfismo presenta una probabilidad significativa de unión al factor de transcripción PAX-3, de gran relevancia en el desarrollo de la glándula mamaria durante la embriogénesis (Macias 2012) y descrito como oncogen en el contexto tumoral (Karsli-Ceppioglu 2017).



**Figura R4. Análisis de factores de transcripción con capacidad de unión al promotor de ZFP36 humano.** **A.** Motivos de FT enriquecidos significativamente en la región cercana a rs251864 analizados utilizando la base de datos “JASPAR CORE (2022) vertebrates” en el entorno “MEME Suite”. **B.** Sitios de unión de pStat3 identificados mediante experimentos de CHIP-seq en las líneas celulares MCF-7 y T-47D, en el locus de los genes ZFP36 y hsa-miRNA-4530. Se grafica el valor promedio de los datos obtenidos a partir de 15 experimentos independientes con un umbral de confianza de  $q=500$  en la escala PHRED. La escala de color de los sitios de unión de pStat3 corresponde al nivel de confianza en escala PHRED del valor  $q$ .

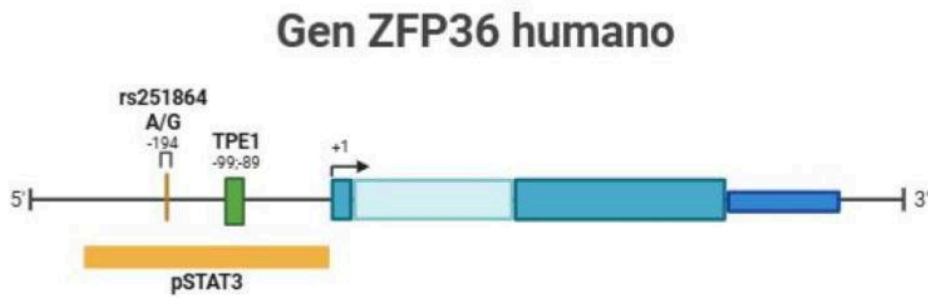
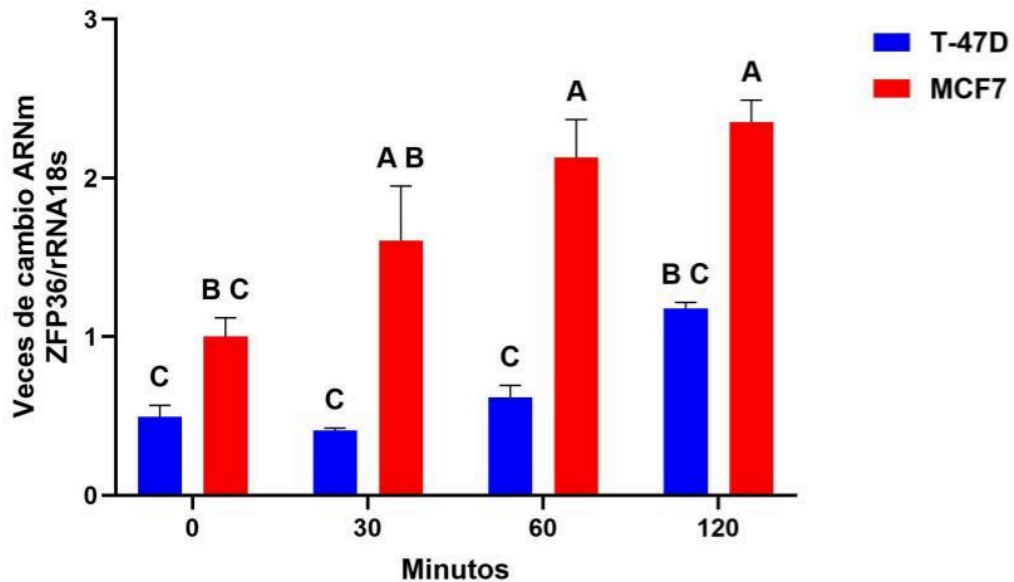
Posteriormente, con el objetivo de identificar para cuál de estos factores de transcripción existe evidencia experimental de interacción con el promotor de ZFP36/TTP en las células T-47D y MCF7, realizamos un análisis bioinformático de datos públicos de CHIP-seq en las mencionadas líneas (ChIP Atlas - Oki & Ohta 2018). Encontramos que STAT3 fosforilado es el factor de transcripción con mayor

probabilidad de interactuar con la región de interés (Figura R4B). Por otro lado, también identificamos a LXR $\alpha$  y AP-1 como posibles interactores, aunque con una menor probabilidad.

Nos resultó llamativo comprobar que, además de unirse a la región promotora de *ZFP36*, STAT3 presenta sitios de unión en el locus del miRNA 4530 (microARN 4530), localizado 215 pb “río abajo” del 3'UTR de dicho gen.

## **INDUCCIÓN DIFERENCIAL DE ZFP36/TTP EN CÉLULAS MCF7 Y T-47D EN RESPUESTA AL SUERO**

Está reportado que el promotor de *ZFP36/TTP* aumenta su actividad al ser estimulado con Suero Fetal Bovino (SFB), siendo responsable de esta respuesta el denominado “elemento 1” (TTP Promoter Element 1, TPE1, Lai WS 1995). Este elemento corresponde a una secuencia palindrómica de 10 nucleótidos de longitud que está conservado entre el ratón y el ser humano, y es responsable del 85% de la respuesta al suero del promotor de *ZFP36* (Lai WS 1995). El mismo se encuentra 94 pb río abajo del polimorfismo rs251864 y dentro de la región identificada por su interacción con el factor de transcripción p-STAT3 (Figura R5 A). Por lo tanto, quisimos determinar si las variantes de rs251864 (genotipo AA y GG) introducen algún cambio en la respuesta a suero de las líneas T-47D y MCF7. Para ello, las células fueron incubadas con medio conteniendo SFB 1% (control) ó SFB 10% (tratadas) durante distintos tiempos. Los niveles de expresión del ARNm de *ZFP36/TTP* relativos al tratamiento control medidos por RT-qPCR se muestran en la Figura R6. Los resultados indican que, en las células MCF7, *ZFP36/TTP* es inducido a partir de los 30', y sostenidamente hasta los 120', de manera significativamente mayor que en la línea T-47D. Ésta última muestra una leve inducción en la transcripción a los 120' de estímulo.

**A****B**

**Figura R5. Estructura del promotor de ZFP36 y análisis de la respuesta al Suero Fetal Bovino (SFB) en células MCF7 y T-47D.** **A.** Representación del gen humano ZFP36 indicando los elementos relevantes del promotor y sus posiciones en números, correspondientes a las pares de bases respecto al +1 de inicio de la transcripción. **B.** Cuantificación de la expresión del ARNm de ZFP36 relativizado a rRNA18s en células MCF7 y T-47D en presencia de medio de cultivo conteniendo SFB 10% a distintos tiempos (minutos), expresada como veces de cambio respecto a la expresión a 0 minutos en MCF7. Se grafica la media de 3 réplicas biológicas  $\pm$ SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores y un análisis de comparación múltiple de Tukey ( $p < 0,05$ ). Los grupos que no comparten ninguna letra son significativamente distintos.

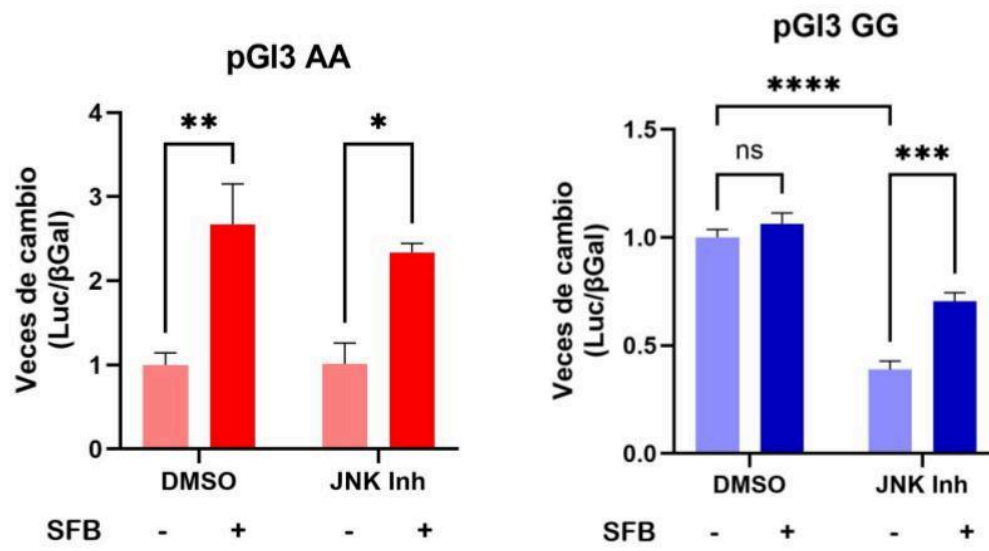
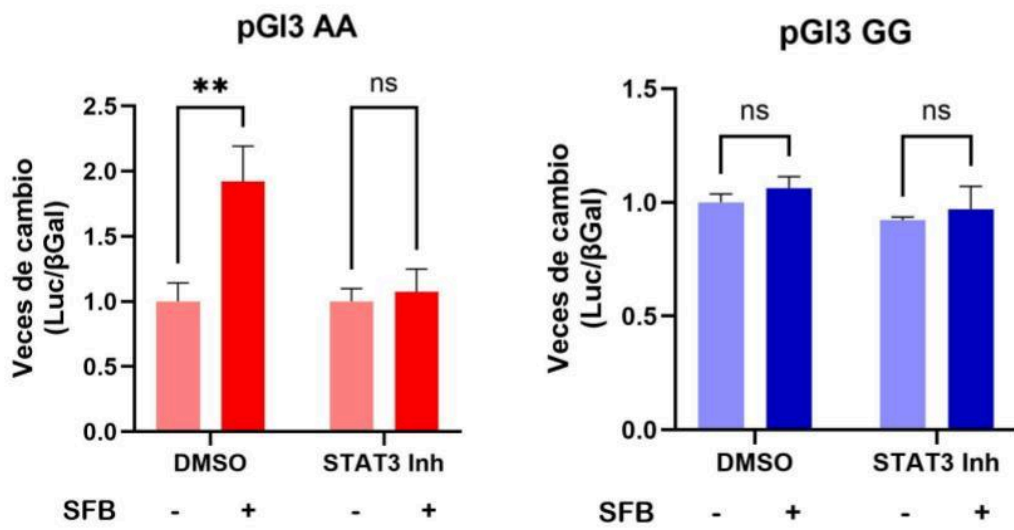
## AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE ZFP36/TTP DE CÉLULAS MCF7 Y T-47D

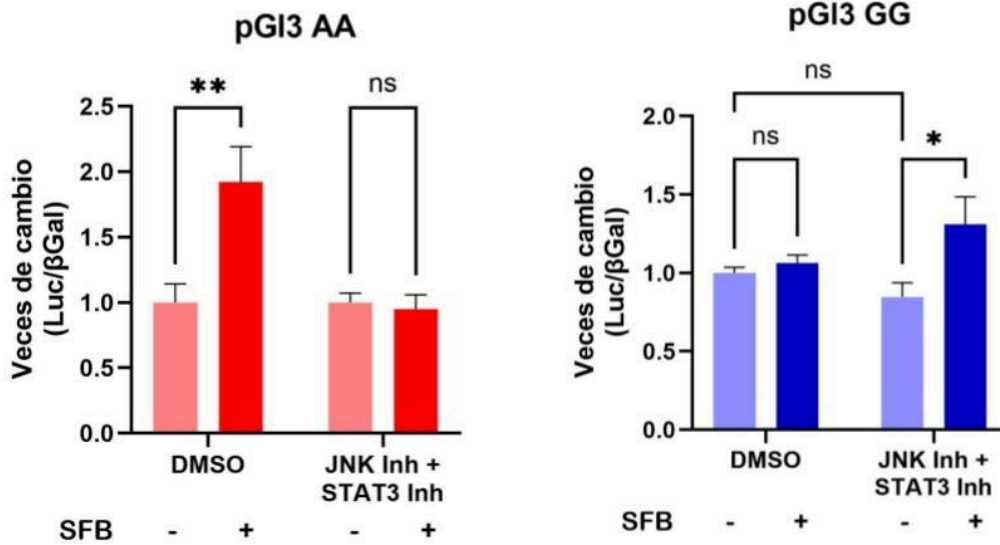
Con el objetivo de analizar en mayor detalle el impacto de las variantes del rs251864 en la actividad del promotor de *ZFP36*, se procedió a clonar la región ya descrita, conteniendo AA (de MCF7) ó GG (de T-47D) de dicho SNP, en plásmidos reporteros, río arriba del gen que codifica la enzima Luciferasa (ver Materiales y métodos). Las construcciones obtenidas fueron luego secuenciadas (para confirmar la presencia correcta de los insertos), amplificadas y transfectadas en células HEK293T durante 18 hs en medio con SFB 1%. La Figura R6 A muestra que en estas condiciones el plásmido con la variante AA presenta una actividad significativamente mayor que la secuencia conteniendo GG.

Luego, las células fueron estimuladas (o no) con SFB 10% por 240 minutos (4hs) y pre-tratadas (o no) durante 120 minutos (2hs) con inhibidores específicos para bloquear la actividad de AP-1 (JNK), de STAT3 o de ambos factores de transcripción (Figura R6 B, C y D).

**A**



**B****C**

**D**

**Figura R6. Actividad de los plásmidos pGI3-ZFP36PromAA-luc y pGI3-ZFP36PromGG-luc en respuesta a suero y en presencia de inhibidores de JNK y/o STAT3. A.** Esquema de clonado utilizado para la obtención de los plásmidos reporteros pGI3-ZFP36PromAA-luc (pGI3 AA) y pGI3-ZFP36PromGG-luc (pGI3 GG) (izquierda) y actividad luciferasa relativizada a la expresión del plásmido CMV-LacZ en células HEK293T transfectadas con uno u otro plásmido (derecha). Se muestran las veces de actividad de luciferasa con respecto a la mostrada por las células transfectadas con el plásmido pGI3-ZFP36PromAA-luc. Se grafica la media de 3 réplicas biológicas  $\pm$ SEM. SEM: error estándar de la media (Prueba t-Student, \*  $p < 0,05$ ) **B.** Actividad luciferasa relativizada a la expresión del plásmido CMV-LacZ en células HEK293T transfectadas con un plásmido reportero conteniendo 640 pb del promotor de ZFP36 con la variante AA (pGI3 AA) o GG (pGI3 GG) de rs251864 río arriba del gen de la luciferasa. Las células transfectadas fueron incubadas con un inhibidor de la actividad JNK (**B.**), STAT3 (**C.**) o JNK + STAT3 (**D.**) durante 2 hs, seguido de una inducción con SFB 10% durante 4 hs. Se muestran las veces de inducción con respecto a las células transfectadas con el plásmido pGI3 AA o pGI3 GG estimuladas con DMSO  $\pm$  SEM. Se grafica la media de 3 réplicas biológicas  $\pm$ SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores y un análisis de comparación múltiple de Tukey (ns=no significativo, P valor ajustado: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p = 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

En el caso del plásmido con la variante AA del promotor de ZFP36, proveniente de las células MCF7, se observa claramente la inducción por SFB y la dependencia de la misma a la presencia de STAT3 activo. Para esta variante, el bloqueo de JNK produce un efecto inhibitorio mucho más leve y la falta de inducción por SFB al tratar con ambos inhibidores parecería deberse, fundamentalmente, al bloqueo de STAT3 (Figura R6 A, B C y D, gráficos de barras en rojo). Por otro lado,

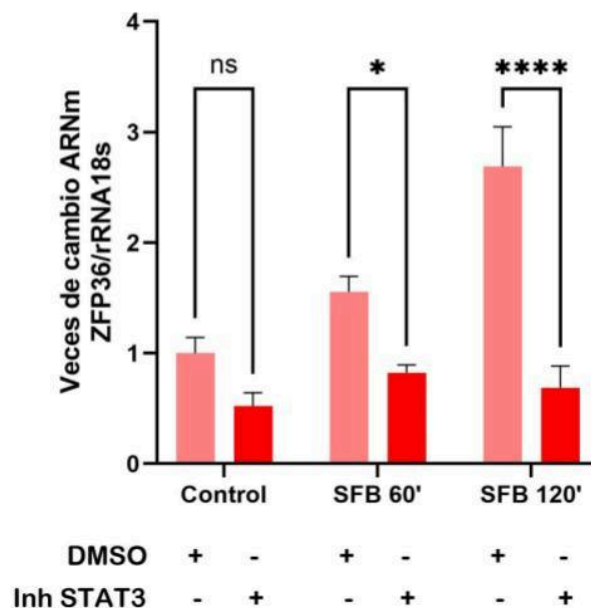
en las células transfectadas con el plásmido conteniendo la variante GG no se observa la inducción de actividad de luciferasa por el agregado de SFB 10%. Llamativamente, en este contexto, el agregado del inhibidor de JNK provocó una disminución de la actividad basal del promotor de *ZFP36* y lo “sensibilizó” al tratamiento con SFB. Al inhibir JNK y STAT3, el promotor conteniendo la variante GG no presenta cambios en su actividad basal, pero al ser inducido con SFB 10% vuelve a mostrar un incremento significativo, sugiriendo la participación de otro factor de transcripción, no considerado en estos experimentos (Figura R6 A, B, C y D, gráfico de barras en azul).

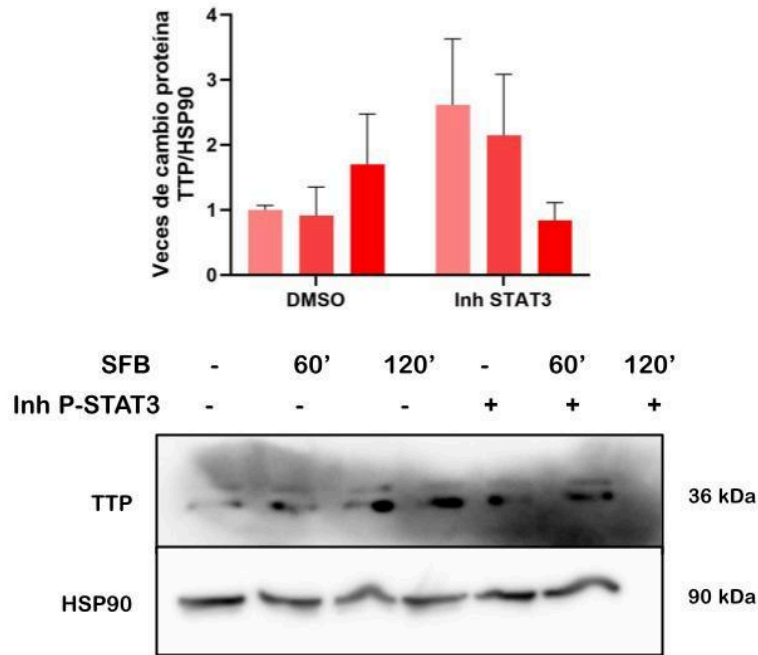
Estos resultados indican claramente una mayor actividad del promotor de *ZFP36* conteniendo la variante AA, con respecto a la GG, en condiciones basales y también luego de la inducción con SFB 10%. Asimismo, se demuestra que para la variante AA, la inducción por SFB es dependiente de la activación de STAT3. Por otro lado, el promotor con la variante GG tiene una menor actividad en presencia del inhibidor de JNK en condiciones basales, pero este pre-tratamiento “habilita” la inducción con SFB 10%, quizás mediada, al menos parcialmente, por STAT3, ya que en presencia de ambos inhibidores farmacológicos la activación del promotor por suero es menos significativa. Los resultados sugieren que la inhibición de la cascada de JNK, y posiblemente AP-1, permitiría la interacción del promotor con STAT3 y/o con otros factores de transcripción, desencadenando la inducción de la transcripción en presencia de SFB 10%.

Teniendo en cuenta estos resultados, a continuación quisimos evaluar los efectos del inhibidor de la activación de STAT3 sobre la expresión endógena de *ZFP36/TTP* en las líneas celulares MCF7 y T-47D. Realizamos una preincubación con el inhibidor (en la misma concentración utilizada en los experimentos con plásmidos reporteros) durante 2 hs y luego realizamos estímulos con SFB 10% durante 60' y 120'. Luego medimos la cantidad de ARNm y proteína de *ZFP36/TTP* en ensayos de RT-qPCR y Western blot. En la línea MCF7, el análisis del ARNm confirmó el rol relevante de STAT3 en la transcripción de *ZFP36* inducida por suero (Figura R7 A). Desafortunadamente, la mala calidad de los resultados obtenidos en los ensayos de Western Blot realizados en esta línea no nos permiten concluir si estos efectos se trasladan a la regulación de los niveles proteicos (Figura R7 B).

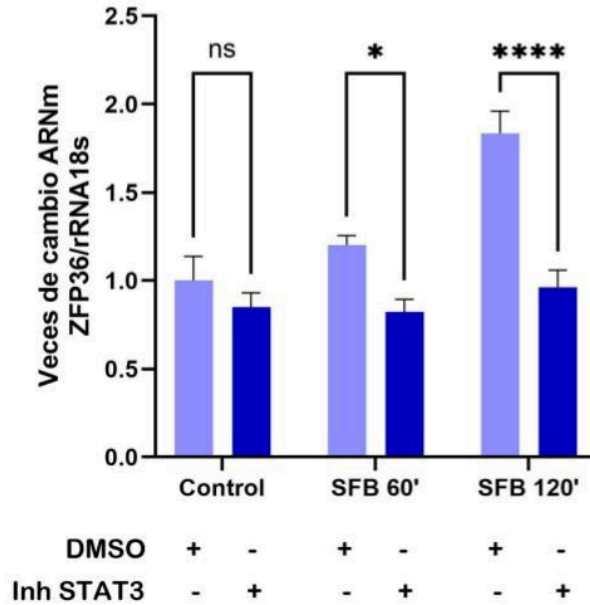
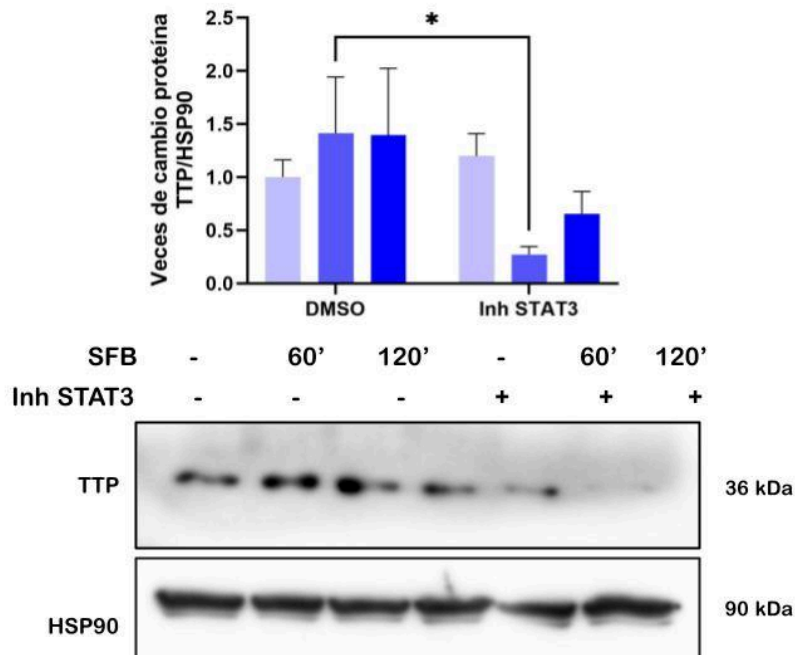
El análisis de los mencionados tratamientos en células T-47D reveló, a nivel del ARNm, que el tratamiento con SFB 10% fue capaz de inducir la expresión endógena de ZFP36, aunque con menor intensidad que en la línea MCF7. Asimismo, en estas condiciones se observó que la inhibición de la activación de STAT3 bloqueó la inducción observada (Figura R8 A). Con respecto a la regulación de la expresión de ZFP36/TTP a nivel proteico, el ensayo de Western Blot muestra una inducción muy modesta, no significativa, por el tratamiento con SFB 10%. Sin embargo, llama la atención la disminución de la proteína TTP luego del tratamiento con el inhibidor de STAT3, en presencia de SFB 10% (Figura R8B). No tenemos una explicación para este efecto, salvo la posibilidad de que dadas los bajos niveles de expresión de ZFP36 en esta línea celular, el bloqueo de STAT3 (que tiene un efecto en la expresión endógena de este gen, como se ve en la Figura R8A) genere una disminución aún más dramática a nivel de la proteína.

**A**



**B**

**Figura R7. Análisis del efecto de un inhibidor de STAT3 sobre la expresión de TTP en respuesta a suero en células MCF7.** Niveles de ARNm (A) y de proteína (B) de ZFP36/TTP medidos por RT-qPCR y Western Blot (respectivamente) en células MCF7 tratadas con DMSO o inhibidor de STAT3 durante 2 hs seguido de una inducción con SFB 10% a 0, 60 y 120 minutos. **A.** Se cuantificó la expresión del ARNm de ZFP36 en relación a la expresión de rRNA18s y se graficaron las veces de inducción respecto a las células MCF7 control (tratadas con DMSO y sin tratar con SFB). **B.** Se cuantificaron las bandas de TTP en relación al control de carga HSP90 y se graficaron las veces de inducción respecto a las células MCF7 control (tratadas con DMSO y sin tratar con SFB 10%). En los dos casos se grafica la media de 3 réplicas biológicas  $\pm$  SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores y un análisis de comparación múltiple de Tukey ( $P$  valor ajustado: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

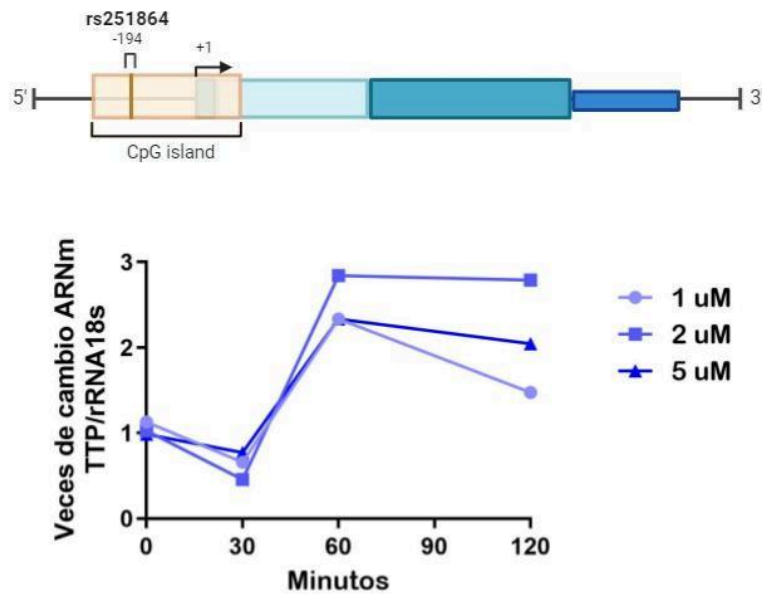
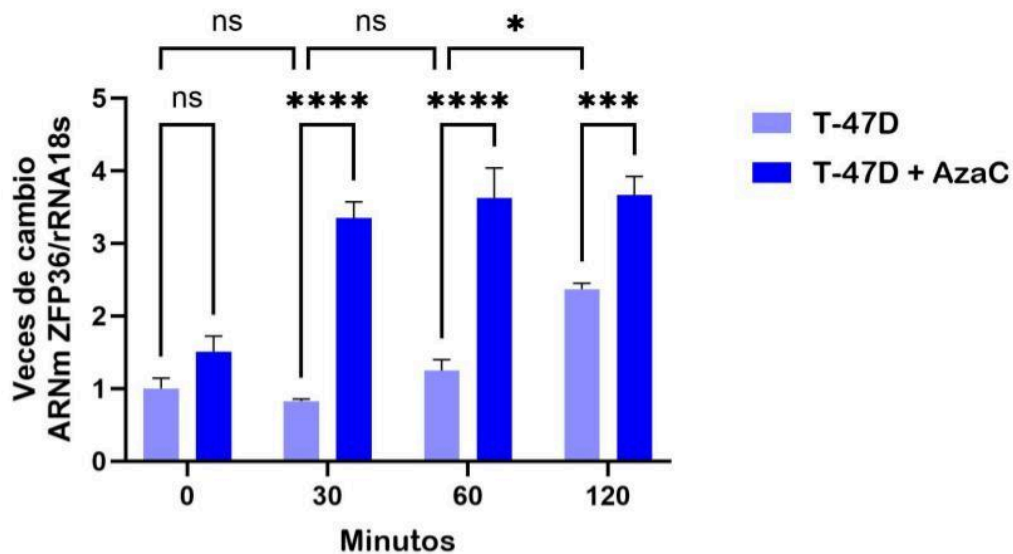
**A****B**

**Figura R8. Análisis del efecto de un inhibidor de STAT3 sobre la expresión de TTP en respuesta a suero en células T-47D.** Niveles de ARNm (A) y de proteína (B) de ZFP36/TTP medidos por RT-qPCR y Western Blot (respectivamente) en células T-47D tratadas con DMSO o inhibidor de STAT3 durante 2 hs seguido de una inducción con SFB 10% a 0, 60 y 120 minutos. **A.** Se cuantificó la expresión del ARNm de ZFP36 en relación a la expresión de rRNA18s y se graficaron las veces de inducción respecto las células T-47D control (tratadas con DMSO y sin tratar con SFB). **B.** Se cuantificaron las bandas de TTP en relación al control de carga HSP90 y se graficaron las veces de inducción respecto a las células T-47D control (tratadas con DMSO y sin tratar con SFB). Se grafica la media de 3 réplicas biológicas  $\pm$  SEM. En los dos casos se realizó un ANOVA de dos factores y un análisis de comparación múltiple de Tukey (P valor ajustado: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

## **LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE ZFP36/TTP EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS ESTÁ REGULADA POR MECANISMOS EPIGENÉTICOS**

El análisis realizado hasta el momento con la región 5'UTR del *ZFP36* nos sugirió la presencia de una isla CpG en la región estudiada. Por lo tanto, decidimos confirmar la presencia de regiones de ADN potencialmente metilables que podrían participar en la modulación de la expresión de este gen, y para ello, se utilizó la herramienta bioinformática EMBOSS Cpplot (Madeira F, 2024). Se analizó la secuencia entera del gen *ZFP36* según los parámetros *default* del algoritmo y, de esta manera, se identificó una isla CpG de 460 pb. La misma comprende una región que se extiende desde -262 hasta +198 respecto al TSS del gen, incluyendo al sitio del polimorfismo rs251864 (en -194) y al elemento de respuesta a SFB (TPE1) (Figura R9A).

Con el objetivo de determinar si los bajos niveles de expresión de *ZFP36/TTP* observados en la línea T47D y asociados al genotipo GG del rs251864 podían deberse a la metilación de la región promotora de dicho gen, se realizaron experimentos utilizando 5-Azacitidina (AzaC), un pan-inhibidor de las ADN metiltransferasas (DNMT), de uso común en investigación sobre metilación del ADN (ver Materiales y Métodos). El efecto de la AzaC se produce por la eliminación de todas las marcas de metilación del ADN durante la división celular obteniéndose células hijas con el genoma entero desmetilado. Por este motivo, se deben incubar las líneas celulares durante al menos 48 hs para asegurarse de que la mayor parte de la población se ha dividido y su genoma se encuentra sin marcas de metilación. En las células T-47D, probamos tres concentraciones distintas de AzaC (1 uM, 2uM y 5uM) (Figura R9B panel superior).

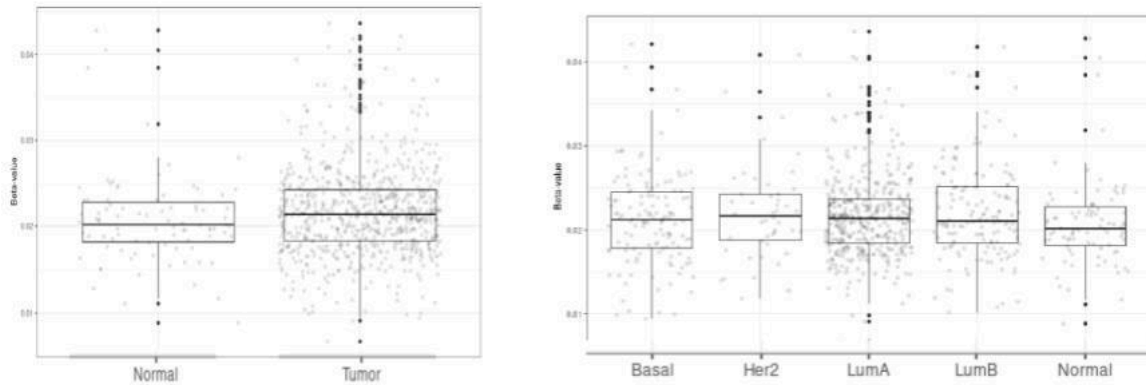
**A****B**

**Figura R9. Efectos de la utilización de un inhibidor de la metilación del ADN sobre la expresión de TTP en células T-47D.** A. Representación del gen ZFP36 mostrando la isla CpG predicha por EMBOSS Cpgplot y su localización en la región promotora del gen (arriba). B. Expresión del ARNm de ZFP36 en células T-47D tratadas durante 48 hs con distintas concentraciones de AzaC seguido de estímulo con SFB 10% (abajo) cuantificado en veces de cambio respecto a T-47D sin tratar con AzaC (panel superior). Cuantificación de la expresión del ARNm de ZFP36 relativizado a rRNA18s en células T-47D tratadas con DMSO o AzaC durante 48 hs, seguido de estímulo con SFB 10% a distintos tiempos, expresada como veces de cambio respecto a la expresión a 0 minutos de T-47D tratadas con DMSO. Se grafica la media de 3 réplicas biológicas  $\pm$ SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores y un análisis de comparación múltiple de Tukey (P valor ajustado: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p = 0.0005$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) (panel inferior).

Los resultados indican que, en las células T-47D, el pre-tratamiento con AzaC permitió un aumento en la actividad transcripcional de *ZFP36* en respuesta a suero significativamente mayor que sin dicho inhibidor de la metilación a partir de los 30 min (Figura R9B, panel inferior), de manera similar a lo previamente observado en las células MCF7 sin ningún tipo de pre-tratamiento (ver Figura R5 B). Dado que en las células T4 la presencia del alelo G en homocigosis en la posición del polimorfismo introduce una Citosina en la hebra complementaria del ADN, hipotetizamos que dicha base nitrogenada podría ser susceptible de metilación y, de esa forma, generar una señal de represión transcripcional ausente en las MCF7. De todos modos, no podemos descartar que otras regiones diferencialmente metiladas en las líneas celulares analizadas pudieran ser también responsables del efecto observado.

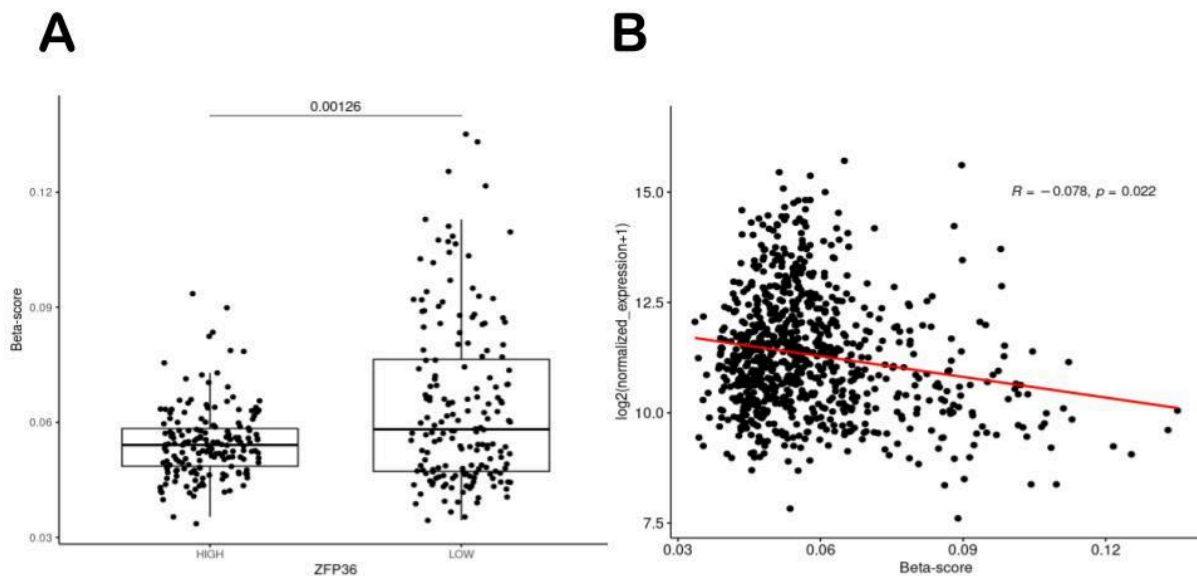
Teniendo en cuenta que nuestros resultados muestran que la metilación de la región 5'UTR de *ZFP36* pueden tener un efecto relevante en los niveles de expresión de este gen, decidimos verificar la existencia de esta situación en muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama. Para ello, realizamos un análisis bioinformático de datos públicos de *BeadChips HumanMethylation450* (Illumina) descargados de la base de datos *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA). Seleccionamos una sonda de 50 pb de extensión que mapea sobre la variante rs251864 (cg25739316) y graficamos los niveles de metilación del ADN correspondiente a dicha sonda (medidos como *Beta value*) comparando muestras de tejido normal y tumoral, teniendo en cuenta, en este último caso, el subtipo de cáncer de mama al que pertenece la muestra (Perou 2000).

Los datos indican que la sonda cg25739316 presenta un aumento en la media del *Beta value* de metilación en las muestras de tumores con respecto al tejido normal, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa (Figura R10, panel de la izquierda). Por otro lado, tampoco encontramos diferencias significativas en el análisis de estos datos de los tumores de las pacientes separadas por subtipo tumoral (Figura R10, panel de la derecha). Lamentablemente, no fue posible acceder a los datos genéticos de las pacientes, por lo cual no pudimos realizar este análisis separando por genotipo de rs251864.



**Figura R10. Análisis del estado de metilación del locus del SNP rs251864.** Se grafican los niveles de metilación expresados como Beta value correspondientes a la sonda cg25739316 que hibrida en la región donde se localiza el rs251864, utilizando los datos de pacientes con cáncer de mama provenientes de The Cancer Genome Atlas (TCGA). Se grafican los Beta value para tejidos provenientes de mama normal comparado con tumoral (izquierda) y según los distintos subtipos de cáncer de mama (derecha). Se realizó una prueba de Wilcoxon (izquierda) y de Kruskal-Wallis (derecha) para determinar la significancia estadística.

A continuación, quisimos evaluar los niveles de metilación del ADN en una región más abarcativa que incluyera toda la secuencia promotora del gen *ZFP36*, para lo cual utilizamos la totalidad de las sondas de *BeadChips HumanMethylation450* que mapeaban sobre dicha región. En este análisis pudimos tomar en cuenta la expresión de *ZFP36/TTP* en las muestras tumorales clasificándolas en niveles bajos o altos (Figura R 11A) y verificando si existe correlación entre los niveles de metilación del promotor (*Beta score*) y los niveles de ARNm de dicho gen (Figura R11B).

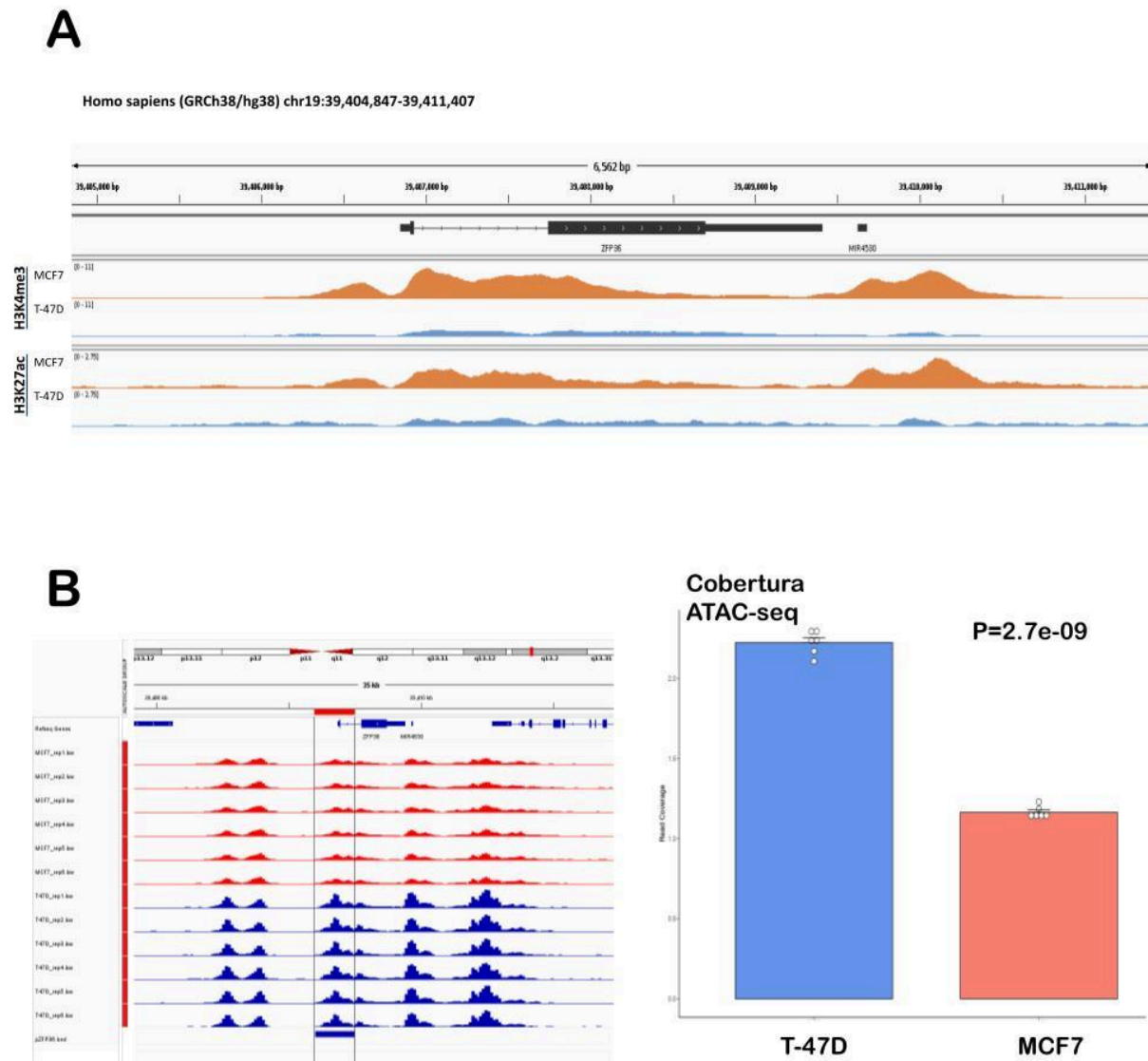


**Figura R11. Análisis del estado de metilación del promotor de ZFP36 y su relación con la expresión de este gen según datos de TCGA. A.** Niveles de metilación del promotor de ZFP36 (Beta score) comparados entre los cuartiles de expresión de TTP baja y alta en tumores de pacientes con cáncer de mama. **B.** Correlación entre la metilación del promotor (Beta score) y la expresión de ZFP36. Se realizó una prueba de Wilcoxon (A) y un análisis de correlación (B) para determinar la significancia estadística. En los dos casos se informa el P Valor asociado y, en el caso B, también el coeficiente de Pearson obtenido.

Los resultados muestran que existe una asociación significativa entre niveles bajos de expresión de ZFP36 y mayor metilación de la región promotora de este gen, y hay una correlación negativa significativa entre las variables analizadas (menor Beta score corresponde a mayor expresión de ZFP36). Por lo tanto la metilación de esta región del genoma parece ser un mecanismo relevante en la disminución de la expresión de ZFP36/TTP observada en tumores mamarios.

A continuación, quisimos evaluar la relevancia de otros mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión de ZFP36 y para ello realizamos un análisis de datos de ChIP-seq descargados de Gene Expression Omnibus (GEO) (Goppi & Kidder 2021), de dos modificaciones de histonas asociadas a activación transcripcional: H3K27ac y H3k4me3 (Figura R12 A). Nuestros resultados indican que ambas marcas presentan mayor señal detectada en las células MCF7 que en las T-47D, lo cual indica un contexto de mayor actividad transcripcional para el

promotor de ZFP36 y coincide con nuestros resultados previos. Sin embargo, al analizar datos de apertura de la cromatina provenientes de experimentos de ATAC-seq, encontramos que la señal acumulada en torno el promotor de ZFP36 presenta mayor disponibilidad del ADN en las células T-47D que en las MCF7 (Figura R12 B).

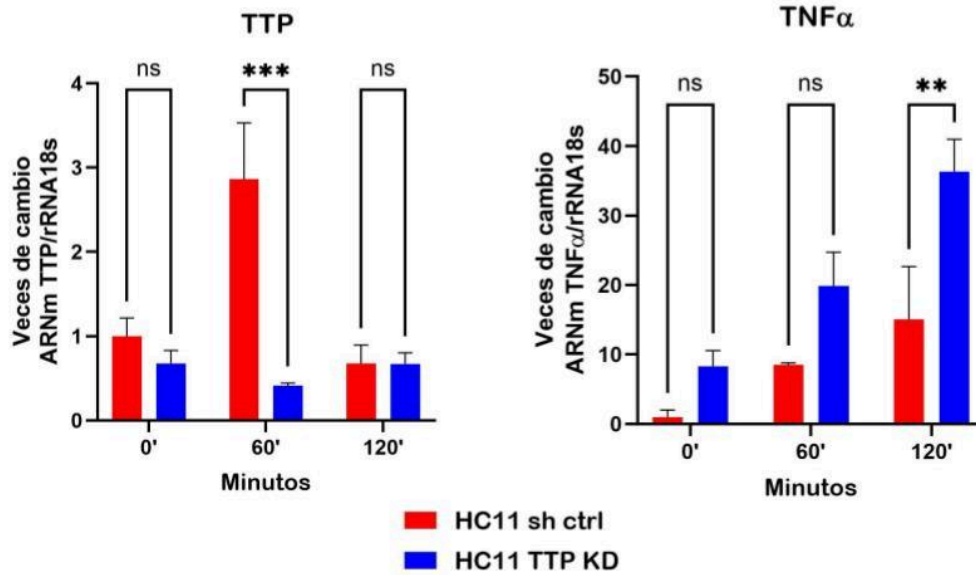
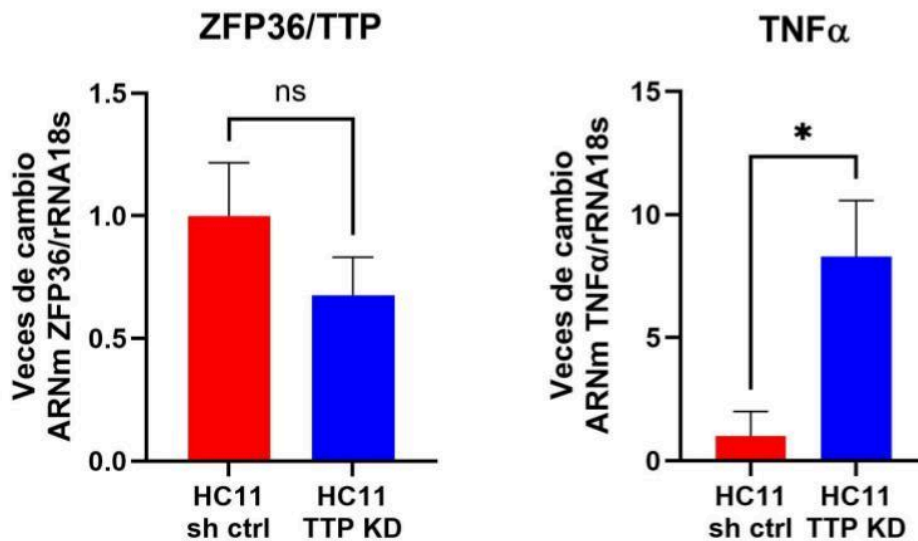


**Figura R12. Análisis del estado de modificaciones de histonas y apertura de la cromatina del promotor de ZFP36** **A.** Cuantificación de las modificaciones de histonas asociadas a activación transcripcional H3K27ac (arriba) y H3K4me3 (abajo) medidos por ChIP-seq en el locus de ZFP36, comparando las líneas MCF7 (rojo) y T-47D (azul). Se grafican los picos de señal integrados de 4 experimentos independientes, analizados a partir de datos públicos descargados de Gene Expression Omnibus (GEO) (Goppi & Kidder 2021). **B.** Análisis de apertura de la cromatina en la región del locus de ZFP36 (localización genómica indicada en el panel de la izquierda) comparando

*las líneas MCF7 (en rojo) y T-47D (en azul) a partir de datos públicos de 6 experimentos independientes de ATAC-seq (GSE233784). La integración de la cobertura correspondiente se muestra en el panel de la izquierda junto con el P Valor obtenido.*

## **LA DISMINUCIÓN EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE TTP CONFIERE CARACTERÍSTICAS PRO-TUMORALES A LAS CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS**

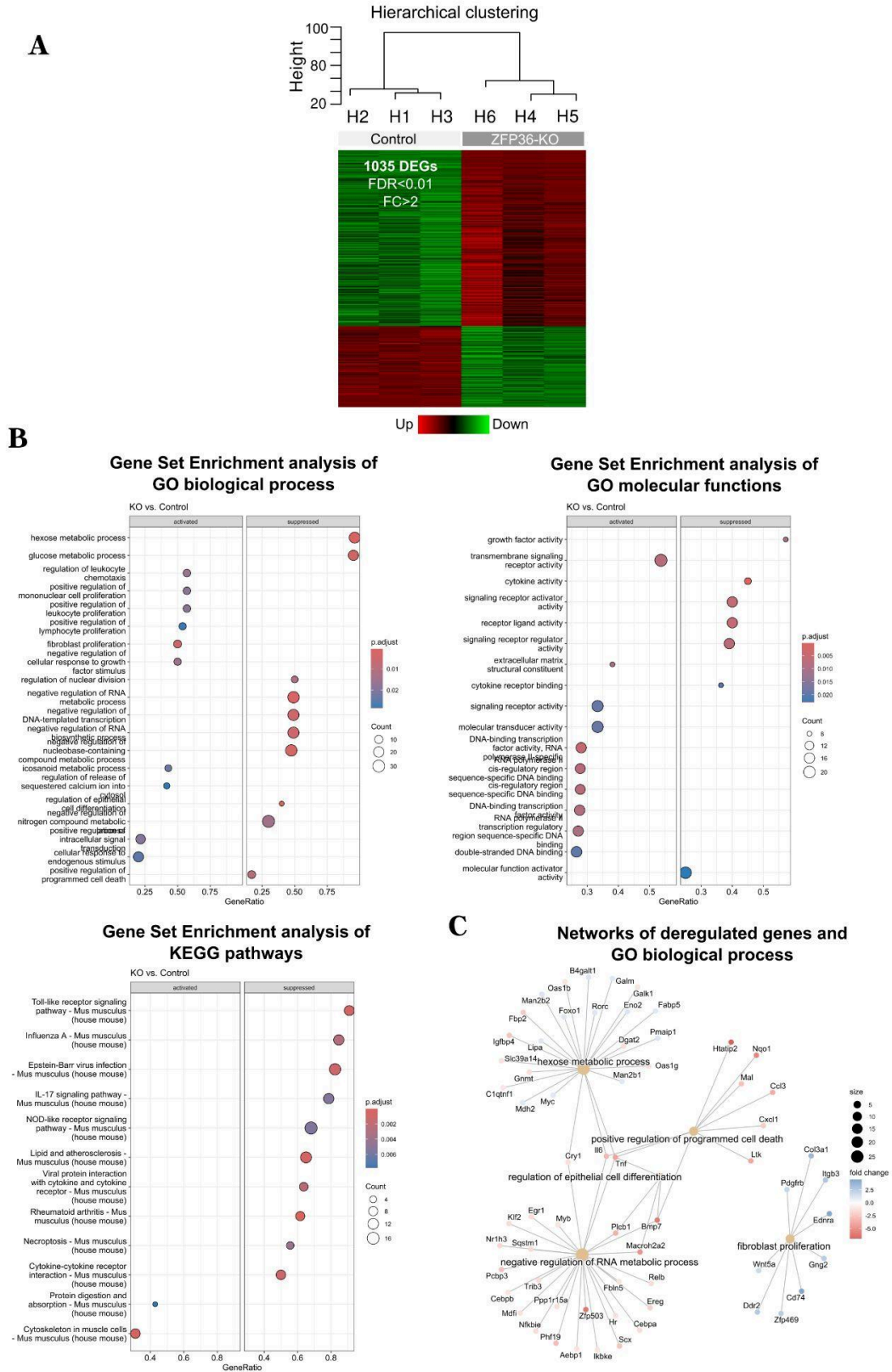
Diversos autores han verificado que la disminución en los niveles de expresión de ZFP36/TTP está asociado al fenotipo neoplásico en distintos tejidos incluyendo la glándula mamaria (Brennan 2009). Por otro lado, nuestro grupo ha demostrado que el silenciamiento parcial de ZFP36/TTP en células mamarias no-tumorigénicas de ratón lleva a un aumento significativo en los niveles de la citoquina TNF $\alpha$ , lo que induce muerte celular y disminución de las células progenitoras de este tejido (Stedile 2024). Por lo tanto, en este trabajo nos propusimos analizar si la disminución en la expresión de ZFP36/TTP en este sistema generaba cambios asociados a la progresión tumoral, a pesar del fenotipo pro-apoptótico observado previamente. Para esto, utilizamos las líneas derivadas de las células mamarias murinas HC11, transfectada de manera estable con shRNAs *scrambled* (HC11 Sh-control) o shRNA específico contra ZFP36 (HC11 TTP-KD) descritas en Stedile et al 2024. En primer lugar quisimos verificar la respuesta de estas células a la inducción por SFB10% para lo cual cada sublínea celular fue cultivada en medio completo hasta una confluencia de alrededor del 80%, momento en el cual se les cambió el medio a SFB 1% y para luego estimular con SFB 10%, seguido de la determinación de niveles de expresión de RNAm de TTP y TNF $\alpha$  por RT-qPCR. Los resultados se muestran en la Figura R13.

**A****B**

**Figura R13. Análisis de la expresión de ZFP36/TTP y TNF $\alpha$  en las células HC11 Sh Ctrl y HC11 TTP KD en respuesta al tratamiento con suero. A.** Cuantificación de la expresión del ARNm de ZFP36 relativizado a rRNA18s en células HC11 Sh Ctrl y HC11 TTP KD expuestas a un estímulo de SFB a distintos tiempos (indicado en minutos). Se grafica la media de 3 réplicas biológicas  $\pm$ SEM. Se realizó un ANOVA de dos factores y un análisis de comparación múltiple de Tukey (P valor ajustado: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p = 0.0041$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). **B.** Cuantificación de la expresión del ARNm de ZFP36 (izquierda) o TNF $\alpha$  (derecha) relativizado a rRNA18s en células HC11 Sh Ctrl y HC11 TTP-KD en condiciones de cultivo con SFB 1% (medio mínimo). Se expresa como veces de cambio respecto a HC11 sh ctrl. Se grafica la media de 3 réplicas biológicas  $\pm$ SEM. Se realizó una prueba t de Student (\*  $p < 0.05$ ).

Los resultados muestran que la expresión del ARNm de ZFP36/TTP es menor en las células TTP-KD que en las Sh-Control en condiciones basales, pero, fundamentalmente, luego de estimular con SFB 10%, por 60 minutos. Esto se debe a que la inducción que ejerce el suero sobre la expresión de ZFP36/TTP en las células Sh-Ctrl, no ocurre en las células TTP-KD. Por otro lado, los niveles de expresión del blanco más relevante de TTP, el ARNm de la citoquina TNF $\alpha$ , son más altos en las células TTP-KD que en las Sh-Control tanto en condiciones basales como a lo largo de todo el experimento de inducción, particularmente luego de 2h de tratamiento. Estos datos sugieren que el tratamiento con SFB10% no sólo inducen la expresión de ZFP36/TTP, sino también la de TNF $\alpha$ , siendo más relevante el aumento del ARNm de esta citoquina en las células TTP-KD por la disminución de la regulación negativa ejercida por TTP (Figura R13).

A pesar de que la mayor diferencia en los niveles de expresión de ZFP36 entre las líneas analizadas se observaron luego de 60 min de tratamiento con SFB 10%, se hizo el estudio comparativo de la secuenciación de ARN total (RNAseq) entre las dos líneas (TTP-KD y control) en condiciones basales. Por este motivo, realizamos un análisis de los niveles de ARNm de TTP y TNF $\alpha$  únicamente en estas condiciones (es decir, sin tener en cuenta la comparación con condiciones de estímulo con SFB 10%) (Figura R13 B). Tomamos esta decisión basándonos en que: 1) Previamente habíamos observado y reportado que, a pesar de que la línea con silenciamiento parcial presentaba niveles sólo marginalmente disminuidos de TTP, los efectos sobre la expresión y actividad de TNF $\alpha$  así como sobre otras características fenotípicas eran sustanciales (Stedile 2024); y 2) Ante la imposibilidad (económica) de llevar a cabo el estudio comparativo entre las dos líneas celulares tanto en presencia como en ausencia de SFB 10%, consideramos que la falta de un control adecuado sin inducción no nos permitiría evaluar correctamente las diferencias entre el perfil de expresión de TTP-KD y Sh-Control, únicamente en presencia de dicho estímulo. Por estas razones, se realizó el estudio de RNA-seq de tres muestras de cada sublínea celular y se llevó a cabo el análisis bioinformático de los datos tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura R14.



**Figura R14. Análisis del transcriptoma de las células HC11 sh-Control en comparación con HC11 TTP-KD. A. Agrupamiento jerárquico entre dos conjuntos de 3 réplicas biológicas de las células HC11 sh-Control y HC11 TTP-KD. Se obtuvieron de 1035 Genes Diferencialmente Expresados (Differentially Expressed Genes, DEG, en inglés) utilizando parámetros FDR<0,01 (False Discovery Rate en inglés, en castellano "Tasa de Descubrimiento Falso") y FC>2 (Fold change en**

*inglés, en castellano "Veces de cambio"). B. Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Genes (o Gene set Enrichment analysis, en inglés) de vías de Ontología de Genes (Gene Ontology, GO, en inglés). Los colores representan las diferencias en el p valor ajustado según se indica en cada caso, y el tamaño del círculo correspondiente a cada categoría representada indica proporcionalmente la cantidad de genes que se encontraron incluidos en dicha clasificación. C. Representación de las redes de genes regulados diferencialmente y asociados funcionalmente, según procesos biológicos de Ontología de Genes (Gene Ontology, GO, en inglés). Las líneas representan vinculación funcional de cada gen al nodo general analizado, el tamaño del nodo ("size", en inglés) está indicado en número de genes que lo integran y los colores asociados a las veces de cambio ("Fold change", en inglés) se presentan en tonos de azul si la regulación es positiva para ese gen en TTP-KD respecto a sh-control, y en tonos de rojo si la misma es negativa.*

El análisis de enriquecimiento de sets de genes que surge de la comparación indica que las células TTP-KD presentan importantes diferencias funcionales respecto a las control. Por un lado, detectamos una marcada supresión de vías con actividad inhibitoria del metabolismo del RNA, y una activación de funciones moleculares asociadas a la unión de factores de transcripción y de la ARN polimerasa II al ADN, lo cual en conjunto implica un aumento global en la transcripción (Figura R14 B). También, detectamos una activación de la división celular (es decir un incremento de vías proliferativas), así como la represión de vías de regulación de la muerte celular programada, de la diferenciación celular epitelial y de regulación de la matriz extracelular (Figura R14 B y C). Todos estos factores le otorgan a las células TTP KD características pro-tumorales y confirman lo publicado por otros autores acerca de la actividad supresora tumoral de TTP. A su vez, observamos que TTP presentaría una marcada actividad regulatoria de la transcripción, ya que, en las células KD, ésta se ve significativamente disminuida (regulación negativa de Procesos biológicos GO: Regulación negativa del proceso de biosíntesis de ARN, Regulación negativa de la transcripción mediada por ADN, Regulación negativa del proceso metabólico de ARN) (Figura R14 B). Estos resultados coinciden funcionalmente con la activación de las Funciones Moleculares GO: Actividad de unión de factor de transcripción al ADN, específico de la ARN polimerasa II, Actividad de unión de factores de transcripción al ADN, Unión a ADN de doble cadena, Actividad de unión al ADN específico en regiones cis-regulatorias y Actividad de unión de ARN polimerasa II específica a regiones regulatorias de la transcripción) (Figura R14 B). Al analizar concretamente los genes regulados más relevantes, podemos observar que en el nodo de Regulación negativa del

metabolismo del ARN (“negative regulation of RNA metabolic process”, en inglés), en las células HC11 TTP-KD se encuentran con expresión disminuida: Myb (un factor de transcripción clave en la regulación del ciclo celular (Nakata, Shetzline et al., 2007)), Nr1h3 (codificante del factor de transcripción LXR $\alpha$ , posible regulador de la transcripción de TTP), Egr1 (early growth response 1, en inglés), Relb (factor de transcripción fundamental para la unión específica de la ARN polimerasa II a secuencias específicas del ADN (James T. Kadonaga, 2004)), entre otros (Figura R14 C). Por otro lado, al analizar los genes regulados asociados a proliferación, encontramos con expresión aumentada: Wnt5A (un regulador clave del desarrollo de la glándula mamaria (Roarty & Serra, 2007)), Itgb3 (subunidad beta 3 de integrina) y Pdgfr (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas), entre otros, mientras que en la categoría de Regulación positiva de muerte celular programada encontramos regulados de manera fuertemente negativa a las citoquinas IL-6 y TNF $\alpha$  (Figura R14 C y Figura R15). Esto nos resultó sorprendente dado que estas últimas son blancos de degradación de TTP y que estudios previos (Stedile et al., 2024) las han señalado como uno de los transcritos con niveles más aumentados en las células deficientes de TTP, lo cual, en el caso de TNF $\alpha$ , también fue corroborado por cuantificación mediante RT-qPCR de estas mismas muestras (Figura R13). No tenemos una explicación para este hallazgo y lo señalamos como una falta de concordancia entre las determinaciones de la expresión de TNF $\alpha$  por RNA-seq y RT-qPCR. Por último, reportamos una supresión de procesos metabólicos de hexosas, lo cual asociamos a una modificación de los procesos energéticos celulares (Figura R14 B y C). Entre los genes regulados positivamente, encontramos: FoxO1 (regulador clave del metabolismo de la glucosa y la homeostasis energética (Kousteni et al., 2011)), RORC (regula la expresión de genes asociados a la gluconeogénesis y la sensibilidad a la insulina (Kang et al., 2015)), MAN2B1 y MAN2B2, que codifican para dos proteínas pertenecientes a la familia de las manosidasas, responsables de la degradación de glicoproteínas en los lisosomas (Y. Wong et al., 2019). Estos cambios metabólicos nos resultan interesantes en el contexto de las demás características que hemos descrito en estas células deficientes en TTP, asociadas a la progresión tumoral, ya que está ampliamente reportado que los tumores presentan fenómenos metabólicos únicos, como el efecto Warburg (Hammoud et al., 2011).

A continuación, analizamos otros genes regulados positiva y negativamente en las células HC11 TTP-KD y que nos resultaron los más relevantes en la caracterización de estas células (Figura R15).

Genes regulados positivamente en HC11 TTP KD	Genes regulados negativamente en HC11 TTP KD
S100a9	SOCS2
Wnt5a	CEBPB
Mmp19	Fos
Vimentina	Septina9
DUSP9	Nr1h3
Bcl9	CCL3
IL7	CXCL1
FASN	TNF $\alpha$
Amigo2	IL6

**Figura R15. Genes regulados positivamente y negativamente en células TTP-KD.** Listado de genes relevantes para el desarrollo y la progresión tumoral que se encontraron diferencialmente expresados en las células HC11 TTP-KD respecto a las HC11 sh-Control.

Regulados positivamente encontramos genes asociados a inflamación (S100a9, IL7), migración celular (Mmp19, Vimentina), *stemness* (DUSP9, Bcl9) y procesos celulares vinculados a la tumorigénesis (FASN, Amigo2, Wnt5a). Regulados negativamente encontramos genes asociados a la supresión tumoral (SOCS2, CEBPB, Septina9), así como también genes que se co-expresan con TTP y con actividad dual en cáncer de mama, como Fos. Es importante aclarar que en las células TTP-KD verificamos que la media de los niveles de expresión de ZFP36/TTP eran menores que en las Sh-Ctrl, pero la diferencia no resultó significativa, lo cual coincide con los datos mostrados en la Figura R13.

# DISCUSIÓN

---

TTP es un regulador relevante de la expresión de varios genes asociados con la progresión del cáncer de mama (Wi S. Lai, Perry J. Blackshear, 2001). Los mecanismos de acción de esta proteína son complejos y comprenden tanto la desestabilización post-transcripcional de ARNm blancos (Brooks & Blackshear, 2013), como la regulación directa de la eficiencia de la transcripción y la traducción de numerosos genes (Guo, J., Qu, H., Chen, Y. & Xia, 2017). Ha sido reportado que la expresión de TTP está disminuida en la mayoría de los tumores mamarios en comparación con el tejido normal (Goddio et al, 2012), pero los mecanismos moleculares que conducen esta reducción no se han dilucidado aún. En este trabajo de Tesis, estudiamos la regulación de la expresión de TTP a varios niveles, incluyendo la caracterización de rs251864, un polimorfismo no codificante localizado en el promotor del gen humano *ZFP36* que codifica la proteína TTP. Se ha demostrado que la presencia del nucleótido guanina (G) comparada con adenina (A) en esa posición está asociada a un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Upadhyay et al., 2013).

En este trabajo, hemos desarrollado un método para la genotipificación del polimorfismo de base única (SNP, por su sigla en inglés) rs251864 a partir de ADN genómico que puede extraerse fácilmente de cualquier tejido del paciente. Esto permite una determinación de la variante presente en las células de la paciente de manera rápida, sencilla y económica. Una de nuestras mayores limitaciones ha sido el tamaño de la muestra que hemos logrado genotipificar, 20 individuos, lo cual es pequeño en comparación a la población de nuestro país. Sin embargo, nuestros resultados constituyen un estudio preliminar, el primero en Argentina sobre este SNP, que puede ser fácilmente ampliado a un mayor número de muestras utilizando el protocolo que hemos establecido. Aún en la reducida muestra que hemos caracterizado, pudimos determinar que la presencia del alelo G en rs251864 es cercana al 75%, por lo que estudiar sus efectos en el contexto tumoral nos parece sumamente relevante (Figura R1 C).

Hacer estudios genéticos utilizando líneas celulares como modelo conlleva la dificultad de la gran frecuencia de polisomías que las mismas presentan. En el caso de nuestro trabajo, la trisomía del cromosoma 19 que presentan las células MDA-MB-231 y la evidencia que encontramos de que presentaban al menos un alelo G y un alelo A, nos indicaron la presencia de un modelo mixto que no lograría representar las características de ninguna de las dos variantes (Figura R2 A y B). Por lo tanto decidimos no continuar con una mayor caracterización de la línea MDA-MB-231. En cambio, las líneas MCF7 y T47-D resultaron excelentes modelos para analizar el genotipo AA y GG, respectivamente en células tumorales luminales (ER+PR+), siendo éste además el subtipo al que corresponden todos los cánceres de mama de las pacientes analizadas.

El análisis de los niveles de expresión de TTP en las líneas celulares sugiere que la presencia del alelo G disminuye la actividad del promotor de ZFP36 en condiciones basales, confirmando observaciones anteriores de otros autores (Suzuki et al., 2008) (Figura R2 C). A su vez, el análisis de bases de datos de experimentos de RNA-seq, indican que los bajos niveles de TTP podrían estar afectando la expresión de algunos de sus blancos de degradación los cuales aparecen aumentados en la línea T-47D respecto a MCF7 (VEGFB y TNF $\alpha$ ). Estos dos genes son, además, factores fuertemente asociados al desarrollo de un fenotipo tumoral más agresivo (Cruceriu et al., 2020; Gunningham et al., 2001). Asimismo, hemos encontrado un perfil similar al previamente descrito para los genes que frecuentemente se co-expresan con ZFP36/TTP, JUN y FOS (Canzoneri et al, 2020), es decir niveles disminuidos en T-47D con respecto a MCF7 (Figura R3).

Con el objetivo de identificar posibles sitios de unión de factores de transcripción en la región promotora de ZFP36, realizamos análisis bioinformáticos que arrojaron múltiples candidatos que podrían ser afectados por el SNP rs251864 (Figura R4 A). La utilización de métodos que incorporan Matrices de Pesos Posicionales o *Position Weight Matrices* (PWMs) proveen una primera caracterización de los posibles factores que interactúan con la región, que luego deben ser confirmados experimentalmente. A su vez, estos análisis, basados únicamente en la secuencia del ADN genómico, no tienen en cuenta el contexto del

tejido donde se intenta establecer la regulación sobre el locus de interés, por lo cual una gran cantidad de las proteínas candidatas podrían no expresarse o no estar disponibles en el núcleo para actuar sobre sus secuencias blanco. Sin embargo, estas metodologías han demostrado gran poder predictivo si se realiza una adecuada selección de los candidatos y permiten plantear interesantes posibilidades, como nuestro hallazgo de un sitio de unión de alta probabilidad para el factor de transcripción PAX3. Una mutación en el gen que codifica esta proteína en humanos produce el síndrome de Poland, caracterizado por una hipoplasia mamaria unilateral (Baban et al., 2009). Si PAX3 puede regular positivamente la expresión de ZFP36/TTP, este podría ser uno de los factores que estimulan su presencia durante el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria. El requerimiento de TTP para una lactancia normal y para la supervivencia de las células progenitoras mamarias ha sido previamente reportado por nuestro grupo (Goddio et al., 2012, Goddio et al., 2018 y Stedile et al., 2024) y podría serlo también durante el desarrollo embrionario de las mismas, como parte de las respuestas a PAX3. En el contexto tumoral, PAX3 ha sido propuesto como oncogen (Karsli-Ceppioglu 2017) y, si bien la mayor parte de la literatura señala a TTP como un supresor tumoral, su capacidad para otorgar supervivencia al epitelio mamario indiferenciado podría contribuir al desarrollo del cáncer de mama, lo cual propone un rol dual para TTP en este contexto, como ya se ha planteado (Stedile et al 2024). Otro factor de transcripción que encontramos con posibilidad de unión al promotor de TTP, cuya interacción luego comprobamos experimentalmente usando vectores de expresión y con análisis de datos de ChIPseq, es STAT3. Esta proteína juega un rol crucial en la regulación de las cascadas inflamatorias de la involución mamaria (Felcher, Bogni, Kordon 2022), así como de la muerte celular programada mediada por lisosomas, característica de este proceso (Hughes & Watson, 2018). En la glándula mamaria post-lactancia su activación mediante fosforilación es máxima durante el período en que la expresión de TTP es mínima (Goddio et al., 2012), lo cual sugiere que no ejerce efectos estimulatorios sobre el promotor de ZFP36 en ese contexto, posiblemente debido a mecanismos represivos específicos, que aún no se conocen. El rol de STAT3 en el cáncer de mama es complejo pero la mayoría de los autores coinciden en que presenta una actividad pro-tumoral al promover, entre otros factores, la supervivencia celular (Hughes & Watson, 2018), a lo cual podría contribuir una expresión de TTP fomentada por STAT3. Esto plantea a su vez

la incógnita del rol de STAT3 frente a la regulación de la expresión de TTP en el contexto tumoral, en presencia del polimorfismo rs251864, que afecta su actividad (Figura R6 B). Otro dato relevante que surge del análisis de ChIPseq de STAT3 es su actividad sobre el promotor del microARN 4530, localizado 215 pb “río abajo” del 3’UTR de ZFP36. Este microARN presenta una expresión significativamente menor en tumores mamarios con respecto al tejido normal adyacente, de manera similar al patrón observado para TTP, y su disminución ha sido propuesta como biomarcador de la progresión tumoral (Sathipati et al., 2024).

Por otro lado, encontramos que el promotor de ZFP36 presenta sitios de unión para el factor de transcripción LXR $\alpha$ , el cual ya ha sido propuesto como regulador positivo de la expresión de TTP (Xiao, Chen et al., 2017). No hemos encontrado evidencias de que la activación de LXR $\alpha$  genere un aumento en la transcripción de TTP en células mamarias humanas, por lo cual no caracterizamos las actividades de esta proteína en este contexto. Sin embargo, quisiéramos señalar la posibilidad de que el gen *Nr1h3*, que codifica a LXR $\alpha$ , forme parte de una red de regulación común con *ZFP36*, *JUN* y *FOS*, ya que lo encontramos sub-expresado en células HC11 TTP KD (Figura R14 C y R15). Además, identificamos sitios de unión de ESR1 (gen codificante del receptor de estrógenos, ER) en la región próxima a rs251864 (Figura R4 A). En el contexto particular del cáncer de mama luminal, donde se sobreexpresan los receptores de estrógenos y de progesterona, encontrar evidencia de que el ER podría estimular la expresión de TTP sería sumamente relevante. Sin embargo, en los análisis de ChIP-seq que realizamos a partir de datos de experimentos en distintas líneas celulares mamarias, no encontramos una señal significativa correspondiente a este factor de transcripción en ninguna zona regulatoria de ZFP36, por lo que no podemos afirmar que existan condiciones en las cuales el receptor de estrógenos se una a estos sitios y efectivamente regule la transcripción de TTP. Por último, encontramos varios sitios de unión de AP-1 (FOS:JUN) de los cuales uno (representado en la Figura R4 A), está justo sobre el sitio del SNP, cuyo cambio de A por G afectaría una de las bases de mayor probabilidad del motivo, presumiblemente condicionando la capacidad del complejo de reconocer la secuencia y unirse a ella. En experimentos de ChIPseq, encontramos una señal asociada a la unión de AP-1 en el promotor de

ZFP36, aunque con una significancia mucho menor que para STAT3 (datos no mostrados).

Los resultados de los experimentos utilizando Suero Fetal Bovino (SFB), un potente inductor de la transcripción de TTP (Lai WS et al., 1995), revelaron una marcada diferencia en la extensión y duración de la transcripción del ARNm de ZFP36 entre las células MCF7 y T-47D (Figura R5 B). En el caso de las MCF7, los niveles de expresión observados son mayores y se alcanzan más rápido que en T-47D, mientras que estas últimas presentan una inducción leve recién a los 120 minutos de estímulo y sin alcanzar, aún en estas condiciones, los niveles observados en MCF7. A su vez, la respuesta en estas últimas se sostiene en el tiempo (a partir de 30 minutos y hasta 120 minutos), lo cual muestra una diferencia con la respuesta a suero en células HC11 de ratón, que presentan un pico de expresión de TTP a 60 minutos y luego disminuye rápidamente (Figura R13 A). Este es un indicador de las diferencias regulatorias de la transcripción de TTP en la glándula mamaria que se evidencian entre *Homo sapiens* y *Mus musculus*, a pesar de la importante conservación de secuencia del promotor que se observa entre ambas especies. Teniendo en cuenta que la única diferencia genética que presentan las células MCF7 con las T-47D en el promotor es el SNP rs251864, estas diferencias en la respuesta a suero podrían atribuirse en gran medida a los efectos de dicho polimorfismo sobre la afinidad de STAT3 por su sitio de unión. Sin embargo, el suero activa numerosos factores de transcripción además de STAT3, AP-1 entre ellos, y considerando que el contexto genético de dos líneas celulares diferentes podría tener un efecto sobre la transcripción de ZFP36, decidimos realizar el clonado del promotor con cada una de las variantes del polimorfismo y analizar su actividad utilizando plásmidos reporteros.

Los experimentos con los vectores reporteros nos permitieron determinar que el genotipo AA en rs251864 permitía la inducción por SFB10%, mientras que la presencia de GG en ese sitio impedía esta respuesta. Además, en este último caso, observamos que el tratamiento con el inhibidor de la actividad de JNK producía una disminución en la actividad del promotor respecto de los niveles basales, sin estimular con SFB 10%. Este inhibidor farmacológico bloquea la actividad de la enzima JNK lo cual impide la fosforilación de JUN y, por lo tanto, la generación de

un factor AP-1 activo. Llamativamente, en presencia del inhibidor de JNK, hallamos una inducción significativa al tratamiento con SFB 10%. Estos resultados sugieren que con el genotipo GG, la activación de AP-1 está involucrada en la actividad basal del promotor de ZFP-36 (en presencia de SFB 1%) pero no participa en la inducción por SFB 10%, si bien Fos y Jun son reclutados al promotor luego de dicho estímulo (Lamph et al.,1988). Por otro lado en el promotor clonado a partir de la línea MCF-7 con genotipo AA en rs251864 resultó muy clara la necesidad de activación del factor de transcripción STAT3 para que se produjese la inducción de la transcripción del gen de Luciferasa por el tratamiento con SFB 10%. Utilizando el constructo con este genotipo, hallamos que la inhibición de JNK redujo los niveles de inducción por dicho estímulo, aunque no de manera significativa.

Llamativamente, cuando estudiamos los efectos del inhibidor de STAT3 en la respuesta al SFB10% de las células MCF7 (AA) y T47-D (GG), hallamos que en ambos casos se producía una disminución en la inducción del ARNm de ZFP36/TTP (Figura R7 y R8).. De todos modos, sigue siendo claro que las células con genotipo AA son más sensibles al mencionado estímulo de inducción. Suponemos que las diferencias observadas en respuesta al SFB10% y al inhibidor de STAT3 en la activación de los promotores aislados, clonados y transfectados en las células HEK293 vs. la respuesta del gen endógeno de ZFP36 en las células MCF7 o T-47D pueden deberse al involucramiento de otras regiones regulatorias del gen endógeno (no presentes en el plásmido) y/o a la presencia diferencial de factores de transcripción u otras proteínas regulatorias en las distintas células utilizadas.

Los experimentos en MCF7 y T-47D de inducción por suero, muestran que estas dos líneas celulares presentan diferencias significativas en la capacidad de respuesta, medida como transcripción de ZFP36/TTP (Figura R5 B). Si bien parte de este fenómeno podría explicarse por la disminución en la afinidad de los factores de transcripción que se unan directamente en el sitio del polimorfismo, también consideramos la posibilidad de que existieran mecanismos epigenéticos asociados. La metilación del promotor de ZFP36 ha sido reportada previamente por otros autores (Sohn et al.,2010), pero no ha sido estudiada en la glándula mamaria hasta ahora. Nuestros experimentos utilizando un inhibidor de este mecanismo indican que tiene un efecto relevante en la regulación de la transcripción de ZFP36/TTP, en

las células T-47D y también en los tumores mamarios. Sería interesante caracterizar con mayor precisión los sitios de metilación del ADN dentro del locus de *ZFP36*, para poder determinar exactamente dónde se producen las modificaciones responsables de los efectos que observamos y si estos se deben a la metilación de un solo sitio o de varios.

Respecto al efecto de modificaciones de histonas y apertura de la cromatina sobre la regulación de la transcripción de *ZFP36/TTP*, resulta interesante observar que estos dos mecanismos parecen responder a objetivos opuestos. En las células MCF7, una mayor señal de modificaciones de histonas que favorecen la actividad transcripcional (H3K27ac y H3k4me3) coincide con una apertura de cromatina menor que en las T-47D, que presentan menor actividad transcripcional y menor intensidad de señal en las mismas modificaciones de histonas. Es una posibilidad que algunos de estos mecanismos estén actuando en compensación de otros; en el caso de las células T-47D, una menor actividad transcripcional dada por un promotor de secuencia con menor afinidad a factores de transcripción y señales de modificaciones de histonas menos activas, podría recurrir a una mayor apertura de la cromatina para favorecer una transcripción basal de *ZFP36/TTP*. En el caso de MCF7, por el contrario, un promotor de secuencia más atractiva para los factores de transcripción y señales de histonas de promoción de la transcripción podrían moderarse mediante una menor disponibilidad de la cromatina. Esto señala la complejidad de las respuestas celulares a distintos estímulos, así como la diversidad y cantidad de mecanismos involucrados en la regulación de la transcripción de *ZFP36/TTP*.

La actividad supresora tumoral de TTP ha sido descrita por varios autores hasta la fecha (Goddio et al., 2012, Guo et al., 2017) y otros trabajos han sugerido que TTP tiene un rol en la regulación de la transcripción a través de su actividad como proteína nuclear fosforilada (Rodríguez-Gómez et al., 2021). Al analizar el perfil transcriptómico global de un modelo de cultivo celular de glándula mamaria de ratón que presenta una disminución en la expresión de la proteína de TTP a causa de su transfección estable con plásmidos shRNA específicos (HC11 TTP-KD) hallamos que estas células presentan características pro-tumorales, como la activación de vías de remodelado de la matriz extracelular y un aumento de

expresión de genes asociados a la proliferación celular. A su vez, observamos que TTP desempeña un papel importante como regulador del metabolismo de las hexosas, que en estas células se ve significativamente disminuido. Por otro lado, encontramos que en las células HC11 TTP KD está afectada la expresión de numerosos genes pro-tumorales, como VEGFB, FOS, Mm19, AMIGO2, entre otros, lo cual indica posibles mecanismos por los cuales la disminución en los niveles de TTP podría conferir características oncogénicas a las células mamarias normales. Esto apoya la hipótesis de que una expresión basal disminuida de TTP predispone al desarrollo tumoral, lo cual podría extrapolarse a la situación de las pacientes portadoras del alelo G en el polimorfismo rs251864. Otro hallazgo interesante resultante de este análisis fue que numerosas vías de regulación de la síntesis del ARN están marcadamente aumentadas en las células HC11 TTP-KD, lo cual sugiere que TTP desempeñaría una importante actividad como represor de la transcripción. Esto ya ha sido señalado por otros autores sobre modelos similares al nuestro (Tu, Wu et al., 2019) y podría ser parte de las funciones de TTP como proteína supresora tumoral, complementando su función más estudiada como desestabilizadora de ARNm específicos en el citoplasma.

# CONCLUSIONES

---

- \* MCF-7 y T-47D portan diferentes genotipos rs251864 y el ARNm de TTP se expresa diferencialmente. Encontramos una prevalencia de alrededor del 75% del alelo G en la población de pacientes argentinas analizadas.
- \* La región del polimorfismo rs251864 presenta sitios de unión para numerosos factores de transcripción, entre los que se encuentran AP-1 y ESR1. En experimentos de ChIP-seq encontramos que STAT3 fosforilado es el factor de transcripción con mayor probabilidad de unión al locus analizado.
- \* ZFP36 se expresa diferencialmente en T-47D en comparación con MCF7 en respuesta al estímulo con suero. El promotor de ZFP36 contiene una isla CpG dentro de la región rs251864 y las células T-47D tratadas con 5-Azacitidina presentan mayor sensibilidad al estímulo con suero. Además el promotor de ZFP36 está metilado diferencialmente en pacientes con cáncer de mama y los niveles de metilación correlacionan de manera inversamente proporcional a la expresión de TTP.
- \* Los plásmidos reporteros que contienen las dos variantes homocigotas de rs251864 replican la respuesta al suero encontrada en las células MCF7 y T-47D, y son sensibles de manera diferencial al uso de inhibidores de la fosforilación de STAT3 y de JNK.
- \* La disminución en los niveles de expresión de TTP confiere características pro-tumorales medidas por RNA-seq.

# BIBLIOGRAFÍA

---

S. M. Anderson, M. C. Rudolph, J. L. McManaman, and M. C. Neville, "Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: It's not just about milk protein synthesis!," *Breast Cancer Research*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, Feb. 2007, doi: 10.1186/BCR1653.

E. R. Andrechek, S. Mori, R. E. Rempel, J. T. Chang, and J. R. Nevins, "Patterns of cell signaling pathway activation that characterize mammary development," *Development*, vol. 135, no. 14, pp. 2403–2413, Jul. 2008, doi: 10.1242/DEV.019018.

A. Baban *et al.*, "Poland syndrome with bilateral features: Case description with review of the literature," *American Journal of Medical Genetics, Part A*, vol. 149, no. 7, pp. 1597–1602, Jul. 2009, doi: 10.1002/AJMG.A.32922,.

T. Bakheet, B. R. G. Williams, and K. S. A. Khabar, "ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome," *Nucleic Acids Research*, vol. 34, no. suppl\_1, pp. D111–D114, Jan. 2006, doi: 10.1093/NAR/GKJ052.

G. A. Balogh *et al.*, "Genomic signature induced by pregnancy in the human breast," *International Journal of Oncology*, vol. 28, no. 2, pp. 399–410, Feb. 2006, doi: 10.3892/IJO.28.2.399/HTML.

Y. Bando *et al.*, "Triple-negative breast cancer and basal-like subtype : Pathology and targeted therapy," *The Journal of Medical Investigation*, vol. 68, no. 3.4, pp. 213–219, 2021, doi: 10.2152/JMI.68.213.

T. Barrios-García, V. Gómez-Romero, Á. Tecalco-Cruz, V. Valadéz-Graham, and A. León-Del-Río, "Nuclear tristetraprolin acts as a corepressor of multiple steroid nuclear receptors in breast cancer cells," *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, vol. 7, pp. 20–26, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.ymgmr.2016.02.004.

S. E. Brennan, Y. Kuwano, N. Alkharouf, P. J. Blackshear, M. Gorospe, and G. M. Wilson, "The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis," *Cancer Research*, vol. 69, no. 12, pp. 5168–5176, Jun. 2009, doi: 10.1158/0008-5472

C. Brisken, S. Park, T. Vass, J. P. Lydon, B. W. O'Malley, and R. A. Weinberg, "A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 9, pp. 5076–5081, Apr. 1998, doi: 10.1073/PNAS.95.9.5076

M. Brook *et al.*, "Posttranslational Regulation of Tristetraprolin Subcellular Localization and Protein Stability by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, no. 6, p. 2408, Mar. 2006, doi: 10.1128/MCB.26.6.2408-2418.2006.

S. A. Brooks and P. J. Blakeshear, "Tristetraprolin (TTP): Interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action," *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1829, no. 6–7, pp. 666–679, Jun. 2013, doi: 10.1016/J.BBAGRM.2013.02.003.

P. Schedin -N. R. Cancer and undefined 2006, "Pregnancy-associated breast cancer and metastasis," *Nature Reviews Cancer*, 2006•nature.com, 2006, doi: 10.1038/nrc1839.

R. Canzoneri *et al.*, "Identification of an AP1-ZFP36 Regulatory Network Associated with Breast Cancer Prognosis," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 25, no. 2, pp. 163–172, Jun. 2020, doi: 10.1007/S10911-020-09448-1/FIGURES/4.

H. Cao, J. F. Urban, and R. A. Anderson, "Insulin Increases Tristetraprolin and Decreases VEGF Gene Expression in Mouse 3T3–L1 Adipocytes," *Obesity*, vol. 16, no. 6, pp. 1208–1218, Jun. 2008, doi: 10.1038/OBY.2008.65.

R. S. Chapman *et al.*, "Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3," *Genes & development*, vol. 13, no. 19, pp. 2604–2616, Oct. 1999, doi: 10.1101/GAD.13.19.2604.

M. C. U. Cheang *et al.*, "Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer," *academic.oup.com*, vol. 101, p. 736, 2009, doi: 10.1093/jnci/djp082.

Y. L. Chen, Y. W. Jiang, Y. L. Su, S. C. Lee, M. S. Chang, and C. J. Chang, "Transcriptional regulation of tristetraprolin by NF- $\kappa$ B signaling in LPS-stimulated macrophages," *Molecular Biology Reports*, vol. 40, no. 4, pp. 2867–2877, Apr. 2013, doi: 10.1007/S11033-012-2302-8/FIGURES/5.

R. W. E. Clarkson *et al.*, "The genes induced by signal transducer and activators of transcription (STAT) 3 and STAT5 in mammary epithelial cells define the roles of these STATs in mammary," *academic.oup.comRWE Clarkson, MP Boland, EA Kritikou, JM Lee, TC Freeman, PG Tiffen, CJ WatsonMolecular endocrinology*, 2006•academic.oup.com, 2006, doi: 10.1210/me.2005-0392.

R. Clarkson, C. W. mammary gland biology and neoplasia, and undefined 2003, "Microarray analysis of the involution switch," *SpringerRWE Clarkson, CJ WatsonJournal of mammary gland biology and neoplasia*, 2003•Springer, vol. 8, no. 3, pp. 309–319, Jul. 2003, doi: 10.1023/B:JOMG.0000010031.53310.92.

D. N. Cook, H. S. Kang, and A. M. Jetten, "Retinoic Acid-Related Orphan Receptors (RORs): Regulatory Functions in Immunity, Development, Circadian Rhythm, and Metabolism," *Nuclear receptor research*, vol. 2, p. 101185, 2015, doi: 10.11131/2015/101185.

B. A. Creamer, K. Sakamoto, J. W. Schmidt, A. A. Triplett, R. Moriggl, and K.-U. Wagner, "Stat5 Promotes Survival of Mammary Epithelial Cells through Transcriptional Activation of a Distinct Promoter in Akt1," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 30, no. 12, pp. 2957–2970, Jun. 2010, doi: 10.1128/MCB.00851-09.

D. Cruceriu, O. Baldasici, O. Balacescu, and I. Berindan-Neagoe, "The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches," *Cellular Oncology 2019 43:1*, vol. 43, no. 1, pp. 1–18, Jan. 2020, doi: 10.1007/S13402-019-00489-1.

K. M. Deleault, S. J. Skinner, and S. A. Brooks, "Tristetraprolin regulates TNF TNF- $\alpha$  mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways," *Molecular Immunology*, vol. 45, no. 1, pp. 13–24, Jan. 2008, doi: 10.1016/J.MOLIMM.2007.05.017.

V. Djonov, A. C. Andres, and A. Ziemiecki, "Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland," *Microscopy Research and Technique*, vol. 52, no. 2, pp. 182–189, Jan. 2001, doi: 10.1002/1097-0029(20010115)52:2<182::AID-JEMT1004>3.0.CO;2-M.

J. Emmons *et al.*, "Identification of TTP mRNA targets in human dendritic cells reveals TTP as a critical regulator of dendritic cell maturation," *RNA*, vol. 14, no. 5, pp. 888–902, May 2008, doi: 10.1261/RNA.748408.

J. E. Fata *et al.*, "The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development," *Cell*, vol. 103, no. 1, pp. 41–50, Sep. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)00103-3.

C. M. Felcher, E. S. Bogni, and E. C. Kordon, "IL-6 Cytokine Family: A Putative Target for Breast Cancer Prevention and Treatment," *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 1809*, vol. 23, no. 3, p. 1809, Feb. 2022, doi: 10.3390/IJMS23031809.

P. C. Fong *et al.*, "Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers," *Mass Medical SocPC Fong, DS Boss, TA Yap, A Tutt, P Wu, M Mergui-Roelvink, P Mortimer, H SwaislandNew England Journal of Medicine, 2009•Mass Medical Soc*, vol. 361, no. 2, pp. 123–134, Jul. 2009, doi: 10.1056/NEJMOA0900212.

C. Fougner, H. Bergholtz, J. H. Norum, and T. Sørli, "Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype," *Nature Communications 2020 11:1*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, Apr. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15574-5.

M. V. Goddio *et al.*, "Expression of the mRNA stability regulator Tristetraprolin is required for lactation maintenance in the mouse mammary gland," *Oncotarget*, vol. 9, no. 9, p. 8278, 2018, doi: 10.18632/ONCOTARGET.23904.

M. V. Goddio *et al.*, "Mammary differentiation induces expression of Tristetraprolin, a tumor suppressor AU-rich mRNA-binding protein," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 135, no. 3, pp. 749–758, Oct. 2012, doi: 10.1007/S10549-012-2216-0/METRICS.

E. Gonzalez-Suarez *et al.*, "RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis," *Nature*, vol. 468, no. 7320, pp. 103–107, Nov. 2010, doi: 10.1038/NATURE09495.

L. K. Gopi and B. L. Kidder, "Integrative pan cancer analysis reveals epigenomic variation in cancer type and cell specific chromatin domains," *Nature communications*, vol. 12, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/S41467-021-21707-1.

V. Guarneri, P. C.-T. oncologist, and undefined 2009, "Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy," *academic.oup.comV Guarneri, PF ConteThe oncologist, 2009•academic.oup.com*, vol. 14, no. 7, pp. 645–656, Jul. 2009, doi: 10.1634/THEONCOLOGIST.2009-0078.

J. Guhaniyogi and G. Brewer, "Regulation of mRNA stability in mammalian cells," *Gene*, vol. 265, no. 1–2, pp. 11–23, Mar. 2001, doi: 10.1016/S0378-1119(01)00350-X.

S. P. Gunningham *et al.*, "VEGF-B expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis," *The Journal of Pathology*, vol. 193, no. 3, pp. 325–332, Mar. 2001, doi: 10.1002/PATH.814.

J. Guo, H. Qu, Y. Chen, and J. Xia, "The role of RNA-binding protein tristetraprolin in cancer and immunity," *Medical Oncology*, vol. 34, no. 12, pp. 1–12, Dec. 2017, doi: 10.1007/S12032-017-1055-6/METRICS.

N. Hammoudi, K. B. R. Ahmed, C. Garcia-Prieto, and P. Huang, "Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications," *Chinese Journal of Cancer*, vol. 30, no. 8, p. 508, 2011, doi: 10.5732/CJC.011.10267.

S. Haricharan and Y. Li, "STAT signaling in mammary gland differentiation, cell survival and tumorigenesis," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 382, no. 1, pp. 560–569, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.MCE.2013.03.014.

K. Hughes and C. J. Watson, "The Multifaceted Role of STAT3 in Mammary Gland Involution and Breast Cancer," *International Journal of Molecular Sciences 2018, Vol. 19, Page 1695*, vol. 19, no. 6, p. 1695, Jun. 2018, doi: 10.3390/IJMS19061695.

R. C. Humphreys, B. Bierie, L. Zhao, R. Regina, D. Levy, and L. Hennighausen, "Deletion of Stat3 blocks mammary gland involution and extends functional

competence of the secretory epithelium in the absence of lactogenic stimuli," *Endocrinology*, vol. 143, no. 9, pp. 3641–3650, Sep. 2002, doi: 10.1210/EN.2002-220224.

J. N. Ihle and I. M. Kerr, "Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily," *Trends in Genetics*, vol. 11, no. 2, pp. 69–74, Feb. 1995, doi: 10.1016/S0168-9525(00)89000-9.

J. L. Inman, C. Robertson, J. D. Mott, and M. J. Bissell, "Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment," *Development*, vol. 142, no. 6, pp. 1028–1042, Mar. 2015, doi: 10.1242/DEV.087643.

M. K. Jena, S. Jaswal, S. Kumar, and A. K. Mohanty, "Molecular mechanism of mammary gland involution: An update," *Developmental Biology*, vol. 445, no. 2, pp. 145–155, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.YDBIO.2018.11.002.

Q. Jing *et al.*, "Involvement of MicroRNA in AU-Rich Element-Mediated mRNA Instability," *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 623–634, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2004.12.038.

J. T. Kadonaga, "Regulation of RNA Polymerase II Transcription by Sequence-Specific DNA Binding Factors," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 247–257, Jan. 2004, doi: 10.1016/S0092-8674(03)01078-X/ASSET/2A783D33-D4C7-438F-8F47-CD9AD8E33B4C/MAIN.ASSETS/GR4.JPG.

S. Karsli-Ceppioglu *et al.*, "The Epigenetic Landscape of Promoter Genome-wide Analysis in Breast Cancer," *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–8, Jul. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06790-z.

H. Kennecke *et al.*, "Metastatic behavior of breast cancer subtypes," *ascopubs.orgH Kennecke, R Yerushalmi, R Woods, MCU Cheang, D Voduc, CH Speers, TO NielsenJournal of clinical oncology, 2010•ascopubs.org*, vol. 28, no. 20, pp. 3271–3277, Jul. 2010, doi: 10.1200/JCO.2009.25.9820.

S. Kousteni, "FoxO1, the Transcriptional Chief of Staff of Energy Metabolism," *Bone*, vol. 50, no. 2, p. 437, Feb. 2011, doi: 10.1016/J.BONE.2011.06.034.

P. Kovarik, A. Bestehorn, and J. Fesselet, "Conceptual Advances in Control of Inflammation by the RNA-Binding Protein Tristetraprolin," *Frontiers in Immunology*, vol. 12, p. 751313, Sep. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.751313/XML/NLM.

B. Kreike *et al.*, "Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas," *SpringerB Kreike, M van Kouwenhove, H Horlings, B Weigelt, H Peterse, H BartelinkBreast Cancer Research, 2007•Springer*, vol. 9, no. 5, Oct. 2007, doi: 10.1186/BCR1771.

P. Kreuzaler, A. Staniszewska, W. Li, ... N. O.-N. cell, and undefined 2011, "Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo," *nature.com* PA Kreuzaler, AD Staniszewska, W Li, N Omidvar, B Kedjouar, J Turkson, V Poli, RA Flavell Nature cell biology, 2011•nature.com, Accessed: Jul. 12, 2025. [Online]. Available: <https://www.nature.com/articles/ncb2171>

E. A. Kritikou *et al.*, "A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland," *Development*, vol. 130, no. 15, pp. 3459–3468, Aug. 2003, doi: 10.1242/DEV.00578.

W. Lai, P. B.-J. of B. Chemistry, and undefined 2001, "Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: tristetraprolin-mediated AU-rich element-dependent mRNA degradation can occur in the absence of a poly (A)," *jbc.org*, vol. 276, no. 25, pp. 23144–23154, Jun. 2001, doi: 10.1074/jbc.M100680200.

W. S. Lai, M. J. Thompson, G. A. Taylor, Y. Liu, and P. J. Blackshear, "Promoter analysis of Zfp-36, the mitogen-inducible gene encoding the zinc finger protein tristetraprolin," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 42, pp. 25266–25272, Oct. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.42.25266.

W. W. Lamph, P. Wamsley, P. Sassone-Corsi, and I. M. Verma, "Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA," *Nature* 1988 334:6183, vol. 334, no. 6183, pp. 629–631, 1988, doi: 10.1038/334629a0.

C. I. Li, D. J. Uribe, and J. R. Daling, "Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer," *British Journal of Cancer* 2005 93:9, vol. 93, no. 9, pp. 1046–1052, Sep. 2005, doi: 10.1038/sj.bjc.6602787.

M. Li *et al.*, "Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 7, pp. 3425–3430, Apr. 1997, doi: 10.1073/PNAS.94.7.3425.

C. I. Li, D. J. Uribe, and J. R. Daling, "Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer," *British Journal of Cancer* 2005 93:9, vol. 93, no. 9, pp. 1046–1052, Sep. 2005, doi: 10.1038/sj.bjc.6602787.

X. Liu, G. W. Robinson, K. U. Wagner, L. Garrett, A. Wynshaw-Boris, and L. Hennighausen, "Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis.," *Genes & Development*, vol. 11, no. 2, pp. 179–186, Jan. 1997, doi: 10.1101/GAD.11.2.179.

R. Lozano-Ascencio, Héctor Gómez-Dantés, S. Lewis, L. Torres-Sánchez, and L. López-Carrillo, "Tendencias del cáncer de mama en América Latina y el Caribe," *Salud Pública de México*, vol. 51, pp. s147–s156, 2009.

J. P. Lydon *et al.*, "Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities," *Genes and Development*, vol. 9, no. 18, pp. 2266–2278, Sep. 1995, doi: 10.1101/GAD.9.18.2266,.

- H. Macias and L. Hinck, "Mammary gland development," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, vol. 1, no. 4, pp. 533–557, Jul. 2012, doi: 10.1002/WDEV.35.
- F. Madeira *et al.*, "The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024.," *Nucleic Acids Research*, vol. 52, no. W1, pp. W521–W525, Jul. 2024, doi: 10.1093/NAR/GKAE241.
- S. Makita, H. Takatori, and H. Nakajima, "Post-Transcriptional Regulation of Immune Responses and Inflammatory Diseases by RNA-Binding ZFP36 Family Proteins," *Frontiers in Immunology*, vol. 12, p. 711633, Jul. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.711633/BIBTEX.
- A. Marti *et al.*, "Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome c release and caspase activation," *Mechanisms of Development*, vol. 104, no. 1–2, pp. 89–98, Jun. 2001, doi: 10.1016/S0925-4773(01)00381-1.
- P. A. Masso-Welch, K. M. Darcy, N. C. Stangle-Castor, and M. M. Ip, "A developmental atlas of rat mammary gland histology," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 5, no. 2, pp. 165–185, 2000, doi: 10.1023/A:1026491221687/METRICS.
- J. L. McManaman, C. A. Palmer, S. Anderson, K. Schwertfeger, and M. C. Neville, "Regulation of Milk Lipid Formation and Secretion in the Mouse Mammary Gland," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 554, pp. 263–279, 2004, doi: 10.1007/978-1-4757-4242-8\_22.
- J. L. McManaman, C. A. Palmer, S. Anderson, K. Schwertfeger, and M. C. Neville, "Regulation of Milk Lipid Formation and Secretion in the Mouse Mammary Gland," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 554, pp. 263–279, 2004, doi: 10.1007/978-1-4757-4242-8\_22.
- S. Nagata and M. Tanaka, "Programmed cell death and the immune system," *Nature Reviews Immunology* 2017 17:5, vol. 17, no. 5, pp. 333–340, Feb. 2017, doi: 10.1038/nri.2016.153.
- Y. Nakata *et al.*, "c-Myb Contributes to G2/M Cell Cycle Transition in Human Hematopoietic Cells by Direct Regulation of Cyclin B1 Expression," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 27, no. 6, pp. 2048–2058, Mar. 2007, doi: 10.1128/MCB.01100-06.
- R. Nishimura and N. Arima, "Is triple negative a prognostic factor in breast cancer?," *Breast Cancer*, vol. 15, no. 4, pp. 303–308, Oct. 2008, doi: 10.1007/S12282-008-0042-3/METRICS.
- S. Paik *et al.*, "A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer," *Mass Medical SocS Paik, S Shak, G Tang, C Kim, J*

Baker, M Cronin, FL Baehner, MG Walker, D Watson *New England Journal of Medicine*, 2004 • *Mass Medical Soc*, vol. 351, no. 27, pp. 2817–2826, Dec. 2004, doi: 10.1056/NEJM0A041588.

C. Pan *et al.*, “Research progress of Claudin-low breast cancer,” *Frontiers in Oncology*, vol. 13, p. 1226118, 2023, doi: 10.3389/FONC.2023.1226118.

C. A. Parise, K. R. Bauer, and V. Caggiano, “Variation in breast cancer subtypes with age and race/ethnicity,” *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 76, no. 1, pp. 44–52, Oct. 2010, doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2009.09.002.

J. M. Park, T. H. Lee, and T. H. Kang, “Roles of Tristetraprolin in Tumorigenesis,” *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 3384, vol. 19, no. 11, p. 3384, Oct. 2018, doi: 10.3390/IJMS19113384.

C. M. Perou, J. S. Parker, A. Prat, M. J. Ellis, and P. S. Bernard, “Clinical implementation of the intrinsic subtypes of breast cancer,” *The Lancet Oncology*, vol. 11, no. 8, pp. 718–719, Aug. 2010, doi: 10.1016/S1470-2045(10)70176-5.

A. Prat, C. P.-M. oncology, and undefined 2011, “Deconstructing the molecular portraits of breast cancer,” *Elsevier A Prat, CM Perou Molecular oncology*, 2011 • *Elsevier*, Accessed: Jul. 12, 2025. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1574789110001274>

H. K. Resemann, C. J. Watson, and B. Lloyd-Lewis, “The Stat3 paradox: A killer and an oncogene,” *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 382, no. 1, pp. 603–611, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.MCE.2013.06.029.

M. M. Richert, K. L. Schwertfeger, J. W. Ryder, and S. M. Anderson, “An atlas of mouse mammary gland development,” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 5, no. 2, pp. 227–241, 2000, doi: 10.1023/A:1026499523505/METRICS.

K. Roarty and R. Serra, “Wnt5a is required for proper mammary gland development and TGF- $\beta$ -mediated inhibition of ductal growth,” *Development*, vol. 134, no. 21, pp. 3929–3939, Nov. 2007, doi: 10.1242/DEV.008250.

G. Rodríguez-Gómez *et al.*, “Tristetraprolin: A cytosolic regulator of mRNA turnover moonlighting as transcriptional corepressor of gene expression,” *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 133, no. 2, pp. 137–147, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.YMGME.2021.03.015.

S. Y. Sathipati *et al.*, “An evolutionary learning-based method for identifying a circulating miRNA signature for breast cancer diagnosis prediction,” *NAR Genomics and Bioinformatics*, vol. 6, no. 1, p. 22, Jan. 2024, doi: 10.1093/NARGAB/LQAE022.

C. Schere-Levy *et al.*, “Leukemia Inhibitory Factor Induces Apoptosis of the Mammary Epithelial Cells and Participates in Mouse Mammary Gland Involution,”

*Experimental Cell Research*, vol. 282, no. 1, pp. 35–47, Jan. 2003, doi: 10.1006/EXCR.2002.5666.

F. Schettini, F. Brasó-Maristany, N. M. Kuderer, and A. Prat, “A perspective on the development and lack of interchangeability of the breast cancer intrinsic subtypes,” *npj Breast Cancer*, vol. 8, no. 1, pp. 1–4, Dec. 2022, doi: 10.1038/S41523-022-00451-9;SUBJMETA=1347,4028,53,631,67,69,692;KWRD=BIOMARKERS,BREAST+CANCER,CANCER+GENOMICS.

C. Schindler, D. E. Levy, and T. Decker, “JAK-STAT signaling: From interferons to cytokines,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 28, pp. 20059–20063, Jul. 2007, doi: 10.1074/JBC.R700016200/ASSET/F5DC6F70-AB68-480D-B096-0250017E38DA/MAIN.ASSETS/GR2.JPG.

D. Schramek *et al.*, “Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer,” *Nature*, vol. 468, no. 7320, pp. 98–102, Nov. 2010, doi: 10.1038/NATURE09387,.

K. L. Schwertfeger, J. L. McManaman, C. A. Palmer, M. C. Neville, and S. M. Anderson, “Expression of constitutively activated Akt in the mammary gland leads to excess lipid synthesis during pregnancy and lactation,” *Journal of Lipid Research*, vol. 44, no. 6, pp. 1100–1112, Jun. 2003, doi: 10.1194/jlr.M300045-JLR200.

R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2019,” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 69, no. 1, pp. 7–34, Jan. 2019, doi: 10.3322/CAAC.21551.

G. B. Silberstein, K. van Horn, G. Shyamala, and C. W. Daniel, “Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens,” *Endocrinology*, vol. 134, no. 1, pp. 84–90, Jan. 1994, doi: 10.1210/EN.134.1.84.

D. J. Slamon *et al.*, “Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2,” *The New England journal of medicine*, vol. 344, no. 11, pp. 783–792, Mar. 2001, doi: 10.1056/NEJM200103153441101.

M. Smid, Y. Wang, Y. Zhang, A. Sieuwerts, ... J. Y.-C., and undefined 2008, “Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse,” *aacrjournals.org* M Smid, Y Wang, Y Zhang, AM Sieuwerts, J Yu, JGM Klijn, JA Foekens, JWM Martens Cancer research, 2008•aacrjournals.org, 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5644.

I. Smith *et al.*, “2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial,” *Lancet*, vol. 369, no. 9555, pp. 29–36, Jan. 2007, doi: 10.1016/S0140-6736(07)60028-2.

B. H. Sohn *et al.*, “Functional Switching of TGF- $\beta$ 1 Signaling in Liver Cancer via Epigenetic Modulation of a Single CpG Site in TTP Promoter,” *Gastroenterology*, vol. 138, no. 5, pp. 1898-1908.e12, May 2010, doi: 10.1053/J.GASTRO.2009.12.044.

S. Srivastava *et al.*, “Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand Induction via Jak2 and Stat5a in Mammary Epithelial Cells,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 46, pp. 46171–46178, Nov. 2003, doi: 10.1074/jbc.M308545200.

M. Stedile *et al.*, “Tristetraprolin promotes survival of mammary progenitor cells by restraining TNF $\alpha$  levels,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 11, p. 1265475, Jan. 2023, doi: 10.3389/FCCELL.2023.1265475/BIBTEX.

R. Strange, R. R. Friis, L. T. Bemis, and F. J. Geske, “Chapter 15 Programmed Cell Death during Mammary Gland Involution,” *Methods in Cell Biology*, vol. 46, no. C, pp. 355–368, Jan. 1995, doi: 10.1016/S0091-679X(08)61935-4.

Y. L. Su *et al.*, “Tristetraprolin inhibits poly(A)-tail synthesis in nuclear mRNA that contains AU-rich elements by interacting with poly(A)-binding protein nuclear 1,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 7, Jul. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0041313,.

T. Suzuki *et al.*, “Tristetraprolin (TTP) gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals,” *Modern Rheumatology*, vol. 18, no. 5, pp. 472–479, Oct. 2008, doi: 10.3109/S10165-008-0085-5.

C. Sympson, R. Talhouk, ... C. A.-T. J. of cell, and undefined 1994, “Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact,” *rupress.orgCJ Sympson, RS Talhouk, CM Alexander, JR Chin, SM Clift, MJ Bissell, Z WerbThe Journal of cell biology, 1994•rupress.org*, Accessed: Jul. 12, 2025. [Online]. Available: <https://rupress.org/jcb/article-abstract/125/3/681/59536>

T. Sørli *et al.*, “Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 19, pp. 10869–10874, Sep. 2001, doi: 10.1073/PNAS.191367098/SUPPL\_FILE/INDEX.HTML.

T. Sørli *et al.*, “Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 19, pp. 10869–10874, Sep. 2001, doi: 10.1073/PNAS.191367098/SUPPL\_FILE/INDEX.HTML.

S. Tabor, M. Szostakowska-rodzios, A. Fabisiewicz, and E. A. Grzybowska, “How to Predict Metastasis in Luminal Breast Cancer? Current Solutions and Future Prospects,” *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 8415*, vol. 21, no. 21, p. 8415, Nov. 2020, doi: 10.3390/IJMS21218415.

M. Tanikawa *et al.*, "Multifunctional transcription factor TFII-I is an activator of BRCA1 function," *British Journal of Cancer* 2011 104:8, vol. 104, no. 8, pp. 1349–1355, Mar. 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.75.

G. A. Taylor *et al.*, "A pathogenetic role for TNF $\alpha$  in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraproline (TTP) deficiency," *Immunity*, vol. 4, no. 5, pp. 445–454, May 1996, doi: 10.1016/S1074-7613(00)80411-2.

G. A. Taylor *et al.*, "A pathogenetic role for TNF $\alpha$  in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraproline (TTP) deficiency," *Immunity*, vol. 4, no. 5, pp. 445–454, May 1996, doi: 10.1016/S1074-7613(00)80411-2.

C. Tchen, M. Brook, J. Saklatvala, A. C.-J. of B. Chemistry, and undefined 2004, "The stability of tristetraproline mRNA is regulated by mitogen-activated protein kinase p38 and by tristetraproline itself," *jbcr.org*, vol. 279, no. 31, pp. 32393–32400, Jul. 2004, doi: 10.1074/jbc.M402059200.

C. Tchen, M. Brook, J. Saklatvala, A. C.-J. of B. Chemistry, and undefined 2004, "The stability of tristetraproline mRNA is regulated by mitogen-activated protein kinase p38 and by tristetraproline itself," *jbcr.org*, vol. 279, no. 31, pp. 32393–32400, Jul. 2004, doi: 10.1074/jbc.M402059200.

P. G. Tiffen, N. Omidvar, N. Marquez-Almuina, D. Croston, C. J. Watson, and R. W. E. Clarkson, "A Dual Role for Oncostatin M Signaling in the Differentiation and Death of Mammary Epithelial Cells in Vivo," *Molecular Endocrinology*, vol. 22, no. 12, pp. 2677–2688, Dec. 2008, doi: 10.1210/ME.2008-0097.

P. G. Tiffen, N. Omidvar, N. Marquez-Almuina, D. Croston, C. J. Watson, and R. W. E. Clarkson, "A Dual Role for Oncostatin M Signaling in the Differentiation and Death of Mammary Epithelial Cells in Vivo," *Molecular Endocrinology*, vol. 22, no. 12, pp. 2677–2688, Dec. 2008, doi: 10.1210/ME.2008-0097.

Y. J. Topper and C. S. Freeman, "Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland.," <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.4.1049>, vol. 60, no. 4, pp. 1049–1106, 1980, doi: 10.1152/PHYSREV.1980.60.4.1049.

H. H. Traurig, "A radioautographic study of cell proliferation in the mammary gland of the pregnant mouse," *The Anatomical Record*, vol. 159, no. 2, pp. 239–247, Oct. 1967, doi: 10.1002/AR.1091590213.

Y. Uchida, T. Chiba, R. Kurimoto, and H. Asahara, "Post-transcriptional regulation of inflammation by RNA-binding proteins via cis-elements of mRNAs," *The Journal of Biochemistry*, vol. 166, no. 5, pp. 375–382, Nov. 2019, doi: 10.1093/JB/MVZ067.

R. Upadhyay, S. Sanduja, V. Kaza, and D. A. Dixon, "Genetic polymorphisms in RNA binding proteins contribute to breast cancer survival," *International Journal of Cancer*, vol. 132, no. 3, pp. E128–E138, Feb. 2013, doi: 10.1002/IJC.27789.

J. Verheijen *et al.*, "Defining a new immune deficiency syndrome: MAN2B2-CDG," *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 145, no. 3, p. 1008, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.JACI.2019.11.016.

N. I. Walker, R. E. Bennett, and J. F. R. Kerr, "Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats," *American Journal of Anatomy*, vol. 185, no. 1, pp. 19–32, May 1989, doi: 10.1002/AJA.1001850104.

C. J. Watson and P. A. Kreuzaler, "Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution," *The International journal of developmental biology*, vol. 55, no. 7–9, pp. 757–762, Nov. 2011, doi: 10.1387/IJDB.113414CW.

B. Weigelt, F. C. Geyer, and J. S. Reis-Filho, "Histological types of breast cancer: how special are they?," *Molecular oncology*, vol. 4, no. 3, pp. 192–208, 2010, doi: 10.1016/J.MOLONC.2010.04.004.

J. P. Witty, J. H. Wright, and L. M. Matrisian, "Matrix metalloproteinases are expressed during ductal and alveolar mammary morphogenesis, and misregulation of stromelysin-1 in transgenic mice induces," *molbiolcell.org* JP Witty, JH Wright, LM Matrisian *Molecular biology of the cell*, 1995•*molbiolcell.org*, vol. 6, no. 10, pp. 1287–1303, 1995, doi: 10.1091/MBC.6.10.1287.

M. T. Worthington, J. W. Pelo, M. A. Sachedina, J. L. Applegate, K. O. Arseneau, and T. T. Pizarro, "RNA binding properties of the AU-rich element-binding recombinant Nup475/TIS11/tristetraprolin protein," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 50, pp. 48558–48564, Dec. 2002, doi: 10.1074/jbc.M206505200.

C. S. Wynn and S. C. Tang, "Anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer: many choices and future directions," *Cancer and Metastasis Reviews* 2022 41:1, vol. 41, no. 1, pp. 193–209, Feb. 2022, doi: 10.1007/S10555-022-10021-X.

C. S. Wynn and S. C. Tang, "Anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer: many choices and future directions," *Cancer and Metastasis Reviews* 2022 41:1, vol. 41, no. 1, pp. 193–209, Feb. 2022, doi: 10.1007/S10555-022-10021-X.

J. Xiao *et al.*, "Activation of liver X receptors promotes inflammatory cytokine mRNA degradation by upregulation of tristetraprolin," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 49, no. 3, pp. 277–283, Mar. 2017, doi: 10.1093/ABBS/GMW136.

J. Xiao *et al.*, "Activation of liver X receptors promotes inflammatory cytokine mRNA degradation by upregulation of tristetraprolin," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 49, no. 3, pp. 277–283, Mar. 2017, doi: 10.1093/ABBS/GMW136.

J. Xiao *et al.*, "Activation of liver X receptors promotes inflammatory cytokine mRNA degradation by upregulation of tristetraprolin," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 49, no. 3, pp. 277–283, Mar. 2017, doi: 10.1093/ABBS/GMW136.

N. Y. Yu *et al.*, "Assessment of Long-term Distant Recurrence-Free Survival Associated with Tamoxifen Therapy in Postmenopausal Patients with Luminal A or Luminal B Breast Cancer," *JAMA Oncology*, vol. 5, no. 9, pp. 1304–1309, Sep. 2019, doi: 10.1001/JAMAONCOL.2019.1856,.

N. Y. Yu *et al.*, "Assessment of Long-term Distant Recurrence-Free Survival Associated with Tamoxifen Therapy in Postmenopausal Patients with Luminal A or Luminal B Breast Cancer," *JAMA Oncology*, vol. 5, no. 9, pp. 1304–1309, Sep. 2019, doi: 10.1001/JAMAONCOL.2019.1856,.

L. Zhao *et al.*, "Mammary gland remodeling depends on gp130 signaling through Stat3 and MAPK," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 42, pp. 44093–44100, Oct. 2004, doi: 10.1074/jbc.M313131200.