



**CENTRO DE REGULACIÓN GENÓMICA**  
**UNIVERSIDAD POMPEU FABRA**  
**PARC DE RECERCA BIOMÉDICA DE BARCELONA**

## **TESIS DOCTORAL**

# **Análisis De Los Dominios Funcionales Del Receptor De Progesterona En Líneas Celulares Estables De Cáncer De Mama**

**IGNACIO QUILES LARA**  
**SEPTIEMBRE 2007**

# **Análisis De Los Dominios Funcionales Del Receptor De Progesterona En Líneas Celulares Estables De Cáncer De Mama**

Memoria presentada en el Centro de Regulación Genómica por  
Ignacio Quiles Lara para aspirar al grado de Doctor en  
Bioquímica

Directores de Tesis

Dr. Miguel Beato del Rosal

Dr. Albert Jordan Vallés

Doctorante

Ignacio Quiles Lara



# Índice

# Análisis De Los Dominios Funcionales Del Receptor De Progesterona En Líneas Celulares Estables De Cáncer De Mama

## RESUMEN (1)

English	3
Castellano	4

## INTRODUCCIÓN (5)

### I.1 - SUPERFAMILIA DE LOS RECEPTORES NUCLEARES

I.1.1 - El Nacimiento	7
I.1.2 - Miembros De La Superfamilia	7
I.1.3 - Función Según La Clase	9
I.1.4 - Evolución Desde El Común Ancestro	10

### I.2 - DOMINIO FUNCIONALES DE LOS RECEPTORES NUCLEARES

I.2.1 - Relaciones Estructura Y Función	11
I.2.2 - La Estructura Del Receptor De Progesterona Humano	12
<i>LBD: Dominio de unión a ligando</i>	14
<i>DBD: Dominio de unión DNA</i>	15
<i>Residuos desde el DBD al extremo-N</i>	15

### I.3 – BIOLOGÍA DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS

I.3.1 - Funciones Fisiológicas De Las Hormonas Esteroideas	17
<i>Progéstina y proliferación celular en hBCC</i>	18
I.3.2 - Aspectos Moleculares De La Acción De La Pg En Cáncer	18
I.3.3 - Clínica De La Progesterona Y Estradiol En Cáncer	20
<i>Terapias por mediadores, inhibidores y reguladores</i>	20

### I.4 – MECANISMOS MOLECULARES DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS EN hBCC

I.4.1 - Efectos Directos O Genómicos	22
<i>Factores de transcripción: Crosstalk transcripcional</i>	23
<i>Chaperonas en complejos con los receptores esteroideos</i>	24
I.4.2 - Efectos Indirectos / No Genómicos / Extranucleares	27
<i>Progesterona y sus acciones no genómicas</i>	28
<i>Crosstalk de señalización</i>	29
<i>Crosstalk con otros receptores</i>	31

### I.5 – REGULACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

I.5.1 - Cofactores De La Transcripción Y Coreguladores	35
<i>Coactivadores</i>	36
Región AF2	37
Región AF1	40

Región DBD	40
Región para Splicing de RNA	41
<i>Corepresores</i>	42
<b>I.5.2 - Efectos Transcripcionales: Fosforilación</b>	43
Funciones De la Fosforilación de Ser294	45
Funciones De la Fosforilación de Ser400	46
<b>I.5.3 - Degradación Por Ubiquitinación</b>	47
<b>I.6 – MECANISMO PROLIFERATIVO DE LA PROGESTERONA</b>	
<b>I.6.1 - Ciclo celular</b>	51
<b>I.6.2 - Ciclina D1</b>	54
<i>MAP kinasa y ciclina D1</i>	55
<i>MAP kinasa, ciclina D1 y la regulación génica</i>	56
<b>I.7 – REDES GÉNICAS INDUCIDAS POR HORMONA</b>	
<b>I.7.1 – Genes Diana En Respuesta A Progesterona</b>	58

## RESULTADOS (61)

### R.1 – CONSTRUCCIÓN DE VECTORES RETROVIRALES PARA EXPRESIÓN DE FORMAS MUTADAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA HUMANO

<b>R.1.1 - Construcción De Un Vector Retroviral Expresando El Receptor De Progesterona Humano (hPR)</b>	63
Fig. R1A - R1B	63
Fig. R1C - R1D	64
Fig. R1C - R1D	65
<b>R.1.2 - Clonaje Y Estudio Funcional De Formas Mutadas Del hPR<sub>B</sub></b>	66
Fig. R2A	66
Fig. R2B - R2C	67
Fig. R2D	68

### R.2 – CREACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES DE CÁNCER DE MAMA EXPRESANDO FORMAS MUTADAS DEL RECEPTOR DE PG

<b>R.2.1 - Creación De Una Línea Celular De Cáncer De Mάma Expresando hPR<sub>B</sub></b>	70
Fig. R3A	70
Fig. R3B	71
Fig. R3C - R3D	72
<b>R.2.2 - Construcción De Líneas Celulares De Cáncer De Mάma Espresando Mutantes Del hPR<sub>B</sub></b>	73
Fig. R4A - R4C	73
Fig. R4C	74
Fig. R4D	75
<b>R.2.3 - Anάlisis De Clones Individuales De TYML25.TAP-hPR<sub>B</sub> [WT]</b>	75
Fig. R5A - R5B - R5C	76
Fig. R5D - R5E	77
Fig. R4D	77
Fig. R6A - R6B	78
Fig. R5C - R6D	79

### **R.3 – ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL EN RESPUESTA A PROGESTERONA**

<b>R.3.1 - Reclutamiento De Las Variantes Del hPR<sub>B</sub> Y Activación Del Promotor De MMTV En Respuesta A Progestina</b>	80
Fig. R7A - R7B	81
Fig. R7C	83
<b>R.3.2 - Proliferación Celular Inducida Por Progesterona</b>	83
Fig. R8A - R8B	84
Fig. R8C	85
<b>R.3.3 - Activación De MAPK Inducida Por Progesterona</b>	85
Fig. R9A - R9B	86
Fig. R9C - R9D	87
<b>R.3.4 - Crosstalk Con El Receptor De Estrógenos</b>	88
Fig. R10A - R10B	89
Fig. R10D	90

### **R.4 – ANÁLISIS POR MICROARRAYS Y RT-PCR DE GENES EN RESPUESTA A PROGESTERONA**

<b>R.4.1 - Análisis Por Microarrays De Los Genes Que Responden A Progesterona En Líneas Celulares Expresando Mutantes Del hPR<sub>B</sub></b>	91
Fig. R11A	92
Tabla T1	93
<b>R.4.2 - Análisis Por RT-PCR En Tiempo Real De Los Genes Regulados Por Progesterona</b>	95
Tabla T2	96
Tabla T3	99

### **R.5 – CINÉTICAS DE TIEMPO PARA GENES CANDIDATO**

<b>R.5.1 - Análisis De Inducción De Genes</b>	100
Fig. R12A	101
Fig. R12B	102
Tabla T4	103
Tabla T5	104

### **R.6 – ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE GENES PROMOVIDA POR SEÑALIZACIÓN MOLECULAR Y/O A TRAVÉS DE UNIÓN AL DNA**

<b>R.6.1 - Inhibidores De La Activación De La Vía Erk Eliminan La Inducción Por Progestina De Genes Diana</b>	105
Fig. R13A	106
Tabla T6	108
Tabla T7	108

### **R.7 – CONSTRUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES EXPRESANDO NUEVAS FORMAS MUTADAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA**

<b>R.7.1 - Mutantes Adicionales De Interacción Con hER<sub>α</sub></b>	109
Fig. R14A	109
Fig. R14B - R14C	110
Fig. R14D	111

Fig. R14E	112	
<b>R.7.2 - Mutantes De Dimerización</b>		112
Fig. R15A	113	
Fig. R15B	114	
Fig. R15C - R15D	115	
Fig. R15E	116	
Tabla T8 - T9	119	
<b>R.8 – REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN CCND1</b>		
<b>R.8.1 - Expresión De CCND1 Y Su Relación Con Proliferación</b>		120
Fig. R16A - R16B	121	
Fig. R16C	122	
<b>R.8.2 - Efectos De La Eliminación De CCND1</b>		122
Fig. R17A - R17B	123	
<b>R.8.3 - Regulación Del Promotor De CCND1</b>		124
Fig. R18A	124	
Fig. R18B	125	
Fig. R18C	126	

## **DISCUSIÓN (129)**

### **D.1 – EXPRESIÓN DE FORMAS MUTADAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA HUMANO EN hBCC**

D.1.1 - Sistema De Expresión Retroviral Para hPR<sub>B</sub> 131

D.1.2 - Funcionalidad De hPR<sub>B</sub> Mutantes 132

### **D.2 – LÍNEAS CELULARES MUTANTES DE CÁNCER DE MAMA (hBCC)**

D.2.1 - Poblaciones Estables De Células Expresando hPR<sub>B</sub> 133

D.2.2 - Clones Individuales Versus Pool Celular 133

D.2.3 - Estabilidad De La Expresión A Largo Plazo 134

### **D.3 – ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL EN RESPUESTA A PROGESTERONA**

D.3.1 - Implicación De La Señalización En La Activación Del Promotor De MMTV 136

D.3.2 - Activación Génica A Través De Mediadores Transcripcionales 134

D.3.3 - Proliferación Celular Inducida Por Progesterona 137

### **D.4 – FOSFORILACIÓN POR MAPK**

D.4.1 - Fosforilación De hPR<sub>B</sub> Inducida Por Progesterona 139

D.4.2 - Señalización Por MAP Kinasas 140

D.4.3 - Expresión Endógena De hER $\alpha$  140

### **D.5 – ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN GÉNICA EN RESPUESTA A PROGESTERONA**

D.5.1 - Línea Salvaje Versus Línea Parental (Microarrays) 142

D.5.2 - Línea Salvaje Versus Líneas Mutantes (Microarrays)	143
D.5.3 - Microarray Versus RT-PCR	143
D.5.4 - Implicación De Los Dominios Del hPR <sub>B</sub>	144
<b>D.6 – PATRONES GÉNICOS DE ACTIVACIÓN EN EL TIEMPO</b>	
D.6.1 - Red Génica De Respuesta Tardía Y Progresiva	146
D.6.2 - Red Génica De Respuesta Rápida O Temprana	147
<b>D.7 – IMPLICACIÓN MAPK EN LA ACTIVACIÓN GÉNICA POR PROGESTERONA</b>	
D.7.1 - Dominio ERID Versus Rutas De Señalización	149
D.7.2 - Dominio DBD Versus Rutas De Señalización	149
<b>D.8 – MUTANTES PUNTUALES DEL DOMINIO ERID</b>	
D.8.1 - Mutaciones Puntuales De Interacción Con hER <sub>α</sub>	151
<b>D.9 – IMPORTANCIA DE LA DIMERIZACIÓN</b>	
D.9.1 - Papel De La Dimerización	152
D.9.2 - P-Box Versus D-Box	152
<b>D.10 – IMPLICACIÓN DE LOS DOMINIOS EN LA REGULACIÓN GÉNICA POR PROGESTERONA</b>	
D.10.1 - Dominios Funcionales Implicados En La Regulación Génica Por Pg	154
Tabla T10 – T11	155
<b>D.11– REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN CCND1</b>	
D.11.1 - Expresión De CCND1 Y Su Relación Con Proliferación	156
D.11.2 - Efectos De La Eliminación De CCND1	157
D.11.3 - Regulación Del Promotor De CCND1	157

## CONCLUSIONES (159)

## MATERIAL Y MÉTODOS (163)

### MATERIAL

Reactivos Y Plásmidos	165
-----------------------	-----

### MÉTODOS

M.1 – Cultivo Celular	167
M.2 – Western Blot	167
M.3 – Ensayos De Transfección	168

<b>M.4</b> – Ensayos de Luciferasa	168
<b>M.5</b> – Generación De Líneas Estables Por Infección Retroviral	168
<b>M.6</b> – Ensayo De Proliferación Celular Y/O Distribución De Ciclo Celular	169
<b>M.7</b> – Localización Subcelular // Microscopía Confocal	169
<b>M.8</b> – Ensayos De Inmunoprecipitación De Cromatina	169
<b>M.9</b> – Purificación Secuencial Por TAP // Inmunoprecipitación Por Flag	170
<b>M.10</b> – Extracción de RNA // RT-PCR // PCR En Tiempo Real	170
<b>M.11</b> – Análisis Estadístico	171
<b>M.12</b> – Microarrays Y Análisis De Datos	171

## **BIBLIOGRAFÍA (173)**

## **APÉNDICE (187)**

### **Abreviaturas**

189

# Resumen

## **Analysis Of Progesterone Receptor Functional Domains In Human Breast Cancer Cell Lines**

Steroid hormone receptors act directly in the nucleus over the chromatin organization and transcriptional activity of several cellular promoters. On the other hand, they have an indirect, less understood effect on cytoplasmic signal transduction pathways, affecting ultimately on gene expression. For the progesterone receptor (PR), MAPK pathway activation in response to progestins in the breast cancer-derived cell line T47D is mediated by the interaction and activation of PR on the estrogen receptor (ER). We are interested on distinguishing between direct effects of nuclear receptors and those mediated by signal transduction pathways on transcription of hormone-responsive genes and cell proliferation. For this, we have stably expressed in the PR-negative T47Dy cell line, tagged forms of the PR isoform B (PR<sub>B</sub>) mutated at regions involved either in DNA binding (PR<sub>B</sub>-DBD), or in its ability to interact with ER and activate the c-Src/Erk cascade (PR<sub>B</sub>-ERID). The PR<sub>B</sub>-DBD mutant has lost its ability to bind and activate the reporter mouse mammary tumor virus (MMTV) promoter, and PR<sub>B</sub>-ERID is unable to induce cell proliferation in response to progestins. An additional mutant, PR<sub>B</sub>-AF2, previously described as unable to recruit coactivators to the MMTV promoter, has also been tested. Gene expression in response to progestins in cell lines expressing wild type or mutant PR<sub>B</sub> has been studied by microarray hybridizations on a 750 genes-containing breast cancer customized cDNA array. Our results define the subsets of hormone-responsive genes regulated by the different modes of action of PR<sub>B</sub>, as well as genes where the nuclear and nongenomic pathways of PR<sub>B</sub> cooperate. Results have been extensively validated by RT-real time PCR on kinetic experiments of hormone treatment, and by using additional PR<sub>B</sub> mutants and several signaling pathways inhibitors. Finally, we have focused our attention on the involvement of Cyclin D1 gene (CCND1) activation by hormone on cell proliferation, the mode of action of PR on its activation and the analysis of promoter regions where PR binds. In conclusion, the stable cell lines generated here have proven to be useful to identify the transcriptome regulated by the different modes of action of PR and further understand biological consequences of steroid hormones.

## **Análisis De Los Dominios Funcionales Del Receptor De Progesterona En Líneas Celulares Estables De Cáncer De Mama**

Los receptores esteroideos actúan directamente en el núcleo en la organización de la cromatina y en la actividad transcripcional de varios promotores celulares. Por otro lado, estos tienen otro efecto indirecto, menos comprendido en las rutas de transducción de señales citoplasmáticas, afectando en última instancia a la expresión génica. Para el receptor de progesterona (PR), la activación de la ruta de MAPKs en respuesta a progesterona en líneas celulares de cáncer de mama T47D es mediada por la interacción y activación de PR sobre el receptor de estrógenos (ER). Nosotros estamos interesados en distinguir entre los efectos directos de los receptores nucleares y aquellos mediados por las rutas de transducción de señales en la transcripción de genes en respuesta a hormona y proliferación celular. Para esto, nosotros hemos expresado establemente en una línea celular T47Dy desprovista de PR, formas varinates marcadas de la isoforma B del PR en regiones involucradas bien en la unión al DNA(PR<sub>B</sub>-DBD), o en su habilidad para interaccionar con ER y activar la cascada c-Src/Erk (PR<sub>B</sub>-ERID). El mutante PR<sub>B</sub>-DBD ha perdido su capacidad para unirse y activar el promotor reportero Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), y PR<sub>B</sub>-ERID es incapaz de inducir proliferación celular en respuesta a progesterona. Un mutante adicional, PR<sub>B</sub>-AF2, previamente descrito como incapaz de reclutar coactivadores para la regulación del promotor MMTV, también ha sido probado. La expresión génica en respuesta a progesterona en líneas celulares expresando los PR<sub>B</sub> salvaje y mutantes ha sido estudiada por hibridaciones en un microarray personalizado conteniendo el cDNA de 750 genes de cáncer de mama. Nuestros resultados definen conjuntos de genes regulados en respuesta a hormona por los diferentes modos de acción del PR<sub>B</sub>, también genes dónde las rutas nucleares y no genómicas cooperan. Los resultados han sido extensamente validados por RT PCR en tiempo real en experimentos cinéticos con tratamientos hormonales, y por usar mutantes adicionales de PR<sub>B</sub> y varios inhibidores de rutas de señalización. Por último, hemos centrado nuestra atención en la participación del gen Ciclina D1 (CCND1) en proliferación celular por hormona, el modo de acción del PR en su activación y el análisis de las regiones promotoras dónde PR se une. En conclusión, las líneas estables generadas aquí han probado ser útiles para identificar el transcriptoma regulado por los diferentes modos de acción de PR y adicionalmente comprender las consecuencias biológicas de las hormonas esteroideas.



# **Introcucción**

### I.1.1 - EL NACIMIENTO DE LA SUPERFAMILIA

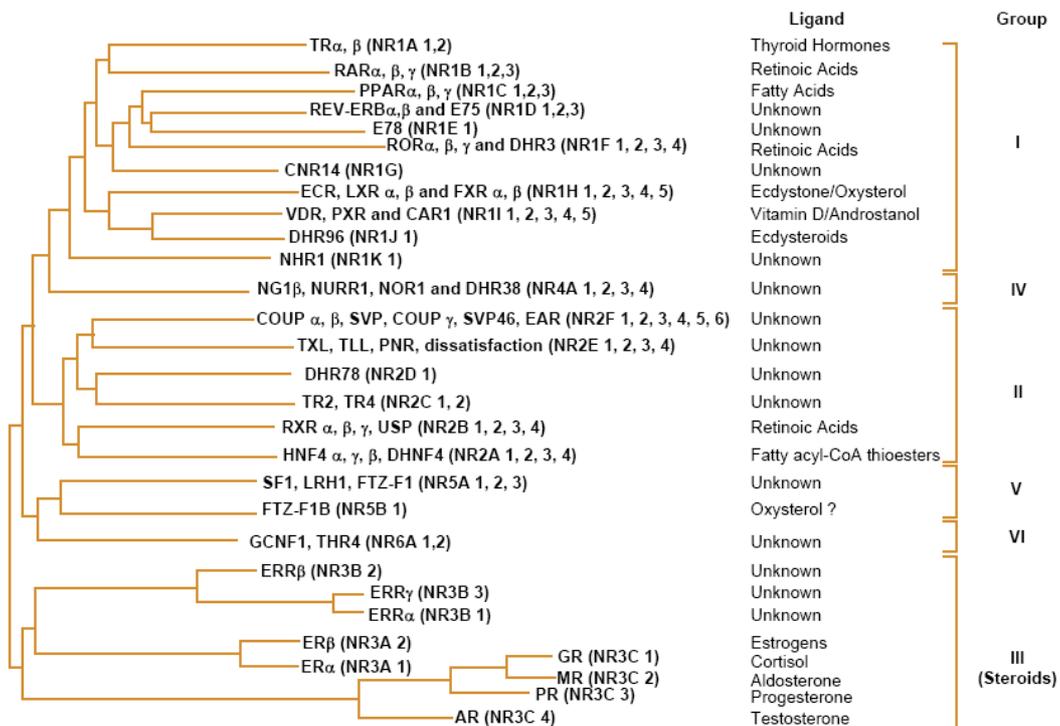
Aunque las hormonas lipofílicas (esteroideas, tiroideas, y vitamina D3) fueron aisladas en la primera parte del siglo XX, sus mediadores permanecieron ocultos hasta la síntesis del estradiol radiomarcado por Jensen y Jacobsen en 1960, el cual permitió la identificación de una o más proteínas de unión a estradiol. El hallazgo de que esta proteína se translocaba del citoplasma al núcleo tras administrar hormona sugirió que había una unión entre el control de transcripción y las acciones fisiológicas de la hormona (Jensen, 2004). Este concepto se apoya en el trabajo de los laboratorios de Clever y Ashburner, mostrando que el resople cromosómico en cromosomas polidiez de insecto era activado por ecdisteroides (Ashburner, Chihara, et al, 1974). Las identificaciones siguientes de genes respondiendo transcripcionalmente en tejidos diana por hormonas esteroideas de vertebrados, junto con el hallazgo de que el receptor de glucocorticoides (GR) podría exhibir una estructura modular con sitios separados para la hormona y de unión al ADN, y también que el promotor MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) tenía elementos de respuesta a GR (GRE) con las propiedades características de un elemento potenciador, llevó a un modelo de la acción de las hormonas esteroideas como factores transcripcionales de unión a potenciadores regulados por ligando (Chambon, 2004)(Yamamoto, 1985). En esta fase el clonaje de los receptores esteroideos se volvió una imperiosa necesidad porque estudios genéticos requerían elucidar la base molecular de este modelo.

Originalmente, en 1972, se identificaron en el oviducto de gallina, dos formas diferentes del receptor de progesterona (PR), llamadas PR<sub>A</sub> y PR<sub>B</sub>, y desde entonces se han encontrado en la mayoría de células que responden a progesterona (Schrader, Toft, and O'Malley, 1972) estas dos formas que comparten la estructura modular, con el dominio de transactivación (AF), un muy conservado dominio de unión a ADN (DBD) y el dominio de unión a ligando (LBD) en el extremo carboxilo (Beato, Herrlich, and Schutz, 1995). Trece años, tuvieron que pasar para que el ADNc del GR humano fuese clonado por Ron Evans (Govindan, Devic, et al, 1985). En la misma época, usando anticuerpos preparados contra el receptor de estrógenos humano (ER), junto a oligonucleótidos sonda derivados de su secuencia aminoacídica, el laboratorio de Chambon aisló y secuenció clones de ADNc para GR (Govindan, Devic, et al, 1985), y mostró que uno de ellos contenía el marco abierto de lectura (ORF) completo del ER, del ahora conocido como ER $\alpha$  (Raymoure, McNaught, et al, 1986). El GR y el ER, los cuales a propósito fueron los primeros

factores de transcripción para RNA-Polimerasa II en ser clonados, exhibieron una sorprendente homología con el oncogen viral v-erbA cuyo homólogo celular, la proteína c-erbA, mostró ser el receptor de hormonas tiroideas (TR) (Weinberger, Thompson, et al, 1986). Este evento mostró la primera indicación de que los receptores esteroideos podrían pertenecer a una superfamilia de receptores estructuralmente relacionados, que interaccionan con ligandos químicamente no relacionados.

Una comparación de los receptores con el ER de gallina el laboratorio de Kumar reveló seis regiones de homología, dos de las cuales estaban altamente conservadas, al usar construcciones con receptores quiméricos en los que faltaba alguna de las dos regiones de la estructura modular e independiente de los NRs, en la cual las regiones actualmente conocidas como LBD y DBD funcionaban independientemente (Kumar, Green, et al, 1987). Poco después vendrían los descubrimientos del primer receptor de ácido retinoico  $\alpha$  (RAR), y de las dos isoformas más de RAR- $\beta$  RAR- $\gamma$  (Petkovich, Brand, et al, 1987)(Krust, Kastner, et al, 1989).

Queda claro que 1987 fue la época del inicio del clonaje de todos los miembros de las superfamilia de receptore nucleares (NR), basándose en la homología de sus DBDs. y LBDs. El gran hito fue logrado in 1999: 49 NRs humanos habían sido clonados, entre los cuales 24 eran receptores huérfanos para los que aún su ligando no ha sido descubierto.



## I.1.2 - MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA

Los receptores nucleares son factores de transcripción intracelulares que regulan la actividad de los complejos de redes génicas. Estas proteínas definen una superfamilia responsable de la mayor parte de los aspectos del desarrollo eucariota, diferenciación, reproducción, y homeostasis metabólica. Esta superfamilia se divide típicamente en 3 clases: La familia de receptores esteroideos (**Clase I**) incluyendo el receptor de progesterona (PR), el de estrógenos (ER), glucocorticoides (GR), andrógenos (AR) y mineralocorticoides (MR). La familia del ácido retinoico o tiroideo (**Clase II**) incluye los receptores de tiroides (TR), vitamina D (VDR), ácido retinoico (RAR) y del peroxisoma activador proliferador (PPAR). La tercera clase de receptores (**Clase III**) ha sido llamada la familia de receptores huérfanos, y define un conjunto de proteínas identificadas por análisis comparativo de secuencias como pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares para la cual su ligando es desconocido. Los receptores huérfanos están recibiendo una particular atención porque algunos de los nuevos ligandos identificados (pe: ácido biliar) implican a sus receptores en una variedad de procesos metabólicos (Chawla, Repa, et al, 2001).

### I.1.3 - FUNCIÓN SEGÚN LA CLASE

Aunque todos los receptores nucleares regulan la expresión génica, entre las tres clases existen sutiles diferencias en los mecanismos bioquímicos por los cuales los receptores llevan a cabo su función. Con respecto a la familia de receptores esteroideos **clase I**, modelo tradicional dónde tras la unión del ligando hormonal, el receptor se libera de las proteínas de choque térmico (HSPs), trasloca al núcleo y se une como homodímero a elementos palindrómicos de respuesta (repetidos a la inversa) corriente arriba de los sitios promotores. ER reconoce la secuencia consenso AGGTCA, y el resto de receptores esteroideos reconoce la secuencia consenso AGAACA. La unión al ADN va a la par al reclutamiento de proteínas coactivadoras y a la posterior activación transcripcional. Los receptores esteroideos se unen como dímeros cabeza-cabeza: Un promotor de un dímero se une a una muy conservada mitad de uno de los hexanucleótidos, y el segundo receptor se une a la secuencia hexanucleotídica menos conservada. Las dos mitades son separadas por un número invariante de tres nucleótidos, aunque el tipo de nucleótidos no está conservado. La **clase II** de receptores típicamente funciona como heterodímeros, TR, VDR, RAR y PPAR son asociados con el receptor de ácido retinoico X (RXR) y se unen como un complejo dimérico a repetidos elementos de respuesta. El heterodímero reconoce la secuencia consenso hexanucleotídica de AGGTCA. A diferencia de los receptores esteroideos, estas proteínas se unen con una orientación cabeza-cola y soportan pequeños cambios en el número de nucleótidos entre las dos mitades necesarias para una especificidad combinada (Umesono, Murakami, et al, 1991). Desde una perspectiva funcional, los heterodímeros tienden a quedarse unidos a sus elementos de respuesta a pesar de que el

agonista/ ligando esté presente; En ausencia de ligando, la activación génica es evitada por la interacción con corepresores manteniendo el heterodímero unido a ADN. Tras la unión del ligando, las proteínas corepresoras son liberadas y los coactivadores reclutados, llevando a la activación de la transcripción.

Todavía no se tiene un completo conocimiento de la función de los receptores huérfanos **clase III**, pero ciertas evidencias indican que estos receptores bien pueden heterodimerizar con RXR o pueden unirse como monómeros a elementos de respuesta a hormona para llevar a cabo su función. Típicamente estas proteínas reconocen secuencias hexanucleótidas similares, como hacen los de clase II, pero algunos de los receptores huérfanos también se unen como monómeros a las secuencias de ADN que flanquean los sitios de reconocimiento.

Los modelos actuales han servido para la comprensión de la acción de los receptores nuclear. Sin embargo, sus limitaciones son evidentes, demostrando la dependencia alostérica de los receptores nucleares para regular la expresión génica, dependencia estructural tanto del receptor como con las proteínas coactivadores y el promotor de ADN. Algunas de estas transiciones incluyen cambios localizados en la orientación helicoidal, y otras son transiciones globales de orden-desorden. Aunque los mecanismos físicos que llevan a reajustes estructurales no son conocidos. Además a la complejidad, le añadimos que las interacciones del receptor nuclear y coactivadores al promotor no son estáticas, sino que incluyen procesos altamente inestables dependientes del tiempo que involucran a más de 50 proteínas (Kastner, Krust, et al, 1990).

#### **I.1.4 - EVOLUCIÓN DEL COMÚN ANCESTRO**

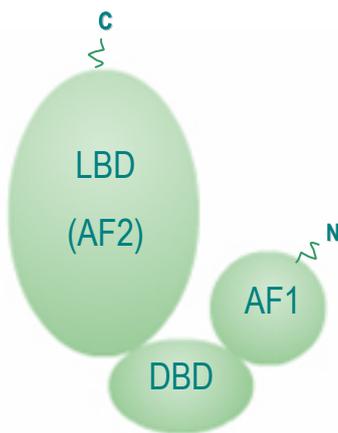
Los efectos de las hormonas esteroideas son mediados a través de su unión a receptores intracelulares, los cuales son miembros de la superfamilia de receptores nucleares (NR). Esta familia de factores de transcripción engloba a los receptores para hormonas esteroideas, tiroideas, vitamina D y ácido retinoico así como a un número de receptores huérfanos. Se cree que todos los NRs derivan de un antecesor común y que los receptores ancestrales podrían haber sido constituidos de factores de transcripción homodiméricos que han evolucionado y adquirido la habilidad para unirse a ligando y heterodimerizar. Alternativamente, los receptores ancestrales podrían haber sido originalmente dependientes de ligando y la unión a ligando específica podría haber cambiado a lo largo de la evolución, resultando en la pérdida de dependencia de ligando para algunos de esos receptores.

## I.2.1 - RELACIONES ESTRUCTURALES CON LA FUNCIÓN

Estudios bioquímicos de receptores parcialmente purificados, demostraron que los **receptores nucleares** contienen dos subunidades estructurales: una moderadamente conservada en el extremo-C de unión a ligando (LBD) y una altamente conservada de unión a ADN (DBD) localizada centralmente. La **LBD** tiene un número de funciones críticas. Primero, como indica su nombre, el LBD contiene un bolsillo interior de unión específico para su hormona o ligando. Segundo, el dominio contiene una función de activación transcripcional por ligando (AF2) necesaria para reclutar proteínas coactivadoras. El coactivador es entonces capaz de interactuar con proteínas de remodelamiento de la cromatina y activar así la maquinaria general de transcripción. Finalmente, el LBD es un mediador de reacciones para reajuste (dimerización o tetramerización), necesarias para la unión de alta afinidad a elementos de respuesta a hormona.

### RECEPTORES ESTEROIDEOS CLÁSICOS

Clásicos o nucleares, los receptores esteroideos son proteínas localizadas en el citosol (o algunas veces en el núcleo). En unión a ligando, realizan un cambio conformacional que les permite interactuar con el ADN. Los receptores contienen un *dominio en el extremo carboxilo* que presenta un bolsillo de unión a ligando; un *dominio central* conservado rico en cisteínas que es probablemente responsable de la actividad de unión a ADN; y una *región variable* en el extremo amino que podría modular la transactivación. Los receptores nucleares esteroideos muestran una considerable homología entre ellos, y forman una superfamilia de proteínas junto a los receptores de la vitamina D, y para hormonas tiroideas. Más de 60 diferentes proteínas receptoras han sido identificadas en los vertebrados. En algunos casos, sus ligandos no han sido identificados, y en este caso se describen como receptores huérfanos.



La segunda subunidad identificada fue el **DBD**, la que ancla el receptor al elemento de respuesta hexanucleotídico localizado dentro de los promotores nucleares regulados por el receptor. Como veremos con más detalle, el DBD también sirve como un transmisor alostérico de información a otras regiones de la molécula del receptor. EL DBD está conectado al LBD por una corta secuencia de aminoácidos bisagra, llamada región H. Las propiedades funcionales de la secuencia bisagra aún no son muy claras, aunque ésta puede

ser fosforilada y la fosforilación produce un incremento de la activación transcripcional (Knotts, Orkiszewski, et al, 2001).

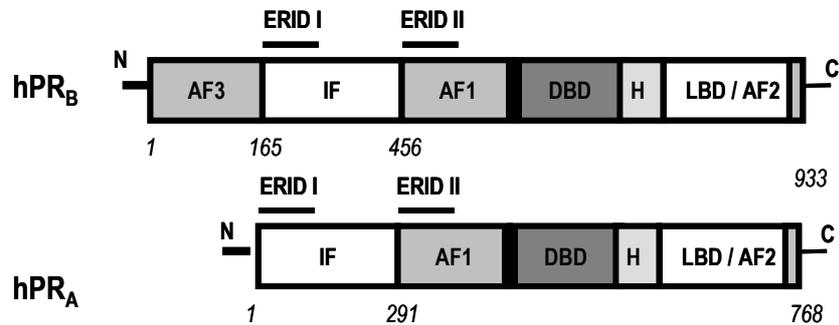
La mayoría de los receptores nucleares contienen secuencias aminoacídicas en el extremo-N del DBD. Estos residuos contienen funciones de activación transcripcional llamadas AF1. A diferencia de las secuencias moderadamente conservadas AF2 incluidas dentro del LBD, la secuencia AF1 esta poco conservada (<15%) a lo largo de la superfamilia de los receptores nucleares, e incluso dentro de subgrupos tal como la familia de receptores esteroideos. Esta falta de homología entre secuencias tanto de AF1 como del extremo-N podría explicar, por ejemplo, como los receptores esteroideos pueden unirse a elementos de respuesta similares In Vitro, de promotores de genes diferencialmente regulados, conteniendo las mismas secuencias que In Vivo. Finalmente, aunque la secuencia AF1 puede funcionar como un activador transcripcional independiente de ligando, esta también puede sinergizar funcionalmente con AF2 (Sartorius, Melville, et al, 1994).

Las propiedades funcionales de los residuos localizados entre AF1 y el extremo lejano N son las menos comprendidas de cualquiera de las secuencias de los receptores nucleares. Para algunos receptores, estos residuos juegan un papel importante al atenuar o modular las propiedades de activación transcripcional. Además, residuos de serina y treonina localizados dentro de estas secuencias son fosforilados en respuesta a ligando, relacionándose con ciclo celular, y de este modo funcionan como sensores de transducción de señales (Narayanan, Adigun, et al, 2005). Aún no está claro si la fosforilación u otras modificaciones postraduccionales provocan cambios en la estructura del receptor nuclear, aunque sí está bien determinado usando un sistema modelo con péptidos que la fosforilación de la cadena de aminoácidos pueden bien estabilizar o desestabilizar la estructura secundaria (Mestas, and Lumb, 1999)

### **I.2.2 – LA ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA HUMANO**

Como ya hemos visto, el PR pertenece a la familia de receptores esteroideos de los receptores nucleares. PR media la acción de la hormona progesterona, un ligando clave en reproducción y embarazo. Comprender la función de PR es complejo, en parte porque el receptor existe In Vivo como dos isoformas funcionalmente distintas, PR<sub>A</sub> (94Kd) y PR<sub>B</sub> (116Kd) (Kastner, Krust, et al, 1990), expresadas desde un mismo gen (11at q22-23) por el uso de promotores alternativos y diferentes sitios internos para el inicio de traducción. Las dos isoformas son idénticas, salvo que a la isoforma A le faltan 164 aminoácidos en el extremo amino. Como vimos en todas las otras formas de receptores nucleares, ambas isoformas contienen un LBD en el extremo-C y una región DBD centralmente localizada. Ambos dominios están unidos por 50 aminoácidos de secuencia bisagra. Las funciones de activación transcripcional están localizadas en el extremo-N de DBD (AF1) y dentro del LBD (AF2). En un aparente contraste con todos los

otros receptores nucleares, existe una tercera función de activación (AF3) localizada dentro de la secuencia única de la isoforma B de 164 Aa (BUS). Este AF3 no es un activador tradicional de transcripción ya que puede funcionar sólo en el contexto de su homólogo DBD, sugiriendo que el contacto directo entre las dos superficies es necesario para llevar a cabo su función.



A pesar de su alto grado de homología, las dos isoformas despliegan propiedades funcionales significativamente diferentes en promotores naturales y sintéticos:

- (a) PR<sub>B</sub> es típicamente un mejor activador transcripcional que PR<sub>A</sub> (Sartorius, Melville, et al, 1994)
- (b) La antiprogestina RU486 actúa como un antagonista parcial en PR<sub>B</sub>, y como antagonista puro del PR<sub>A</sub> (Meyer, Pornon, et al, 1990)
- (c) El ratón knockout para el gen PR<sub>A</sub> desarrolla displasia uterina y ovarios anormales, sin embargo el knockout para PR<sub>B</sub> afecta a la glándula mamaria, causando un arresto prematuro del crecimiento ductal y una diferenciación alveolar-lobular incompleta (Mulac-Jericevic, Lydon, et al, 2003)
- (d) Estudios por microarrays han demostrado que las dos isoformas regulan conjuntos de genes diferentes (Richer, Jacobsen, et al, 2002)

En definitiva, aunque las dos isoformas del PR tienen similares actividades de unión a ADN y a hormona, también muestran distintas actividades transcripcionales. PR<sub>B</sub> es en general, un activador más fuerte que PR<sub>A</sub>. Aunque PR<sub>A</sub> puede ser un mayor activador en cierto tipo celular y en contextos de genes diana específicos, el mayor potencial activador de PR<sub>B</sub> es debido en parte a la existencia del tercer dominio de activación AF3. También en ciertas células y contextos de promotores diana el PR<sub>A</sub> es inactivo como factor transcripcional y puede funcionar como un represor transdominante dependiente de ligando de otros receptores esteroideos incluyendo PR<sub>B</sub> y ER. PR<sub>A</sub> puede actuar como represor en respuesta a la unión de agonistas de progestina o antagonistas, a través de un dominio inhibitorio (ID) situado en los primeros 140 Aa (165-305 Aa) que es el responsable de esta función de transrepresión. La secuencia interna ID está presente en ambas isoformas pero es sólo activa en el contexto de PR<sub>A</sub>, sugiriendo que la

secuencia específica de PR<sub>B</sub> en su extremo amino juega un papel clave en suprimir la función del dominio ID.

### **LBD: EL DOMINIO DE UNIÓN A LIGANDO**

William & Sigler (Tanenbaum, Wang, et al, 1998) en 1998 determinaron la primera estructura de alta resolución del dominio LBD del PR unido a su ligando, la progesterona. Como observamos en todos los demás LBDs, la estructura del PR está compuesta de una región globular y un sándwich de hélices alfa antiparalelas. Aunque la estructura conserva la estructura terciaria, está compuesta de diez hélices: La hélice 2 está enteramente inmersa en la estructura del PR, y las hélices 10 y 11 están condensadas en una única unidad continua. La hélice 12, más implicada en la regulación del reclutamiento de coactivadores, es más larga que en otros LBDs y abarca todo el bolsillo de unión a ligando. La progesterona se une en la zona propuesta por Williams y Sigler, localizada en la mitad del LBD, formando específicos enlaces de hidrógeno y contactos de Van Der Waals con los residuos de la lámina  $\beta$  y las hélices 3, 5, 7, 11 y 12. Además, se producen interacciones hidrofóbicas entre el ligando y las paredes del bolsillo de unión para la estabilidad y especificidad de la reacción de unión.

Dado que el LBD del PR aún no ha sido cristalizado en presencia de un péptido coactivador LXXLL, la naturaleza exacta de la interacción receptor-coactivador no está definida. Sin embargo, la comparación estructural con otras estructuras de LBDs revela que la hélice 12 participa formando una ranura hidrofóbica probablemente necesaria para la unión de una proteína coactivadora (Tanenbaum, Wang, et al, 1998). La estabilización de la hélice en presencia de progesterona, ocurre por las interacciones hidrofóbicas de la hélice 4 y de la unión por enlaces de hidrógeno con el agonista hormonal. Por comparación, la posición de los antagonistas de la progesterona como RU486, quedaría como mediante choques estéricos con la hélice 12 y el triptófano 755, el cual contacta la hélice 12 en la estructura unida a progesterona(Williams, and Sigler, 1998). Estas observaciones sugieren que la hélice 12 debería ser desplazada en presencia del antagonista y de este modo sería incapaz de formar la interfaz necesaria para el reclutamientos de coactivadores.

Varias estructuras del PR-LBDs, complejo con diversos ligandos esteroideos o no esteroideos, han sido propuestas desde que se determinó la primera estructura(Madauss, Deng, et al, 2004). A pesar del tipo de ligando, el LBD mantiene la misma estructura terciaria tal y como hemos descrito arriba. Sin embargo, minuciosos análisis de la interacción en el bolsillo de unión revelan que los contactos receptor-ligando están ajustados dependiendo del tipo de ligando. Como consecuencia, el volumen del bolsillo de unión LBD está modulado desde 490Å a 730Å,

dependiendo del ligando. Los cambios de volumen se acomodan por reajustes de la cadena principal y lateral orientándose a la interfaz de la unión.

### **DBD: EL DOMINIO DE UNIÓN A DNA**

Recientemente, la estructura del complejo PR-DBD unida a los elementos palindrómicos de respuesta ha sido determinada mediante cristalografía por rayos X (Roemer, Donham, et al, 2006). Como vimos para otras estructuras de receptores esteroideos, PR se une al ADN como un dímero, usando una orientación cabeza-cabeza. En general la estructura terciaria del núcleo de la estructura del DBD es bastante similar a la de otros DBDs de receptores nucleares. La hélice 1 de cada monómero DBD cae dentro de la ranura mayor del hexanucleótido en el sitio medio, y la hélice 2 cae sobre y perpendicularmente a la hélice 1. El análisis de la interacción proteína-ADN revela que los contactos de la cadena lateral aminoacídica con las bases en la ranura mayor son casi idénticos, a aquellos vistos para el cercano receptor de glucocorticoides o andrógenos. Sin embargo, la ranura menor dentro del trinucleótido espaciador entre cada hemisítio está altamente comprimida en relación a los de los complejos de GR y AR-ADN. Las implicaciones funcionales de esta última observación están aún bajo investigación.

A pesar de las muchas similitudes con otras estructuras DBDs, existen varias diferencias implicadas en el reconocimiento de promotores para receptores esteroideos y de especificidad funcional. El CTE del DBD interacciona directamente con la ranura menor del ADN en las bases exteriores de cada elemento de respuesta hexanucleotídico. Además, un análisis mutacional reveló que el CTE contribuyó a la afinidad de unión general del PR y a la habilidad del receptor para unirse a los hemisítios de modo aislado. La contribución del CTE no es debida a interacciones inespecíficas, como reveló un ensayo de selección de sitios de unión, en el cual se vió también unión del DBD por las secuencias que flanquean la secuencia hexanucleotídica canónica preferencial. Los promotores regulados por PR tienden a no exhibir claramente los elementos palindrómicos de respuesta. De este modo, los promotores están a menudo compuestos de sitios palindrómicos pobremente conservados o hemisítios no relacionados, sugiriendo así que el PR-CTE ayudaría a estabilizar la unión a estos promotores.

### **RESIDUOS DESDE EL DBD AL EXTREMO AMINO**

Usando aproximaciones bioquímicas y biofísicas, Horwitz demostró que las isoformas del PR sin el LBD (NTA y NTB) mantenían una estructura amino estable (Bain, Franden, et al, 2001). Sin embargo, los análisis indicaron que esta estructura existe en solución como un amplio conjunto de conformaciones, mas que como una estructura única tipo globular. Estudios de mapeo revelaron que las regiones de baja estabilidad estructural corresponden a los motivos

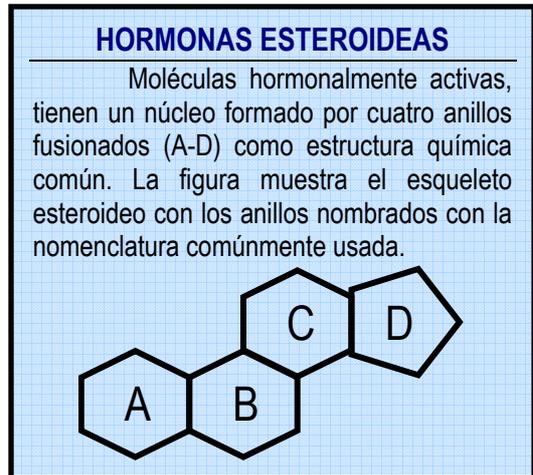
previamente identificados como de fosforilación y a los límites funcionales de la subunidad AF1, y las regiones de alta estabilidad estaban entremezcladas entre estos sitios. Sin embargo, estos resultados no implican que las secuencias estructurales sean intrínsecamente estables, aunque sí que los fragmentos que no contenían más que el DBD fueron inmediatamente degradados por proteasas. Estas observaciones tomadas juntas indican que el DBD puede influenciar la estructura amino y estabilizarla. Estos resultados podrían también explicar por qué, cuando se estudian aisladas, las funciones de activación de los receptores nucleares son típicamente desestructuradas. Tras la unión a los HREs palindrómicos, tanto NTA como NTB produjeron cambios conformacionales. Estos cambios fueron localizados en la región AF1 y la bisagra (H). De este modo, demostraron que la unión a ADN es una transición estructural alostérica mediada por DBD. Los cambios dependientes de ADN en la estructura del extremo-N aparecen como un tema común entre los receptores nucleares, aunque sus implicaciones funcionales no estén totalmente claras. Los experimentos sugieren que los cambios son necesarios para el reclutamiento de proteínas coactivadoras al promotor (Murphy, and Blenis, 2006). Sin embargo, la hipótesis de que los receptores unidos a ADN verdaderamente reclutan coactivadores, esto es, incrementan las energías de unión para la interacción coactivador–AF, aún ha de ser rigurosamente probada. Análisis bioquímicos de NTA y NTB revelaron idénticas propiedades estructurales entre ambas isoformas, y diferencias en su conformación hidrodinámica. Esta observación llevó a la hipótesis de que las diferencias funcionales específicas de cada forma no fueron debidas a diferencias estructurales macroscópicas entre las dos isoformas, sino a que BUS podría estabilizar dando una mayor funcionalidad a la actividad de los conformeros dentro del conjunto PR<sub>B</sub> en relación al conjunto PR<sub>A</sub>.

## I.3.1 – FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS

Las **hormonas esteroideas** como el estradiol y la progesterona ejercen sus efectos en células diana predominantemente a través de la unión y activación del ER y PR, respectivamente. Estos receptores son miembros de la superfamilia de factores de transcripción hormonales dependientes de ligando, que se unen a las regiones de control (promotoras) de genes específicos, donde se reclutan los coactivadores o corepresores, junto a la maquinaria transcripcional necesaria para la expresión génica. Por otro lado, la

habilidad del receptor nuclear para modular la transcripción de genes no es sólo dependiente de su interacción con otros factores transcripcionales. Existe una extraordinaria diversidad de factores involucrados en la respuesta celular a señales hormonales, y destacando el papel de ER y PR en la regulación de las funciones ováricas y uterinas.

Las **hormonas esteroideas** -incluyendo progestinas, estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides- son moléculas pequeñas, potentes y lipofílicas que regulan un amplio conjunto de funciones fisiológicas y celulares, tales como proliferación, supervivencia, diferenciación, desarrollos de órganos, metabolismo y homeostasis. En el tracto reproductivo femenino, la regulación de los niveles de las hormonas ováricas como el estradiol y la progesterona controlan el remodelamiento cíclico de los tejidos del ovario y el útero, lo que es necesario para la ovulación, implantación, placentación y mantenimiento del embarazo. Las diversas actividades fisiológicas del estradiol y la progesterona, sin embargo, no están restringidas al sistema reproductivo femenino. Los estrógenos son también esenciales para la fertilidad masculina, y ambas hormonas han sido implicadas en el sistema cardiovascular, inmunológico y nervioso central y en la función ósea. En particular, los estrógenos juegan un papel importante en la protección contra la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas, en la prevención de las enfermedades coronarias y en el mantenimiento de la función cognitiva.



Por otro lado, un abanico de enfermedades reproductivas y desordenes, incluyendo endometriosis, adenomiosis, fibrodiosis, infertilidad y desarreglos menstruales, se caracterizan por una respuesta celular alterada de las señales hormonales en los tejidos diana. El mayor reto en la biología celular reproductiva actual, es definir los mecanismos por los que el estradiol y la progesterona controlan tal diversidad de eventos celulares tales como proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis en las células diana. La explicación a esta multiplicidad de efectos se debe a la extraordinaria diversidad de señales citoplasmáticas y factores nucleares capaces de modular la función de receptores esteroideos. Además de los efectos positivos en los órganos reproductivos, los estrógenos juegan un papel importante en el desarrollo de los cánceres de útero, y ambas hormonas están implicadas en el desarrollo de los cánceres de mama. El papel crítico que juega el estradiol en el desarrollo de cáncer de mama se muestra en la respuesta protectora observada en mujeres tratadas con el antiestrogénico (4-OHT), resultando en una disminución de la mortalidad en un 25% y un 45% de disminución en la incidencia.

### **PROGESTINA Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE MAMA**

Las hormonas incrementan el riesgo de cáncer al incrementar la división celular, incrementando así el riesgo de errores genéticos de varios tipos o produciendo eventos mutagénicos. La gran mayoría de los experimentos In Vitro hechos con células normales de mama ,en cultivo, y con líneas de cáncer de mama han mostrado que los estrógenos aumentan la proliferación, y que añadir progestina reduce este efecto. En contraste, estudios In Vivo de los efectos mitogénicos de los estrógenos y la progesterona en células humanas de epitelio mamario de mujeres premenopáusicas, que muestran una predominancia de eventos proliferativos durante la fase luteal del ciclo menstrual cuando los niveles de ambas hormonas son altos, sugieren que la terapia EPRT (estradiol+progesterona) respecto a la ERT (restradiol) tiene mas efectos adversos por aumentar el riesgo de cáncer de mama.

#### **I.3.2 - ASPECTOS MOLECULARES DE LA ACCIÓN DE LA PROGESTERONA EN CÁNCER**

Clínicamente, el PR es una importante diana terapéutica. Los agentes progestacionales son ampliamente usados en la contracepción oral, terapia hormonal sustitutiva en menopausia (HRT), y para tratar el cáncer de mama y la hiperplasia endometrial (Kimmick, and Muss, 1998). Las antiprogestinas se usan en ensayos clínicos para estudios de contracepción, inducción de parto, y el tratamiento de meningiomas, endometriosis y cánceres endometriales. En cáncer de mama, los niveles totales de PR son medidos como una guía para la terapia hormonal, y como marcadores de pronóstico de la enfermedad (Horwitz, and McGuire, 1978). Es interesante el hecho de que mientras la adición de progestina al HRT disminuye la incidencia de cáncer

endometrial, también incrementa la incidencia de cáncer de mama (Schairer, Lubin, et al, 2000). Las acciones de la progesterona en la mama son paradójicas porque tiene funciones proliferativas y de diferenciación. Esto contrasta con las acciones principalmente antiproliferativas del útero. Por lo tanto, para proteger el útero, las progestinas son a menudo añadidas a los estrógenos en HRT. Sin embargo, este tratamiento es controvertido, porque recientes experimentos sugieren que la progestina en HRT incrementa el riesgo de cáncer de mama. Dado que la expresión de una u otra isoforma del PR podría ser más o menos beneficioso para ciertos estados fisiológicos o tumores, sería útil tener ligandos que activaran o suprimieran preferentemente una de las isoformas.

Datos recientes sugieren que las células positivas para SRs en mama actúan como proveedoras de las células progenitoras cercanas.. En contraste con las células mamarias normales, donde las células en proliferación están desprovistas de SRs, la mayoría (80%) de las diagnosticadas como células cancerosas de mama, expresan ER y PR. Esto sugiere que las células positivas para SRs llevan a cabo una temprana activación de los mecanismos endocrinos, y/o que las líneas positivas para SRs, de algún modo, retienen la habilidad de dividirse. Las células expresando PR también se dividen en la glándula mamaria de las embarazadas, donde el PR<sub>B</sub> está colocalizando con Ciclina D1 en estas células en división(Aupperlee, Smith, et al, 2005). De este modo, las rutas involucradas en el crecimiento normal de la glándula mamaria y el desarrollo, están probablemente reactivados durante la progresión del cáncer de mama.

Un papel más directo del PR en cáncer de mama ha sido ilustrado por los ensayos clínicos que muestran como la progestina incrementa el riesgo de padecer cáncer cuando es tomada con estrógenos como parte de la terapia de reemplazo hormonal combinada (SHRT). Los tumores fueron más grandes y de más alto grado en relación con los debidos sólo a estrógenos o placebo (Chlebowski, Hendrix, et al, 2003). Datos experimentales en organismos modelo apoyan esta teoría y sugieren un papel proliferativo para las progestinas, aún sin ser carcinogénicas (Haslam, Osuch, et al, 2002). Sin embargo, la progesterona podría inducir a poblaciones de células mamarias precancerosas y de manera inapropiada reentrarlas al ciclo celular o estimular a células madre durmientes para realizar una autorenovación. Conforme los tumores mamarios progresan, éstos se vuelven más resistentes a los tratamientos endocrinos (antiestrógenos y/o inhibidores de aromatasas). Sin embargo, la mayoría (65%) de los cánceres de mama resistentes retienen los altos niveles de SRs (ER $\alpha$  y PRs). En estos cánceres resistentes, positivos para SRs, la activación rápida de SRs desde la membrana podría volverse gradualmente dominante y quizás inapropiadamente integrarse en la regulación de las

actividades transcripcionales directas. Tanto el PR activado por niveles hormonales extremadamente bajos o por debajo del umbral de concentración, como el PR fosforilado en ausencia de hormona, son capaces de activar las rutas de señalización asociadas a membrana, incluyendo la kinasa c-Src, EGFR y la ruta p42/p44 MAPK. Los niveles elevados de la actividad MAPK ocurren frecuentemente en cánceres de mama, proporcionándoles un estímulo proliferativo continuo y una alta supervivencia (Dunn, and Davie, 2003). Los efectos finales de señalización por MAPK de los receptores EGFR o Her2 (erbB2) también se estudian como terapias endocrinas (Schiff, Massarweh, et al, 2005)

### I.3.3 - CLÍNICA DE LA PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN CÁNCER

El conflicto entre las actividades positivas y negativas de estas hormonas ha acelerado la búsqueda de moduladores selectivos de los receptores (SRMs), para usarlos en terapias sustitutivas que aprovechan selectivamente los efectos beneficiosos en los diversos tejidos de los esteroides, mientras se eliminan las actividades adversas en mama y útero.

#### TERAPIA HORMONAL SUSTITUTIVA (HRT)

La mayoría incluyen solo estrógenos, o en combinación con progestágenos, se usan para aliviar los síntomas menopáusicos y para prevenir la osteoporosis. Las progestinas son preescritas para compensar el incremento del riesgo de cáncer de endometrio asociado a la terapia de reemplazo con estrógenos (ERT). En EEUU, desde 1980s es muy común prescribir estrógenos en combinación con progestina, al igual que en los países escandinavos lo es desde antes.

### TERAPIAS POR MEDIADORES, INHIBIDORES Y REGULADORES

Estrógenos y progestágenos juegan papeles clave tanto en el desarrollo normal de la glándula mamaria como en la progresión del cáncer de mama. Estrategias terapéuticas dirigidas a inhibir la acción de los SRs (PR, ER) usando mediadores selectivos (SRMs) (Osborne, Zhao, and Fuqua, 2000), reguladores negativos (SRDs), retirando estrógenos por cirugía (Ooforectomía), mediante la ablación ovárica (con agonistas y antagonistas de hormonas luteinizantes) o con inhibidores de aromatasas, representan diversos ejemplos de terapias clínicas para tratar el cáncer de mama. Se han descrito grupos significativos de cánceres de mama (ER+/PR-) con una selectiva resistencia a la terapia con SRMs. Las diferencias entre los beneficios clínicos de usar SERMs o inhibidores de aromatasa en tumores con marcadores ER+/PR-, podría explicarse mediante la comprensión de los mecanismos regulatorios de ER y PR que simultáneamente causan el fenotipo y la resistencia a las terapias. Estos mecanismos involucran cruzamientos moleculares entre ER, PR con otros factores de crecimiento y con las rutas de señalización, relacionándose así los efectos clásicos y no clásicos de NRs en células de cáncer de mama.

La importancia de las hormonas esteroideas en cáncer de mama se conoce desde hace décadas, y muchos estudios han descrito la ontogenia de la expresión de los receptores esteroideos en sistemas modelo de ratón y glándula mamaria. Uno de los genes regulados por ER más estudiados ha sido el gen de PR, el cual media los efectos de la progesterona en el desarrollo de la glándula mamaria y en el cáncer de mama. No es sorprendente que los tumores más comunes sean ER+/PR+. Interesantemente, una sobreabundancia de PRA en cánceres de mama humanos se asocia con resistencias a tamoxifeno, por otro lado el polimorfismo funcional que resulta de una producción incrementada de PR<sub>B</sub> está asociado con un incremento en el riesgo de padecer cáncer (De Vivo, Hankinson, et al, 2003). Además, cuando los niveles de PR disminuyen drásticamente durante la terapia con tamoxifeno, más de la mitad de los tumores cambian su expresión génica y desarrollan resistencia al inhibidor. Dejando a los tumores más agresivos y metastáticos e indicando un cambio en los mecanismos regulatorios del tumor. Los tumores ER+/PR- (sin PR) se asocian a con una avanzada edad, al uso de la hormona posmenopáusica, un alto índice de masa corporal, a la menopausia, mostrando en muchos casos resistencias al tratamiento SERM y con altos grados de expresión de EGFR-Her2

Existen muchas teorías para explicar la generación de tumores ER+/PR-. La más simple es que el ER no es funcionalmente capaz de estimular la producción de PR. Aunque el fenotipo de estos tumores podría explicarse por los bajos niveles circulantes de estrógenos endógenos en mujeres posmenopáusicas, la mayoría de ellos no son debidos a que esta teoría y no explicarían la resistencia a tamoxifeno ni la nula expresión de PR. De hecho, la literatura sugiere que como esta teoría no explica la pérdida de PR, deben ser otros mecanismos los que expliquen este fenotipo. Incluso un reciente estudio habla de mutaciones encontradas en el NR-DBD imposibilitando su unión a ADN y relacionándolo con estrés oxidativo. Y otros estudios señalan que la regulación de PR es independiente de ER y que la disminución de los niveles proteicos de PR ocurre a nivel de ARNm implicando a AP1 en la represión del promotor.

## MECANISMOS MOLECULARES DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS EN CÁNCER DE MAMA

A pesar de la intensa investigación sobre la etiología de los cánceres hormonalmente regulados, los mecanismos moleculares básicos sobre la desregulación celular permanecen inciertos. Una característica de los receptores de hormonas esteroideas (SR), además de su función nuclear como factores de transcripción, es su interacción citoplasmática con factores de crecimiento que inician rutas de señalización en múltiples tipos celulares. Los efectos rápidos de señalización mediados por los SRs, ocurren independientemente de sus acciones nucleares, y juegan un papel clave en la regulación de los eventos transcripcionales mediados por SRs, representando una vía independiente para coordinar la regulación génica en respuesta a la activación de rutas kinasas.

### I.4.1 - EFECTOS DIRECTOS O GENÓMICOS

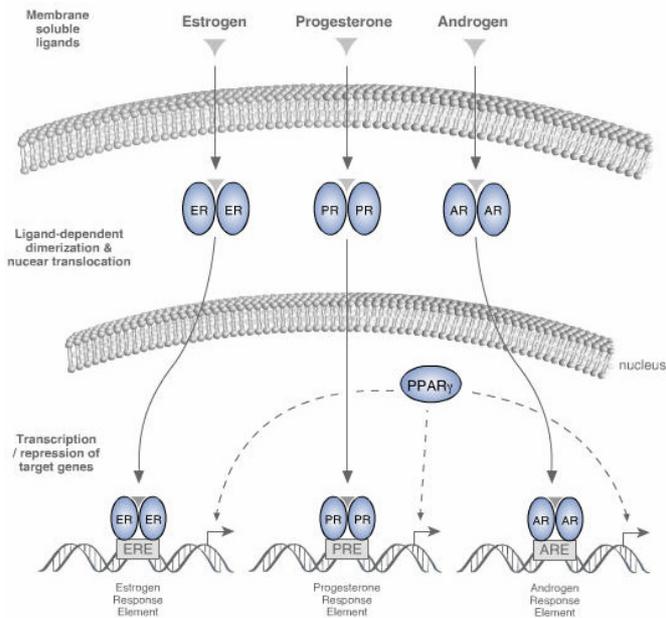
Los efectos de la progesterona son mediados a través de la interacción directa con su receptor intracelular específico PR (Beato, 1989). La unión de la hormona, difundiendo a través de la membrana lipídica, induce cambios conformacionales en la estructura del receptor, provocando la disociación de las **chaperonas**, la dimerización, modificaciones postrcripcionales y la unión a elementos específicos de respuesta a hormona (**HREs**) en el ADN de los promotores de genes específicos. Finalmente se reclutan proteínas coreguladoras que interaccionan con la maquinaria general de transcripción para elaborar los cambios en la actividad promotora inducidos por la hormona. El tiempo entre la entrada de la hormona a la célula y la acumulación de cantidades significativas de proteína formada es del orden de horas, y la ruta completa es sensible a inhibidores particulares de síntesis de proteínas o ARNm, tales como Actinomicina D o Cicloheximida.

#### CHAPERONAS

En ausencia de la hormona esteroidea, los SRs están complejados con varias moléculas chaperonas, incluyendo las proteínas de choque térmico (HSP) como Hsp90, Hsp70, Hsp40, Hop y p23. Estas uniones son un requisito indispensable para un apropiado empaquetamiento y ensamblaje de los heterocomplejos SRs-HSPs adecuados para la unión al ligando. Las HSP también funcionan como conexiones de los SRs con el sistema de tráfico proteico.

(Ver Apartado I.4.1 - Chaperonas)

De este modo, el PR interacciona con los elementos de respuesta a progesterona (PREs) o secuencias específicas en los promotores de c-myc (Moore, Zhou, et al, 1997), ácido graso sintetasa (Chalbos, Chambon, et al, 1987), promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) (Krusekopf, Chauchereau, et al, 1991). Sin embargo, el tratamiento con hormonas esteroideas también lleva a la expresión de genes que sin los clásicos PREs en su región promotora, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Richer, Lange, et al, 1998), c-fos y ciclina D1. Sin estos PREs, la regulación de estos genes ocurre a través de mecanismos de unión indirecta, como es el caso de la interacción del PR con la proteína específica 1 (SP-1) que promueve la transcripción del gen p21 en presencia de progestina (Owen, Richer, et al, 1998). PR también se puede regular a través de su unión a la proteína activadora 1 (AP-1) (Tseng, Tang, et al, 2003) o de transductores de señales y activadores de la transcripción (STATs) (Proietti, Salatino, et al, 2005).



Cuando se unen al ADN, bien directamente o de otro modo, todos los SRs interactúan con componentes de la maquinaria basal de transcripción, asistidos por moléculas coregulatoras del receptor nuclear. Los coreguladores controlan la susceptibilidad de la cromatina para la transcripción (el remodelamiento de cromatina) y el reclutamiento de la maquinaria de transcripción (pe: RNA polimersa II). Las transferasas de grupos acetilo de histonas (HATs) funcionan como coactivadores, sin embargo las deacetilasas de histonas (HDACs) funcionan como corepresores. Estas enzimas trabajan en concierto con otras proteínas reguladoras transcripcionales, incluyendo los complejos de remodelamiento de cromatina dependientes de ATP (SWI/SNF), las metiltransferasas de arginina (CARM1 y PRMT1), y las kinasas de histonas. Además, los agonistas de ligando de los receptores promueven la unión de proteínas coactivadoras causando el inicio de transcripción, mientras la unión de antagonistas promueve la interacción con proteínas corepresoras que facilitan la represión de la transcripción.

### FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN: “CROSSTALK” TRANSCRIPCIONAL

Como hemos mencionado antes, la unión directa a HREs en el ADN no es la única manera por la cual los receptores esteroideos controlan la transcripción génica. Un mecanismo

alternativo permite a los NRs regular la expresión génica en ausencia de unión a ADN. Este mecanismo es conocido como “crosstalk con factores de transcripción” y depende de las interacciones proteína-proteína entre los receptores esteroideos y otros factores de transcripción con secuencias de unión específica a promotores diana. Un ejemplo bien estudiado es el crosstalk entre los receptores esteroideos y los factores de transcripción AP-1 (Fos/Jun). Los receptores esteroideos tales como ER, GR, AR y PR pueden modular la actividad de promotores de genes dependientes de AP-1 sin sitios de unión al ADN para receptores esteroideos (Bamberger, Bamberger, et al, 1996). En muchos casos la interferencia es mutua, por ejemplo AP-1 también afecta la actividad transcripcional de los receptores esteroideos activados. Un crosstalk similar ha sido demostrados entre los receptores esteroideos y otros factores de transcripción con secuencias específicas tales como, la familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B, SP-1, CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc), C/EBPs (proteínas de unión a regiones potenciadoras CCAAT), STAT-5 (transductor de señales y activador de la transcripción) y OCT de factores de unión al octámero (Gottlicher, Heck, and Herrlich, 1998). Las consecuencias funcionales de estos crosstalk transcripcionales varían dependiendo del tipo celular, del promotor diana, del receptor esteroideo y del factor transcripcional involucrado. Por ejemplo, se ha demostrado como ER unido a su ligando estimula y/o reprime la transcripción de genes conteniendo sitios AP-1 según el tipo celular, el promotor y la isoforma del receptor en una manera específica (Webb, Nguyen, et al, 1999). Más aún, ER incrementa la transcripción de genes conteniendo sitios SP-1 pero inhibe la transcripción de genes vía sitios NF- $\kappa$ B (Stein, and Yang, 1995).

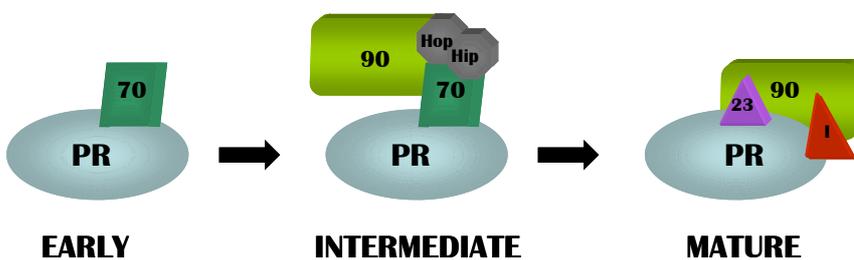
### **CHAPERONAS EN COMPLEJOS CON RECEPTORES ESTEROIDEOS**

Las chaperonas funcionan generalmente en los procesos de empaquetamiento estructural de proteínas, pero también asisten en la regulación de diversas rutas de transducción de señales; la mejor caracterizada es la ruta de respuesta a esteroides por proteínas receptoras específicas. En ausencia de hormonas, sin embargo, los monómeros de receptores esteroideos existen típicamente en complejos heteroméricos transcripcionalmente silenciados conteniendo diferentes proteínas chaperonas complementarias.

La primera indicación de que las chaperonas son componentes en los complejos inactivos con receptores esteroideos apareció en 1985, cuando una proteína de 90Kd asociada a PR y al receptor de glucocorticoides (GR) fue identificada como Hsp90 (Catelli, Binart, et al, 1985). Esta fue la primera vez en la que la pareja de unión de la chaperona hsp90 había sido identificada, así el descubrimiento puso juntas a las proteínas de choque térmico (hsp) y al

campo de los receptores esteroideos propusiendo un interesante modelo. En esa misma época, una proteína de 50-60Kd fue encontrada complejada con receptores nucleares, siendo catalogada como un miembro de la familia de las inmunofilinas FBP52 (Tai, Maeda, et al, 1986).

Sabemos que PR en la mayoría de los vertebrados existe en dos formas A y B, sin embargo no existen diferencias en el ensamble con las chaperonas. Se encontró a Hsp70 junto a Hsp90 en complejos con los PRs, además de otras tres proteínas desconocidas en ese momento (Kost, Smith, et al, 1989). Mas tarde, una de ellas fue identificada como FKBP52, una segunda FKBP51 (Smith, Baggenstoss, et al, 1993) y la tercera fue la proteína p23 (Johnson, Beito, et al, 1994). Una vez descubiertas las subunidades, se buscó la función que cada proteína tenía en el complejo. En paralelo, usando un sistema In Vitro para ensamblar complejos aislados de reticulocito de conejo en condiciones fisiológicas se determinaron tres nuevos miembros: Cyp40 previamente detectado con ER (Ratajczak, Hlaing, et al, 1990), Hip y Hop. Asimismo, al analizar la curva temporal de ensamblaje una imagen empezó a emerger explicando la asociación de estas proteínas con el PR (Smith, 1993). Basándose en estas observaciones y en otros experimentos adicionales, se propuso una ruta ordenada de ensamblaje consistente en complejos de PR con una composición diferente de subunidades.



Se identificaron tres fases básicas: (a) una fase temprana en la cual Hsp70 inicialmente se une a PR; (b) una fase

intermedia implicando a Hsp70, Hip, Hop y Hsp90; (c) una fase madura con Hsp90, p23 y las Inmunofilinas. También, se determinó que bajo condiciones máximas de ensamblaje los complejos maduros con PR no son de por sí estables y se disocian sin la unión del estímulo hormonal. Este encuentro chocaba con el anterior modelo en el cual los complejos son estables hasta la unión de la hormona que provoca la disociación. Por otro lado, la falta de complejos a largo plazo es consistente con la naturaleza transitoria normal de la unión por chaperonas. Así los complejos con PR están en un estado cíclico continuo de reacciones de ensamblaje en las cuales los complejos tempranos, intermedios y maduros están siempre presentes. Los ensamblajes de los monómeros de PR a los complejos maduros llevan aproximadamente 3 minutos y la disociación ocurre en 5 minutos, indicando que la mayoría del PR estará en forma de un complejo maduro relativamente estable. A temperatura fisiológica, el PR debe existir en un complejo maduro para establecer y mantener así, su alta afinidad por las conformaciones de unión a hormona (Smith, 2000). De hecho, no es sorprendente que el dominio de unión a ligando

(LBD) de los receptores esteroideos tenga una estructura relativamente inestable que es reconocida por las chaperonas. En realidad, todas las interacciones chaperona-receptor esteroideo se localizan en el dominio de unión al ligando (LBD) del extremo-C del receptor. Otros estudios sugieren que las chaperonas asociadas al receptor podrían estar involucradas en el tráfico intracelular del receptor entre los compartimentos citoplasmático y nuclear (DeFranco, 1999). Por tanto es obvio, que las chaperonas poseen una estructura externa para mantener intacto el bolsillo de unión a ligando del PR, pero esta estructura externa podría ser substituida por estructuras intramoleculares ancestrales, como ocurre en el ER y en otros receptores nucleares.

La extensa interacción con las chaperonas aparece como el mecanismo principal que mantiene a los receptores esteroideos silenciados. Así en estos complejos, el PR previene la dimerización de su sitio de unión al ADN (DBD) dejándolo enmascarado, y bloquea efectivamente las interacciones con potenciales proteínas coreguladoras. Cuando la progesterona se une a PR, no directamente estimula la disociación de chaperonas sino que bloquea la reiniciación del ciclo de ensamblaje. La apropiada fosforilación del PR podría causar en cierto modo, un cambio conformacional en el PR que reduciría la probabilidad de iniciar el ensamblaje con Hsp70, y no con Hsp90 ya que las tasas de disociación de Hsp90 están inalteradas por la unión de hormona.

En un contexto de evolución molecular, los receptores esteroideos parecen haberse adaptado a tomar a las chaperonas como subunidades regulatorias represivas. Varias características de las chaperonas las hacen tan adaptadas para este papel:

- (a) Hsp70 y Hsp90 son proteínas abundantes en todas las células, y su existencia esta datada con anterioridad a la aparición de los receptores esteroideos en células de vertebrados.
- (b) Las chaperonas tienen una afinidad natural por muchas proteínas, de este modo probablemente el receptor primitivo de esteroides obvio la necesidad de fabricarse un sitio de unión a chaperonas.
- (c) Las chaperonas se adaptaron a funcionar como complejos multiproteicos evitando relativamente la interferencia estérica.

De este modo, el receptor primitivo de hormonas esteroideas no requirió evolucionar, simultáneamente a las chaperonas, hacia un mecanismo de unión y liberación de estas parejas reguladoras desde que las chaperonas ya estaban adaptadas a interaccionar transitoriamente con los substratos. Para que el primitivo receptor de hormonas escapase de las repetidas rondas de unión y liberación con las chaperonas, su conformación tenía que cambiar, y basándose en

un comportamiento común de los otros receptores nucleares de ramas evolucionadas, la unión de hormona ya le proporcionaba este estímulo-salida.

#### **I.4.2 - EFECTOS NO GENÓMICOS / EXTRANUCLEARES / NO CLÁSICOS**

En 1942, Hans Selye en un estudio con hormonas esteroideas descubrió que estas inducían efectos anestésicos a los pocos minutos de su aplicación, mientras que las acciones hormonales conocidas en ese momento por hormonas corticoides, luteinizantes, foliculares y testiculares eran sólo visibles después de horas o días de su aplicación [Fue el primer artículo detallado sobre las acciones esteroideas rápidas, además de que la acción retrasada era un claro ejemplo de un cuidado trabajo científico e imparcial sobre ideas preconcebidas]. El artículo de Selye fue en realidad el primero en detallar las acciones no genómicas de las hormonas esteroideas, y su descubrimiento ha permitido el desarrollo de anestésicos esteroideos que se usaron durante años rutinariamente en medicina y que actualmente son usados con animales. Dos décadas después, estudios In Vitro sobre la modulación del Ion de Sodio ( $\text{Na}^+$ ) inducida por aldosterona en eritrocitos (célula roja sanguínea sin núcleo ni mitocondrias) contribuyó con mas evidencias a la descripción de las acciones no genómicas de las hormonas esteroideas (SPACH, and STREETEN, 1964). La transcripción requiere ADN, el cual esta localizado en el núcleo, de modo que la ausencia de núcleo excluye la posibilidad de transcripción y así de acciones genómicas. Muchos fenómenos inducidos por hormonas esteroideas ocurren rápidamente, por ejemplo la reacción acrosómica (rotura de la membrana acrosomal de la cabeza del espermatozoide y liberación de enzimas) inducida por progesterona toma lugar segundos después de que el esperma entre en contacto con la hormona (Osman, Andria, et al, 1989). Así la alta concentración (micromolar) de progesterona presente en la región que rodea a los oocitos, activa la reaccion acrosómica de los espermatozoides.

Los SRs median cambios en la expresión génica y en la biología celular por activación directa de rutas de señalización citoplasmáticas. En 1969, Smith & Ecker demostraron que los esteroides promueven la maduración de oocitos de rana independientemente de la transcripción (Smith, and Ecker, 1969). Cuando los núcleos fueron sacados de los oocitos de *Xenopus laevis* y *Rana pipiens*, la activación de las proteínas kinasa activadas por mitógenos (MAPK) y CDK1 seguía detectándose en respuesta a hormona.(Masui, 2001). Estos estudios proporcionaron pruebas inequívocas de que las señales activadas por esteroides que regulan la meiosis, eran iniciadas sin necesidad de la maquinaria genómica. Sorprendentemente, aunque mucho hemos aprendido sobre la señalización activada por progesterona desde este artículo de 1969, poco se ha avanzado respecto a las moléculas inmediatamente activadas por progesterona para la señalización.

## PROGESTERONA: ACCIONES NO GENÓMICAS

Consistente con su papel de hormona esteroidea de las gónadas, la mayoría de los efectos no genómicos de la progesterona han sido descritos en células germinales tales como oocitos o espermátidas. Cuando la hormona es añadida los Oocitos de *Xenopus laevis* previamente arrestados en la fase G2 inducen su maduración. Este fenómeno es insensible a Actinomicina D e incluso ocurre en células sin núcleo (Masui, and Markert, 1971), indicando que es el resultado de una acción no genómica. La respuesta inicial a progesterona implica la inhibición de la adenilato ciclasa, y consecuentemente la disminución de los niveles de AMPc (Finidori-Lepicard, Schorderet-Slatkine, et al, 1981). La progesterona es mas efectiva cuando se aplica en el exterior celular que cuando es microinyectada en el citoplasma, consistente con la localización de membrana del receptor respectivo. Ensayos recientes indican que existe una isoforma homóloga al receptor clásico de progesterona en *Xenopus*, el cual es conocido como XPR y esta presente en pequeñas cantidades en la membrana celular (Bagowski, Myers, and Ferrell, 2001). Más aún, XPR parece estar asociado con la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) y con la kinasa regulada por señales extracelulares (Erk)/proteína kinasa activada mitogénicamente (MAPK), ambas activadas al añadir progesterona. Sin embargo, otras hormonas como hidrocortisona, deoxycortisona y el antagonista del receptor de progesterona clásico RU486 (Mifepristona, previene la implantación del óvulo fertilizado en el útero) pueden sacar adelante la maduración de los oocitos sin activar este mecanismo concreto. Esto indica que hay otros mecanismos potenciales no clásicos, implicando receptores y mecanismos de señalización, e incluso receptores clásicos modificados.

Investigaciones recientes han demostrado que además de los mecanismos genómicos de las acciones de los receptores esteroideos, algunos receptores exhiben funciones no genómicas (Losel, and Wehling, 2003). En estos casos, los receptores esteroideos no funcionan como factores de transcripción en el núcleo. Los efectos no genómicos de los receptores esteroideos son caracterizados por el corto intervalo de tiempo necesario para producir una respuesta biológica seguida de la estimulación hormonal. Esto es debido al hecho de que, contrariamente a la ruta genómica, el tiempo extra para que ocurra la transcripción y traducción no es necesario. Como resultado, las funciones no genómicas de los receptores esteroideos son insensibles a inhibidores de transcripción como Actinomicina D, también a inhibidores de traducción como Cicloheximida (Smith, 1998). Diferentes ensayos han mostrado que las hormonas esteroideas, incluyendo estrógenos, andrógenos y progestina, pueden interactuar con sus receptores esteroideos en la membrana y activar cascadas intracelulares de señalización corriente abajo de los receptores para los factores de crecimiento (Ames, Tanaka, et

al, 1995). Se ha demostrado que los receptores nucleares esteroideos se unen a las regiones adaptadoras SH2/SH3 de los receptores tirosin kinasa, influyendo en su actividad. Se ha descrito también que el estradiol, la progestina y los andrógenos inducen la asociación directa de sus receptores con la tirosina kinasa citoplasmática Src y p85, y a la subunidad de la vía clásica de kinasas PI3K(Migliaccio, Castoria, et al, 2002). Esta interacción activa las cascadas de señalización Src/Ras/Erk y la PI3K/PKB (AKT), las cuales son importantes para las funciones celulares de proliferación y supervivencia. Juntos, estos resultados ilustran que estas funciones no genómicas de los receptores esteroideos, se basan en las rutas de señalización intracelular para ejercer las rápidas respuestas fisiológicas. De modo que las acciones no genómicas involucran la generación de los segundos mensajeros intracelulares, y varias cascadas de transducción de señales, tales como el flujo de iones (a menudo calcio), modulación de AMP cíclico y las rutas proteínas kinasas.

### **CRITERIO PARA DEFINIR LAS ACCIONES NO GENÓMICAS**

Una acción no genómica define cualquier acción que indirectamente influencia la expresión de genes, como hacen los receptores clásicos esteroideos, mediante efectos rápidos tales como la activación de cascadas de señalización. Hay varios criterios que indican una acción no genómica:

- (a) La ausencia de un “normal-funcional” núcleo en algunos tipos celulares, tales como eritrocitos, plaquetas y espermatozoides, excluyen la acción genómica.
- (b) Efectos que no son bloqueados por inhibidores de transcripción, tales como Actinomicina D, no pueden involucrar expresión génica. En una manera similar, efectos insensibles a Cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, proporcionando las pruebas para definir los mecanismos no genómicos.
- (c) Un corto intervalo de tiempo – en el rango de segundos a minutos –. Sin embargo, muchos efectos no genómicos podrían también ocurrir sobre una escala de tiempos mayor, al incluir las acciones genómicas.
- (d) La observación de los efectos producidos por análogos a las hormonas esteroideas que no acceden al interior celular, excluiría los mecanismos clásicos de translocación del receptor unido al ligando hacia el núcleo. Sin embargo, ciertos experimentos directos demuestran que esto es difícil de conseguir.

El término señalización iniciada en la membrana por esteroides (MISS) ha sido propuesto como una alternativa a las acciones no genómicas: sin embargo, es posible que haya efectos no genómicos que necesariamente no se originen en la membrana.

### **CROSSTALK DE SEÑALIZACIÓN**

El papel directo del PR en el desarrollo de cáncer de mama o su progresión permanece poco definido, en comparación a los estudios con AR en cáncer de próstata o ER en cáncer de mama. Sin embargo, tanto ER $\alpha$  como PR son necesarios para el normal desarrollo mamario. Los estrógenos inducen la elongación ductal, mientras los progestágenos actúan directamente en el glándula mamaria induciendo la extensión de los brazos laterales ductales e inducen alveologénesis (Hovey, Trott, and Vonderhaar, 2002). Estos efectos ocurren en asociación con las acciones de los factores de crecimiento. EGF promueve la proliferación de los brotes del extremo ductal durante el desarrollo mamario normal, aumenta el exterior crecimiento ductal y la extensión lateral inducida por los estrógenos mas la progesterona. De hecho, la expresión de PR no puede llevarse a cabo a menos que EGF este presente (Ankrapp, Bennett, and Haslam,

1998), sugiriendo la existencia de importantes crosstalk entre EGFR y ambos SRs. El PR unido a ligando es un potente mitógeno de mama. Sin embargo, las células epiteliales mamarias que expresan PR también expresan ER, y los estrógenos normalmente son necesarios para inducir la expresión de PR. Por esta razón, ha sido difícil separar los efectos de la progesterona del de los estrógenos, en si mismos potentes mitogenos mamarios.

Aunque el papel de los SRs citoplasmáticos en la fisiología de mamíferos no esta totalmente clara, la activación rápida mediada por SR podría servir para potenciar varias funciones nucleares activadas por los SRs . La amplificación de la función de los SRs nucleares podría ocurrir a través de las rápidas y directas fosforilaciones de los SRs y/o sus coreguladores en respuesta a la activación de rutas citoplasmáticas inducidas por la unión de SR a ligando. Tal bucle positivo retroalimentado explicaría la dramática influencia de las rutas de señalización en las funciones nucleares de PR y AR. Por ejemplo, varias funciones dependientes de progestina de PR son MAPK dependientes, incluyendo la regulación positiva de Ciclina D1, Ciclina E, la activación de CDK2 y la entrada en la fase S (Richer, Lange, et al, 1998).

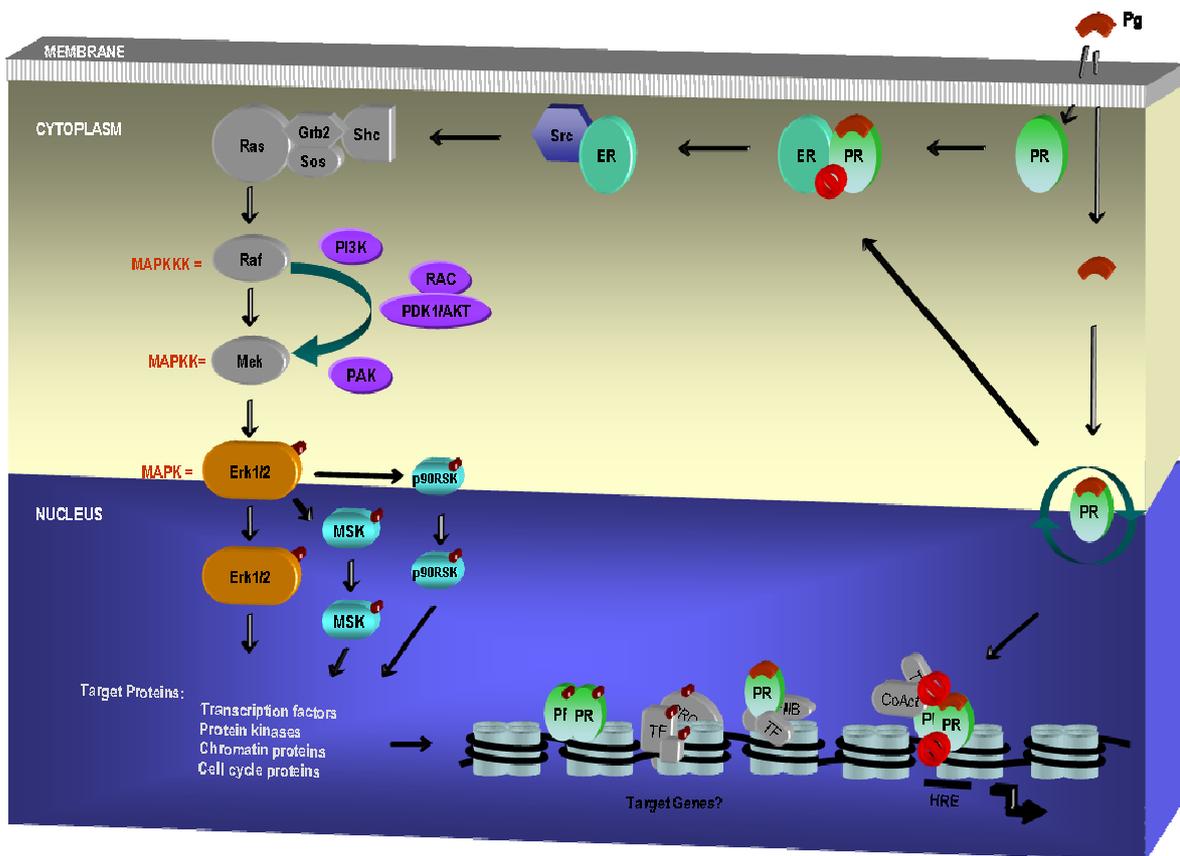
Seguida a la unión al ligando, la mayoría de los SRs estimulan un activación transitoria (3-10 minutos) de las MAPKs. Sin embargo, la señalización mitogénica requiere una activación sostenida (de horas a días) de MAPK en modelos de células de fibroblasto(Murphy, and Blenis, 2006). Recientemente, Lange encontró que (Lange no publicado), además de la activación rápida y transitoria de MAPK por progestina/PR<sub>B</sub> (5-15 minutos), el PR<sub>B</sub> unido a progestina induce subsecuentes oscilaciones de la actividad de MAPK que culminan en una fase de activación sostenida (horas a días), que es c-Src y EGFR dependiente. Estudios adicionales revelaron la creación de un bucle de señalización autocrino, en el cual PR<sub>B</sub> activa la regulación transcripcional positiva de Wnt-1, llevando a la activación del receptor-Frizzled dependiente de MMP9 y arrojando ligandos de EGF desde la superficie celular. Consistente con la transactivación dependiente de Wnt-1 por progestina, se produce la regulación positiva de Ciclina D1, la entrada en fase S y el crecimiento en agar de células de cáncer de mama T47D. Efectos bloqueados por un ShRNA contra Wnt-1 o por los inhibidores de MAPK, SRC o EGFR. Es mas, la progestina falla al estimular la entrada en fase S en células MCF7 que expresan establemente un mutante PR<sub>B</sub>-PXXP incapaz de unirse al dominio SH3 de c-Src y activar MAPK (Skildum, Faivre, and Lange, 2005). Estos resultados indican que las acciones integradas del PR<sub>B</sub> citoplasmático y el nuclear, actuando por la vía de interacción con c-Src y mediante eventos transcripcionales directos, junto a la señalización de EGFR inducen la proliferación de células de cáncer de mama. Otros importantes efectores corriente debajo de EGFR incluyen a los STATs. Las progestinas inducen la fosforilación de las tirosinas y la translocación de Stat5a y

Stat3(Richer, Lange, et al, 1998). Proietti demostró que la fosforilación de Stat3 y la activación de las acciones no genómicas del PR, son eventos críticos para el crecimiento de las células de cáncer de mama. En este sentido, se ha descrito como el crecimiento de las células T47D y de tumores de adenocarcinomas mamarios inducidos por progestina en ratones BALB/c depende de la activación de Jak1 y Jak2, c-Src y Stat3 (Proietti, Salatino, et al, 2005).

### **CROSSTALK CON OTROS RECEPTORES**

Las acciones extranucleares de los factores transcripcionales SRs clásicos se han vuelto una intensa área de investigación, particularmente en modelos de cáncer de mama y próstata. Miagliazzio fue el primero en escribir sobre la kinasa p60-Src y la activación de MAPK por estradiol en células MCF-7 y sobre la interacción entre PR<sub>B</sub>, ER $\alpha$ , y la kinasa p60-Src en células T47D(Migliaccio, Piccolo, et al, 1998). El tratamiento con hormonas esteroideas de células de cáncer de mama o próstata causa una rápida y transitoria activación de la señalización por MAPK que es dependiente de SR pero independiente de su actividad transcripcional (Boonyaratanakornkit, Scott, et al, 2001). Mientras los efectos genómicos del tratamiento hormonal están retrasados durante varios minutos a horas (ej: llevando transcripción y traducción), los efectos extranucleares o no genómicos, ocurren rápidamente en solo unos pocos minutos. Por ejemplo, tras el tratamiento con progestina, la activación máxima de la kinasa p60-Src ocurre a los 2-5 minutos, y corriente abajo la activación de p42/p44 MAPK a los 5-10 minutos. El PR humano contiene un motivo rico en prolinas (PXXP) que media la unión directa al dominio homólogo Src 3 (SH3) de moléculas de señalización de la familia kinasa Src-p60 en una manera dependiente de ligando. PR<sub>A</sub> y PR<sub>B</sub> purificados y activados por la unión al ligando activan la proteína kinasa relacionada con Src (Hck), In Vitro. Mutaciones de la secuencia PXXP del PR bloquean la habilidad de la progestina para unirse a Src y así activar tanto c-Src (o Hck) como p42/p44 MAPKs, indicando que ambas son probablemente activadas por mecanismos dependientes de c-Src involucrando la activación de Ras por la vía de fosforilación de las proteínas adaptadoras del substrato Src (p190 y Shc), seguido por Grb-2 y la unión a SOS. Mutaciones del dominio de unión a ADN (DBD) eliminarían la actividad transcripcional sin afectar a los efectos de activación de c-Src o MAPK.

Ballaré (Ballare, Uhrig, et al, 2003) recientemente presentó que la activación de MAPK por progestina esta bloqueada por antiprogestina y antiestrógenos en células Cos-7 transfectadas con PR y ER $\alpha$ . Propuso que la activación de c-Src/MAPK por PR esta mediada indirectamente por la interacción del dominio homólogo 2 a Src (SH2) de c-Src con la fosfotirosina 537 de ER $\alpha$ .



En este modelo, la activación de c-Src y la ruta MAPK por progesterina depende de la presencia de un ER $\alpha$  no unido a ligando, el cual interacciona constitutivamente con PR<sub>B</sub> a través de dos dominios que flanquean el dominio rico en prolinas. La delección de uno de estos dos dominios de interacción con ER $\alpha$  in el PR<sub>B</sub> bloqueaba la activación de c-Src/MAPK por progesterinas en presencia de ER $\alpha$ . Mutaciones del dominio PXXP de PR<sub>B</sub> no tenían efecto. Por otro lado, Boonyaratanakornkit encontró que la expresión de PR incrementa la actividad de c-Src en células Cos-7 en ausencia de progesterina e independientemente de añadir ER. La coexpresión de PR y ER $\alpha$  reducía los niveles basales de la actividad c-Src, revelando una clara estimulación de c-Src por progesterina. Además, la progesterina activó c-Src en células MCF12A desprovistas de PR e infectadas con un PR salvaje pero no infectadas con un PR mutante en PXXP. Ambos grupos coinciden en que ER $\alpha$  interacciona con el dominio SH2 de c-Src, pero ninguno muestra los efectos de los estrógenos en la habilidad de la progesterona para activar c-Src o MAPK.

Aunque las discrepancias entre los dos modelos deben ser resueltas, la sobreexpresión de los SRs en células Cos7 podría llevar a efectos dependientes de la concentración, resultando en la formación de diferentes complejos de señalización dependientes de la presencia de otras señalizaciones y moléculas adaptadoras. Apoyando esta idea, Wong(Wong, McNally, et al, 2002)

identifico una proteína adaptadora de interacción con ER, llamada MNAR (modulador de la actividad no genómica del receptores de estrógenos) que contenía tanto a los motivos LXXLL (de unión a receptores nucleares) como los PXXP (de unión a dominios SH3). MNAR es esencial para la interacción ER-Src, pero no es requerido para la activación dependiente de Src PR/progestinas (Edwards no publicado). En oocitos de *Xenopus* MNAR interacciona con AR y parece mediar la inhibición de la meiosis por la vía de señalización por  $G\beta\gamma$ . La MNAR de *Xenopus* también incrementa la transcripción de AR por la vía de activación de c-Src en células CV1 (Haas, White, et al, 2005).

### ¿CÓMO DEFINIR TODOS ESTOS EFECTOS? - TERMINOLOGÍA

La confusión persiste en las publicaciones con un vocabulario inconsistente. Intentemos clasificar los efectos: **“Genómicos”** se refiere a cualquier acción de una hormona que lleva a un cambio en la transcripción de genes, estando el receptor nuclear clásico de esa hormona esteroidea involucrado o no. **“No Genómicos”** es usado para cambios que ocurren con una presintetizada maquinaria celular, que ocurren independientemente de la transcripción de nuevos mensajeros. Este término no debería ser usado cuando nos referimos a cambios rápidos que claramente inician transcripción. **“Mediados Por Receptores Nucleares”** se referiría a cambios que requieren acciones directas o indirectas de los receptores esteroideos clásicos. **“Post-transcripcionales”** definen cambios que precisan de la traducción de nuevas proteínas o la activación ribosomal, sin que nuevos genes sean transcritos. **“Post-Traduccionales”** modificaciones de proteínas que incluyen cambios en el estado glicosilado, adición de lípidos y fosforilación. **“Rápidos”** se refiere a cualquier acción que tenga lugar en una escala temporal desde milisegundos a minutos. **“A Largo Plazo”** incluye efectos que ocurren durante muchas horas o incluso días después de administrar la hormona. **“Intermedios”** incluyen aquellos eventos que ocurren dentro de unas pocas horas y no necesariamente persisten por un día; comprenden la mayoría de las acciones involucradas en el crosstalk entre respuestas genómicas y no genómicas. **“Iniciados En La Membrana”** su uso se limita a cuando los efectos de la hormona claramente cambian la actividad de proteínas de membrana tal como ocurre con los receptores de superficie, canales iónicos, o complejos de señalización asociados a membrana. Este término también puede ser usado cuando nos referimos a cambios en los lípidos de membrana tales

Todos estos resultados juntos, indican que múltiples interacciones contribuyen a la activación directa de las proteínas kinasas por SRs y sugieren que al menos algunas funciones no genómicas de anfibios PR/AR han sido conservadas en mamíferos. De modo interesante, Zhu (Zhu, Bond, and Thomas, 2003) ha descrito un producto génico codificando un posible homólogo de mamífero para un receptor de progesterona en membrana (mPR). Este receptor a la par que proteína G unido a progesterona ha sido identificado en los oocitos de trucha con lunares. Los mPRs de pescado y mamífero parecen estar estructuralmente no relacionados con los clásicos PR<sub>A</sub> o PR<sub>B</sub>. Mas estudios son necesarios para determinar si mPR juega un papel en la señalización rápida inducida por progestina o si mPR interacciona con los clásicos PRs. Sin embargo, estudios con mPR subrayan el importante mensaje de que las proteínas de unión a hormonas esteroideas diferentes de los clásicos SRs podrían regular algunos eventos no genómicos de señalización mediados por hormonas esteroideas.

Durante muchos años, los mecanismos de acción de los receptores esteroideos parecían bastante simples. La hormona de alguna manera se desplazaba al núcleo celular, donde proteínas inactivas – los receptores – la esperaban. La señal hormonal entonces activaba los receptores, el cual se unía a secuencias específicas de ADN y regulaba la transcripción. Simple, los científicos se felicitaban a sí mismos por el hecho de que podrían estudiar directamente la transcripción y además evitar las desconcertantes cascadas de kinasas con las que otros colegas, estudiando los receptores de superficie, tenían que contentarse. Todo ello antes de los efectos transcripcionales, actualmente favoritos, de señalización activados por hormona.

Tras las prematuras felicitaciones, las cosas empezaron a desenredarse cuando quedó claro que los receptores esteroideos son sólo un grupo de una larga familia de receptores cuyos ligandos son también no esteroideos y en muchos casos desconocidos; los receptores que unían un ligando, podían ser expresados como estructuras variantes múltiples; los receptores que no se situaban en el núcleo esperando a ser activados, podían ser activos incluso sin ligando; los receptores se emparejaban en un desconcertante conjunto de heterodímeros y con sitios de unión a ADN; los receptores podían controlar la transcripción sin (herejía!) unirse al ADN; y, la mayoría de receptores – lejos de ser controladores directos de transcripción – interaccionan con un complejo conjunto de proteínas coreguladoras, las cuales funcionan como intermedios de señalización entre los receptores y la maquinaria general de transcripción.

### **I.5.1 - INTERACCIÓN CON FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y COREGULADORES**

La transcripción de genes por RNA polimerasa II necesita ensamblarse a la caja TATA con múltiples proteínas formando el complejo de iniciación. La unión del factor transcripcional II D (TFIID) - en sí mismo un complejo de la proteína de unión a TATA (TBP) - es el primer paso en este ensamblaje. TFIIIB, sirviendo como un puente funcional entre TBP y la polimerasa II, se recluta entonces con TFIID. Otros factores transcripcionales generales, designados TFIIA hasta TFIIJ, se unen al complejo de preiniciación (Tjian, and Maniatis, 1994). Sin embargo, mientras TBP es necesario, este no es suficiente para mediar transcripción dependiente de RNA polimerasa II en respuesta a los transactivadores (Sadowski, Henry, et al, 1993). Esta y otras observaciones llevaron a la hipótesis de que existen factores adicionales, llamados "coactivadores", también necesarios para una transcripción eficiente. A diferencia de TBP, el complejo TFIID solo puede

soportar la transcripción regulada por los activadores corriente arriba, concluyendo que la función del coactivador es proveída por los TAFs asociados con TFIID. De hecho, se han descrito interacciones entre los receptores nucleares y TAFs. Evidencias de factores adicionales se apoyan en las observaciones de que diferentes clases de receptores pueden interferir en las actividades transcripcionales de los otros, al necesitar factores de transcripción que son limitantes y que no son componentes de la maquinaria de transcripción basal (Kost, Smith, et al, 1989). Estos factores son también llamados coactivadores si el ligando puede replicar la transcripción mediante los receptores unidos a promotores, sin disminuir los niveles de transcripción basal, o inhibiendo la transcripción de otros promotores.

### **MEDIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN**

Los receptores esteroideos median la activación de la transcripción a través del reclutamiento de RNA pol II a promotores diana, y esto está mediado a través del ensamblaje secuencial del complejo de preiniciación de multisubunidades, el cual consiste en un número de factores de transcripción generales (TFIIs). Siendo un camino por el cual los receptores esteroideos pueden influenciar la expresión génica, a través de sus interacciones con componentes del complejo preiniciado de transcripción. De hecho, se ha demostrado que los receptores esteroideos interactúan indirectamente con diferentes componentes del complejo de preiniciación, así con la proteína de unión a TATA (TBP, una subunidad de TFIID), TFIIH, TFIIF y con los factores asociados a TBP (TAFs). Tales interacciones indirectas podrían serlo a través de puentes moleculares compuestos e moléculas de coactivadoras.

Si las interacciones entre los receptores y los factores de transcripción basal son necesarias pero no suficientes para un control transcripcional eficiente y preciso dependiente de hormona, entonces al menos debe estar involucrada también una tercera categoría de factores. Un complejo oligomérico - que incluye a activadores de proteínas (pe: de los receptores), coactivadores, y factores basales - es necesario para estabilizar los interactuantes y proporcionar especificidad transcripcional (Goodrich, Hoey, et al, 1993).

### **COACTIVADORES**

Experimentos iniciales en levaduras mostraron la imagen de los coactivadores como "adaptadores transcripcionales" (Ptashne, and Gann, 1990). Estos adaptadores proporcionaban un puente entre los factores de transcripción unidos a ADN y la maquinaria general de transcripción. Aunque realmente este simple escenario de acción de coactivadores es mucho más complejo. Se ha escrito que los coactivadores tienen muchas actividades además de la de iniciar la transcripción, tales como el transporte de ARNm desde el núcleo, la traducción de ARNm, y modificaciones postraduccionales de las proteínas sintetizadas. Estos coactivadores poseen acciones estratificadas en el completo proceso de transcripción/traducción, reflejando el hecho que estos no actúan solos sino como parte de complejos multiproteicos. Estas entidades poseen muchas actividades enzimáticas, representando una máquina compleja que es capaz de concentrar y coordinar diversas enzimas en el proceso que regulan, en un mismo lugar.

Sorprendentemente, los primeros coactivadores descritos para un receptor nuclear fueron los componentes de la holoenzima polimerasa II, aunque atendían a otra función (Yamamoto, Hirosawa, et al, 1992). En levaduras, la familia de proteínas SWI/SNF es requerida para la transcripción de genes regulados diferencialmente, en parte porque SWI/SNF revierte los efectos represores de los componentes de la cromatina (Singh, Coe, and Hong, 1995). Yoshinaga presento que la activación transcripcional a través de receptores de glucocorticoides o ER en levaduras es dependiente de la función de SWI1-3. Los homólogos humanos de estas proteínas denominados hSNF2 $\alpha$ -2 $\beta$  (Hartig, and Cato, 1994) o Hbrm potencian la transcripción a través de ER, RAR y GR, en ensayos de transfección, y requieren un dominio receptor DBD intacto. Tras la identificación del primer coactivador de NR - el coactivador del receptor de esteroides SRC-1 (Onate, Tsai, et al, 1995) - , se pronostico que esta sería una pequeña familia de coactivadores (quizás cinco a diez) para llevara a cabo el papel de puenteo entre los factores de transcripción y la maquinaria traduccional. Lejos de la predicción, actualmente están descritos aproximadamente 200 coactivadores de NR que trabajan con unos 48 NRs.

### **REGIÓN AF2:**

En definitiva, en la transcripción de la regulación a través de la interacción directa con la maquinaria basal, los receptores de hormonas esteroideas median la activación de la transcripción mediante el reclutamiento de los coreguladores (coactivadores y corepresores), los cuales poseen actividad de remodelamiento de cromatina o facilitan la interacción entre los receptores esteroideos y la maquinaria de transcripción. Los coactivadores normalmente interaccionan con la región AF2 del extremo-C de los NRs. La interacción entre los coactivadores y los receptores esteroideos unidos a ligando ocurre a través de la caja NR o de los motivos LXXLL (L es leucina y X es cualquier aminoácido). La caja NR permite al coactivador interaccionar con la región AF2 del extremo-C in el LBD de un receptor unido a ligando. De este modo, se han descrito varios factores que interaccionan con los receptores nucleares en una manera dependiente de ligando, alguno de los cuales podría ser miembro de una larga familia de proteínas relacionadas:

#### **1.- Histonas Acetiltransferasa**

Los coactivadores de NR CBP (proteínas de unión a CREB), los factores relacionados a CBP p300 y p/CAF (factor asociado a p300/CBP) son ejemplos de coactivadores unidos a NR con una actividad intrínseca acetiltransferasa de histonas (Lee, Lee, et al, 2001). La actividad acetiltransferasa permite a los coactivadores acetilar residuos de lisina en el extremo-N de histonas presentes en el ADN. La acetilación neutraliza las cargas positivas de los extremos de

las histonas, disminuyendo su afinidad por el ADN negativamente cargado y dejando menos compacta a la cromatina. Como una consecuencia, la estructura de la cromatina queda abierta y los factores de transcripción pueden acceder a las regiones promotoras de genes diana.

## **2.- La Familia SRC De Coactivadores De Receptores Nucleares**

El coactivador del receptores esteroideos p160 (SRC) de la familia de coactivadores incluye SRC-1 (también llamado NCoA1), SRC-2 (también llamado TIF-2, GRIP-1, NCoA-2), y SRC-3 (también llamado AIB1, RAC3, ACTR, pCIP y TRAM-1), y no tienen actividad remodeladora de cromatina (Leo, and Chen, 2000). Su principal función es la de reclutar la maquinaria transcripcional basal y otros coactivadores, tales como p300/CBP, que si poseen actividad histona acetiltransferasa y metiltransferasa. Las proteínas histona acetiltransferasa no sólo apuntan al extremo-N de las histonas para acetilarlas, también a ciertos factores de transcripción basales y algunos coactivadores son también objetivos. Por ejemplo, la respuesta transcripcional puede también ser atenuada a través de la acetilación de las proteínas SRC p160 por p300/CBP. También se reclutan a los NRs por la vía de los complejos SRC, metiltransferasas, incluyendo la metiltransferasa de arginina asociada al coactivadores I (CARM-1) y la metiltransferasa de proteínas argininas I (PRMT-1), las cuales tienen actividad remodeladora de cromatina. Se cree que las metiltransferasas son capaces de cambiar la actividad de la maquinaria transcripcional basal.

Aunque todos estos coactivadores están implicados en la activación de genes mediada por PR, no todos son funcionalmente equivalentes In Vivo ni son expresados de la misma manera en todas las células. Por ejemplo SRC3 tienen un patrón de expresión más restrictivo que SRC1 o SRC2 (Suen, Berrodin, et al, 1998). Un artículo reciente de X. Li demostró que el PR preferencialmente reclutaba a SRC1, SRC3 y CBP, pero no a SRC2 o pCAF, llevando a la modificación específica de histonas del promotor modelo MMTV y sugiriendo el reclutamiento de coactivadores por los receptores nucleares como un mecanismo para mediar la señalización hormonal específica (Li, Wong, et al, 2003). SRC-1 fue aislada en un escaneo por doble híbrido en levaduras contra una librería de cADN humano usando HBD del hPR como cebo (Onate, Tsai, et al, 1995). In Vitro, SRC1 interacciona cuando los agonistas ocupan el hPR pero no con los antagonistas. In Vivo, SRC-1 aumenta la transcripción mediada por hPR en presencia de R5020 pero no del antagonista RU486, y no altera la actividad basal transcripcional.

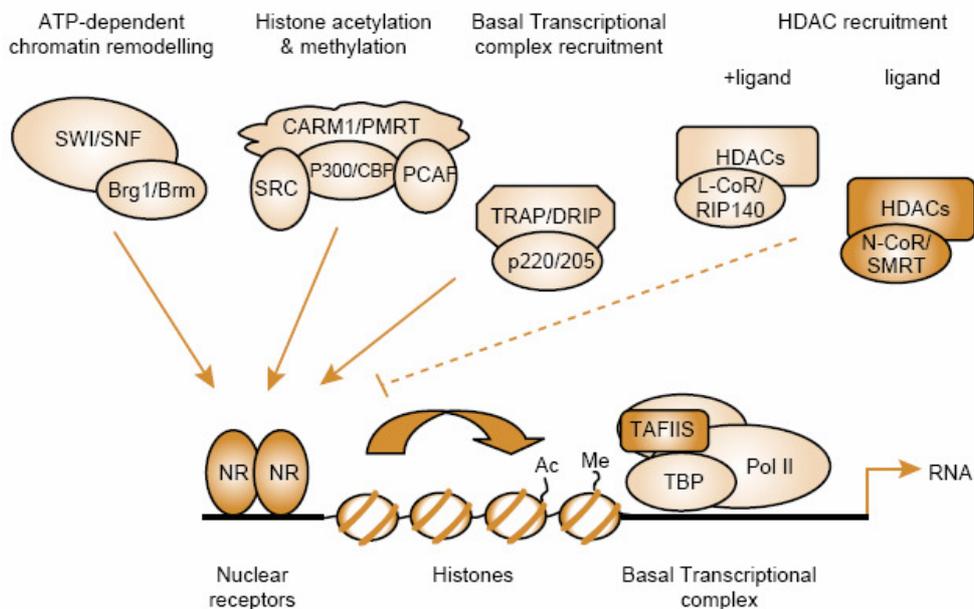
## **3.- La Familia DRIP/TRAP De Coactivadores De Receptores Nucleares**

Las complejos de proteínas de interacción con receptores para la vitamina D (DRIP) y de las proteínas asociadas a receptores tiroideos (TRAP) carecen de la actividad enzimática

remodeladora de cromatina, aunque aumentan la transcripción dependiente del receptor a través de mecanismos que difieren de los usados por la familia de coactivadores SRC. El complejo DRIP/TRAP aumenta la transcripción dependiente del receptor por reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción al receptor unido a ligando, por la vía de la subunidad DRIP205 (también llamada TRAP220 y proteína de unión a PPAR)

#### 4.- Otros Complejos Coactivadores

Otros complejos coactivadores de NR que tienen un papel en el remodelamiento de cromatina incluyen al complejo SWI/SNF de remodelamiento de la cromatina dependiente de ATP, el cual contiene las subunidades Brg-I(gen relacionado a brama I)/Brm y el complejo activador de señal Cointegrador-2 conteniendo proteínas del grupo trithorax, las cuales pueden metilar histonas(Belandia, Orford, et al, 2002). También al hRPF-1 que es el homologo humano de RSP5 de levadura, una proteína relacionada con la familia de proteínas ubiquitin-lipasas (Imhof, and McDonnell, 1996). En células de mamífero la expresión de hRPF1 aumenta la eficiencia transcripcional dependiente de hormona de PR, sin alterar la transcripción basal. In vivo, solo la isoforma B, y no la A, de PR es activada por coexpresión de hRPF1. Los receptores B contienen un dominio de activación 3 (AF3) que no los A, mientras que sus AF1 y AF2 son idénticos, de ahí que quizás hRPF1 ejerce su efecto a través de este dominio.



#### REGIÓN DBD:

Un grupo diferente de coactivadores esta especializado en la interacción con el dominio **DBD** del receptor. EL DBD del PR es necesario para la unión específica con los elementos de respuesta a progesterona (PREs) del ADN, pero mucho menos conocida es su función de unión a cofactores nucleares. Estos incluyen pequeñas proteínas nucleares de dedos en anillo

(SNURF), GT198, coactivadores tejido específico, y el grupo de proteínas de alta movilidad (HMG). SNURF es una proteína nuclear expresada ubicuamente, capaz de activar la transcripción dependiente de los receptores esteroideos (Moilanen, Poukka, et al, 1998). Esta forma de unión en la transcripción regulada por la hormona esteroidea (Poukka, Aarnisalo, et al, 2000), demuestra un mecanismo por el cual los coactivadores interaccionando con el DBD sinergizan en transactivación por permitir la cooperación entre los receptores nucleares y otros factores de transcripción. HMG-1 y HMG-2 son miembros de una familia de proteínas de cromatina no histónicas producidas por dos genes separados (Melvin, Roemer, et al, 2002). Las proteínas HMG no reconocen secuencias específicas de ADN sino que se unen en a la ranura menor del ADN, reconociendo curvas en el ADN. Parece que PR usa HMG1-2 para interaccionar con alta afinidad con el ADN, al menos In Vitro, y para la inducir la actividad transcripcional In Vivo.

### **REGIÓN AF1:**

Comparada con los coreguladores interaccionando con AF2 y DBD, los cofactores de interacción con **AF1** están menos caracterizados. Las AF1 son las regiones menos conservadas entre las diferentes especies de PRs y están probablemente asociadas con una habilidad diferente de PR<sub>A</sub> y PR<sub>B</sub> para reclutar proteínas coreguladoras específicas (Giangrande, Kimbrel, et al, 2000). Un estudio reciente ha identificado varios dominios del extremo-N interaccionando con factores, incluyendo a la proteína de dimerización de Jun 2 (JDP-2), al coactivador de receptores nucleares 62 (NCoA62, también conocida como proteína de interacción con Ski), y a APE2, una proteína reparadora del corte de nucleótidos (Edwards, Wardell, and Boonyaratanakornkit, 2002). JDP2 inicialmente definida como un represor de Jun y otros factores de transcripción bZIP, funciona como un coactivador AF1 del PR. Se ha mostrado que la JDP2 endógena y el PR son reclutados, en una manera dependiente de hormona, al promotor en el contexto de cromatina In Vivo. Los cofactores de AF1 podrían potenciar la función de PR al reclutar o estabilizar otros coactivadores in una ruta alternativa independiente de AF2 y de los coactivadores SRC (Edwards, Wardell, and Boonyaratanakornkit, 2002). Además de en la región AF2, los coactivadores para AF1 también interaccionan con el dominio A/B del NR (Berrevoets, Doesburg, et al, 1998). Tales interacciones se han encontrado al estimular la actividad transcripcional de AF1 y crean un sinergismo entre las dos funciones de activación AF1 y AF2.

### **REGIÓN PARA SPLICING DE ARN:**

Descripciones recientes sobre los coactivadores de PR han revelado otro mecanismo por el cual el PR regula la expresión génica, que es influyendo en el splicing de ARN. Aunque la transcripción y el procesamiento del RNAm son eventos unidos In Vivo, el mecanismo que

coordina estos procesos permanece esquivo. Estudios de Auboeuf han demostrado que los promotores dependientes de progesterona en splicing alternativo dependen del reclutamiento mediado por PR de coreguladores, que están involucrados tanto en la estimulación de la transcripción como en la regulación del splicing alternativo del RNAm. Uno de estos coreguladores involucrados, es el coactivador activador (CoAA), el cual contiene dos motivos de reconocimiento de ARN altamente conservados (RRM) comúnmente encontrados en ribonucleoproteínas. Es más, CoAA potencialmente coactiva la transcripción mediada por múltiples elementos de respuesta a hormona y actúa sinérgicamente con TRBP y CBP (Iwasaki, Chin, and Ko, 2001). Se han mostrado otros coactivadores de receptores nucleares que regulan el splicing de ARN (Monsalve, Wu, et al, 2000). Además, PR podría influenciar el splicing al promover la expresión de factores de splicing. Por ejemplo, Kester (Kester, van der Leede, et al, 1997) identificó un nuevo gen diana para progesterona, homólogo a los miembros de la familia proteica de los SRs (ricos ser/arg) de factores de splicing. Por lo tanto, los receptores hormonales esteroideos activados coordinadamente, controlan la actividad de transcripción de genes y el procesamiento del ARN, y el PR parece jugar un papel primordial en este aspecto.

En resumen, diversos estudios han indicado varios aspectos de los coactivadores que parecen involucrar múltiples mecanismos cooperativos. Las propiedades estructurales de los coactivadores permiten múltiples interacciones entre el receptor y el complejo coactivador (Tsai, and O'Malley, 1994). Además, los dominios de interacción con varias actividades enzimáticas dentro de los coactivadores determinan el reclutamiento de distintas acetiltransferasas (CBP/p300, PCAF), metiltransferasas (CARM1, PRMT1) (Tochio, Tsui, et al, 2001), kinasas (Rsk2, Msk1) (Chen, Tini, and Evans, 2001), ubiquitin ligasas (E6-AP, p300) (Grossman, Deato, et al, 2003), complejos remodeladores de la cromatina (SWI/SNF), y factores de splicing de ARN, facilitando la formación de un complejo de preiniciación que contribuye también a los eventos corriente abajo en la transcripción. Es más, el reclutamiento preferente de cofactores específicos a promotores particulares y en un entorno celular específico crea varios distintos patrones de expresión de genes.

### **COREPRESORES**

Además de la activación génica, los receptores esteroideos pueden reprimir ciertos genes diana con su unión a los HREs en una manera dependiente de ligando. La represión puede ocurrir a través de HREs negativos, los receptores se unen a estos y median una regulación negativa. Pudiendo ejemplificarse con la acción del receptor de tiroides unido a la hormona tiroidea en la represión transcripcional del gen regulador de ciclo celular E2F-1 (Bigler, and Eisenman, 1995). Los HREs negativos están normalmente cerca de los sitios de iniciación de la transcripción y algunos están presentes corriente abajo de la caja TATA; algunos incluso

tiene localizaciones inusuales, como la región 3' no traducida (Belandia, Latasa, et al, 1998). Se cree que las propiedades de los HREs negativos dependen de su localización; Estos median una respuesta negativa solo cuando están posicionados cerca o corriente abajo del sitio de iniciación. Esto sugiere que los HREs negativos y sus receptores unidos podrían regular los genes diana por controlar la tasa de liberación de RNAPol II del promotor.

Por otro lado, la mayoría de los mecanismos generales de represión ocurren por reclutamiento de complejos corepresores a receptores unidos a antagonistas en promotores de genes diana a través de HRE. Así la represión directa transcripcional es a menudo mediada por el reclutamiento de complejos corepresores, los cuales están asociados con receptores unidos a antagonistas o sin ligando.

La búsqueda de coactivadores es una salida lógica del hecho que todos los ligandos naturales conocidos de receptores nucleares son agonistas que activan la transcripción. Sin embargo, hay dos condiciones bajo las cuales la presencia o ausencia de ligando inhibe la transcripción. Una ocurre cuando antagonistas sintéticos de hormonas esteroideas compiten por el éxito con los agonistas naturales por unirse a receptores e inhibir la transcripción inducida por el agonista. La otra es una propiedad clave de algunos miembros de la subfamilia de receptores nucleares no esteroideos, los cuales se unen al ADN en ausencia de ligando y activamente reprimen la transcripción basal (Sap, Munoz, et al, 1989). Bajo condiciones similares, los receptores esteroideos no unidos a ligando no pueden unirse al ADN, porque ellos son secuestrados por un complejo cubierto de proteínas de choque térmico. Las proteínas se unen al ADN para reprimir la transcripción por tres mecanismos:

- (a) el represor se une al mismo sitio o por solapamiento en el ADN con el activador y competitivamente bloquea el acceso del activador al ADN
- (b) ambas proteínas se unen al ADN a sitios no solapados, pero el represor interfiere con la actividad del activador
- (c) el represor se une al ADN y silencia la maquinaria basal de transcripción directamente.

Obviamente los receptores nucleares han estado implicados en todos estos procesos.

De este modo, por analogía con los coactivadores, definimos los corepresores como factores limitantes que inhiben la transcripción después de ser unidos al promotor por los receptores unidos a ADN y factores cuyos efectos inhibitorios pueden ser liberados por squelching. Un ejemplo de un corepresor, es el represor Ssn6 de levadura. Esta proteína afecta a la represión génica dependiente de glucosa cuando está unido al promotor. De interés es el hecho que Ssn6, haya sido identificado junto a su pareja Tup1, como un represor transcripcional

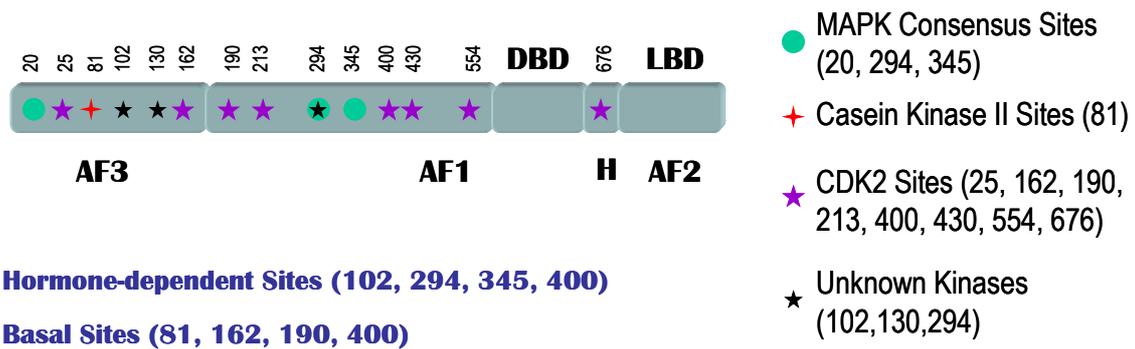
de PR. La eliminación de Ssn6 aumenta los efectos transcripcionales de un fragmento PR AF1, aumentando los efectos de progesterona, y permitiendo que el antiprogestágeno RU486 se vuelva un potente agonista. Cuando el RU486 ocupa el PR, este puede atraer corepresores al complejo antagonista del receptor esteroideo. Entonces el complejo podría no simplemente bloquear la activación pasivamente, por competir con la unión a HREs., sino que activamente reprime la transcripción por reclutar corepresores al complejo transcripcional

### **I.5.2 - EFECTOS POSTRANSCRIPCIONALES: FOSFORILACIÓN**

Actualmente existen evidencias sobre que los factores de crecimiento puedan mimetizar los efectos de los esteroides en sus receptores. La actividad de los SRs es también regulada por fosforilación, y la mayoría de los sitios de fosforilación están situados dentro de las regiones A/B, E y F. La fosforilación de NRs es mediada por las proteínas quinasas activadas por mitógenos MAPK, las activadas por estrés p38 MAPK, la proteína quinasa A y C (PKA y PKC), también con la subunidad CDK7 del factor transcripcional basal TFIIH y el complejo de quinasas de ciclinas A 2 (CDK-2). Las consecuencias funcionales de la fosforilación de NR varían. Mientras la fosforilación por MAPK parece incrementar la actividad transcripcional de ER, la fosforilación por MAPK reprime la habilidad para transactivar del PPAR- $\gamma$ . Estas rutas de señalización intracelular pueden por lo tanto, integrar sus señales con receptores esteroideos y substituir o aumentar los efectos de los ligandos hormonales.

Los eventos de fosforilación y desfosforilación que ocurren en los miembros de la familia de SR proporcionan un nivel añadido de complejidad a la acción del PR. Las isoformas del PR están altamente fosforiladas por múltiples quinasas; la fosforilación ocurre en los residuos de Serina dentro del extremo-N, y en menor medida, en residuos de Serina a lo largo del receptor. El PR contiene un total de 14 sitios conocidos de fosforilación. Las Serinas en las posiciones 81, 162, 190 y 400 se definieron originalmente como sitios basales porque parecían estar constitutivamente fosforiladas en ausencia de hormona. Las Serinas 102, 294 y 345 son sitios fosforilados tras 1-2 horas de tratamiento hormonal (Zhang, Beck, et al, 1995). Interesante es el hecho de que la fosforilación de PR inducida por hormona incluye a las actividades quinasas dependiente e independientes de ADN. Ya se han identificado algunas de las quinasas responsables de la fosforilación, mientras otras permanecen esquivas. Por ejemplo, las Serinas 81 y 294 son fosforiladas por la caseína quinasa II (Zhang, Beck, et al, 1994) y MAPK (Lange, Shen, and Horwitz, 2000) respectivamente. Las progestinas pueden también estimular la fosforilación de Ser294 independientemente de MAPK por la activación de una quinasa desconocida. Ocho de los 14 sitios (Thr430, Ser25, 162, 190, 213, 400, 554 y 676) son conocidos por ser fosforiladas por la proteína quinasa dependiente de ciclina A 2 (CDK2), In

Vitro(Knotts, Orkiszewski, et al, 2001). Cinco de estos sitios han sido confirmados In Vivo como auténticos sitios de fosforilación (Ser162, 190, 213, 400, 676)



Aunque el papel de la fosforilación de PR no esta completamente claro, la fosforilación influye en aspectos de la regulación transcripcional tales como la interacción con los coreguladores (Narayanan, Adigun, et al, 2005), la regulación de la localización nuclear del PR dependiente de ligando (Shen, Horwitz, and Lange, 2001), las actividades transcripcionales (Takimoto, Hovland, et al, 1996), el recambio del receptor (Lange, Shen, and Horwitz, 2000), y todos ellos necesitan de la fosforilación. Por ejemplo, la fosforilación de Ser294 dependiente de MAPK es necesaria para la traslocación nuclear de PR libre y la exportación de PR unido a ligando, sugiriendo que la señalización de MAPK regula la acción de PR al alterar el movimiento núcleo-citoplasma (Qiu, Olsen, et al, 2003). El significado funcional del secuestro del PR nuclear en respuesta a la activación de MAPK es desconocido. La localización nuclear podría servir para concentrar el receptor inactivo o activo, ya que los PRs son degradados en el citoplasma tras la salida del núcleo. Tras a un breve pretratamiento (5-15 minutos) con EGF, el receptor PR<sub>B</sub> fosforilado se vuelve ultrasensible a niveles subfisiológicos de progestina. Pero cuando EGF y progestina son añadidos a las células simultáneamente, la magnitud de la sensibilidad de PR es mucho mas reducida con relación al pretratamiento con EGF, sugiriendo la importancia del orden temporal de eventos de fosforilación en la regulación de la sensibilidad a hormona. Además, el PR fosforilado sin ligando parece regular genes mediante mecanismos no clásicos. Por ejemplo, la regulación por PR<sub>B</sub> de la expresión de IRS-2 ocurre independientemente de ligando pero requiere la fosforilación de Ser 294 de PR en células de cáncer de mama (Qiu, and Lange, 2003).

De hecho, los SRs actúan como sensores para las rutas de transducción de señales. El PR fosforilado es hipersensible a niveles subfisiológicos de progestina con relación a un PR homólogo no fosforilado. EGF y progestina sinergizan expresando el RNAm o los niveles proteicos para un número de genes reguladores de crecimiento, incluyendo a Ciclina D1 y Ciclina E (Hovland, Powell, et al, 1998); la regulación de las ciclinas por progestina es MAPK

dependiente. Las ciclinas regulan la progresión de células a través del ciclo celular por su interacción con proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Las progestinas activan a CDK2 (Groshong, Owen, et al, 1997), y el PR está predominantemente fosforilados por CDK2 en sitios de prolina (S/TP) (Knotts, Orkiszewski, et al, 2001), tal vez permitiendo la regulación coordinada de la actividad transcripcional de PR durante la progresión del ciclo celular. Apoyando esta idea, Narayanan (Narayanan, Adigun, et al, 2005) encontró que la actividad de PR es mayor durante la fase S y mas baja en G0/G1 del ciclo celular, concomitantemente a la fosforilación disminuida de PR. La sobreexpresión de Ciclina A o CDK2 es aumentada por la actividad transcripcional de PR; mientras ciclina A interacciona con el extremo-N de PR, CDK2 parece alterar la función de PR indirectamente por incrementar su fosforilación y el reclutamiento de SRC-1 al PR activado.

### **FUNCIONES DE LA FOSFORILACIÓN DE SER294**

La Ser294 del PR es un sitio de fosforilación inducible por ligando; este se vuelve rápidamente fosforilado tras la exposición hormonal (Zhang, Beck, et al, 1995). La Ser294 es también un sitio consenso para MAPK (PXXSP) o directo de prolinas. En contraste a la fosforilación de Ser294 inducida por progestinas, la cual ocurre a los 30-60 minutos independientemente de la activación de MAPK, la fosforilación de Ser294 inducida por factores de crecimiento ocurre a los 3-5 minutos y es MAPK dependiente (Qiu, Olsen, et al, 2003). Diversos estudios sugieren que la Ser294 del PR es un sitio significativo para la regulación de PR por múltiples quinasas (Qiu, and Lange, 2003). La fosforilación de Ser294 parece mediar el incremento del movimiento núcleo-citoplasma del PR (Qiu, Olsen, et al, 2003), y es necesaria para sostener el sinergismo transcripcional en presencia de progestina y factores de crecimiento (Shen, Horwitz, and Lange, 2001).

La fosforilación de ser 294 podría también mediar algunos aspectos de la acción de PR independientemente de ligando. Los factores de crecimiento tales como EGF son fuertes activadores de p42/p44 MAPK e inducen la fosforilación rápida de PR en Ser294 y la consecuente acumulación nuclear. Mutaciones en el sitio consenso MAPK (S294A) eliminan la translocación mediada por EGF; sin embargo, la habilidad de la progestina (R5020) de inducir localización nuclear de PR-S294A quedo inalterada. La acumulación de PR en el núcleo, inducida por EGF, sugiere un mecanismo de activación de la transcripción independiente de ligando. Labriola (Labriola, Salatino, et al, 2003) propuso que la heregulina, un miembro de la familia del EGF, puede estimular la localización nuclear, la unión al ADN, y la actividad transcripcional de PR en células de cáncer de mama (T47D) en ausencia de hormona. Esto fue acompañado por la activación de MAPK y la fosforilación de Ser294. Qiu (Qiu, Olsen, et al, 2003)

propuso cambios similares a los de la fosforilación de Ser294 sin que los factores de crecimiento estimularan la actividad transcripcional del PR o alteraran la regulación negativa en células variantes (T47D) (Shen, Horwitz, and Lange, 2001). Aunque estas pruebas necesitaban de la unión al ligando, la activación de MAPK estaba claramente aumentada. Las razones de estas diferencias son desconocidas, pero podrían involucrar a diferentes expresiones de los miembros de la familia de EGFR expresados en la superficie celular en los clones de las líneas celulares (T47D), llevando a diferencias en la activación de las kinasas intracelulares corriente abajo tales como CDK2. En cualquier caso, estos datos sugieren una continuidad entre la hipersensibilidad de PR a las extremadamente bajas concentraciones de ligando y la independencia completa a ligando, un fenómeno bien documentado para AR. La regulación de PR por rutas de señalización alternativas, incluyendo la elevada actividad MAPK a menudo exhibida por los tumores de mama, podría contribuir a la desregulación génica y a cambios en el crecimiento celular y/o supervivencia.

### **FUNCIONES DE LA FOSFORILACIÓN DE SER400**

A diferencia de Ser 294, la Ser400 esta basalmente fosforilada y regulada por ligando In Vivo mediada por CDK2. Como los mitógenos, la progestina regula la actividad de CDK2 (Musgrove, Swarbrick, et al, 1998). Además, como la progestina, los mitogenos también inducen una fosforilación rápida y fuerte de Ser400 (Pierson-Mullany, and Lange, 2004), sugiriendo un mecanismo de regulación de PR, dependiente del ciclo celular. En presencia de la CDK2 activada, la fosfoSer400 permanece nuclear, sugiriendo que la fosforilación de Ser400 secuestra PR sin ligando. La sobreexpresión de CDK2 incrementa la actividad transcripcional de PR en ausencia y presencia de progestina. Mutando Ser400 en Alanita (S400A) selectivamente se bloquea la actividad transcripcional de PR independiente de ligando, con un débil efecto en la transcripción inducida en respuesta a la unión a ligando (Pierson-Mullany, and Lange, 2004). Este resultado sugiere que CDK2 regula positivamente PR sin ligando (la actividad transcripcional basal) por actuar en Ser400 mientras aún ejerce positivos efectos en presencia de ligando, tal vez en cooperación con otros sitios CDK2 del PR (Edwards, Weigel, et al, 1993) o sus coactivadores (Narayanan, Adigun, et al, 2005). Además, Ser400 esta situada junto a 9 aminoácidos reconocidos como un motivo de destrucción, que podrían alterar el recambio de PR, sugiriendo un importante significado por el cual el PR es regulado en respuesta a fosforilación (Shen, Horwitz, and Lange, 2001). Consistente con esta idea, el CDK2 activado induce una rápida regulación negativa de PR en presencia o ausencia de progestina, mientras los inhibidores de CDK2 bloquean la regulación negativa de PR inducida por ligando. Los mecanismos que unen la estabilidad/recambio con la actividad transcripcional necesitan mas estudios. Sin embargo, se ha propuesto un modelo en el cual ciertos SRs son regulados por

proteínas kinasas que primero modulan la localización del receptor, llevando a cambios en la actividad transcripcional y/o en el recambio proteico (Rowan, Garrison, et al, 2000).

### **I.5.3 - DEGRADACIÓN POR UBIQUITINACIÓN**

La regulación de la expresión de PR por ligandos ocurre tanto a nivel de RNAm como proteína. A nivel de RNAm, los efectos de la progestina en al menos 6 de los mensajeros del PR ha sido definidos en células hBCC (T47D) (Sheridan, Krett, et al, 1988). Los niveles de ARNm disminuyen gradualmente entre 4-20 horas después del tratamiento con progestina y entonces regresan los niveles de antes tras 24-48 horas. Además, a las fluctuaciones en ARNm, los niveles de proteínas son también rápidamente regulados negativamente en respuesta a unión de ligando. El PR endógeno, marcado mediante la incorporación de los aminoácidos densos H<sup>2</sup>, C<sup>13</sup> y N<sup>15</sup>, es recambiado con una vida media de 21 horas en las células control, y de 6 horas en células tratadas con progestina. La tasa y la extensión de la proteína decrece como reflejaría la curva temporal de ocupación por ligando y la saturación fraccional del receptor. La antiprogestina también induce la regulación negativa del PR pero con unas menores cinéticas que los agonistas, sugiriendo una relación entre la actividad transcripcional del PR inducido por ligando y la regulación negativa del receptor.

Una razón sería que las células gastan la energía para limpiar los receptores activos, para atenuar su respuesta transcripcional propia. Alternativamente, el recambio del receptor nuclear podría proveer un mecanismo de “reseteo” del aparato transcripcional después de cada estímulo, así que receptores previamente modificados puedan ser reemplazados por los nuevos sintetizados para ser moléculas completamente funcionales. De este modo, la regulación negativa del receptor podría permitir una reactivación continua de la transcripción de los genes regulados por PR, en los tejidos en los cuales el PR esta constantemente expuesto a cambios de los niveles fisiológicos de la progesterona.

La destrucción temporalmente marcada de las proteínas reguladoras por la ruta del proteosoma-ubiquitinas esta emergiendo como un mecanismo importante para el estricto control de los diversos procesos celulares (Mimnaugh, Chavany, and Neckers, 1996), en transcripción de genes (Treier, Staszewski, and Bohmann, 1994), en angiogenesis y en progresión del ciclo celular (Stearns, Evans, and Kirschner, 1991). Las aberraciones en esta ruta o de sus substratos proteicos están implicadas en enfermedades como Alzheimer (Huang, Atwood, et al, 1997) o cáncer. De este modo, los inhibidores de ubiquitinación son candidatos a las pruebas clínicas para tratar cáncer.

El PR es un objetivo para la regulación negativa por fosforilación. Un inhibidor específico de la ruta de degradación 26S proteosoma bloquea la pérdida de PR dependiente de ligando. El mismo resultado se produce por la inhibición de la vía MAPK p42/p44, también por la mutación de un solo sitio de fosforilación consenso del PR para MAPK. Sugiriéndose que el PR activado es un sustrato de la fosforilación inducida por MAPK, el cual marca al receptor para la degradación por el complejo 26S-proteosoma.

La degradación de PR en presencia de R5020 parecer estar específicamente mediada por el 26S proteosoma, porque el inhibidor ALLM, de la actividad de enzimas implicadas en degradación pero no de 26S, no tienen efecto en la degradación de PR. En contraste, el inhibidor LLnL, para varias proteasas de cisteínas incluyendo la actividad proteasa de la cisteína del 26S proteosoma, efectivamente bloquea la degradación de PR. Aunque la degradación independiente de ubiquitina de los sustratos por el 26S es conocida, la mayoría de las proteínas diana marcadas para ser destruidas lo hacen a través de esta ruta al ligarseles moléculas de 76 ubiquitinas, ensamblándose como cadenas poliubiquitinizadas. Estas proteínas ubiquitinizadas son a menudo difíciles de visualizar. Sólo el 3% de las calcinas existen como conjugados sububiquitinados durante la mitosis; estas especies tienen una vida media de 90 segundos. La proporción de PR que existe como conjugado ubiquitinado a este punto dado, sería incluso menor, porque los receptores tienen una vida media de varias horas.

Los sustratos para la vía ubiquitina-proteosoma a menudo contienen secuencias/motivos aminoacídicos específicos necesarios para su reconocimiento y degradación (Glotzer, Murray, and Kirschner, 1991). El examen de la secuencia próxima a la Ser294 del PR reveló la presencia de tales motivos; un caja de destrucción consenso de 9 aminoácidos originalmente descrita en moléculas de ciclina y necesaria para la destrucción por la ruta ubiquitin-proteosoma (King, Glotzer, and Kirschner, 1996). Es curioso que en el PR esta secuencia este junto al sitio consenso de las MAPK. Otro motivo de cajas consenso esta localizado entre los aminoácidos del PR 399-407, solapando con el sitio de fosforilación basal Ser400, el cual es un objetivo In Vitro de la kinasa CDK2. Aunque existen otros sitios basales de fosforilación en el hPR, esta Ser400 también produce un modesto incremento en la fosforilación en respuesta a ligando (Zhang, Beck, et al, 1995). Aunque el significado funcional de estas dos secuencias es desconocido, su presencia en diferentes posiciones del PR podría explicar porque la destrucción del receptor intermedio inmaduro y la fosforilación de un PR maduro dependiente de ligando. La fosforilación de PR en Ser294 por MAPK podría exponer el motivo de destrucción para ser la diana del 26Sproteosoma. La fosforilación del segundo sitio podría llevar a la degradación del receptor inmaduro o receptor sin ligando. De hecho, el análisis estructural de la

región amino del PR<sub>A</sub> indica que ambos sitios de fosforilación están expuestos en la superficie de la molécula.

Siguiendo a la unión a ligando, el PR realiza una rápida regulación negativa (Sheridan, Krett, et al, 1988). Este proceso está muy aumentado por la fosforilación de Ser294, el cual es la diana de PR para ubiquitinación y degradación por la ruta 26S-proteosoma (Lange, Shen, and Horwitz, 2000). Un mutante de PR, en donde Ser294 fue reemplazada por alanina S294A, se une a ligando, como el PR salvaje, y realiza a característico retardo en un gel de movilidad propio de otros sitios de fosforilación que entran en el núcleo y se unen a PREs. Sin embargo, el PRS294A falla al realizar el proceso ubiquitinación dejando al receptor estable en la presencia de progestina con relación al salvaje. Interesantemente, cuando es establemente expresado en células de cáncer de mama, el PR mutante S294A activado es un débil activador transcripcional y falla al responder a los agentes que activan MAPK (Shen, Horwitz, and Lange, 2001). La creación de un receptor que fosforimetiza Ser294 al reemplazar Ser294 por ácido aspártico (S294D) invirtió estos efectos, resultando en un PR hiperactivo mostrando un recambio incrementado en relación al salvaje (Lange no publicado). De este modo, la fosforilación reversible de Ser294 se une al incremento de la actividad transcripcional, para realizar una rápida regulación negativa del PR por la vía del proteosoma ubiquitina; la unión entre estos eventos requeriría más ensayos, pero podría involucrar la regulación de eventos transcripcionales por componentes de la ruta ubiquitin y/o la participación de factores para el movimiento entre el núcleo-citoplasma o las chaperonas.

De este modo, la fosforilación específica de PR en Ser294 por MAPK parece ser necesaria para la ubiquitinación de PR inducida por progestina y la posterior degradación por el 26S proteosoma. La unión de ligando podría alterar la conformación de PR tal que este se vuelve un mejor sustrato para la MAPK p42/p44.

## I.6.1 - CICLO CELULAR

Los factores de crecimiento inducen independientemente la fosforilación de PR en sitios específicos mediante rutas kinasas separadas, además de por la activación de su propia ruta por la unión de progestina con su receptor en si mismo (Lange, Shen, and Horwitz, 2000). El crosstalk entre PR y los factores de crecimiento mitogénicos ocurre a diferentes niveles, incluyendo la regulación positiva por progestina de los receptores para factores de crecimiento epidérmico (EGFRs) y sus ligandos (Lange, 2004).

En el tejido mamario normal, el EGF potencia las acciones proliferativas de progesterona y estrógenos, y causa la aparición de las ramas ductales laterales y el desarrollo lobuloadveolar de la glándula mamaria madura (Haslam, and Shyamala, 1981). En el tejido mamario canceroso, EGF y progestina sinérgicamente regulan de modo positivo los niveles proteicos de Ciclina D1 y Ciclina E (Hovland, Powell, et al, 1998). Las Ciclinas regulan la progresión de las células a través del ciclo celular por interacción con las proteínas kinasas dependientes de ciclina (CDKs). Por ejemplo, las ciclinas de tipo D son expresadas a lo largo del ciclo celular en respuesta a la estimulación mitogénica, mientras la expresión de ciclinas E, A y B (las ciclinas mitóticas) es periódica. Los complejos son formados por isoformas de Ciclina D con CDK4 y CDK6, y ciclinas A-E asociadas con CDK2 en la fase S. La ciclina A también forma complejos con CDK1 en la fase S tardía y G2, mientras el complejo ciclina B/CDK1 está restringidos a la fase M (Sherr, 1996).

La mayoría de los 14 residuos de Ser fosforilados in PR son sitios para CDK2. De este modo, la fosforilación de PR es inducida prioritariamente por los complejos Ciclina E/CDK2 (en la transición de G1 a S) y/o ciclina A/CDK2 (durante la fase S temprana). Además, la progestinas son excelentes sincronizadores naturales del ciclo celular, e inducen el incremento de los niveles y la actividad de CDK2, además de la expresión de ciclina D1, precisamente para la entrada en la fase S seguida por la inhibición del crecimiento celular al límite G1/S (Groshong, Owen, et al, 1997).

La actividad de CDK2 puede incrementar la actividad transcripcional, tanto en presencia como en ausencia de progestina (Lange, 2004). De ahí que la fosforilación de PR por CDK2

activado sugiere un mecanismo para la regulación coordinada de la acción de PR durante la progresión del ciclo celular. Narayanan (Narayanan, Edwards, and Weigel, 2005) mostró que la actividad transcripcional es mas alta en la fase S con relación a las fases G1 y G2/M, en las cuales PR es expresada pero este existe en un estado de actividad represora.

Además, el estado fosforilado de PR en cada fase ha sido examinado usando los anticuerpos disponibles para los sitios fosforilados conocidos. Las Ser162 y 294 eran fosforiladas hormonalmente en las fases G1 y S, pero no en la fase G2/M. Sugieren que en la fase G2/M el PR esta en una conformación alterada o se asociado con otras proteínas que ocluyen estos sitios. Una interpretación alternativa de estos datos es que las especies de PR con la Ser294 fosforilada son activas, pero se degradan rápidamente; quizás de manera preferente en la fase G2/M. Esto podría explicar los bajos niveles detectados de PR con la Ser294 fosforilada en proporción al PR total. Es posible además que la fosfatasas del citosol (activas en G2/M) medien en la red de fosforilación por los movimientos de entrada y salida del núcleo de los PRs, siendo nucleares durante la fase S. Sin tener en cuenta los mecanismos, existe una clara correlación entre la actividad de PR y la fosforilación del mismo (en las Serinas 162 y 294). Sin embargo, en una publicación previa en la misma revista (Narayanan, Edwards, and Weigel, 2005) estos investigadores mostraron que el incremento inducido por CDK2 en la actividad transcripcional del PR (pe: en presencia de progestina) no se detectó en los sitios de fosforilación de PR, pero en su lugar se estimulaba la asociación de SRC1 fosforilado sobre los complejos de PR presentes en el promotor de MMTV. También encontraron que la ciclina A y el CDK2 estaban asociados con PR en los complejos de transcripción activa.

En recientes artículos (Narayanan, Edwards, and Weigel, 2005) usando un ensayo ChIP se mostró que además de SRC-1/2 también SRC3 y CBP eran reclutados por el promotor MMTV, de modo preferente, durante la fase S en proporción con las fases G1 o G2/M. Finalmente, estos autores mostraron que la actividad transcripcional de PR durante las fases G1 y G2/M podría volver a los niveles de la fase S añadiendo el inhibor HDAC (Histona acetil transferasa) tricostatina A (TSA). Sin embargo, el tratamiento con TSA no restauraba totalmente la habilidad de la progestina para inducir la fosforilación 294 de PR. Los autores interpretan estos datos sugiriendo que la fosforilación de Ser294 de PR no esta involucrada en el mecanismo de activación transcripcional de PR. Otra explicación podría ser que la acetilación de histonas y el remodelado de la cromatina (sin enrollar) son pasos que ocurren tras la fosforilación de PR, lo que actuaría induciendo la acumulación nuclear de PR durante la fase S y un reclutamiento temprano de cofactores, por ejemplo de las isoformas de SRC. De modo que la fosforilación de Ser294 de PR puede no ser necesaria por los complejos con suficiente actividad HDAC.

Asimismo, los niveles totales de la actividad transcripcional de PR en las fases G1 y G2/M del ciclo celular eran muy sensibles a progestina, pero permanecían bajos en la fase S. Por contra, la actividad transcripción de PR en la fase S era elevada, pero mucho menos elevada y respondiendo en menor medida al añadir hormona, así pues la actividad basal era también muy alta. Dado que esta actividad era claramente bloqueada por el inhibidor antagonista RU486, los autores del estudio atribuyen esta actividad dependiente de PR alegando la presencia residual de ligando tras los lavados del suero, requeridos durante los pasos de sincronización del ciclo celular para el enriquecimiento de la fase S.

Narayanan (Narayanan, Edwards, and Weigel, 2005) ha revelado una ventana (en fase S) de la hipersensibilidad de PR, en la que el receptor nuclear fosforilados podría ser activado por niveles subfisiológicos de hormona. Los eventos de fosforilación que inducen el reclutamiento de los receptores esteroideos (SRC-1/3 o CBP) ocurren como una curva dependiente de la dosis bajando la aparente  $EC_{50}$  para inducir la activación transcripcional en la activación de los receptores. Esto sugiere que cuando las células están en fase S, es suficiente con una concentración mucho menor de ligando de PR (pe: agonistas) para conseguir la regulación de la expresión génica en promotores seleccionados. Los cánceres de mama muestran notorias alteraciones en la regulación del ciclo celular, incluyendo aumentos de la expresión de la ciclina D, E, pérdida de p27 y elevada actividad de CDK2. Claramente así, el incremento de la proliferación es medido por varios marcadores incluyendo ciclina A la cual indica un mal pronóstico (van Diest, van der Wall, and Baak, 2004). Elevados niveles de ciclina A están relacionados con la proliferación y predicen una disminución del tiempo de la primera recaída acortando la supervivencia tras el diagnóstico.

De este modo, la cuestión clave es el papel de la acción de PR durante la fase S en la progresión del cáncer de mama. Los datos clínicos sugieren que el añadir progestina a la terapia de sustitución hormonal aumenta el riesgo de cáncer de mama. Tomando estrógenos y progesterona los tumores son mayores y de un alto grado en relación con los tratamientos sólo con estrógenos o placebo, lo que sugiere que la progestina estimula la progresión del cáncer de mama. En las células cancerosas de mama, la actividad de PR es mayor en la fase S, y estas pueden ser particularmente ultrasensibles a los bajos niveles hormonales. El CDK2 puede también conducir a una actividad de PR independiente de ligando cuando los niveles de p27 son bajos (como en la fase S) o esta noqueado(Lange, 2004).

## **I.6.2 - CICLINA D1**

En células epiteliales mamarias, las hormonas ováricas inducen el estado quiescente de células en G<sub>0</sub>, la progresión en G<sub>1</sub>, y la transición G<sub>1</sub>-S a través del control transcripcional directo de genes que codifican reguladores clave del ciclo celular, tales como FOS, JUN, o MYC (Altucci, Addeo, et al, 1996), y genes de ciclina para G<sub>1</sub>, en particular, CCND1, codificando a ciclina D1 (Altucci, Addeo, et al, 1996). Este último gen, el cual actúa como un sensor mitogénico uniendo señalización extracelular a la maquinaria de ciclo celular, juega un papel fundamental en la fisiología de la glándula mamaria y en la patología. De hecho, ratones CCND1<sup>-/-</sup> muestran profundos defectos en el desarrollo alveolar-lobular mamario, más evidentes durante el embarazo, cuando los compartimentos de células epiteliales mamarias no responden a las hormonas ováricas y fallan al realizar los cambios masivos en proliferación que inducen las células normales (Fantl, Stamp, et al, 1995). Por otro lado, la sobreexpresión de Ciclina D1 en células epiteliales mamarias de ratón induce cáncer de mama (Gillett, Fantl, et al, 1994), mientras la inactivación del gen CCND1 protege contra el cáncer de mama inducido por el oncogen RAS (Yu, Geng, and Sicinski, 2001). En humanos, la sobreexpresión de D1 se mide para distinguir carcinomas de mama invasivos In Situ de lesiones no malignas (Weinstat-Saslow, Merino, et al, 1995). El 50% de los tumores mamarios sobreexpresan Ciclina D1, aún cuando la amplificación del gen CCND1 puede ser de sólo un 13% (Fantl, Richards, et al, 1990). Estos datos indican que mecanismos como una deficiente señalización hormonal o una desregulación del promotor, contribuyen significativamente a este fenotipo específico de cáncer.

Los efectos de los estrógenos en la expresión de ARNm de Ciclina D1 ocurren predominantemente a nivel transcripcional en células hBC que responden a hormona, donde se ha localizado una región sensible a estrógenos en las posiciones -956 a -136 del promotor de Ciclina D1 (Altucci, Addeo, et al, 1996), región del ADN que no contiene elementos de respuesta para hormonas esteroideas ováricas. Otra región de respuesta a estrógenos ha sido localizada en células HeLa, expresando un ER ectópico, en un elemento de respuesta a AMPc (CRE) localizado 52 nucleótidos corriente arriba del sitio del inicio de transcripción, con la posible participación menor de un sitio AP-1 localizado más arriba. Se ha mostrado que la regulación de promotores a través de sitios CRE puede ser directa en hBCC, requiriendo la activación de la ruta de la proteína kinasa A (Castro-Rivera, Samudio, and Safe, 2001).

Se sabe que el ligando de PR R5020 activa la misma cascada de eventos moleculares, sugiriéndose la posibilidad de que algún elemento genético del gen de Ciclina D1 podría representar un sitio para regulación de la fase G<sub>1</sub>. La progesterona induce el ARNm y la expresión proteica de Ciclina D1 durante la estimulación mitogénica de células epiteliales mamarias (Musgrove, Hamilton, et al, 1993), de este modo sus efectos hormonales son

comparables a aquellos llevados a cabo por los estrógenos. En hBBC, la activación del gen CCND1 es inducida por las isoformas a y b de PR (Richer, Jacobsen, et al, 2002), pero el mecanismo genético involucrado es desconocido porque el promotor de este gen no incluye PREs. Weisz (Cicatiello, Addeo, et al, 2004) identificó un elemento regulador de 24bp, localizado unos 940 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de transcripción del gen CCND1, el cual actúa como clave para la regulación por estrógenos y quizás por progestágenos. Este sitio regulador, llamado ERGE, incluye un elemento AP1 (TRE), el cual une el heterodímero JUN-FOS en hBBC, y solapa sitios de unión para dos proteínas adicionales: OCT1 e YY1.

### MAP KINASAS Y D1

Un importante punto final de la señalización de MAPK es la regulación positiva de Ciclina D1. Los niveles proteicos y de mensajero de esta ciclina incrementan en respuesta al tratamiento con estrógenos, progesterona y estradiol, y está demostrado que la ciclina D1 está frecuentemente elevada en cánceres de mama y próstata (Lukas, Bartkova, and Bartek, 1996).

Evidencias recientes sugieren que los SR están a menudo reclutados en regiones potenciadoras distales, lejos de los promotores génicos regulados por hormonas. Estos elementos conteniendo HRE distales asociados con proteínas que unen ciertos factores, funcionan para reclutar los complejos de SR al promotor proximal creando un loop de cromatina (Carroll, Liu, et al, 2005). De este modo, el reclutamiento de SR a los sitios potenciadores distantes es un mecanismo para la regulación directa de genes tales como ciclina D1 por la vía clásica. Como los tumores que progresan llevados por los SRs, los SRs

#### MAPK REGULA LA EXPRESIÓN DE CICLINA D1

La estimulación de factores de crecimiento por MAPK provoca la fosforilación y activación de numerosos factores de transcripción, incluyendo ETS 2, un miembro de una larga familia de factores ETS. Las proteínas ETS promueven la progresión de la fase G1 por la regulación de los genes involucrados en el control de la proliferación celular, incluyendo el regulador de ciclo celular ciclina D1 (Vu, 1995). Ciclina D1 activa y define la especificidad de sustrato para CDK4 y 6, cuya actividad es necesaria para la progresión de las fases G1 a S (Reed, 1997). Los CDKs son inactivos en ausencia de ciclinas; la disponibilidad de ciclina D1 es el mayor determinante para la progresión del ciclo celular a través de G1 en respuesta a diversos mitógenos, incluyendo hormonas esteroideas y EGF (Bartek, 1996). MAPK también puede funcionar postraduccionalmente para regular el ensamblaje y la activación de complejos ciclina D1/CDK (Russel, 1998). Ciclina D1 está elevada en el 45% de los cánceres de mama y el 30% de los cánceres de próstata (Bartek, 1994).

de membrana podría empezar a funcionar predominantemente, llevando a conectar la regulación del promotor a la inducción dependiente de MAP kinasas mediante los sitios proximales del promotor. Esto podría explicar cómo los tumores escapan a la acción de los antagonistas de los SRs que bloquean los eventos transcripcionales pero no inhiben la función de señalización de estos receptores. En relación con esta idea, podría ocurrir que múltiples SRs regulen la expresión de ciclina D1 por sitios y vías distantes. Sin embargo, la activación transcripcional de

ciclina D1 por esteroides es un evento MAP quinasa dependiente. De este modo, la activación de rutas de señalización citoplasmáticas por SRs no sólo aumentan la acción específica de los SRs activando genes mediante secuencias HRE, sino que esto se une a la regulación adicional de genes cuyos promotores claramente usan SRs y pueden también utilizar rutas MAP quinasa activadas independientemente de la actividad transcripcional de SRs.

### **MAP KINASAS, LA REGULACIÓN GÉNICA Y CICLINA D1**

Más aún, el estado de fosforilación y los niveles de expresión de un amplio rango de productos génicos tempranos de la vía de señalización de las MAPK, así como de los factores de transcripción FOS, MYC y JUN, dictan los resultados biológicos (Murphy, 2004). FOS funciona como un sensor para la duración de la señal de ERK. Cuando la activación de ERK es transitoria, su actividad cae antes de que la proteína FOS se acumule. Por contra, los resultados que muestran una señalización de ERK sostenida vienen de la fosforilación de FOS, llevando a su estabilización, e impactando positivamente en la entrada del ciclo celular (Murphy, 2002).

La proliferación celular puede activarse por la activación de los receptores de los factores de crecimiento y/o por la unión de integrinas a moléculas específicas de la matriz extracelular durante la adhesión celular. La activación de estos receptores está asociado con la inducción de ciclina D1 y la regulación negativa de inhibidores de kinasas ciclina dependientes endógenas (CDK) tales como p21 (también conocido como WAF1 o CIP1) y p27 (conocidos como KIP1) (Assoian, 1997). Estudios recientes muestran una unión entre la vía MEK-ERK y la maquinaria del ciclo celular que incluye la demostración del bloqueo de trombina – inhibición de la proliferación inducida en fibroblastos de pulmón de hamster chino correlacionada con la supresión de la activación de ERK. De manera similar, las formas dominante-negativas de ERK, así como nucleótidos ERK complementarios, inhiben la proliferación de fibroblastos NIH3T3 (Pages, 1993). Además, complementarios estudios usando inhibidores farmacológicos de MEK (Dudley, 1995) o de activación de la fosfatasa 1 de MAPK (MKP1), un regulador negativo de MEK1, significativamente redujeron la habilidad de estas células para proliferar en respuesta a estimulación por factores de crecimiento.

La expresión de Ciclina D1, a través de la expresión de dominantes negativos o de las formas activadas de MEK, esta controlada por la señalización MEK-ERK (Lavole, 1996). Esta inducción esta mediada, en parte, por al activación del factor de transcripción AP-1 (Cook, 1998). Muchos autores indican que la activación ERK es requerida para la expresión de ciclina D1, de modo que la intensidad y la duración de la señalización a través de esta ruta determina si una célula realiza diferenciación, proliferación o arresto de ciclo celular (Marshall, 1995).

### I.7.1 - GENES DIANA EN RESPUESTA A PROGESTERONA

Otros recientes avances en la biología del PR han sido en la identificación de los genes diana para PR, por diferentes laboratorios. Kester (Kester, van der Leede, et al, 1997) ha identificado varios genes regulados por PR en una línea celular T47D usando una estrategia diferencial. Los posibles genes diana fueron inducidos por progesterona en presencia de Cicloheximida, el cual debería presentar sólo a los genes directamente inducidos por PR, involucrados en la regulación de transcripción y diferenciación celular. Estos genes incluyeron a TSC22, un posible factor transcripcional, CD9/MRP1 (proteína relacionada con motilidad 1), ATPasa Na/K  $\alpha$ 1, desmoplakin, CD59 /protectiva, y FKBP51, una inmunofilina.

Una investigación de la regulación génica por PR usando un único modelo de cáncer de mama humano que expresa bien las isoformas PR<sub>A</sub> o PR<sub>B</sub>, demostró que ambas isoformas regulan diferentes conjuntos de genes involucrados en rutas funcionales particulares (Richer, Jacobsen, et al, 2002). Es interesante que en células de cáncer de mama, aunque algunos genes son regulados por progesterona a través de ambas isoformas, la mayoría de genes son únicamente regulados a través de una o la otra isoforma, predominantemente a través de PR<sub>B</sub>. Un subgrupo de

#### REGULACIÓN GÉNICA DE LAS ISOFORMAS DE PR

Richer (Richer, 2002) basándose en determinaciones por triplicado, demostró que en respuesta a progesterona, PR<sub>A</sub> y PR<sub>B</sub> regulan diferentes subgrupos de genes, y aunque PR<sub>B</sub> es transcripcionalmente más activo, hay genes que son sólo regulados por PR<sub>A</sub>. Este subconjunto incluye genes conocidos involucrados en cáncer de mama y/o desarrollo de la glándula mamaria que no fueron previamente descritos como dianas de la progesterona. La regulación de la progesterona de muchos de estos genes es deletérea en cáncer de mama. Un sorprendente número de estos genes, son dianas de la membrana celular o están involucrados en señalización iniciada en la membrana. Otro grupo de genes está involucrado en metabolismo, transcripción, crecimiento celular y apoptosis, y procesamiento de los ácidos nucleicos y proteínas. Los resultados sugieren que PR<sub>A</sub> y PR<sub>B</sub> tienen diferentes funciones moleculares en dianas genéticas y que esto podría ser importante y no sólo la cuantificación del contenido de cada isoforma en cáncer de mama o del PR total.

estos genes identificados involucrados en cáncer de mama y desarrollo de la glándula mamaria, incluyen a STAT5a, Mx2 y C/EBP $\beta$ . De modo relevante, un significativo número de genes estaban involucrados en eventos iniciados en la membrana, incluyendo proteínas involucradas en adhesión celular, receptores unidos a membrana, proteínas de unión a calcio, y moléculas de señalización. Estos genes representaron casi la mitad de todos los genes regulados por progesterona identificados en este modelo de cáncer de mama, señalando a la membrana celular como una diana importante corriente debajo de acción de la progesterona. Otro grupo de

genes identificados estaba involucrado en metabolismo incluyendo genes del metabolismo de esteroides/colesterol, ácidos grasos, nucleótidos, o de aminoácidos. Además, la regulación positiva del gen Bcl-XL en estas células T47D expresando PR<sub>A</sub>, sugirió un papel para la progesterona en el bloqueo de la apoptosis, el cual podría explicar la resistencia a apoptosis en ratones transgénicos que sobreexpresan PR<sub>A</sub> en la glándula mamaria (Shyamala, Yang, et al, 1998). Otros genes encontrados dianas de PR tenían funciones en transcripción, crecimiento celular, y procesamiento de proteínas, indicando el amplio rango de genes regulados por PRs.

Usando líneas celulares de carcinoma endometrial establemente transfectadas con PR<sub>A</sub> o PR<sub>B</sub>, Smid-Koopman (Smid-Koopman, Blok, et al, 2003) ha observado un panel diferente de genes regulados por los PRs. Entre los genes regulados por la progesterona en las células positivas PR<sub>A</sub> en Ishikawa, destacaron la regulación positiva de los genes de receptor de ácido retinoico  $\gamma$ , integrina  $\beta/\alpha 7$ , la proteína quinasa activada por mitógenos p97, y p16-INK4, y la regulación negativa de citokeratina 7 y ciclina D1. Por contra, las células Ishikawa expresando PR<sub>B</sub> exhibían sólo tres genes regulados negativamente: IGFBP3, Fibronectina y la proteína de replicación A. Aunque estos genes podrían no ser objetivos directos de PRs, estas observaciones sugieren una especificidad celular y de tejido en la regulación génica diana entre las dos isoformas.

En un esfuerzo por explorar los eventos de regulación negativa de la acción de la progesterona in vivo, Takamoto (Takamoto, Zhao, et al, 2002) usó úteros de ratones mutantes con PR salvaje o sin este, como material de partida y escaneo para detectar diferencialmente genes expresados usando arrays de expresión de ADNc. Uno de estos genes identificados fue el del erizo indio (Ihh), el cual se indujo rápidamente (dentro de las 3h) después de la administración de progesterona en los ratones ovariectomizados. Es más, el perfil de expresión de varios genes conocidos por ser rutas de señalización del erizo, incluyendo patched-1, siguió el mismo patrón de expresión de Ihh durante el periodo de peri-implantación en otros tejidos. Nuevos estudios del mismo grupo usando microarrays han revelado más de 100 genes regulados por progesterona tras las 4h de tratamiento (Richer, Jacobsen, et al, 2002). El análisis del impacto de la inducción de estos genes será importante para comprender el papel fisiológico de la progesterona al regular un amplio rango de procesos biológicos distintos.





# Resultados

# CONSTRUCCIÓN DE VECTORES RETROVIRALES PARA EXPRESIÓN DE FORMAS MUTADAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA HUMANO

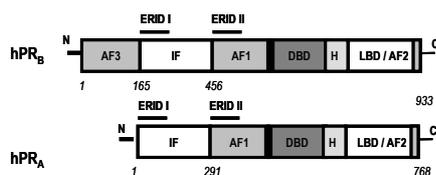
## R.1.1 - CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR RETROVIRAL EXPRESANDO EL RECEPTOR DE PROGESTERONA HUMANO (hPR)

El primer objetivo de este trabajo fue el de expresar un hPR recombinante marcado en una línea celular de cáncer de mama humana. Sabemos que de un sólo gen se transcriben dos isoformas A y B, debido a promotores diferentes, y que la isoforma A expresada carece del dominio de activación 3 (AF3: 164 aminoácidos) [Fig. R1-A]. La isoforma B juega un papel clave como activador transcripcional de la acción de la progesterona en la regulación de diversos procesos fisiológicos de la glándula mamaria y el útero.

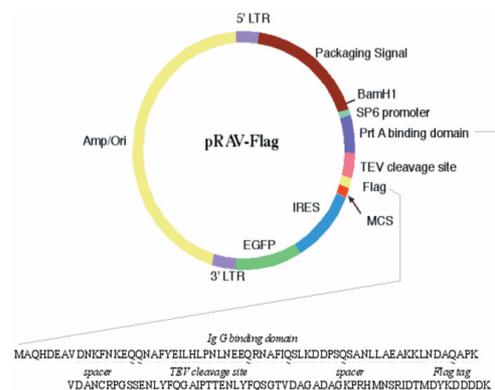
Con el propósito de expresar la isoforma B del hPR, usamos un vector retroviral, que usado a baja multiplicidad de infección (MOI) permite la integración controlada de un número limitado de copias del gen de interés en el genoma de la célula diana. Además, la integración estable es llevada a cabo sin necesidad de seleccionar para la resistencia a un antibiótico.

Hemos usado el vector retroviral pRAVFlag, amablemente cedido por el Dr. Xuedong Liu (Universidad de Colorado. USA), el cuál tiene dos interesantes peculiaridades (Knuesel, 2003). La proteína resultante de la clonación poseerá en el extremo amino (N) un péptido señal, compuesto de un dominio de unión a IgG, un lugar específico de corte para la proteasa del TEV y un péptido Flag. Y por otro lado, el vector permite la coexpresión independiente de una proteína GFP para la posterior identificación y separación de las células positivamente infectadas [Fig. R1-B]. El tener formas marcadas del hPRb nos permite una fácil inmunodetección de la proteína expresada usando un anticuerpo contra el péptido fusionado Flag y, sería sumamente provechoso para la purificación de complejos proteicos usando el sistema TAP (Tandem Affinity Purification) (Puig, 2001).

**A**



**B**

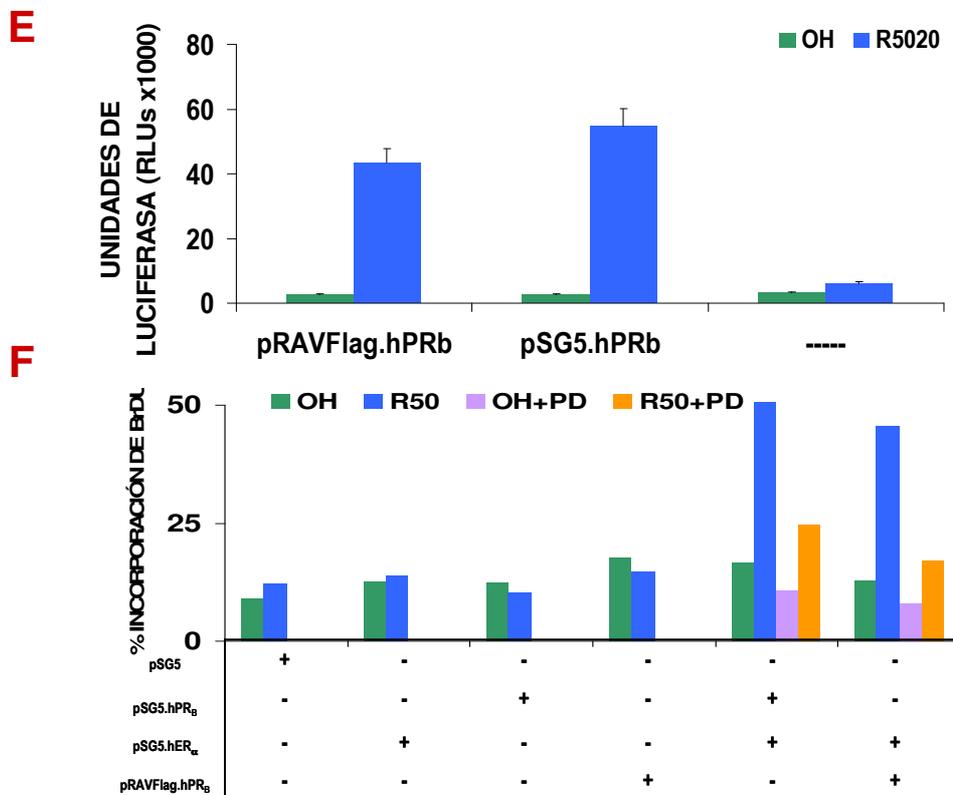




progestágenos, medimos la habilidad para proliferar en respuesta a R5020 de células que expresan la proteína marcada.

Esta capacidad, para inducir la proliferación a través de la activación de señalización, fue medida en fibroblastos (293T) transfectados con una combinación de diferentes vectores de expresión para el receptor de estrógenos (hER $\alpha$ ), hPR<sub>B</sub> o TAP- hPR<sub>B</sub>, mediante un ensayo de incorporación de BrDU (Ver material y Métodos). Las células sincronizadas, por privación de suero durante 48h, fueron inducidas con progestina (10nM) durante 18 horas, con objeto de medir por citometría de flujo la cantidad de DNA como indicador de proliferación.

En presencia de progestina (R5020), detectamos casi un 50% de células en proliferación tanto para el hPR<sub>B</sub> marcado como el salvaje, respecto a un 15% en ausencia de hormona (niveles basales del líquido conservante en que esta la hormona) [Fig. R1-F]. Se ha descrito en la literatura que un inhibidor específico de la activación de la kinasa ERK (PD980599), bloquea la proliferación inducida por hormona y mediada por la ruta MAPK, como ocurre aquí. Estos resultados indican que los fibroblastos pueden sufrir proliferación inducida por hormona, al igual que las células de cáncer de mama, cuando PR y ER son cotransfectados. Además de que todos los resultados juntos sugieren que marcar el PR con TAP no afecta negativamente a su función.



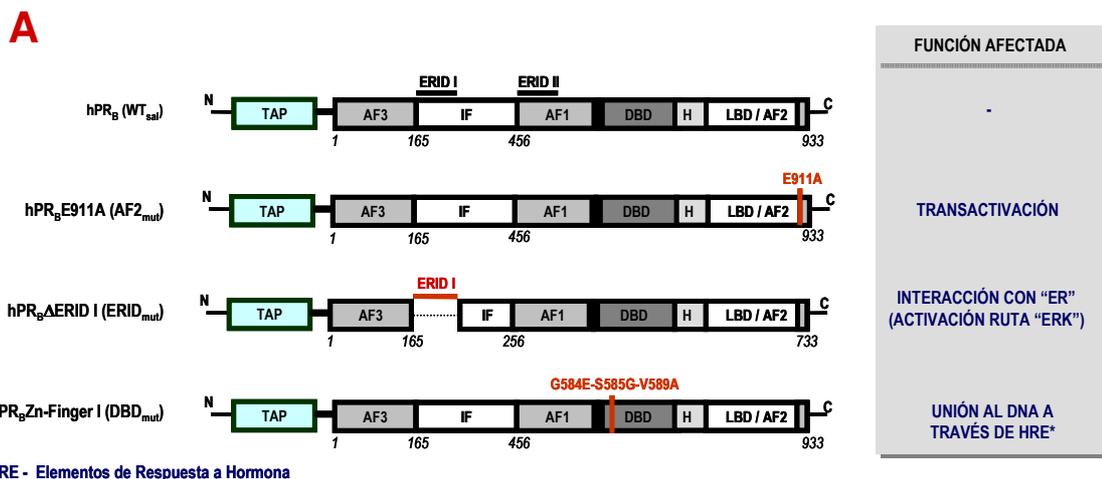
**FIGURA 1. Expresión Del Receptor De Progesterona Marcado hPR<sub>B</sub>.** (E) Activación transcripcional del gen reportero MMTVLuc por progestina en células 293T. Las células fueron cotransfectadas con ER $\alpha$  y los vectores de expresión junto con la construcción reportera MMTVLuc. Tras la transfección, el medio fue reemplazado con medio sin suero charcolizado y 48 horas después añadimos 10nM de R5020 o diluyente (etanol). Medimos la actividad

luciferasa en los extractos celulares 24 horas después de la normalización protéica. Los datos mostrados representan la media de dos experimentos. **(F)** Efectos de la transfección transitoria de hPR<sub>B</sub> en la proliferación celular inducida por progesterona e condiciones de cultivo libres de suero. Los fibroblastos (293T) fueron transfectados con ER $\alpha$  y los diferentes vectores de expresión. Tras la transfección el medio fue reemplazado con medio sin suero y 48 horas después tratadas con 10nM de R5020 o diluyente (etanol diluido 1:10000). La Bromodeoxiuridina (BrdU) se añade 12 horas después se deja 2 horas. Después de eso las células son procesadas con un anticuerpo anti-BrdU y contamos el número de células en proliferación por análisis FACS.

## R.1.2 - CLONAJE Y ESTUDIO FUNCIONAL DE FORMAS MUTADAS DEL hPR<sub>B</sub>

Para comprender en más detalle el papel del receptor de progesterona actuando como factor nuclear o tomando parte en la activación de la ruta de la MAPK a través de la interacción con el receptor de estrógenos, construimos mutantes que deberían presumiblemente afectar a estas dos habilidades.

En el laboratorio ha sido descrita y mapeada la interacción hPR<sub>B</sub>-hER $\alpha$  y su implicación en proliferación, definiéndose dos importantes regiones para la interacción, llamadas ERID-I (Estrogen Receptor Interacting Domain) y ERID-II [Fig. R2-A] (Ballaré, 2003).



**FIGURA 2. Expresión de formas funcionalmente deficientes del hPR<sub>B</sub>.** (A) Representación esquemática de las construcciones recombinantes del hPR<sub>B</sub>. AF, activation function; ERID, ER interaction domain; DBD, DNA binding domain; H, hinge region; IF, inhibitory function; LBD, ligand binding domain; TAP, tandem affinity purification peptide.

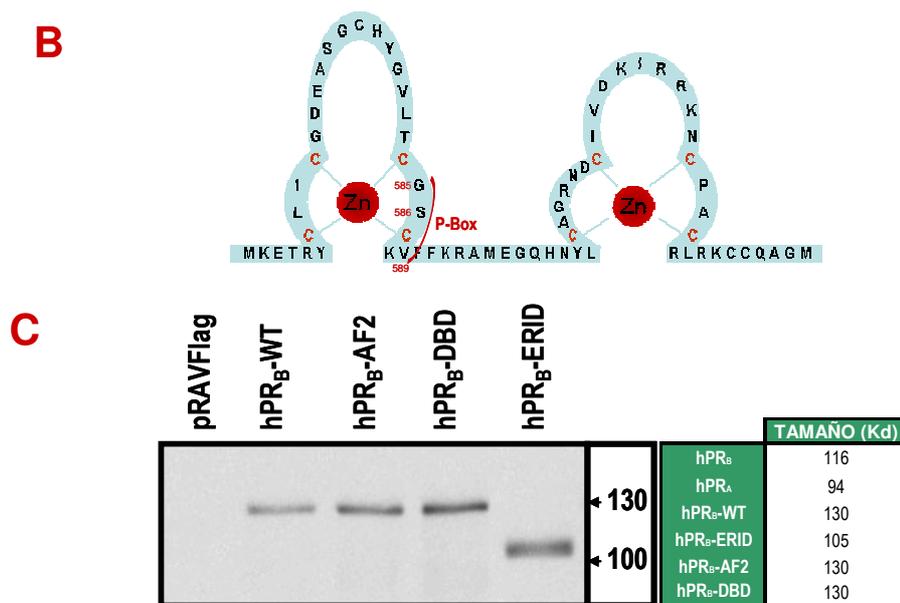
También, fue descrito un residuo aminoacídico en el AF2 (Activation Function 2), que cuando es mutado causa la inhibición de la transactivación, en ciertas líneas celulares (Wong, 1997). Este Ácido glutámico (E) en la posición 911 está implicado en el reclutamiento específico de ciertos coactivadores en el contexto de la activación del promotor MMTV por hormona.

Con objeto de crear una herramienta para el estudio de la función del hPR<sub>B</sub> en su unión específica a ciertos promotores conteniendo PREs, mutamos tres residuos del dominio de unión a DNA (DBD) pertenecientes a la caja P y descritos como claves en la interacción de la hélice1- $\alpha$  del hPR<sub>B</sub> con la ranura mayor del PRE [Fig. R2-B]. Imponemos una polaridad negativa

(G586E), evitamos la formación de puentes de hidrógeno con W21 adyacente a Gua3-O6 (S587G) y provocamos un cambio de orientación, evitando así la interacción mediante enlace de Van der Waals con Thy4-C5 (V589A), buscando así eliminar completamente el contacto de hPR<sub>B</sub> con el DNA.

Posteriormente además del hPR<sub>B</sub> inalterado, hemos clonado el mutante previamente descrito como defectivo en su reclutamiento de coactivadores E911A y una delección entre los residuos 165 hasta 345 afectando al dominio ERID-I, además del mutante generado para ser defectivo en su unión al DNA G586E-S587G-V589A.

Antes de generar las líneas celulares estables expresando estos mutantes, analizamos los efectos de todas las variantes del hPR<sub>B</sub> creadas por transfección transitoria en células 293T. La expresión fue analizada por Western Blot con un anticuerpo contra Flag dos días después de la transfección, confirmando los esperados tamaños moleculares de las formas marcadas de 130Kd, y de 105Kd para el ERID [Fig. R2-C].

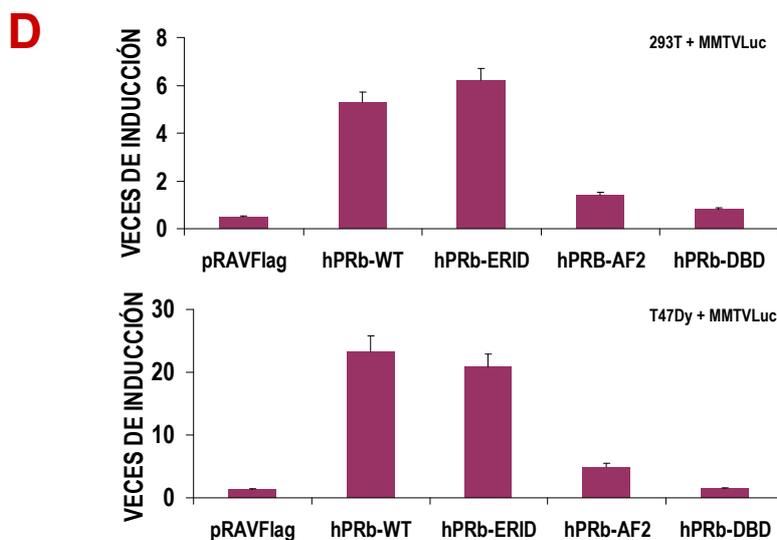


**FIGURA 2. Expresión de formas funcionalmente deficientes del hPR<sub>B</sub>.** (B) Representación de la region de los dedos de Zinc dónde se sitúa la caja P del dominio de unión a DNA (DBD) en el PR<sub>B</sub>. (C) Análisis por Western Blot de la transfección transitoria de las formas variantes del PR<sub>B</sub>. Transfectamos las células 293T con cada una de las construcciones del hPR<sub>B</sub> y 48 h6ras después 50 ug de extracto de proteína total es corrido en un gel SDS-PAGE, e hibridado con un anticuerpo contra hPR.

La actividad transcripcional de las diferentes variantes en respuesta a progestina fue analizada al cotransfectar estos mutantes con una construcción reportera MMTV-Luc, junto con el plásmido de expresión para el hER $\alpha$  en células 293T. El WT marcado mostró aproximadamente unas 5 veces de inducción en la expresión del MMTV-Luc tras 18 horas de tratamiento con progestina (R5020: 10nM) [Fig. R2-D]. Ballaré describió que la delección de

ERID-I no afectaba a la habilidad del hPR<sub>B</sub> para inducir al promotor MMTV en respuesta a hormona, mediante transfección transitoria en células Cos-7 (Ballaré, 2003). En este sentido, hemos detectado que la inducción por hormona (6 veces) para hPR<sub>B</sub>-ERID es comparable a lo que obtenemos con el WT. La ligera diferencia podría ser debida al menor tamaño del mutante de delección que podría ser compensado corrigiendo la cantidad de DNA transfectado en las células.

Por otro lado, AF2 muestra una menor inducción, como se esperaba tras ser descrita esta mutación como defectiva en su reclutamiento de coactivadores para la activación del promotor modelo MMTV (Truss, 1995). Finalmente, el mutante DBD es totalmente incapaz de promover la activación del MMTV en respuesta a R5020, confirmando su defecto para la unión a las secuencias específicas de respuesta a hormona (PRE) que contiene este promotor [Fig. R2-D]. Resultados similares fueron obtenidos cuando las células T47Dy (T47D sin expresión endógena de hPR, ver más adelante) fueron cotransfectadas con la batería de mutantes y la expresión de luciferasa fue medida tras el tratamiento con progestina [Fig. R2-D].



**FIGURA 2. Expresión de formas funcionalmente deficientes del hPR<sub>B</sub>. (D)** Transactivación del gen reportero MMTVLuc por progestina en células 293T y T47Dy sin PR. Las células son cotransfectadas con ER $\alpha$  (en el caso de 293T) y con las diferentes construcciones de hPR<sub>B</sub>, junto con el gen reportero MMTVLuc. Después de la transfección, cambiamos el medio a medio sin suero, y 48 horas después añadimos R5020 10nM. Medimos la actividad luciferasa en extractos celulares 24 horas después de la cuantificación proteica. Mostramos las veces de inducción de células tratadas con R5020 respecto etanol. Los datos representan la media de dos experimentos.

Todos estos resultados muestran que el péptido de fusión no afecta negativamente la función del PR. Consecuentemente, estos mutantes serán muy útiles para definir el conjunto de genes inducidos hormonalmente que requieren vías de señalización que vayan a través de la

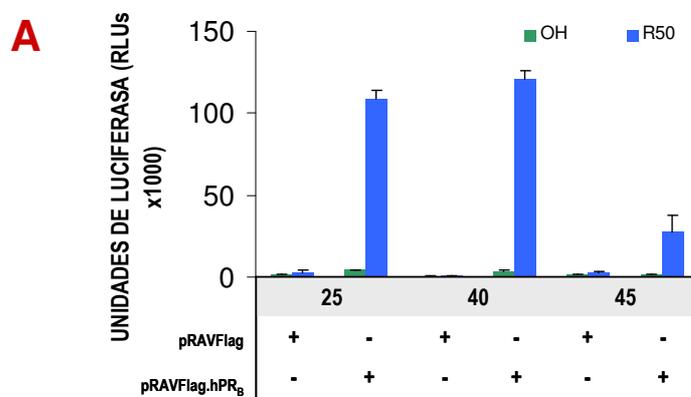
interacción PR-ER, o bien requieran la capacidad transcripcional del PR, o en su conjunto la colaboración de ambos mecanismos.

## CREACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES DE CÁNCER DE MAMA EXPRESANDO FORMAS MUTADAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

### R.2.1 - CREACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MÁMA ESPRESANDO hPR<sub>B</sub>

Para investigar la función y la expresión de genes inducidos por hormona en los diferentes mutantes del hPR<sub>B</sub>, en un entorno celular de cáncer de mama, usamos un clon de una línea celular previamente descrita T47D desprovista de la expresión endógena de las isoformas A y B del receptor de progesterona, llamada T47Dy (Sartorius, 1994). Antes de infectar esta línea celular con los mutantes del hPR<sub>B</sub>, introdujimos una copia del promotor reportero MMTV-Luc mediante transfección estable de células T47Dy (en adelante TYML) para así monitorizar la respuesta transcripcional a progestina mediante el ensayo de actividad de luciferasa.

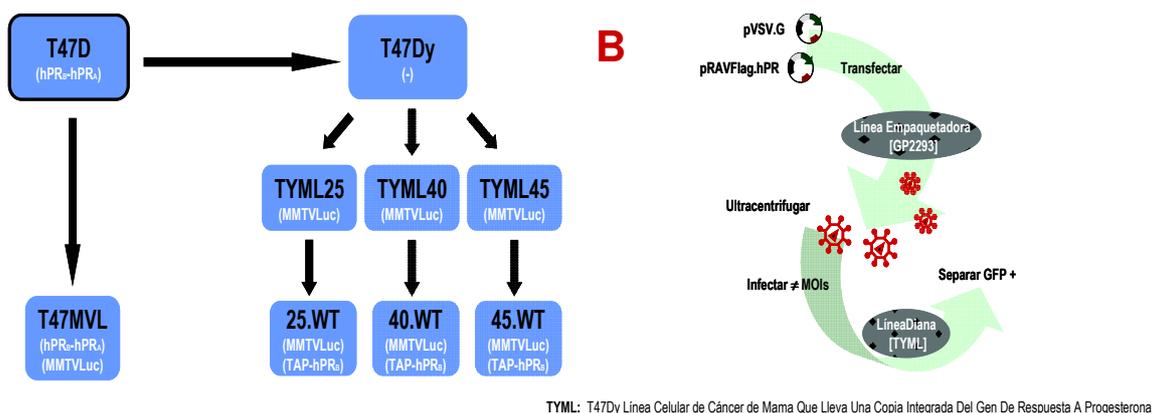
El plásmido pMB013 (pMMTV-Luc) linearizado se introdujo por electroporación en células T47Dy creciendo exponencialmente y, mediante selección por antibiótico (Neomicina), clones individuales fueron seleccionados y amplificados. Se chequeo la presencia del gen introducido y el número de copias por PCR semicuantitativa en tiempo real comparando con una línea previamente establecida en el laboratorio (T47DMLV) portadora de una única copia del reportero MMTVLuc. Tres clones TYML25 - TYML40 - TYML45 mostrando integraciones únicas fueron elegidos y la respuesta a progestina fue analizada tras transfección transitoria con el plásmido vacío o expresando hPR<sub>B</sub>, obteniendo inducciones de entre 20 a 30 veces tras añadir hormona cuando PR esta presente [Fig. R3-A]. Ninguna respuesta fue obtenida en ausencia de PR, confirmando la ausencia de PR endógeno.



**FIGURA 3. Líneas Celular Diana De Cáncer de Mama Para la Infección Estable De La Forma Salvaje o Formas Funcionalmente Deficientes De hPR<sub>B</sub>. (A)** Transactivación del gen reportero MMTVLuc por progestina en células TYML25-40-45 (Clones de T47Dy con una copia integrada de MMTVLuc) y sin PR endógeno. Transfectamos las células con el plásmido vacío o el de expresión de hPR<sub>B</sub>. Tras 48 horas en un medio sin suero añadimos R5020

10nM. Medimos la actividad luciferasa en extractos celulares 24 horas después de la cuantificación proteica. Mostramos unidades arbitrarias de luciferasa como media de dos experimentos.

Para analizar el comportamiento del PR recombinante en un entorno estable infectamos los tres clones con la construcción viral para la expresión del hPR<sub>B</sub> salvaje. Por tanto, los virus fueron producidos por transfección de las células empaquetadoras GP2293 (**Ver Material y Métodos**), y concentrados por ultra-centrifugación [Fig. R3-B]. Usamos tres concentraciones diferentes de virus para infectar un número fijo de células pertenecientes a los clones (25-40-45) de la línea TYML (T47Dy.MMTV-Luc). Posteriormente, medimos la proporción de células infectadas para cada clon mediante la expresión de GFP usando FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Bajas infecciones (aproximadamente 6-8% de GFP) fueron seleccionadas para lograr tener una copia de cada integrante por genoma diana, evitando así la sobreexpresión de hPR<sub>B</sub>. Aislamos las células GFP positivas en un separador de FACS, con objeto de establecer así las líneas celulares. Varios meses después de la separación, más del 95% de las células retenían la expresión de GFP.



TYML: T47Dy Línea Celular de Cáncer de Mama Que Lleva Una Copia Integrada Del Gen De Respuesta A Progesterona

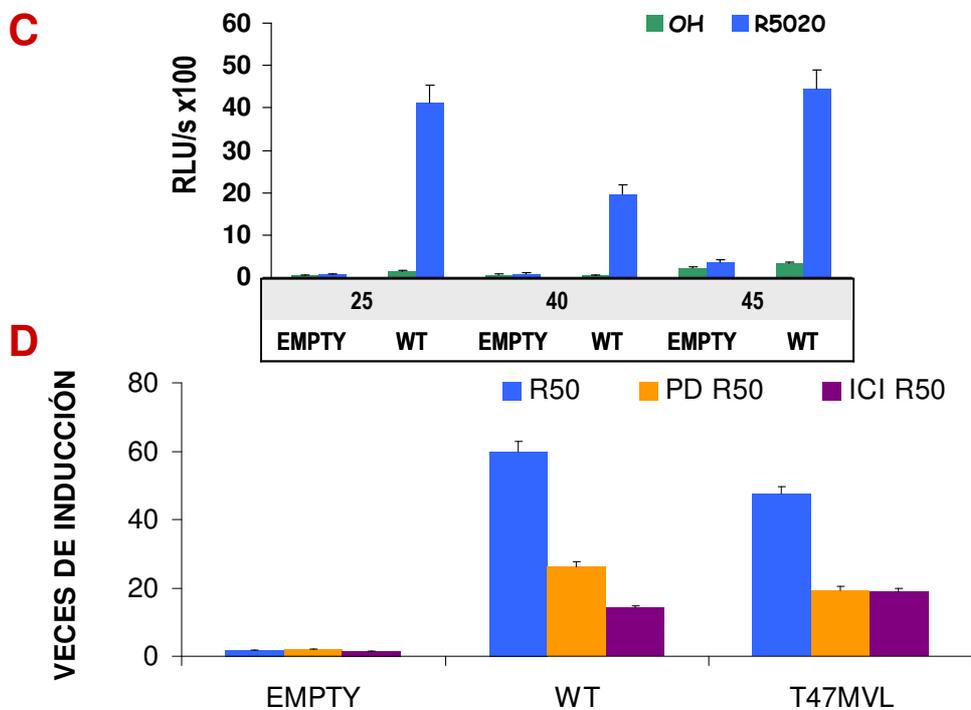
### FIGURA 3. Líneas Celular Diana De Cáncer de Mama Para la Infección Estable De La Forma Salvaje o Formas Funcionalmente Deficientes De hPR<sub>B</sub>. (B) Creación por infección de líneas estables de cáncer de mama.

*Diagrama Superior.* Arbol genealógico de las líneas de cáncer de mama expresando hPR<sub>B</sub> salvaje usadas en este estudio. La integración estable de la construcción reportera MMTV-Luc en las células de cáncer de mama T47Dy, se realizo por transfección estable de la construcción y obtención de los clones resistentes a neomicina. *Diagrama Inferior.* Integración estable de la construcción retroviral hPR<sub>B</sub> en la línea TYML25 (con una copia establemente integrada de MMTV-Luc). Transfectamos pVSG y pRAVFlag en la línea empaquetadora GP2293, recogemos las partículas virales durante 72 horas, y el sobrenadante es ultracentrifugado durante 1h30min a 26000 rpm. La resuspensión del pellet se usa para infectar las células diana a diferente MOIs. Finalmente, separamos las células positivas por la señal de fluorescencia EGFP co-expresada.

Aprovechamos que nuestras células poseen una copia integrada del gen MMTV-Luc, para mediante un ensayo de actividad de luciferasa, analizar los efectos de la expresión de la forma marcada TAP-hPR<sub>B</sub> en la activación transcripcional del promotor MMTV en presencia o ausencia de progesterona. Se observa un incremento en la actividad luciferasa en respuesta a

progestina en los tres clones de células establemente infectadas (25.WT- 40.WT- 45.WT), con inducciones de entre 15 a 30 veces [Fig. R3-C]. Tomando cuenta la actividad luciferasa de los tres clones analizados elegimos el clon TYML25 para realizar las posteriores infecciones con las construcciones retrovirales mutantes del hPR<sub>B</sub> debido a que mostraba una reducida actividad basal, una nula respuesta a progesterona de las células con el vector vacío, y a los niveles de inducción de las células con el hPR<sub>B</sub> salvaje.

En relación con la ruta mitogénica de activación del promotor modelo MMTV en respuesta a progesterona, hicimos un ensayo de luciferasa usando inhibidores de la misma. Comparamos nuestra línea celular TYML25.WT con la línea modelo réplica T47MLV (T47D.MMTV-Luc), la cuál expresa PR endógenamente y posee una copia integrada del mismo gen reportero (Truss, 1995). Como se ha descrito previamente la línea celular T47MVL muestra que tanto el bloqueo de la vía MAPK por PD como el uso del antagonista de ER ICI afectan a la inducción hormonal del MMTV, al igual que ocurre en nuestra línea celular [Fig. R3-D]. Por otro lado la línea expresando PR endógeno muestra una inducción ligeramente inferior (45 veces) a la nuestra línea generada (58 veces), aunque ambas tienen similares niveles de expresión de PR. De este modo los resultados están indicando, que el PR marcado también ejerce su efecto de inducción del reporter en respuesta a hormona apoyado en la activación de la vía de las MAPK a través de su interacción con ER.



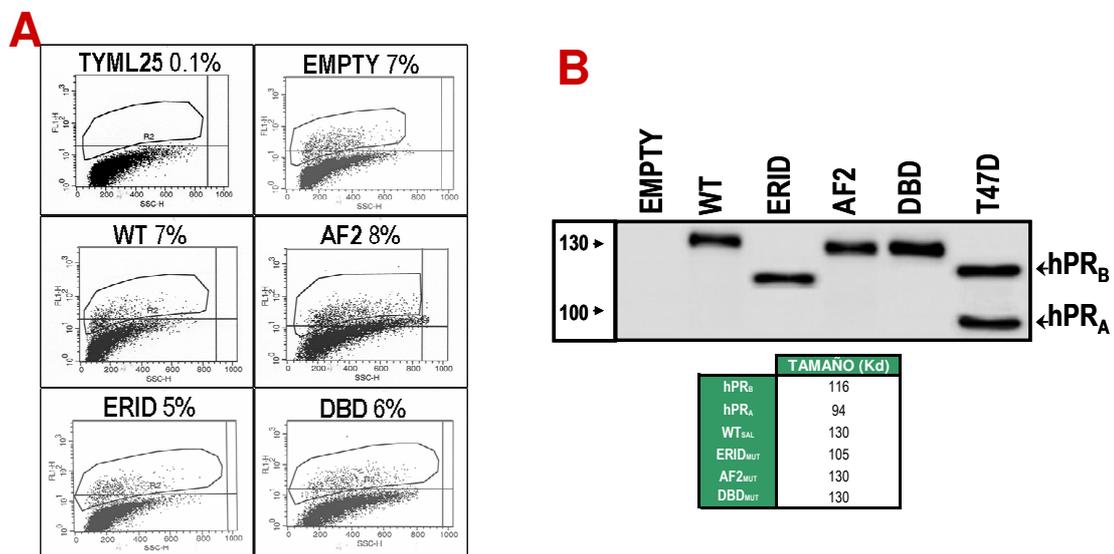
**FIGURA 3. Líneas Celular Diana De Cáncer de Mama Para la Infección Estable De La Forma Salvaje o Formas Funcionalmente Deficientes De hPR<sub>B</sub>.** (C) Transactivación del gen reportero MMTVLuc por progestina en células infectadas TYML25.WT, TYML40.WT y TYML45.WT. Tras 48 horas en medio mínimo (sin suero), añadimos R5020 10nM y medimos la actividad luciferasa en extractos celulares cuantificados 24 horas después. Mostramos unidades arbitrarias de luciferasa como media de dos experimentos. (D) Transactivación del gen reportero MMTVLuc por

progesterona en células TYML25.WT y T47MVL (T47D.MMTVLuc). Cambiamos el medio a medio sin suero, y 48 horas después añadimos R5020 10nM y, cuando es indicado, ICI (antagonista ER $\alpha$ ) 10nM o 1 hora antes de la hormona PD (bloquea Erk) 50uM. Medimos la actividad luciferasa en extractos celulares 24 horas después de la cuantificación proteica. Mostramos las veces de inducción de células tratadas con R5020 respecto etanol, como media de dos experimentos.

## R.2.2 - CONSTRUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MÁMA ESPRESANDO MUTANTES DEL hPR<sub>B</sub>

Seguimos el protocolo de producción de virus (**Ver Material y Métodos**) ya utilizado con el TYML25.WT, infectamos las células TYML25 con diferentes concentraciones (MOIs) virales de todas las construcciones mutantes generadas, seleccionando y aislando las bajas tasas de infección (aproximadamente 6-8% de GFP) para así lograr tener sólo una copia integrada por célula [Fig. R4-A].

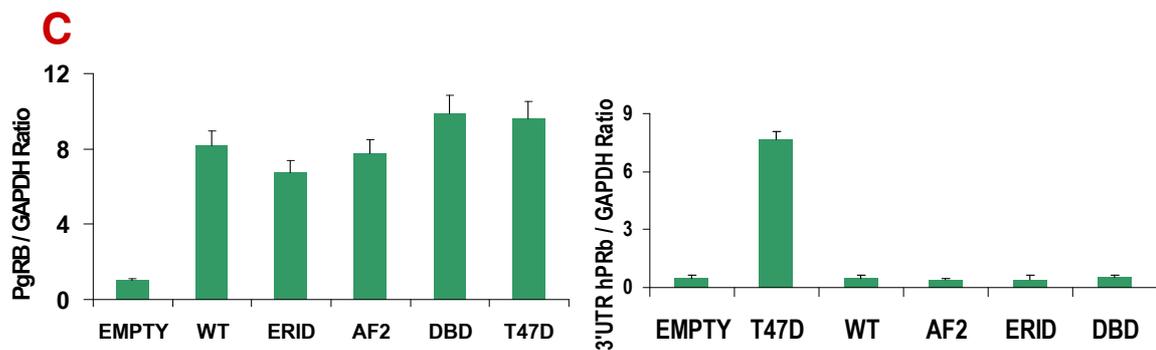
Analizamos la expresión de las variantes de hPR<sub>B</sub> en las líneas celulares por hibridación-WB con anticuerpos contra hPR, y comparando con los niveles endógenos de T47D. Observamos niveles de expresión semejantes entre la proteína del TAP-hPR<sub>B</sub> salvaje (**hPR-WT**) (~130Kd), y las hPR<sub>B</sub> mutadas con relación a la isoforma B (116Kd) de la línea parental T47D. Las variantes TAP-hPR<sub>B</sub>.AF2 (**hPR-AF2**) y TAP-hPR<sub>B</sub>. $\Delta$ ERID-I (**hPR-ERID**) muestran niveles de expresión semejantes a los hPR<sub>B</sub> de las líneas TYML25.WT y T47D, además de que hPR-ERID tiene un menor tamaño (~105Kd) debido a la delección del dominio ERID-I. Y respecto a la proteína mutada TAP-hPR<sub>B</sub>.DBD (**hPR-DBD**), detectamos una expresión ligeramente mayor a las demás variantes [Fig. R4-B].



**FIGURA 4. Caracterización De Líneas Celulares Estables De Cáncer De Mama Expresando La Forma Salvaje o Formas Funcionalmente Deficientes De hPR<sub>B</sub>.** (A) Análisis por FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) de las células TYML25 infectadas con los retrovirus bicistrónicos expresando las variantes de hPR<sub>B</sub> y GFP a baja multiplicidad. Una semana después de la infección, las células positivas para GFP (gated) fueron separadas y mantenidas en cultivo para posteriores análisis. (B) Análisis por Western Blot de las formas recombinantes de hPR<sub>B</sub> en las células positivas para GFP. Hibramos 50 ug de extracto de cada línea celular generada con un anticuerpo contra hPR. La línea celular T47D es usada como control de la expresión endógena de hPR.

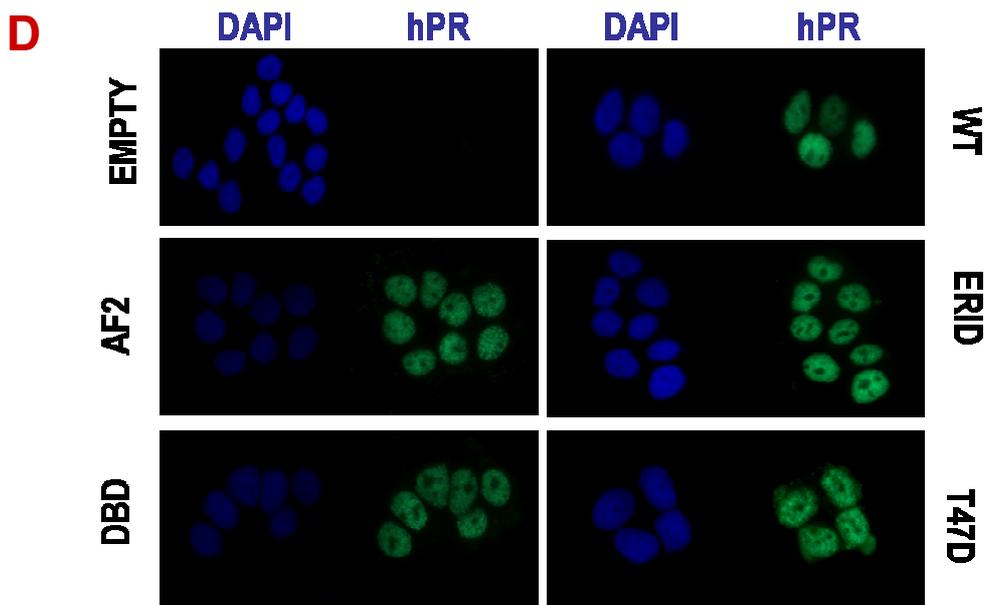
A nivel de mRNA la expresión del transcrito para hPR<sub>B</sub> se muestra equivalente entre todas las líneas celulares, como podemos comprobar en el ensayo de RT-PCR usando GAPDH como control. Evidenciamos también como la expresión del transcrito para hPR-DBD esta algo incrementada, al igual que la de hPR-ERID ligeramente disminuida respecto al salvaje [Fig. R4-C].

Una vez confirmada la expresión del hPR recombinante de las líneas celulares generadas y con objeto de demostrar la ausencia total de hPR endógeno en estas líneas provenientes de TYML25, mediante RT-PCR estudiamos la expresión del transcrito concerniente a la región 3'-UTR (región no transcrita) del gen endógeno para hPR. Comprobamos como ninguna de las líneas creadas expresaban endogenamente hPR a nivel de transcrito primario [Fig. R4-C]. Sólo detectamos la expresión endógena de hPR en la línea parental T47D. Este resultado confirma la ausencia de hPR endógeno en estas líneas, tanto a nivel de mRNA como de proteína (como vimos en la figura anterior [Fig. R4-B]).



**FIGURA 4. Caracterización De Líneas Celulares Estables De Cáncer De Mama Expresando La Forma Salvaje o Formas Funcionalmente Deficientes De hPR<sub>B</sub>. (C) Niveles de expresión de mRNA para hPR<sub>B</sub>.** Las células TYML25 expresando hPR<sub>B</sub> o las forma mutadas, fueron recogidas para la extracción del RNA total. Analizamos la expresión del mRNA de hPR<sub>B</sub> (para comparar niveles) y de la región 3'UTR no codificante (para descartar expresión endógena de hPR<sub>B</sub> en TYML25) por RT-PCR en tiempo real con oligos específicos. Los oligos específicos para el cDNA de GAPDH son usados como control.

Además para confirmar la localización nuclear del receptor de progesterona en todas las líneas celulares, ya que habíamos mutado ciertos dominios funcionales aunque no descritos directamente con alteración de la movilidad celular, hicimos un ensayo de inmunofluorescencia contra Flag y hPR. La localización eminentemente nuclear y la expresión de las proteínas recombinantes no mostraba diferencias entre el hPR endógeno (en TYMLV) con las líneas celulares variantes TYML25.AF2 [AF2], TYML25.DBD [DBD] o TYML25.ERID [ERID], ni con la salvaje TYML25.WT [WT] [Fig. R4-D]. En definitiva, la expresión del hPR<sub>B</sub> para las diferentes líneas generadas muestra tasas de expresión y localización similares para todas ellas y con respecto a la línea parental T47D.



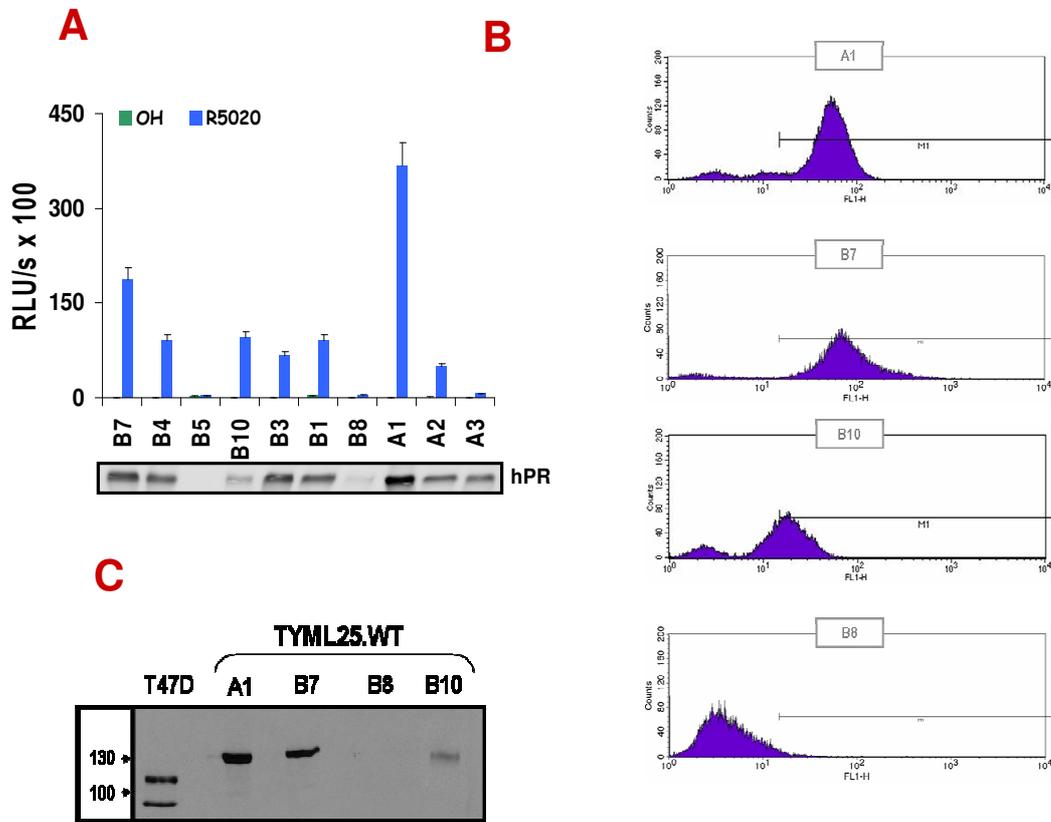
**FIGURA 4. Caracterización De Líneas Celulares Estables De Cáncer De Mama Expresando La Forma Salvaje o Formas Funcionalmente Deficientes De hPR<sub>B</sub>. (D)** Detección por inmunofluorescencia de la expresión de hPR<sub>B</sub>. Las líneas celulares son sembradas sobre cubres de vidrio durante 48 horas, tras permeabilizar y fijar usamos un anticuerpo contra hPR para localización celular se expresión subcelular. Finalmente, montadas sobre portas y analizadas por microscopía.

### R.2.3 - ANÁLISIS DE CLONES INDIVIDUALES DE TYML25.TAP-hPR<sub>B</sub> [WT]

Tras obtener las nuevas líneas celulares expresando formas mutadas del hPR, conscientes de que se trata de una población heterogénea de células que pueden tener integrado el vector de expresión en distintos sitios del genoma, nos planteamos si haría falta obtener clones homogéneos provenientes de células individuales para continuar nuestros estudios. Un clon particular podría ser más controlado y tener un comportamiento más constante, pero también podría acumular una mutación que pasase desapercibida, mientras una población heterogénea tendría un comportamiento promedio.

Para obtener clones individuales de las células expresando TAP-hPR<sub>B</sub> salvaje (**hPR-WT**), aislamos células individuales de la línea TYML25.WT [WT] mediante separación por FACS. Dos meses después de la separación, algunos clones habían perdido la expresión y la habilidad para inducir MMTV en respuesta a hormona, mientras la mayoría no. Los niveles de expresión, cuando estaban presentes, fueron comparables a los niveles endógenos de T47D. La inducción de MMTV fue ligeramente diferente entre clones y esta diferencia correlacionaba bastante bien con los niveles de expresión de hPR [Fig. R5-A].

Para analizar en más detalle la correlación entre la expresión del receptor, los niveles de GFP y su actividad transcripcional, tomamos 4 clones A1-B7-B8-B10. En paralelo, medimos la expresión de GFP por FACS y la de hPR mediante WB e Inmunofluorescencia. Observamos como los niveles de GFP muestran una mayor expresión para A1-B7, menor para B10 y nula para B8 [Fig. R5-B], exactamente la misma secuencia de expresión de hPR<sub>B</sub> [Fig. R5-C].

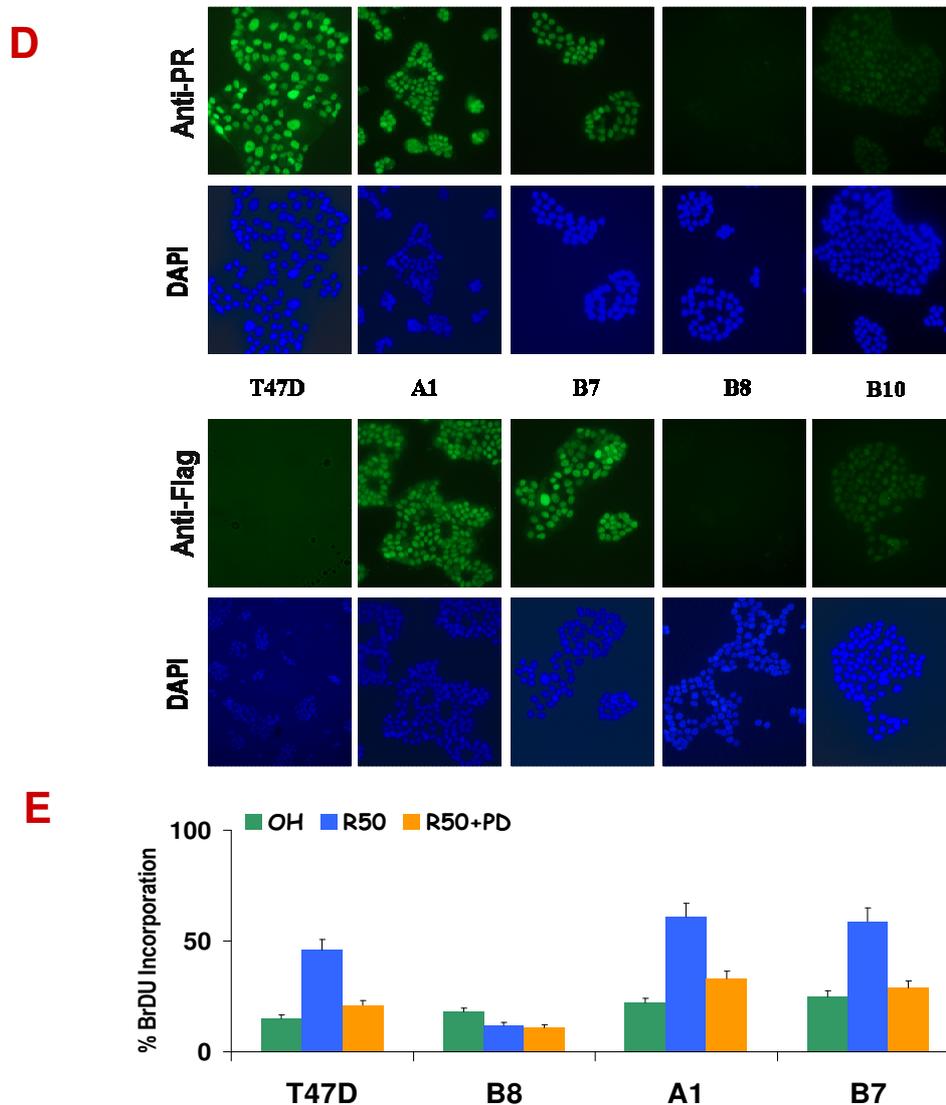


**FIGURA 5. Clones De La Línea Celular Estable De Cáncer De Mama Expresando hPR<sub>B</sub>.** (A) Transactivación del gen reportero MMTVLuc por progesterina en clones individuales expresando niveles proteicos medidos de hPR<sub>B</sub>. Tras 48 horas en medio mínimo, añadimos R5020 10nM y medimos la actividad luciferasa en extractos celulares cuantificados tras 24 horas. Mostramos unidades arbitrarias de luciferasa como media de dos experimentos. (B) Análisis por FACS Fluorescence Activated Cell Sorting) de los clones A1, B7, B8 y B10 (provenientes de TYML25.WT). Los gráficos muestran los niveles de expresión para GFP para las células mantenidas en cultivo. (C) Análisis por Western Blot de los clones A1, B7, B8 y B10 de las células TYML25.WT. Hibridamos 50 µg de extracto de cada clon con un anticuerpo contra hPR. Usamos la línea celular T47D como control de la expresión endógena de hPR.

Por otro lado, mediante inmunofluorescencia fuimos capaces de detectar, tanto con anticuerpos contra PR como para Flag, no sólo la localización nuclear esperada sino también unos niveles de expresión acordes con los niveles previos de GFP y hPR mediante Western Blot [Fig. R5-D]. En resumen, determinamos que la expresión de GFP y hPR se produce a un mismo nivel y que la activación por progesterina del promotor MMTV esta regulada por la presencia y cantidad de receptor.

En relación a la capacidad para inducir la proliferación en presencia de progesterina (R5020), el ensayo de incorporación de BrDU nos muestra un 50% de células en proliferación

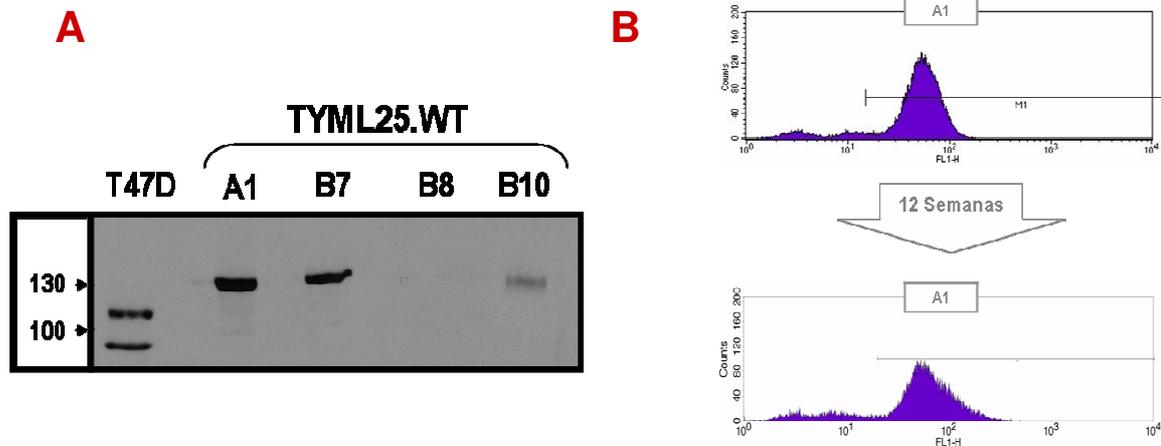
tanto para el clon A1 como para B7 [Fig. R5-E], y una respuesta celular mínima al estímulo hormonal cuando añadimos el inhibidor de la activación de ERK (PD980599). Estos resultados indican que los clones positivos testados se comportan de la misma manera que las células de cáncer de mama que expresan endogenamente el hPR.



**FIGURA 5. Clones De La Línea Celular Estable De Cáncer De Mama Expresando hPR<sub>B</sub>.** (D) Detección por inmunofluorescencia de la expresión de hPR<sub>B</sub>. Los clones son sembrados sobre cubres de vidrio durante 48 horas, permeabilizados y fijados antes de usar un anticuerpo contra hPR para determinar la localización celular. Tras ser montadas sobre portas, se analizan por microscopía. (E) Efectos de los clones A1, B7 y B8 expresando hPR<sub>B</sub> (provenientes de TYML25.WT) en la proliferación celular inducida por progesterona. Las células son crecidas durante 48 horas en medio libre de suero, seguido por 16 horas de incubación con R5020 10nM o etanol, y pretatadas (1 hora antes) o no con 50uM de PD98059. La distribución de las células se analiza por FACS de células teñidas con BrdU y con FITC-AntiBrdU para detectar la incorporación de BrdU (añadido al medio 2 horas antes del final de la incubación).

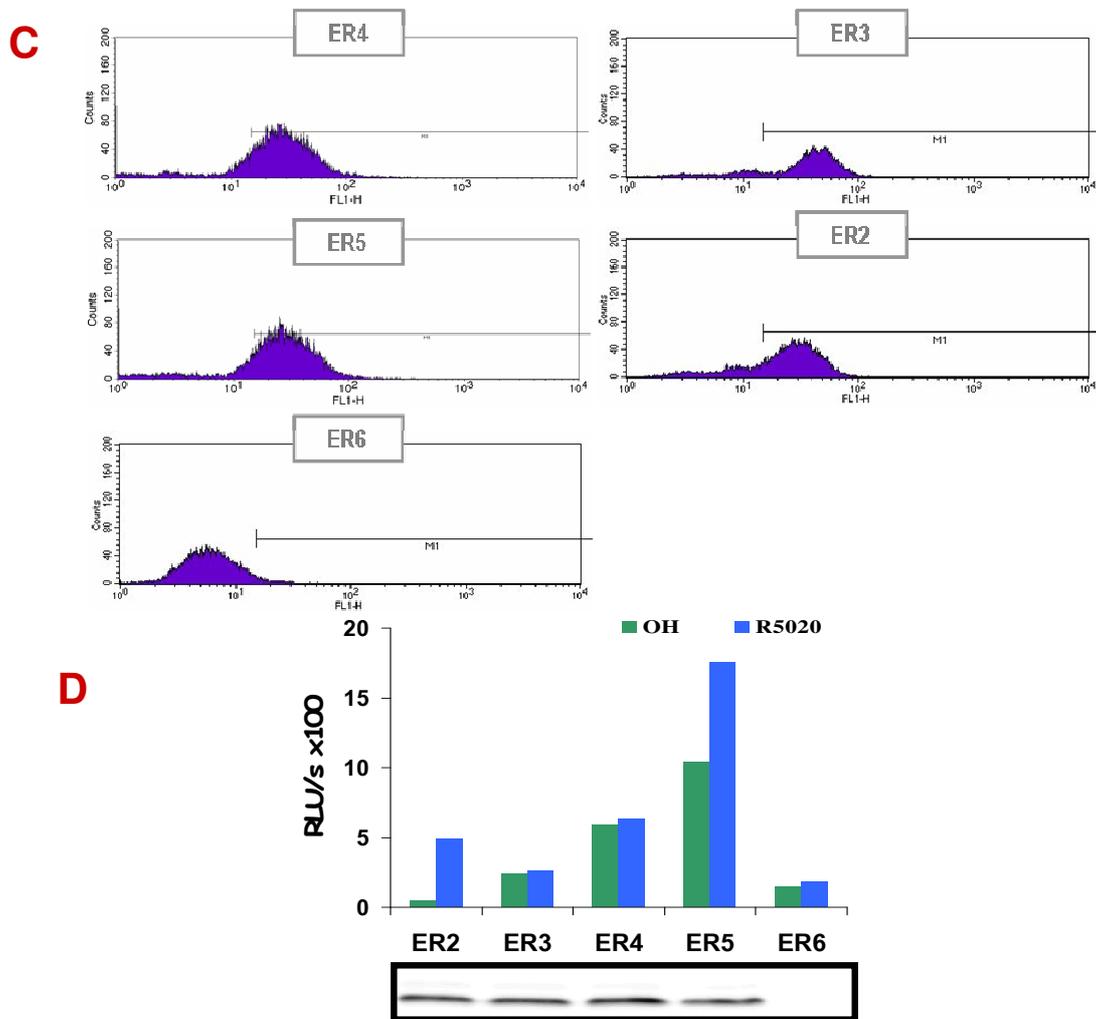
Para analizar la estabilidad a largo plazo de la expresión de hPR<sub>B</sub>-WT, elegimos el clon A1 para llevar a cabo el seguimiento cada dos semanas durante un total de tres meses. Los niveles de expresión de PR medidos mediante WB se mantuvieron durante este período [Fig.

R6-A]. Pasados tres meses de la infección, los niveles de fluorescencia seguían también iguales que al principio [Fig. R6-B]. La mayoría de los clones individuales mostraron una alta estabilidad a largo plazo, independiente de los niveles de expresión de la proteína recombinante.



**FIGURA 6. Estabilidad Y Caracterización De Clones Con Variantes de hPR<sub>B</sub> Establemente Expresados En Células de Cáncer de Mama. (A)** Análisis por Western Blot de la expresión del clon A1 proveniente de las células TYML25.WT a lo largo del tiempo. Recogimos extractos celulares cada dos semanas, manteniendo las células en cultivo. Hibridamos 50 µg de extracto de cada muestra temporal con un anticuerpo contra hPR. Usamos la línea celular T47D como control de la expresión endógena de hPR. **(B)** Análisis por FACS del clon A1 (proveniente de TYML25.WT) tras 3 meses de cultivo. Los gráficos muestran niveles de expresión para GFP a tiempo 0 y tras tener las células mantenidas en cultivo durante 12 semanas.

Tras las conclusiones obtenidas con los clones de la línea salvaje, en cuanto a estabilidad a largo plazo y similitud funcional respecto a la línea parental (T47MVL), repetimos el mismo proceso de infección llevado a cabo en TYML25.WT [WT] para ahora obtener clones provenientes del vector de expresión TAP-hPR<sub>B</sub>.ERID-I (mutante de delección para el dominio ERID de interacción con hER $\alpha$ ). Mediante infección de células TYML25 con la variante ERID y la posterior separación celular individualizada por FACS, conseguimos establecer clones mostrados unos niveles positivos de GFP [Fig. R6-C]. Contrariamente a lo esperado, aunque sus niveles de expresión, medidos por GFP y hPR, eran bastante semejantes, detectamos un comportamiento bastante heterogéneo al medir la inducción del reportero MMTV en respuesta a progesterona. Observamos inducciones de entre 3 y 17 veces según el clon analizado, con unos niveles basales (en ausencia de progesterona) también muy dispares entre clones. Aún sin considerar la variabilidad basal, no podríamos determinar el comportamiento estándar del mutante ERID, ya que los clones ER2-ER5 mostrarían que la mutación afecta parcialmente a la inducción de MMTV y ER3-ER4 que afecta totalmente. En resumen, aunque los niveles de expresión en los clones fueron comparables entre sí, la inducción del gen reportero fue tan diversa que no pudimos determinar cual era el comportamiento real del mutante ERID [Fig. R6-D], o que clon representaría mejor los resultados obtenidos con la población no clonal. Esto implicaba que tendríamos que elegir clones particulares para cada mutante de PR de forma subjetiva, basados en la inducción de MMTV y otro parámetro parcial.



**FIGURA 6. Estabilidad Y Caracterización De Clones Con Variantes de hPR<sub>B</sub> Establemente Expresados En Células de Cáncer de Mama.** (A) Análisis por Western Blot de la expresión del clon A1 proveniente de las células TYML25.WT a lo largo del tiempo. Recogimos extractos celulares cada dos semanas, manteniendo las células en cultivo. Hibridamos 50 µg de extracto de cada muestra temporal con un anticuerpo contra hPR. Usamos la línea celular T47D como control de la expresión endógena de hPR. (B) Análisis por FACS del clon A1 (proveniente de TYML25.WT) tras 3 meses de cultivo. Los gráficos muestran niveles de expresión para GFP a tiempo 0 y tras tener las células mantenidas en cultivo durante 12 semanas.

Tras estos estudios con clones individuales se decidió proseguir el trabajo con las poblaciones iniciales. Descartamos utilizar clones individuales, puesto que corrimos el riesgo de que su comportamiento fuese causado por el lugar de integración de la construcción en el genoma, por las posibles mutaciones, recombinaciones con el gen endógeno u otros efectos particulares que pudiera experimentar una sola célula.

## ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL EN RESPUESTA A PROGESTERONA

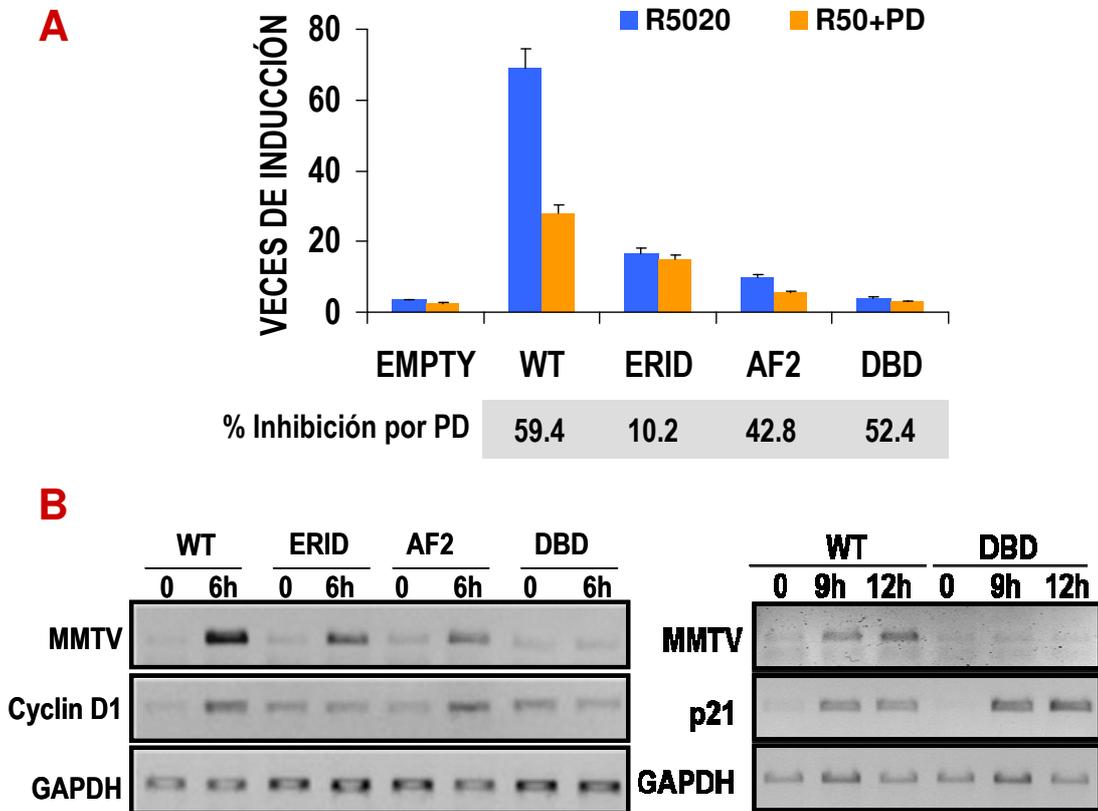
### R.3.1 - RECLUTAMIENTO DE LAS VARIANTES DEL hPR<sub>B</sub> Y ACTIVACIÓN DEL PROMOTOR DE MMTV EN RESPUESTA A PROGESTINA

Como ya hemos comentado, decidimos proseguir nuestros estudios con las poblaciones de células obtenidas tras infectar con cada vector de expresión de las formas mutadas del PR y aislar las células que expresaban GFP. La función de los mutantes establemente expresados en células de cáncer de mama TYML fue analizada para la respuesta del gen reportero MMTVLuc a progestina. Medimos la actividad luciferasa de las líneas celulares generadas, crecidas durante 48h en medio con suero charcolizado, seguido de 24h de tratamiento hormonal. En paralelo, para medir la influencia de la vía MAPK en la actividad transcripcional, se añadió el inhibidor PD (de ERK) 1h antes de la hormona.

El promotor MMTV no respondió a la hormona en la línea celular que contenía el plásmido vacío [EMPTY], a diferencia de en la línea WT donde la activación transcripcional fue máxima [Fig. R7-A]. La respuesta de MMTV a hormona fue reducida en las líneas ERID y AF2, y completamente eliminada en DBD. Esto indica que la activación de MMTV por hPR requiere tanto unión a la región promotora, impedida en la línea DBD, como el reclutamiento de coactivadores, bloqueado en la línea AF2. Contrariamente a lo que habíamos observado en el ensayo luciferasa al transfectar transitoriamente la construcción hPR-ERID [Fig. R2-D], la delección en la línea estable ERID sí que interfería con la inducción de MMTV. Esto indicaba que la interacción PR-ER y la activación de quinasas está también involucrada cuando el promotor diana está integrado en el genoma. Este argumento fue confirmado con el hecho de que el inhibidor PD reducía la activación hormonal del promotor MMTV en un 50% en las líneas WT y AF2 [Fig. R7-A]. La activación parcial en ERID no fue casi afectada por PD, sugiriendo que la diana de PD es un paso ya eliminado con este mutante, presumiblemente la activación de MAPK por la interacción hPR<sub>B</sub>-hER $\alpha$  en respuesta a progestina. Por lo tanto, el MMTV es el primer ejemplo de un promotor que responde a progestina, donde no sólo la función transcripcional del PR es requerida, sino también su habilidad para mediar la activación de cascadas citoplasmáticas de quinasas. Esto fue en paralelo sugerido con el uso de inhibidores de quinasas (Vincent, 2006) y ahora es inequívocamente confirmado usando mutantes funcionales de PR.

De forma complementaria a estudiar la capacidad del MMTV-Luc endógeno de responder a hormona en las líneas construidas mediante ensayo de luciferasa, también llevamos

a cabo una RT-PCR con primers específicos para el gen de luciferasa. En este caso la duración de la inducción hormonal fue de 6 horas. De modo que, obtuvimos resultados muy parecidos: el mutante hPR-DBD es incapaz de activar al promotor MMTV, mientras que los mutantes ERID y AF2 lo hacen parcialmente [Fig. R7-B].



**FIGURA 7. Efectos De La Actividad Transcripcional En Las Variantes hBCC. (A)** Transactivación del gen reportero endógeno MMTVLuc por progesterina en células estables expresando variantes de hPR<sub>B</sub>. Tras 48 horas en medio mínimo con suero charcolizado, añadimos R5020 durante 24 horas. Alternativamente, 50UM de PD98059 (un inhibidor de la activación de Erk) es añadido 1 hora antes de tratar con hormonal. Mostramos las veces de inducción de líneas tratadas respecto al diluyente. Para la normalización usamos iguales cantidades de extracto celular de cada muestra. Los valores representados son la media de las unidades arbitrarias mas/menos la desviación estándar de dos experimentos hechos por duplicado. Las veces de inducción en respuesta a hormona comparadas a etanol es lo que mostramos de cada construcción. **(B)** Expresión de mRNA MMTVLuc en respuesta a progesterina. Células TYML25 expresando hPR<sub>B</sub> o hPR<sub>B</sub>-DBD, son tratadas con R5020 10nM durante 9 o 12 horas o con etanol diluido. Las células son recogidas y el RNA total es extraído. La expresión del mRNA de los genes MMTVLuc, Ciclina D1 y p21 es analizada por RTPCR con oligos específicos. También son usados primers específicos para medir el cDNA de GAPDH como control. Los productos de PCR son corridos en genes de agarosa 1,2% y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

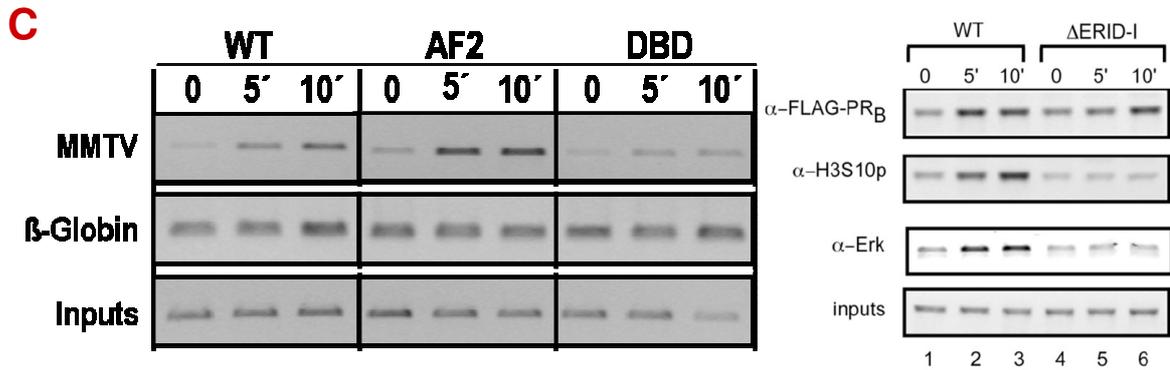
Existen otros genes clásicos que responden a hormona esteroideas, sin HREs conocidos en sus secuencias promotoras, cuya inducción se lleva a cabo a través de la interacción del receptor hormonal con factores transcripcionales mediadores, como Sp1 o Ap1, sin que exista

una conexión directa de SR (receptor para hormonas esteroideas) con el DNA. Se ha propuesto que el gen CCND1 se activa en respuesta a hormona mediante el reclutamiento de hPR por el factor AP1, y que el gen para p21 (CDKN1A) lo hace reclutando hPR a sitios Sp1. Hemos usado nuestras líneas para investigar la inducción hormonal de estos dos genes en presencia de los distintos mutantes de hPR

El análisis en este tipo de genes mostró que el promotor de Ciclina D1 (CCND1) responde a progesterona en las líneas WT, AF2 pero no en ERID o DBD, en cambio el promotor de p21 (CDKN1A) no se vio afectado por la mutación de la línea DBD tras 9-12 horas de tratamiento hormonal. Estos resultados indican que la activación de MAPK kinasas, ausente en la línea ERID, es fundamental en la expresión de Ciclina D1 y que la inducción del gen p21 no requiere de la unión directa al DNA [Fig. R7-B]. Sorprendentemente, el gen CCND1 no se activó con la línea mutante DBD, sugiriendo que sí puede haber participación de la unión de hPR al DNA en la activación de este promotor, no descrito hasta el momento, o bien que, el dominio DBD es también necesario para la interacción con AP1. En el caso del gen p21, nuestros resultados indicarían que el dominio DBD no está implicado en el reclutamiento mediado por Sp1. Volveremos sobre estas cuestiones mas adelante.

Mediante la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se ha demostrado el reclutamiento de hPR al promotor integrado MMTV, en la línea T47MVL, tras cortos tiempos de tratamiento hormonal (Vicent, 2006). Nosotros hemos analizado el reclutamiento de las diferentes formas variantes de hPR<sub>B</sub> al promotor MMTV por ChIP, para confirmar el reclutamiento de la forma salvaje, la incapacidad para unirse a los PREs del hPR-DBD, y comprender mejor el comportamiento de los otros dos mutantes de hPR<sub>B</sub> HPR-AF2 y hPR-ERID. Por ello células sin suero fueron tratadas con R5020 durante 5 o 10 minutos, entonces fijadas con formaldehído y sonicadas para obtener fragmentos de cromatina de aproximadamente 400bp (**Ver Material y Métodos**). Usamos el anticuerpo Flag para precipitar la cromatina asociada a PR y analizamos la presencia de la región del nucleosoma B del MMTV mediante amplificación por PCR usando oligos específicos. Vimos como HPR-WT fue reclutado al promotor MMTV tras 5-10 minutos de estimulación con hormona, también el HPR-ERID y HPR-AF2 [Fig. R7-C]. Esto indica que estos dos mutantes no tienen alterada su habilidad para unirse al DNA del promotor MMTV en respuesta a hormona, descartando esto como la causa de la disminuida activación del promotor. Inversamente, HPR-DBD no fue encontrado en el promotor, confirmando que la triple mutación bloque la posibilidad de unión a PREs [Fig. R7-C]. Adicionalmente, comentar que aunque HPR-ERID no ha perdido su capacidad de unirse al DNA si hay ciertos eventos posteriores que están afectados, como por ejemplo el reclutamiento del complejo Erk-Msk y la fosforilación de la

Histona H3 en Ser10 (H3Ser10) descrita como implicada en la activación de MMTV y consecuencia directa de la incapacidad de ERID de activar la señalización ER / c-Src / Ras / Erk / Msk.



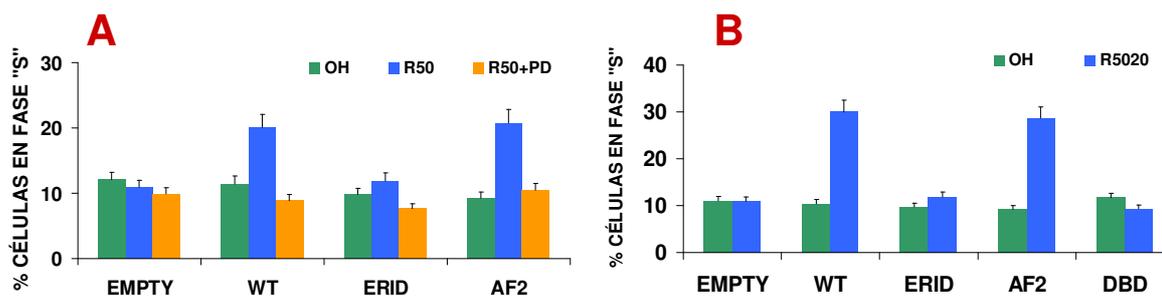
**FIGURA 7. Efectos De La Actividad Transcripcional En Las Variantes hBCC. (C)** Análisis de inmunoprecipitación de cromatina del reclutamiento de las variantes de hPR<sub>B</sub> al promotor endógeno MMTV en respuesta a progestina. Las células son tratadas con R5020 10 nM durante 5 o 10 minutos, recogidas, y usadas para el experimento de ChIP con anticuerpos contra Flag, Erk y pSer10-H3. Los fragmentos precipitados son sujetos a un análisis por PCR con oligos específicos correspondientes al nucleosoma B MMTV, y el gen  $\beta$ -globina como control.

### R.3.2 - PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR PROGESTERONA

Se ha descrito como la respuesta proliferativa de las células de cáncer de mama a progestina podría venir de la activación de las cascadas de señalización mas que de una activación directa transcripcional (Skildum, 2005).

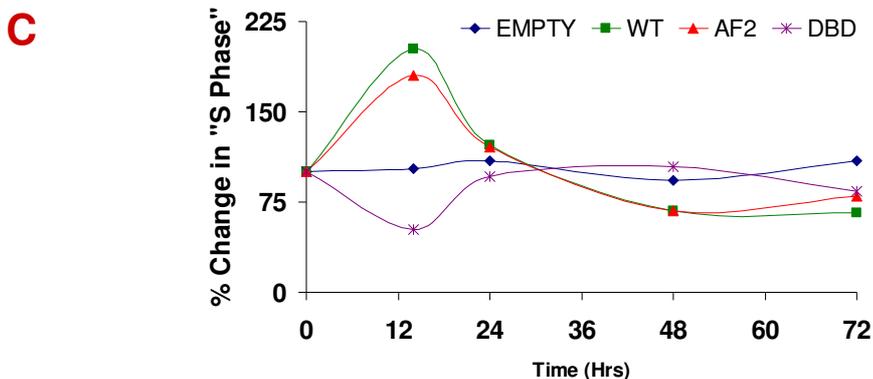
Para determinar si la cascada de señalización ER / c-Src / Erk esta implicada en la mediación de los efectos proliferativos inducidos por progesterona, analizamos la habilidad proliferativa de la línea mutante ERID. Tras arrestar las células durante 2 días en ausencia de suero, analizamos la distribución de ciclo celular después de 16h de tratamiento hormonal de las células variantes teñidas con Ioduro de Propidio (IP). En células expresando el hPR-WT R5020 incrementó el porcentaje de células en fase S del 9 al 20% [Fig. R8-A]. Este incremento no fue observado en células expresando el mutante ERID, indicando que la interacción con ER es requerida para provocar la señalización que llevará a la proliferación celular, y confirmando el esperado defecto funcional de este mutante. Tampoco observamos inducción tras tratar con el inhibidor PD la línea celular WT, mostrando que la activación de MAPK es necesaria para mediar el efecto proliferativo en células de cáncer de mama mediado por progesterona Además, en paralelo, ensayos de proliferación en la línea celular T47MVL mostraron ausencia de la capacidad proliferativa inducida por progestina cuando están presentes los inhibidores ICI (antagonista de hER $\alpha$ ) y PD (bloquea Erk), viniendo a confirmar la importancia de la cascada ER / c-Src / Erk sobre estos efectos de ciclo celular.

Para responder la pregunta de si la vía no genómica o citoplasmática es completamente responsable de la proliferación celular inducida por hormona en células de cáncer de mama, analizamos la habilidad de la línea DBD para llevar a cabo estos efectos mediante un ensayo de incorporación de IP. En el DBD, donde la función transcripcional ha sido eliminada, inesperadamente comprobamos que tampoco era capaz de inducir proliferación en respuesta a hormona [Fig. R8-B]. Por otro lado, AF2 no vio mermada su habilidad para mediar proliferación en respuesta a progestina, incrementando el porcentaje de células en fase S del 12 al 29%.



**FIGURA 8. Capacidad Proliferativa En Respuesta A Progesterona De Las Líneas Mutantes hBCC.** (A) Efectos de los mutantes de hPR<sub>B</sub> ERID y AF2 en la proliferación celular inducida por progesterona en células estables de cáncer de mama. Las células son crecidas 48 horas en medio libre de suero, seguidas por 16 horas de incubación con R5020 10nM o etanol, y pretratadas (1 hora antes) o no con 50µM de PD98059. La distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular se evalúa por FACS de células teñidas con yoduro de propidio. El gráfico muestra el porcentaje de células en fase S, como media de dos muestras independientes llevadas en paralelo. (B) Efectos de los mutantes de hPR<sub>B</sub> ERID, AF2 y DBD en la proliferación celular inducida por progesterona en células estables de cáncer de mama. Las células son crecidas 48 horas en medio libre de suero, seguidas por 16 horas de incubación con R5020 10nM o etanol. La distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular se evalúa por FACS de células teñidas con yoduro de propidio. El gráfico muestra el porcentaje de células en fase S, como media de dos muestras independientes llevadas en paralelo.

Con objeto de analizar en más detalle el comportamiento proliferativo de la línea DBD a lo largo del tiempo, hicimos un nuevo ensayo de yoduro de propidio para diferentes tiempos de tratamiento hormonal (14-24-48-72h). Observamos como la mutación hPR-DBD no sólo había eliminado la capacidad del hPR de inducir proliferación en respuesta a hormona tras 14 horas de exposición, sino que esta mutación le había conferido la habilidad de arrestar un 40% de las células en la fase G0/G1 sin posibilidad de paso hacia fase S [Fig. R8-C]. Asimismo, las líneas WT y AF2 mantenían intactas su capacidad de respuesta proliferativa tras las 14h de estímulo hormonal con incrementos de entre el 86-94% en el número de células en fase S respecto a tiempo inicial. En general, tanto la línea salvaje WT como AF2 mostraron las mismas curvas de proliferación alcanzando un arresto celular tras 48 horas del tratamiento hormonal, y tras 72 horas la vuelta a los niveles iniciales de ciclo celular. A diferencia de DBD que mostró el arresto celular a tiempos cortos de tratamiento. Finalmente, la línea celular vacía EMPTY no mostró ninguna respuesta al tratamiento con progestina.



**FIGURA 8. Capacidad Proliferativa En Respuesta A Progesterona De Las Líneas Mutantes hBCC. (C)** Efectos de los mutantes de hPR<sub>B</sub> en la proliferación celular inducida por progesterona en células estables de cáncer de mama. Las células son crecidas 24 horas en medio libre de suero, seguidas por incubaciones de 14-24-48-72 horas con R5020 10nM o etanol. La distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular se evalúa por FACS de células teñidas con yoduro de propidio. El gráfico muestra el porcentaje de células en fase S, como media de dos muestras independientes llevadas en paralelo.

En conclusión, además de la conocida implicación de las funciones no-genómicas, parece que algún gen(es) controlado con la intervención del dominio de unión a DNA (DBD) de hPR, juega un papel central en el control de la proliferación. Como se verá después, creemos que el gen de Ciclina D1 podría ser este gen clave.

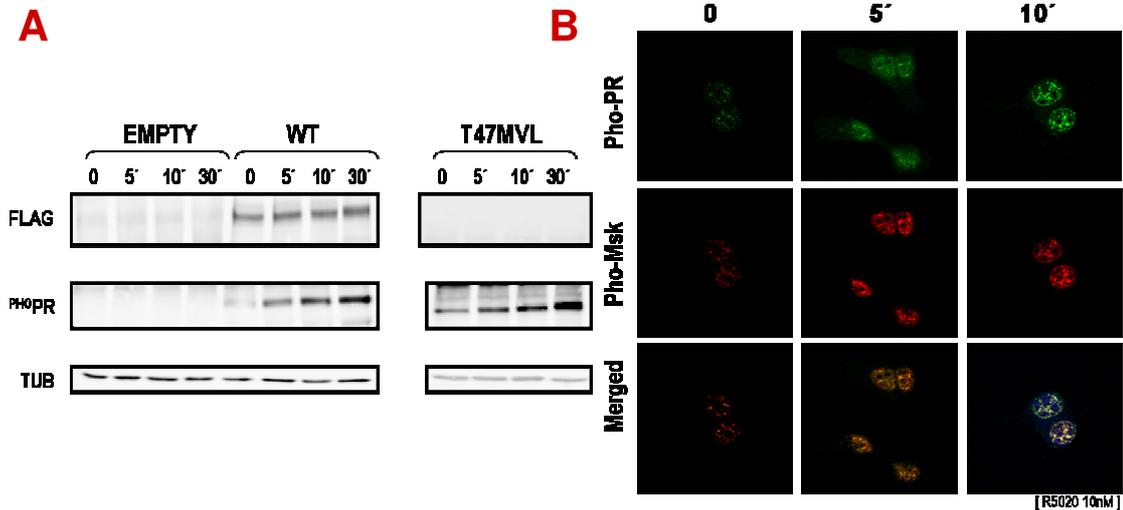
### R.3.3 - ACTIVACIÓN DE MAPK INDUCIDA POR PROGESTERONA

Los efectos de fosforilación y desfosforilación añaden un nuevo nivel de complejidad a las acciones del hPR. Generalmente, a la fosforilación se le atribuye un papel regulador positivo afectando al recambio, la translocación o la transcripción. Como otros receptores esteroideos el hPR puede ser fosforilado por múltiples kinasas CDKs, MAPKs o GSKs en alguno de sus 14 residuos conocidos. Uno de los residuos clave para mediar estos efectos es la Serina 294, que se fosforila rápidamente por MAPK tras tratamiento hormonal (Lange, 2000).

Con el propósito de confirmar la fosforilación del hPR recombinante de la línea WT, inducida por progesterona en el residuo Ser294, medimos la proteína fosforilada tras 5-10-30 minutos de tratamiento con R5020. Observamos que tanto la línea WT como la parental T47MVL muestran el mismo patrón de fosforilación para el residuo 294 a corto tiempo de exposición hormonal [Fig. R9-A].

Por otro lado, se ha descrito que en la activación del MMTV participa un complejo triple reclutado al promotor a corta exposición a hormona, formado por PhohPR<sub>B</sub>Ser294 (pPR<sup>294</sup>), PhoErk42/44 (pErk) y PhoMsk1(pMsk) (Vicent, 2006). Para comprobar como el hPR se encuentra postranscripcionalmente modificado en el núcleo, y que PhoMsk esta colocalizando

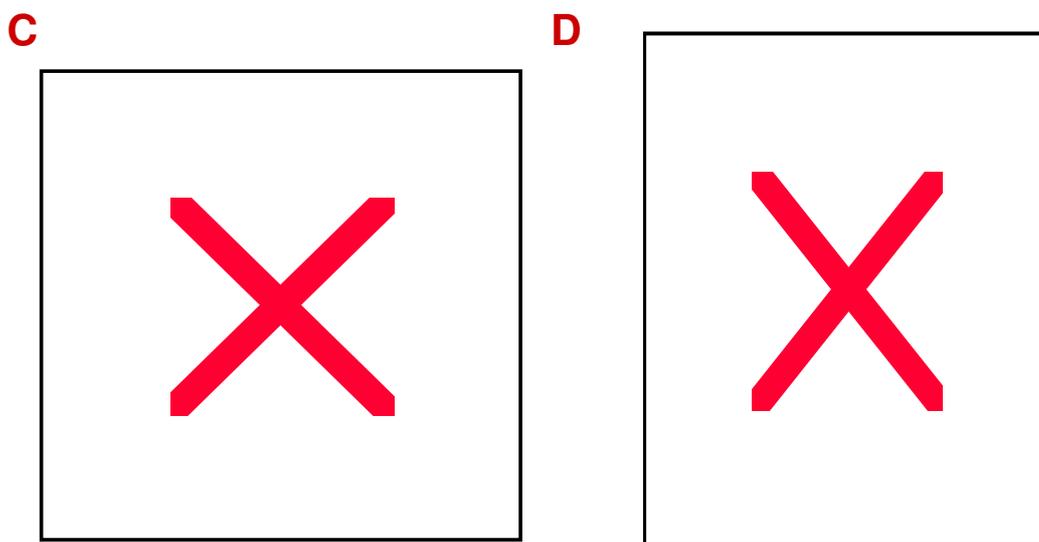
con este hPR modificado, llevamos a cabo un ensayo de inmunofluorescencia usando un anticuerpo contra pPR<sup>294</sup> y otro para pMsk. Tras 10 minutos de tratamiento con progestina ambas proteínas muestran una distribución granular muy similar dentro del núcleo, colocalizando como demuestra la imagen de solapamiento de ambas fluorescencias [Fig. R9-B]. De este modo, ambas proteínas muestran una distribución nuclear compatible con la formación del complejo, y una activación por fosforilación tras 5-10 minutos de progestina.



**FIGURA 9. Activación De Las Rutas De Señalización En Respuesta A Progesterona De Las Funcionalmente Deficientes hBCC. (A)** Modificación postranscripcional por fosforilación de hPRB. Células cultivadas en medio blanco (desprovisto de esteroides) durante 48 horas, seguido por 24 horas sin suero, se les añade durante 5-10-30 minutos R5020 10nM. Los lisados son analizados por western blot con anticuerpos contra a forma fosforilada de hPR. **(B)** Detección por inmunofluorescencia de la colocalización subcelular de pPR y pMsk. Las células plaqueadas sobres cubres son tratadas durante 5-10 minutos con R5020 o no tratadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos contra hPR fosforilado en la serina 294 (pPR) o contra Msk1 fosforilado (pMsk1). Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas con un sistema de microscopia de laser confocal.

Como hemos mencionado antes, la progestina causa la activación directa (Boonyaratanakornkit, 2001) o indirecta por hER $\alpha$  (Ballaré, 2003) de MAPK a través de c-Src, regulando la actividad transcripcional dependiente de hormona del hPR y la expresión génica. Con objeto de comprobar como la vía de las quinasas fosforila a los hPR recombinantes y como la línea ERID (incapaz de llevar a cabo la activación indirecta por hER $\alpha$ ) no induce la vía MAPK, tratamos todas las líneas celulares con progestina a 5-10-30 minutos. La hibridación con los anticuerpos para el pPR<sup>294</sup> y pErk indican que sólo la línea ERID es incapaz de inducir en respuesta a hormona la activación de quinasas, y como las demás líneas llevan a cabo estos efectos en la misma medida que la línea parental [Fig. R9-C]. Por otro lado, la no detección de pPR<sup>294</sup> en la línea ERID se debe a que la delección del dominio ERID-I incluye este residuo. Otro hecho relevante detectado con este ensayo es que, los niveles inducidos de Erk por el tratamiento hormonal estaban claramente disminuidos en cualquiera de las líneas procedentes de TYML con respecto a la línea parental T47D, indicando una posible reducción general en la activación de la cascada MAPK inducida por hormona para las líneas celulares generadas.

Se ha descrito que los factores de crecimiento regulan el crecimiento celular iniciando las rutas intracelulares de transducción de señales mitogénicas durante la progresión del cáncer. En este sentido, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) inicia la cascada de MAPKs, siendo un importante potenciador por fosforilación de las acciones del hPR. De modo que, para demostrar que la activación de la ruta Ras/Erk tras una estimulación no dependiente de hormonas esteroideas esta disminuida en nuestras células WT (provenientes de T47Dy) y no en la parental T47D, analizamos la activación de la kinasa Erk por EGF mediante hibridación con un anticuerpo específico. Encontramos que los niveles de expresión de la cascada MAPK en nuestra línea celular son inferiores a los alcanzados por la línea parental [Fig. R9-D].



**FIGURA 9. Activación De Las Rutas De Señalización En Respuesta A Progesterona De Las Funcionalmente Deficientes hBCC. (A)** Modificación postranscripcional por fosforilación de hPRB. Células **C.** Análisis de la activación de rutas citoplasmáticas de kinasas MAPK en células de cáncer de mama en respuesta a progesterona. Durante 48 horas las células son crecidas en medio blanco, seguido por 24 horas sin suero, antes de tratarlas 30 minutos con R5020 10nM. Los extractos celulares son analizados por hibridaciones con anticuerpos contra la forma fosforilada de Erk (pErk1/2), Erk total, pPR y hPR total. **(D)** Análisis de la activación de rutas citoplasmáticas de kinasas MAPK en células de cáncer de mama en respuesta a factores mitogénicos como EGF. Durante 48 horas las células son crecidas en medio blanco, seguido por 24 horas sin suero, antes de tratarlas 30 minutos con EGF 20nM. Los extractos celulares son analizados por hibridaciones con anticuerpos contra la forma fosforilada de Erk (pErk1/2), Erk total.

Estos últimos resultados implicaban que la cascada MAPK en las células T47Dy (desprovistas de hPR), esta significativamente disminuida. Sin embargo, esta reducción mitogénica no parecía afectar a aquellos efectos dónde la cascada estaría implicada, como de activación transcripcional, de proliferación, ... mediados por hPR en respuesta a progestina.

### R.3.4 – CROSSTALK CON EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

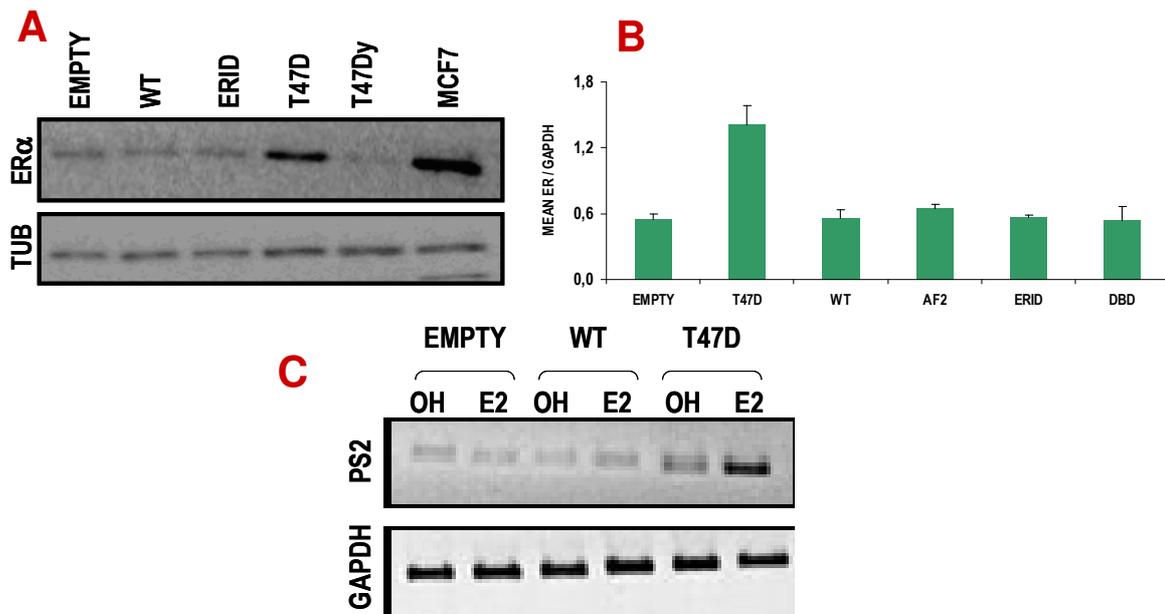
Previamente, el laboratorio ha publicado que entre el 3-5% del hPR celular en la línea de cáncer de mama T47D esta localizado en el citoplasma formando con un complejo con hER $\alpha$

por interacción de dos dominios en el extremo N Terminal (ERID-I y ERID-II) del hPR<sub>B</sub> con el dominio de unión a ligando (LBD) del hER $\alpha$  (Ballaré, 2003). Que el complejo activado por progestina, interacciona con c-Src desencadenando la ruta Src/p21Ras/Erk.

La conclusión del apartado anterior sobre la activación de la cascada de señalización de Erk por progesterona, finalizaba mostrando una clara disminución de la señalización inducida de la vía MAPK de la línea T47Dy respecto a la línea parental. Pues bien, con objeto de encontrar una explicación a esta disminución y a causa de las dificultades en la detección del complejo citoplasmático triple hPR/ER/Src, nos planteamos la posibilidad de el motivo de ambos fenómenos fuese la expresión reducida del receptor de estrógenos en esta línea celular T47Dy.

Con el propósito de cuantificar a nivel de proteína la cantidad de hER $\alpha$  endógeno presente en las líneas celulares generadas, medimos los niveles por hibridación por WB usando un anticuerpo específico de esta isoforma  $\alpha$  del receptor de estrógenos [Fig. R10-A]. Confirmándose la clara disminución en la expresión de hER $\alpha$  en las líneas celulares provenientes de T47Dy. Para verificar si ya a nivel de mensajero la expresión es reducida, cuantificamos mediante RT-PCR en tiempo real los niveles de expresión de transcrito para este gen. Obteniendo que a nivel de RNA mensajero los niveles de expresión de hER $\alpha$  de las líneas celulares son al menos un 50% menor que los de la línea parental [Fig. R10-B], al igual que ocurría con los niveles proteicos.

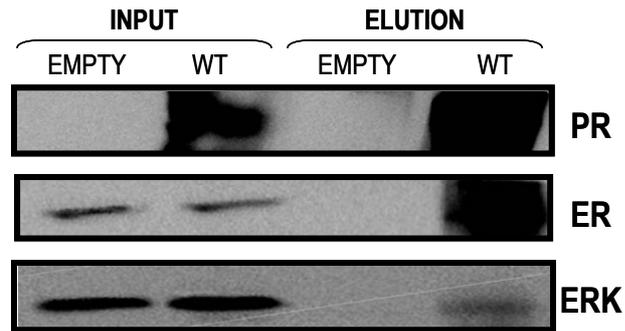
A continuación para averiguar si la cantidad de hER $\alpha$  presente en la línea celular diana (T47Dy) era suficiente para regular la expresión de genes clásicos de respuesta a estradiol, tratamos las células durante 6 horas con la hormona y medimos los niveles de expresión del mensajero para el gen pS2 por RT-PCR en tiempo real. La inducción de pS2 en la línea T47D fue usada como control positivo de inducción [Fig. R10-C], demostrando que la reducción de la cantidad de hER $\alpha$  en las líneas generadas afectaba a la regulación de la expresión génica por estradiol.



**FIGURA 10. Niveles Endógenos de Expresión Para El Receptor De Estrógenos En Las Líneas Generadas hBCC. (A)** Análisis por Western Blot de la expresión de ER $\alpha$  en células de cáncer de mama. Recogimos extractos celulares de las líneas celulares T47D, MCF7, T47Dy y las derivadas de esta última. Hibridamos 50  $\mu$ g de extracto de cada muestra con un anticuerpo contra ER $\alpha$ . **(B)** Niveles de expresión de mRNA pS2 en respuesta a estradiol para las líneas WT, EMPTY y T47D. Las células fueron recogidas para la extracción del RNA total y analizada la expresión de mRNA de pS2 (gen clásico de respuesta a E2) por RT-PCR con oligos específicos. Los oligos específicos para el cDNA de GAPDH son usados como control. Los productos de PCR son cargados en geles de agarosa al 1,2% y teñidos con bromuro de etidio para su visualización. **(C)** Niveles de expresión de mRNA para hPR $\beta$ . Las células TYML25 expresando hPR $\beta$  o las forma mutadas, fueron recogidas para la extracción del RNA total. Analizamos la expresión del mRNA de hPR $\beta$  (para comparar niveles) y de la región 3'UTR no codificante (para descartar expresión endógena de hPR $\beta$  en TYML25) por RT-PCR en tiempo real con oligos específicos. Los oligos específicos para el cDNA de GAPDH son usados como control.

Como hemos mencionado al principio, la detección del complejo triple citoplasmático hPR $\beta$ /ER $\alpha$ /c-Src mediante inmunoprecipitación había sido infructuosa. Ahora bien, tras conocer que los niveles de expresión de ER $\alpha$  estaban disminuidos respecto a los de la línea parental y con objeto de demostrar que la cantidad de hER $\alpha$  no es un obstáculo para la formación del complejo citoplasmático hER $\alpha$ -hPR $\beta$ , llevamos a cabo una nueva inmunoprecipitación de hPR-WT aumentando drásticamente el número de células requeridas para el ensayo incrementando así la concentración de proteína hPR-WT. El WB posterior desvelo la existencia del complejo preformado hER $\alpha$  - hPR $\beta$  - Erk, cuando hPR $\beta$  es expresado en las células [Fig. R19-D]. Anteriormente, la viabilidad e importancia de la función de hER $\alpha$  en el complejo, ya quedo patente con el ensayo de luciferasa [Fig. R3-D], que demostraba que al tratar las células con ICI (antagonista de ER) provocaba una disminución de los efectos transcripcionales sobre MMTV inducidos por progestina.

**D**



**FIGURA 10. Niveles Endógenos de Expresión Para El Receptor De Estrógenos En Las Líneas Generadas hBCC. (D)** Inmunoprecipitación para detectar de la interacción in vivo entre hPR<sub>B</sub> y ER $\alpha$ . Células creciendo en medio sin suero son incubadas con o sin R5020 10nM durante 15 minutos antes de la extracción celular. Los lisados celulares son inmunoprecipitados con un anticuerpo contra Flag y el material separado de las beads es analizado por Western Blot con anticuerpos contra ER $\alpha$ , Flag y Erk.

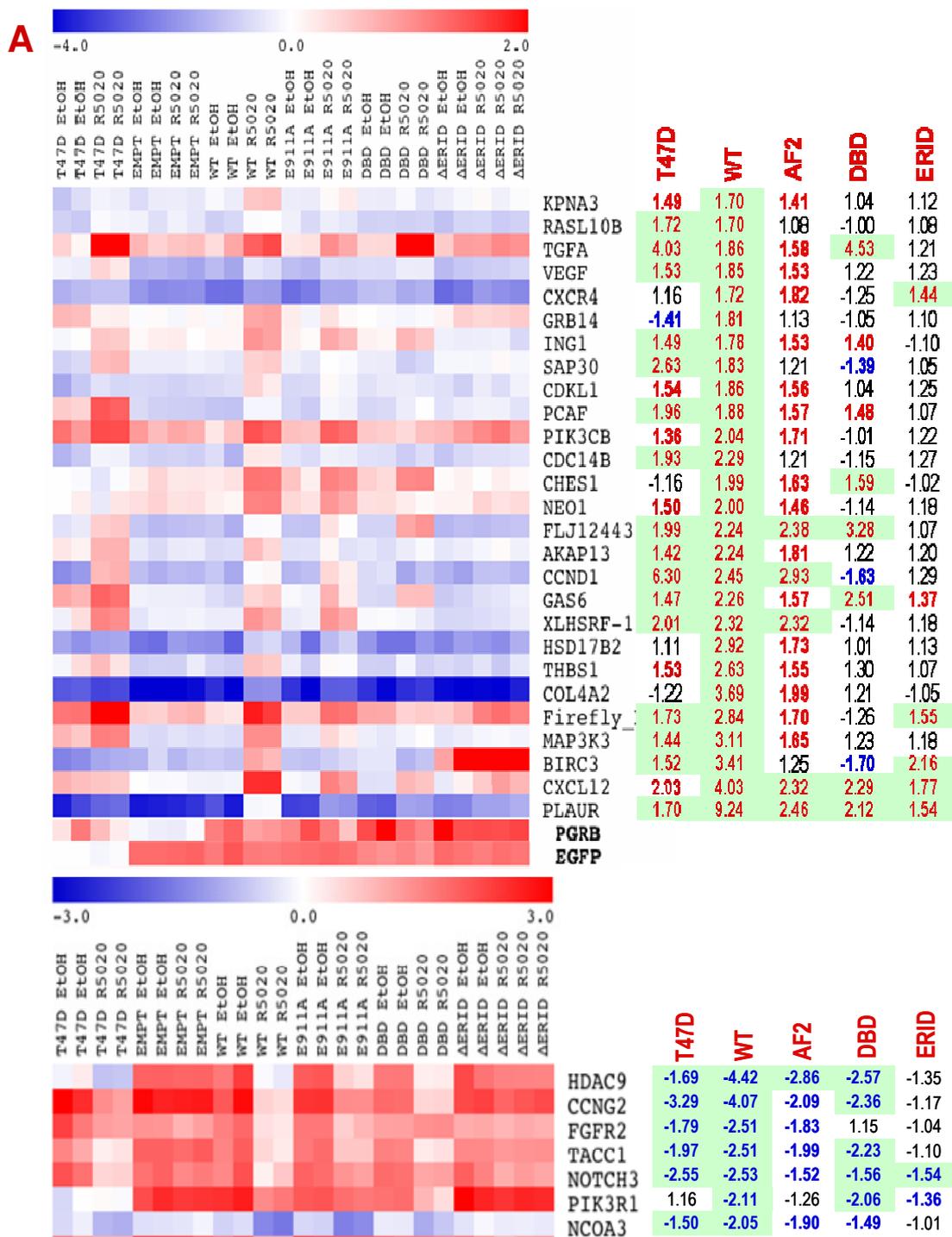
En resumen, la cantidad disminuida de hER $\alpha$  presente en las líneas celulares es incapaz de llevar a cabo la regulación de genes en respuesta a estradiol, sin embargo es suficiente para mediar los efectos citoplasmáticos de las acciones de hPR<sub>B</sub> en respuesta a progestina.

### R.4.1 - ANÁLISIS POR MICROARRAYS DE LOS GENES QUE RESPONDEN A PROGESTERONA EN LÍNEAS CELULARES EXPRESANDO MUTANTES DEL hPR<sub>B</sub>

A continuación, nos propusimos identificar el conjunto de genes que respondían a progestina en células expresando variantes defectivas del hPR<sub>B</sub>. Con este propósito usamos un microarray diseñado para contener 700 genes de interés en cáncer de mama por su implicación en ciclo celular, transducción de señales, cromatina o transcripción. Experimentos previos con diferentes tiempos de tratamiento hormonal en células T47D, para esta misma plataforma, muestran que tras 6 horas un gran número de genes cambian su expresión (Ballaré, 2007-Manuscrito). Por otro lado, con la excepción de los genes de activación temprana (1-2h), los cambios de expresión de la mayoría de genes diana de la progesterona son de pequeña magnitud hasta las 6 horas de tratamiento.

Tanto las células TYML25 conteniendo el vector vacío [EMPTY], como las líneas WT, ERID, AF2 o DBD y la línea parental T47D fueron privadas de suero durante 48h y tratadas posteriormente con hormona (R5020 10nM) durante 6h. Tras el tratamiento, se extrajo el RNA de las líneas para hibridarlas en el microarray de cDNA. Antes de esto, analizamos por RT-PCR la expresión de MMTV-Luc como control interno del experimento, obteniendo resultados similares a los obtenidos midiendo la expresión de luciferasa, y confirmando que el DBD había perdido completamente la capacidad de activar el MMTV, mientras el ERID o el AF2 perdieron su capacidad solo parcialmente [Fig. R11-A].

Con los datos obtenidos de tres hibridaciones independientes separadas en el tiempo a partir de muestras duplicadas para todas las líneas celulares, procedimos a filtrar y buscar significación estadística mediante SAM usando el programa estadístico TIGR Mev ( $p=0.01$ ). Entre los ~700 transcritos únicos probados, 55 (~8%) fueron regulados por hPR<sub>B</sub> con inducciones  $\geq(1.5)$  o  $\leq(-1.5)$ , aunque finalmente 34 fueron los encontrados estadísticamente significativos en los tres experimentos para la línea WT, 27 para inducción positiva y 7 para represión por hormona [Fig. R11-A] (Ver tabla de referencias [Tabla T1]).



**FIGURA 11. Panorama De Regulación Génica Por Progesterona Para Las Líneas Celulares Estables De Cáncer de Mama. (A)** Diagrama de grupo / Dendrograma de genes regulados por progesterona R5020 a 6 horas y en ausencia para líneas celulares expresando variantes del hPR $\beta$ . Las células fueron crecidas en medio con suero charcoalizado durante 48 horas y otras 24 en ausencia de suero, entonces tratadas con 10nM de progesterona o etanol. RNA celular fue preparado e hibridado en el Human Cancer Chip (CRG) con 700 genes humanos. Cada análisis fue hecho en muestras duplicadas, de tres experimentos separados en el tiempo. Rojo y azul significan inducciones positivas y negativas ( $1.4 \geq$  ;  $\leq -1.4$ ) aunque no estadísticamente significativas y el subrayado verde de las significaciones estadísticas. Cada columna significa un tipo celular y cada fila en gen.

# T1

Symbol	Name / Description	Acc No
AKAP13	A kinase (PRKA) anchor protein 13 (guanine nucleotide exchange factor)	NM_007200
BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3 (Inhibitor of apoptosis protein 1)	NM_001165
CCND1	Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	NM_053056
CCNG2	Cyclin G2	NM_004354
CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae)	NM_033332
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	NM_004360
CDKL1	Cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)	NM_004196
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	NM_078467
COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2	NM_001846
CTSL2	Cathepsin L2	NM_001912
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	NM_000609
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	NM_003467
CHES1	Checkpoint suppressor 1	NM_005197
DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	NM_004396
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1 = MKP1	NM_004417
EGFR	Epidermal growth factor receptor ( v-erb-b oncogene homolog, avian)	NM_005228
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2 (Crouzon/vJackson-Weiss syndrome)	NM_023028
FLJ12443	Acytransferase like 2	NM_024830
FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	NM_005252
GAS6	Growth arrest-specific 6	NM_000820
GRB14	Growth factor receptor-bound protein 14	NM_004490
HDAC9	Histone deacetylase 9	NM_178423
HSD11B2	Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2	NM_000196
HSD17B2	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	NM_002153
IFIT2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	NM_001547
ING1	Inhibitor of growth family, member 1	NM_005537
JUN	V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	NM_002228
KPNA3	Karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)	NM_002267
MAP3K3	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	NM_002401
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus	
MUCL2	MUC2L/MUC2L	BG675392
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	NM_002467
NCOA3	Nuclear receptor coactivator 3 = AIB1= SRC3	NM_006534
NEO1	Neogenin homolog 1 (chicken)	NM_002499
NFIB	Nuclear factor I/B	NM_005596
NOTCH3	Notch homolog 3 (Drosophila)	NM_000435
PCAF	P300/CBP-associated factor	NM_003884
PGR	Progesterone receptor	NM_000926
PIK3CB	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	NM_006219
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)	NM_181504
PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	NM_002659
QSCN6	Quiescin Q6	NM_002826
RASL10B		
SAP30	Sin3-associated polypeptide, 30kDa (HDAC complex subunit SAP30)	NM_002953
SOS1	Son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	NM_005633
STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A	NM_003152
TACC1	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	NM_006283
TGFa	Transforming growth factor, alpha	NM_003236
THBS1	Thrombospondin 1	NM_003246
VEGF	Vascular endothelial growth factor	NM_003376
WNT5A	Wnt-5a protein precursor= Wingless-type MMTV integration site family	NM_003392
XLHRSF-1	Dynein, axonemal, heavy polypeptide 1 (AYTL2)	AB037831
ZNF350	Zinc finger protein 350	NM_021632

Tabla T1. Tabla de significaciones de los genes, su significado y número de acceso.

Encontramos que existe un buen grado de concordancia (65%) entre los genes regulados por inducción positiva significativamente en la línea WT respecto a su parental T47D, sin incluir un 23% de genes inducidos aunque no significativos estadísticamente (al 99% de confianza), atribuyendo la diferencia restante (18%) a la expresión endógena de la isoforma PR<sub>A</sub> en la línea parental junto al PR<sub>B</sub>. Un estudio publicado recientemente, señala que la presencia de PR<sub>A</sub> en células humanas de cáncer de mama provoca la adquisición de la respuesta a progestina de un pequeño pero importante subgrupo de genes diana específicos en rutas de señalización, que influyen en la morfología y las propiedades de adhesión celular. Otra publicación anterior, subraya que cuando PR<sub>A</sub> y PR<sub>B</sub> son expresadas independientemente de modo inducible en células de cáncer negativas para PR, estas muestran diferencias génicas específicas para cada isoforma. Además, inducir la expresión de PR<sub>A</sub> provoca que las células se vuelvan más adherentes, y migren con mayor facilidad (Jacobsen, 2002).

Si comparamos los datos obtenidos respecto a inducción génica de las líneas celulares defectivas respecto a la línea salvaje, encontramos comportamientos diversos según el dominio del hPR<sub>B</sub> implicado en la regulación:

- Casi todos los genes regulados en la línea celular **AF2** no estaban afectados o sólo parcialmente por la mutación E911A del dominio de transactivación del hPR<sub>B</sub>. Por el contrario, los genes BIRC3, AKAP13, CDC14B, SOS1, GRB14 y RASL10B estaban claramente afectados.
- Las mutaciones en el dominio **DBD** del hPR<sub>B</sub> eliminaron la respuesta hormonal de la mayoría de genes, entre ellos el gen reportero MMTVLuc, MAP3K3, AKAP13, CDC14B y PIK3CB. Por otro lado, algunos genes respondían negativamente a la hormona en presencia de la mutación DBD: CCND1, GRB14 y SAP30. Otros pocos genes quedaron inalterados (GAS6 y AYTL2), y sorprendentemente, la inducción de FOS y TGF $\alpha$  por hormona estaba claramente aumentada en la línea celular DBD.
- Los datos con la línea celular que expresa hPR<sub>B</sub>-**ERID** como la mayoría de los genes que responden a hormona dependen del dominio ERID del hPR<sub>B</sub>, y consecuentemente, de la interacción de hPR<sub>B</sub> con el receptor de estrógenos ER $\alpha$ . Pocos fueron los genes que mantuvieron una respuesta, aunque parcial, a hormona: MMTV, FOS, CXCL12, CXCR4 y PLAUR.

En resumen, la progesterona es un regulador crítico de un amplio abanico de funciones celulares, reflejado en una respuesta transcripcional de un diverso grupo de genes diana a 6 horas. Genes inducidos por una regulación transcripcional directa y/o por rutas de señalización citoplasmática dominan las dianas de progestina a 6h, consistente con otras evidencias publicadas por el laboratorio. Algunos genes regulados en este estudio como BIRC3, PLAUR o CCND1 son ya conocidas dianas para progesterona, aunque aún no se conozca el mecanismo regulador del hPR.

Finalmente, aunque también habíamos detectado un reducido número de genes regulados negativamente por la hormona de forma significativa, con gran solapamiento (6/7) entre los regulados en la línea WT respecto a T47D, en este estudio nos centraremos en la regulación positiva de la isoforma B del hPR y como las mutaciones de ciertos dominios reguladores afectan a sus papel transcripcional activo.

#### **R.4.2 - ANÁLISIS POR RTPCR EN TIEMPO REAL DE LOS GENES REGULADOS POR PROGESTERONA**

Con objeto de confirmar los grupos de genes, determinados por Microarrays, que mostraron una regulación dependiente de los dominios del hPR estudiados para cada línea celular, recogimos de nuevo mRNA de cada línea celular tras 6h de tratamiento hormonal. A continuación, cuantificamos la expresión génica en unidades arbitrarias mediante detección por SYBR Green en una PCR en tiempo real, para una proporción de los genes seleccionados 23 (19 inducción y 3 represión por hormona) del estudio por microarrays. Además de estos genes, quisimos comprobar otros 6 genes (MUCL2, FOS, HSD11B2, SOS1, QSCN6, y STAT5a) que fueron clasificados como no estadísticamente significativos en el estudio anterior de microarrays, aunque inducidos y de alta reproducibilidad, mas otros 2 genes (IFIT2, CTSL) que se mostraron inalterados por el tratamiento hormonal, para usarlos como control.

Los datos obtenidos mostrados en veces de inducción de R5020 frente a etanol [Tabla T2], filtrados mediante la t de student ( $P < 0,05$ ), usando el gen no regulado GAPDH para normalizar los datos, confirman en un 95% (29/31) la regulación de los genes seleccionados del microarray en respuesta a hormona. Incluso, si tenemos en cuenta las veces de inducción obtenidas en el Microarray y la RTPCR posterior, comparando entre la línea WT y T47D, veremos como los mismos genes expresados en una misma línea mantienen el patrón. Por otro lado, sólo 2 genes muestran un resultado diferente entre el Microarray y la RTPCR posterior, estos son "COL4A2" cuya inducción no fue detectada en las células T47D del Array pero si en la

RTPCR y “PCAF” con una inducción de similares unidades entre WT y T47D para Microarray y con mayor valor para WT en la RTPCR respecto T47D.

## T2

	EMPTY	T47D	WT	AF2	DBD*	DBD**	ERID-I	
CCNG2	1.13	-2.76	-3.55	-1.88	-2.86	-3.58	1.12	CCNG2
NCOA3	1.12	-1.37	-1.54	-1.56	-1.69	-1.79	1.05	NCOA3
NOTCH3	1.04	-1.85	-2.51	-1.45	-2.13	-1.89	-1.10	NOTCH3
IFIT2	-1.25		-1.16	-1.14	-1.52	-1.61	1.55	IFIT2
CTSL	-1.15	1.03	1.21	1.00	-1.92	1.10	1.40	CTSL
MUC2L	-1.23	3.12	1.78	1.60	-1.54	-1.19	1.15	MUC2L
FOS	-1.15	2.34	1.99	-1.41	5.35	6.74	1.80	FOS
PIK3CB	1.08	1.81	2.17	1.78	-1.16	-1.06	1.01	PIK3CB
SOS1	-1.02	3.56	2.29	1.05	-1.75	-1.27	1.32	SOS1
GRB14	-1.20	-2.27	2.57	1.25	-1.96	-2.13	1.10	GRB14
GAS6	-1.06	1.82	2.67	1.44	2.46	3.31	1.37	GAS6
SAP30	-1.49	4.07	2.69	1.58	-1.64	-2.00	1.18	SAP30
AYTL2	-1.69	1.77	3.05	2.03	2.38	2.69	1.21	AYTL2
AKAP13	-1.39	1.52	3.37	2.39	-1.64	-1.18	1.43	AKAP13
BIRC3	1.12	1.52	3.75	-1.19	-1.70	-1.61	2.79	BIRC3
TGFA	-1.03	5.63	3.96	1.90	3.82	6.73	1.38	TGFA
CCND1	-1.23	5.35	3.97	2.42	-2.22	-1.82	1.32	CCND1
PCAF	-1.41	2.26	3.05	2.22	1.38	-1.05	1.26	PCAF
CHES1	1.19	-1.08	4.21	2.34	1.63	1.58	1.24	CHES1
MAP3K3	-1.43	1.53	5.17	1.44	-1.72	-1.28	1.31	MAP3K3
CXCL12	-1.06	1.52	6.76	1.83	-1.54	1.54	2.39	CXCL12
MMTV-LUC	1.36	3.35	7.13	3.13	-1.04	-1.61	3.50	MMTV-LUC
HSD11B2	-1.39	8.50	8.22	6.15	2.49	3.87	2.57	HSD11B2
THBS1	1.20	2.59	8.77	2.91	5.95	6.31	1.07	THBS1
STAT5A	1.29	6.28	11.92	2.63	1.04	1.49	2.12	STAT5A
PLAUR	1.61	2.24	16.97	5.62	2.42	3.28	3.79	PLAUR
QSCN6L1	1.10	1.59	1.71	1.29	1.43	1.68	1.34	QSCN6L1
DNAH1	-1.19	1.04	8.54	1.41	-1.35	-1.41	1.20	DNAH1
COL4A2	-1.69	3.31	7.70	4.51	1.54	1.77	2.42	COL4A2

**activated by hormone**

**less activated than WT**

**no hormone effect**

**became repressed**

**repressed by hormone**

**Tabla T2.** Verificación de los genes candidato del array. RT y PCR en tiempo real fueron usadas en extractos de RNAs para visualizar la inducibilidad de los genes identificados en el array en las diferentes células expresando hPR<sub>B</sub>.

En general, observamos como las mutaciones de **DBD** eliminan la respuesta hormonal de un gran número de genes (~77%) entre ellos el promotor modelo MMTV, o las kinasas MAP3K3 y PIK3CB. Curiosamente, tres genes afectados por la mutación como Cyclina D1, GRB14 y SAP30 muestran una regulación génica negativa al estímulo hormonal, y otros dos se sobreexpresan por encima de la respuesta del WT, estos son el oncogén FOS, y el factor de crecimiento alfa (TGF $\alpha$ ). El 23% restante permanece inalterado, como ocurre en genes como GAS6 implicado en arresto celular y en AYTL2. Por otro lado, datos con la línea **ERID** muestran que la respuesta a progesterona de la mayoría de genes no sólo depende de las acciones directas del receptor sobre el DNA sino que también dependen de las acciones extranucleares iniciadas por la interacción de hPR<sub>B</sub> con el receptor de estrógenos, ya que pocos genes mantienen una respuesta similar (15%) al WT, el oncogén FOS, y la quinasa dependiente de ciclina (CDKL1). Finalmente, el comportamiento de la línea **AF2** es menos drástico al mostrar

como 4 de cada 5 genes bien queda inalterado o se afecta parcialmente, esto ocurre en los genes CCND1, CDCKL1 o CHES1 codificantes de proteínas relacionadas con ciclo celular.. En cambio, sólo 1 de cada 5 genes muestra verse totalmente bloqueado en su inducción, como los inhibidores de CDKs p21 (CDKN1A) o el de apoptosis BIRC3.

Con objeto de descartar la idea de que una mayor cantidad de receptor, aún estando mutado, implicaría un incremento en el número de genes inducidos para esa línea celular deficiente, creamos una línea celular que expresara el doble del receptor mutado hPR<sub>B</sub>-DBD. Siguiendo el protocolo descrito de producción de virus (Ver material y métodos) obtuvimos una línea celular (DBD\*\*) expresando la forma variante del hPR<sub>B</sub>-DBD incapaz mediar efectos directos, pero con una cantidad mayor de receptor. El mRNA de la línea fue recogido en un ensayo paralelo al resto de líneas celulares, para posteriormente cuantificar también mediante RTPCR en tiempo real los mismos genes seleccionados para la verificación del microarray. Cuando comparamos DBD con la línea celular que expresaba el doble de receptor DBD\*\*, encontramos que los mismos nueve genes activados por DBD lo eran para DBD\*\* y ningún gen no inducido en DBD adquirió la capacidad de inducirse por el hecho de que la línea DBD\*\* tuviera mas receptor. Sin embargo, las veces de inducción encontrados en la línea DBD\*\* eran en la mayoría de genes inducidos, de mayor valor que en la línea DBD [Tabla T2]. Indicando que aquellos genes no afectados por la mutación de la caja P del dominio de unión a DNA, incrementan su expresión en una manera dependiente a la cantidad de receptor activado unido a ligando en la línea celular. Y aquellos genes afectados por esta mutación, no se verán inducidos en respuesta al estímulo hormonal aunque la cantidad de hPR<sub>B</sub>-DBD sea dos veces la cantidad de receptor presente en la célula, y por consiguiente, dos veces la cantidad de receptor endógeno en células T47D. Indicando que la mutación del DBD es lo bastante restrictiva, como para eliminar cualquier efecto génico que pudiera aparecer por sobreexpresión.

Finalmente, incluyendo los datos del Microarray y las verificaciones por RTPCR de los genes regulados positivamente por hormona en la línea WT y sus diferencias con las líneas mutantes defectivas, encontramos cinco categorías para estos genes [Tabla T3]. Las líneas defectivas mostraban,

**1.- Genes con valores de inducción mayor respecto al WT**

Sólo la línea **DBD** muestra 2 genes sobreexpresados en comparación con la línea WT, que son el oncogén FOS, y el factor de crecimiento TGF $\alpha$ .

**2.- Genes con valores de inducción similar respecto al WT**

Aquellos genes no afectados por las mutaciones de las líneas celulares serían, el 15% de los analizados en la línea **AF2** incluyendo la deshidrogenasa HSD11b2, y el 9% de los **ERID** como la quemoquina CXCR4, o de los analizados en **DBD** dentro de los cuales estaría un gen asociado con arresto celular como GAS6.

### 3.- Genes con valores de inducción menor respecto al WT

Casi todos los genes regulados en **AF2** (~65%) se ven afectados parcialmente por la mutación E911A, como PCAF, COL4A2, ... No llegan al 22% los genes afectados parcialmente en las líneas **DBD** o **ERID**, como el gen relacionado con metástasis PLAUR o con metabolismo como HSD11b2, respectivamente.

### 4.- Genes no inducidos respecto al WT

La mayoría de los genes estudiados en las líneas deficientes afectados por las mutaciones en los dominios del hPR<sub>B</sub> implicados con la unión a PREs (**DBD**) o con activación de señales extranucleares (**ERID**), se engloban en esta categoría. Aproximadamente el 63% de los genes estudiados dejan de inducirse en las líneas ERID y DBD. Sólo un 18% se afectan totalmente por la mutación E911A de **AF2**, como AKAP13, BIRC3, FOS, ...

### 5.- Genes con valores de inducción negativa respecto al WT

De nuevo, sólo el mutante hPR<sub>B</sub>-**DBD** ve alterado tan drásticamente su modo de acción, para pasar a mostrar una regulación negativa en tres genes que eran inducidos positivamente en la línea WT. Observamos este comportamiento en genes de ciclo celular como CCND1, de crecimiento como GRB14, y de regulación transcripcional como SAP30.

En resumen, tanto la delección ERID-I que afecta la activación de la cascada mitógenica como la mutación en el DBD que perturba el dominio de unión del hPR al DNA, afectaron drásticamente el mayor número de genes. Indicándonos que ambos modos de acción del hPR engloban el 80% de la regulación celular en respuesta a un estímulo hormonal como la progesterona.

### T3

DBD					ERID				
MAYOR	SIMILAR WT	MENOR	SIN INDUCCIÓN	REPRESIÓN	MAYOR	SIMILAR WT	MENOR	SIN INDUCCIÓN	REPRESIÓN
FOS TGFa	AYTL2 GAS6 CDKN1A HSD11B2	CHES1 PLAUR QSCN6 THBS1 ING1	AKAP13 BIRC3 COL4A2 CXCL12 DNAH1 MAP3K3 MMTV MUCL2 PCAF PIK3CB SOS1 STAT5a CDC14B CDKL1 CXCR4 HSD17B2 KPNA3 NEO1 RASL10B VEGF	CCND1 GRB14 SAP30		FOS CDKL1 CXCR4	BIRC3 COL4A2 CXCL12 HSD11B2 MMTV PLAUR QSCN6 STAT5a	AKAP13 AYTL2 CCND1 CHES1 DNAH1 GAS6 GRB14 MAP3K3 MUCL2 PCAF PIK3CB SAP30 SOS1 TGFa THBS1 CDC14B CDKN1A HSD17B2 ING1 KPNA3 NEO1 RASL10B VEGF	

AF2				
MAYOR	SIMILAR WT	MENOR	SIN INDUCCIÓN	REPRESIÓN
	HSD11B2 MUCL2 CDKN1A CXCR4 KPNA3	AYTL2 CCND1 COL4A2 CXCL12 CHES1 DNAH1 GAS6 MAP3K3 MMTV PCAF PIK3CB PLAUR QSCN6 SAP30 STAT5a TGFa THBS1 CDKL1 HSD17B2 ING1 NEO1 VEGF	AKAP13 BIRC3 FOS GRB14 SOS1 CDC14B RASL10B	

**Tabla T3.** Tablas de agrupación de genes según su comportamiento en las líneas celulares variantes en relación a la línea salvaje. Las categorías son Represión, Sin Inducción, Menor, Similar y Mayor.

### R.5.1 - ANALISIS DE INDUCCIÓN DE GENES

Una vez hemos definido un conjunto de genes cuya regulación tras 6 horas de tratamiento hormonal se ve alterada según la línea celular mutante, seleccionaremos 14 de ellos como representación de los diferentes comportamientos observados con objeto de conocer las cinéticas de activación de cada gen. Llevaremos a cabo un ensayo de RT-PCR en tiempo real en cinco puntos diferentes del tiempo (0 - 1 - 2 - 6 - 10 horas), con los genes seleccionados (AKAP13, BIRC3, CCND1, GRB14, HSD11b2, MMTV, PCAF, p21, SAP30, STAT5a, TGF $\alpha$  y THBS1) de respuesta tardía (tras 6h) más tres genes (MYC, JUN y DUSP1) conocidos por su respuesta temprana (tras 1h) a R5020.

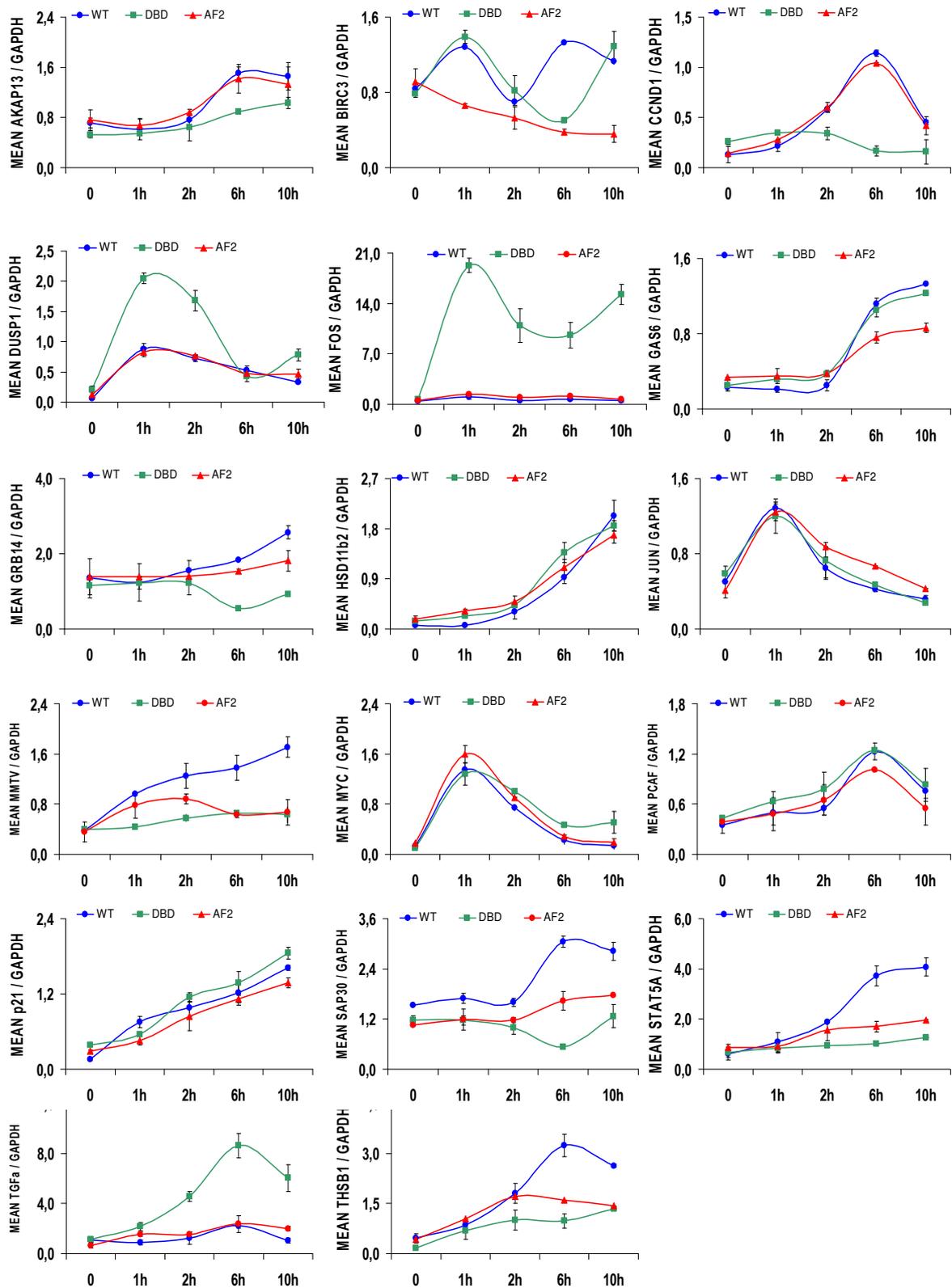
Las cinéticas de tiempo obtenidas mostraban patrones de inducción particulares a cada gen, así como las diferentes mutaciones realizadas en el receptor de progesterona de las líneas celulares (AF2 – ERID – DBD) afectaban de diferentes maneras a la expresión de los genes [Fig. R12-A/B]. Si nos fijamos sólo en el valor obtenido a 6 horas de inducción para cada gen en las diferentes líneas celulares, obtendríamos datos muy similares a los que previamente habíamos obtenido mediante el microarray y su posterior comprobación por RT-PCR.

Observando las cinéticas de respuesta a hormona para cada gen, y de las distintas líneas celulares con hPR<sub>B</sub> variantes, vemos que casi cada gen tiene un comportamiento particular en el momento de máxima acumulación de transcrito y afectación por los distintos mutantes de hPR<sub>B</sub>. Aún así, hemos intentado sacar conclusiones generales y hemos agrupado los distintos genes según distintos criterios.

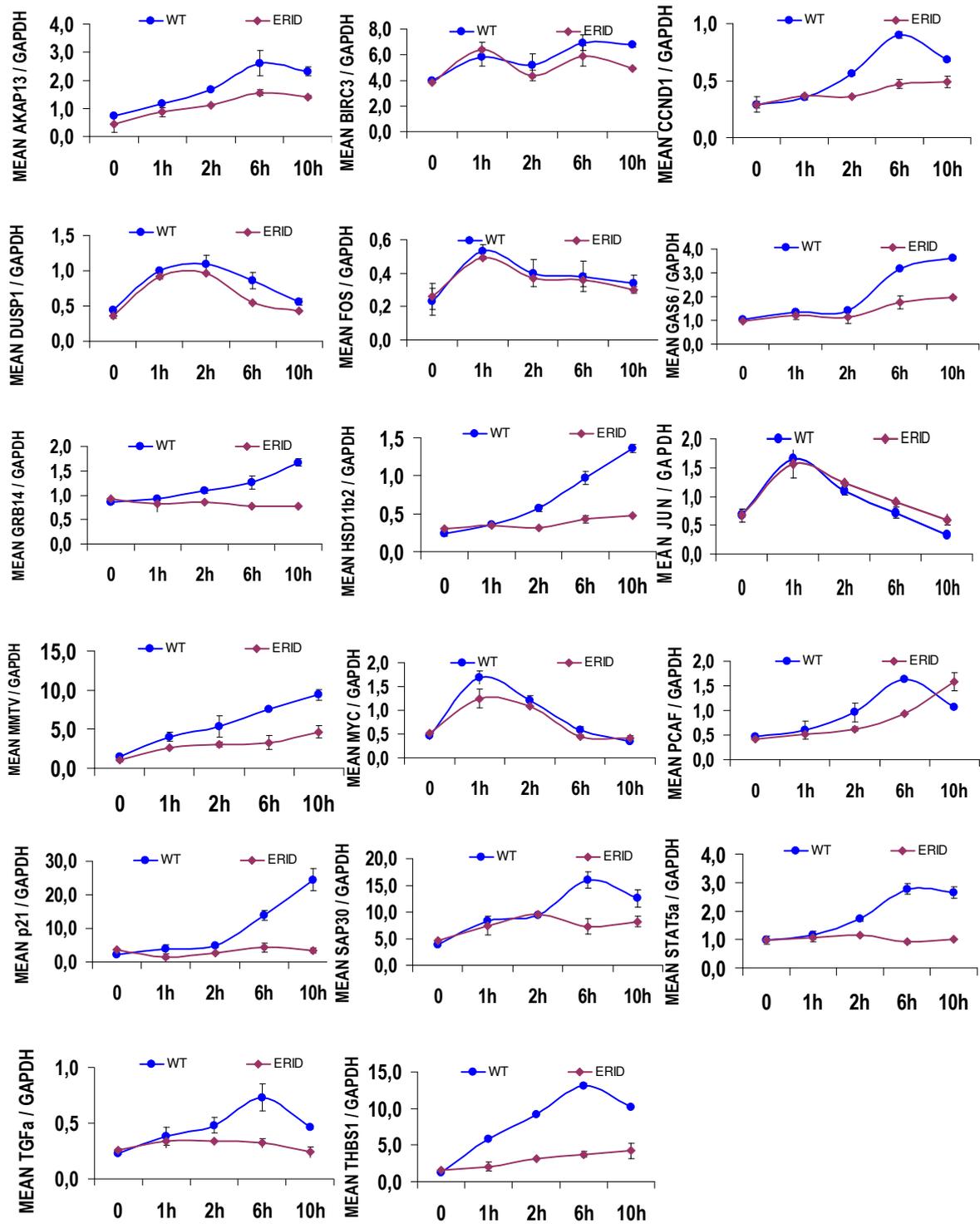
Analizando las curvas de tiempo obtenidas, observamos como la tercera parte de los genes muestran una inducción progresiva y constantemente incrementada a lo largo del tiempo, GAS6, GRB14, HSD11b2, MMTV, p21 o STAT5a. De modo diferente, encontramos que el resto de genes tenían un claro punto de inducción máxima, marcándose un pico a 1 hora para los genes de inducción temprana como JUN, MYC y DUSP1, o a 6h para los de inducción más tardía como CCND1, PCAF, SAP30, THBS1, AKAP13 y TGF $\alpha$  [Tabla T4]. Además encontramos que FOS y BIRC3 tenían picos de expresión tanto a 1h como a 6h. Por otro lado, comprobamos como los genes TGF $\alpha$ , FOS y DUSP1 en la línea celular DBD mostraban curvas de expresión

muy por encima de la WT, como ya se menciona con los resultados previos del microarray y de RT-PCR.

**A**



**FIGURA 12. Análisis Cinético Para Genes Candidato. (A)** Perfiles de expresión para 17 genes diana a lo largo del tiempo. Las células salvaje WT y mutantes AF2, DBD fueron cultivadas durante 48 horas con medio blanco con suero charcolizado, 24 horas sin suero, y durante 12-6-10 horas con R5020 10nM. El mRNA total fue recogido, para analizar la expresión de mRNA de los genes elegidos por RT y PCR en tiempo real usando primers específicos. Como control usamos oligos específicos para el cDNA de GAPDH.

**B**

**FIGURA 12. Análisis Cinético Para Genes Candidato. (B)** Perfiles de expresión para 17 genes diana a lo largo del tiempo. Las células salvaje WT y mutante ERID fueron cultivadas durante 48 horas con medio blanco con suero charcolizado, 24 horas sin suero, y durante 12-6-10 horas con R5020 10nM. El mRNA total fue recogido, para analizar la expresión de mRNA de los genes elegidos por RT y PCR en tiempo real usando primers específicos. Como control usamos oligos específicos para el cDNA de GAPDH.

## T4

TIPO DE INDUCCIÓN		
PUNTUAL		PROGRESIVA
TEMPRANA 1h	TARDÍA 6h	
JUN	AKAP13	CDKN1A
MYC	CCND1	GRB14
DUSP1*	GA6	HSD11B2
FOS*	PCAF	MMTV
	SAP30	STAT5a
	TGFa*	THBS1
BIRC3	BIRC3	

\* Sobreexpresados con DBD<sub>mut</sub>

**Tabla T4.** Tabla resumen de los tipos de perfil de expresión encontrados en las líneas variantes en respuesta a diferentes tiempos de progesterona.

En resumen, al analizar todos los datos obtenidos de expresión génica en respuesta a R5020 de las diferentes líneas celulares mutadas en dominios de relevancia funcional del PR mediando unión al DNA (DBD), activación de la ruta ER/c-Src/Erk (ERID) o reclutamiento de coactivadores (AF2), estamos en disposición de poder definir no sólo un conjunto de genes inducidos por progesterona en células de cáncer de mama, sino también clasificarlos según la ruta a través de la cual el PR podría ejercer su función [Tabla T5].

La mayoría de los genes analizados (2/3 partes) serían aquellos cuya inducción necesita de tres factores como son la unión de PR a las secuencias promotoras específicas (PREs), de la activación de la ruta de las MAPKs y del reclutamiento de coactivadores, apoyando el modelo de activación del promotor de MMTV ampliamente estudiado en nuestro laboratorio (Vicent, 2006). Sólo 6 genes (BIRC3, CXCR4, JUN, FOS, DUSP1 y MYC) serían inducidos, sin mediación de señalización, e incluso los oncogenes FOS / MYC y la fofatasa DUSP1 ni siquiera necesitarían de la unión directa del PR sobre el promotor, apoyando la teoría de activaciones génicas indirectas a través de proteínas mediadoras como AP1 o SP1 y sus sitios específicos de reconocimiento en los promotores diana. En otros pocos genes, como el factor de crecimiento (TGFa) o el factor mitogénico (GAS6) tampoco se necesitaría unión directa al promotor, aunque si la cascada ER/c-Src/Erk, definiéndolos como de inducción no genómica.

En relación con el papel del reclutamiento de coactivadores en la regulación de genes, vemos como en la línea celular AF2 el 80% de los genes estudiados reduce parcial o totalmente su expresión, y sólo los oncogenes FOS, MYC, JUN o CXCR4, KPNA3 y HSD11b2 mantienen intacta su expresión. Revelándonos el papel más que fundamental de los coactivadores en la activación de genes diana en respuesta a progestágenos.

**T5**

		AFECTADOS POR DBD				
		SI			NO	
AFECTADOS POR ERID	SI	AKAP13	COL4A2	CDC14B	CDKN1A	AYTL2
		CCND1 <sup>(2)</sup>	CXCL12	HSD17b2	GAS6	QSCN6
		GRB14 <sup>(2)</sup>	CHES1	ING1	HSD11b2	
		MMTV	DNAH1	KPNA3	TGF $\alpha$ <sup>(1)</sup>	
		PCAF	MAP3K3	NEO1		
		SAP30 <sup>(2)</sup>	MUCL2	RASL10B		
		STAT5a	PI3K3CB	VEGF		
		THBS1	PLAUR			
	NO	BIRC3		CXCR4	DUSP1 <sup>(1)</sup>	
				CDKL1	FOS <sup>(1)</sup>	
					JUN	
					MYC	

DBD (1) Sobreexpresión (2) Represión

AF2 NO Parcialmente SI

AZUL - Genes Estudiados en Cinéticas de Tiempo  
 ROJO - Genes Verificados por Realtime-PCR  
 NEGRO - Genes Detectados en el Microarray

**Tabla T5.** Tabla resumen de los dominios implicados en la inducción de cada gen estudiado en Microarrays, RT-PCR y PCR en tiempo real. La agrupación tiene en cuenta si el gen candidato se encontró mostrando una expresión reducida en relación a la línea WT al tiempo de máxima expresión por progesterona.

Adicionalmente, una tesis paralela en nuestro laboratorio (Tesis Subtil-Rodriguez, 2007) ha estudiado la regulación por progesterona del gen HSD11b2. Los resultados de Subtil-Rodriguez, indican la importancia del reclutamiento de Stat5a en la región distal del promotor, y de ruta citoplasmática JAK/STAT en la regulación transcripcional de este gen. Las cinéticas temporales de este gen para la mutación hPR<sub>B</sub>-DBD indicaban que este dominio de unión directa a DNA no era esencial para la regulación transcripcional, y que la delección del dominio ERID del hPR<sub>B</sub> afectaba totalmente a la inducción. También, habíamos observado que el uso del inhibidor ICI (antagonista de ER $\alpha$ ) afectaba parcialmente la activación transcripcional, indicando la posibilidad de que la delección ERID hubiera provocado algún defecto estructural del hPR<sub>B</sub> y así de sus funciones.

**R.6.1 – INHIBIDORES DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA ERK ELIMINAN LA INDUCCIÓN POR PROGESTINA DE GENES DIANA**

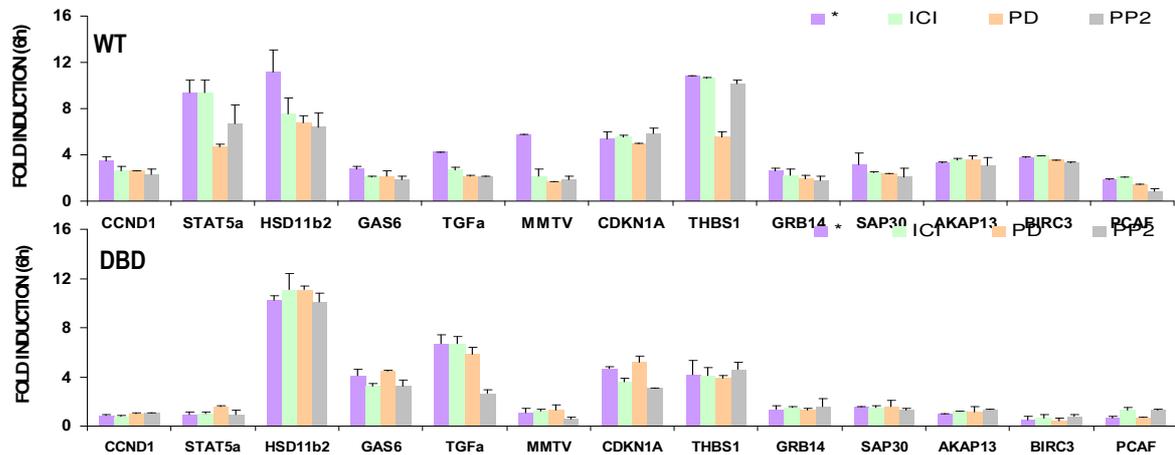
Sabemos que el tratamiento con R5020 de la línea WT aumenta la transcripción del promotor MMTV integrado en la cromatina, como vimos a nivel de transcrito [Fig. R7-B] o a nivel de proteína luciferasa [Fig. R7-A]. Cuando a las células WT se les añade 1h antes del tratamiento hormonal el inhibidor PD (de Erk), se observa una reducción (~60%) de la transcripción hormonal inducida, alcanzándose niveles semejantes al máximo alcanzado con los mismos experimentos en la línea celular ERID (cuyo PR es inactivo para inducir la ruta ER/c-Src/Erk). Observamos un comportamiento inhibitorio similar para el gen MMTV al tratar las células con el antagonista para el receptor de estrógenos ICI (Vicent, 2006). Del mismo modo, hemos comprobado como la mutación ERID, afecta la inducción transcripcional no sólo del MMTV sino también de múltiples genes diana para progesterona. Afirmándose así como la activación de la ruta Erk, mayoritariamente vía interacción de PR con ER, se requiere para la inducción hormonal del MMTV y otros genes diana.

De este modo, para definir en más detalle cuál es el papel de la cascada de señalización utilizamos inhibidores químicos como PD (bloquea ERK), ICI (antagonista de ER) o PP2 (bloquea a nivel c-Src) y medimos la cantidad de transcrito tras el tratamiento hormonal. Para ello, tratamos independientemente las líneas celulares WT y DBD con el conjunto de inhibidores, previamente al tratamiento con progestina de 2 y 6 horas, para medir la acumulación de transcrito de los 17 genes diana elegidos AKAP13, BIRC3, CCND1, DUSP1, GRB14, HSD11b2, JUN, MMTV, MYC, PCAF, p21, SAP30, STAT5a, TGF $\alpha$  y THBS1. Al usar la línea celular DBD buscamos no sólo determinar la relevancia de la señalización para la inducción de genes sin necesidad de unión directa a sus PREs, sino también saber si los genes FOS, DUSP1 y TGF $\alpha$  que mostraban cinéticas de sobreexpresión [Fig. R12-A] han adquirido esta regulación incrementada a través de la cascada mitogénica vía ERK iniciándose corriente arriba en los complejos hPR<sub>B</sub>/ER $\alpha$ /c-Src o bien sin intervención de ER por la interacción directa PR/c-Src.

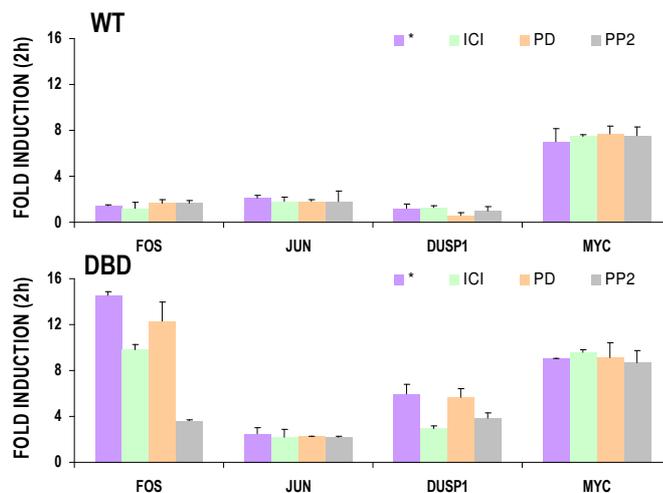
Obtuvimos múltiples gráficos de inducciones, normalizados frente a GAPDH, que muestran el papel del receptor de estrógenos (ER), de la kinasa Erk o de la proteína de membrana Src en la mediación de efectos génicos inducidos por progestina. La figura [Fig. R13-A] resume los datos obtenidos en los diferentes ensayos para medir la cantidad de transcrito, bien usando las líneas celulares mutantes ERID y DBD o mediante el uso de inhibidores químicos.

Reflejando si la mutación afecta a la inducción del gen diana y en que medida cada inhibidor reduce la cantidad de transcrito inducido en cada línea celular. Observamos como las inhibiciones obtenidas con PD, ICI o PP2 rara vez sobrepasan porcentajes de inhibición superiores al 50% de expresión, excepto para el gen MMTV.

## A GENES DE EXPRESIÓN TARDÍA Y PROGRESIVA



## GENES DE EXPRESIÓN RÁPIDA



**FIGURA 13. Análisis De La Inducción De Genes Usando Inhibidores De Las Rutas De Señalización. (A)** Las células WT y DBD fueron cultivadas 48 horas en medio blanco mínimo, 24 horas sin suero antes de incubarlas durante 2-6 horas con R5020. Cuando se indica, ICI182.780 es añadido simultáneamente y PD o PP2 1 hora antes de la inducción hormonal. El RNA total es recogido, y el cDNA preparado para usarlo como muestra para la PCR en tiempo real usando primer específicos para cada gen estudiado. Cada valor fue corregido por el gen humano Actina y expresado como de inducción relativa en la abundancia de RNA sobre el tiempo cero. Los valores representan la media y desviación estándar de dos experimentos llevados a cabo por duplicado

Quando algún gen muestra una inducción disminuida como consecuencia del uso de alguno/s de los inhibidores, este gen también ve comprometida total o parcialmente su expresión en la línea ERID en genes como CCND1, GAS6, HSD11b2, MMTV, STAT5a o TGF $\alpha$ . Por

ejemplo, la baja expresión del ligando para el receptor de la tirosin kinasa (GAS6) en la línea celular ERID como respuesta a progestina, va en consonancia con la inhibición de un 40% en la cantidad de transcrito recogido en la línea WT tras 6h de tratamiento hormonal cuando los inhibidores están presentes [Tabla T6-T7].

Por otro lado genes como AKAP13, BIRC3, FOS, JUN, MYC y CDKN1A en la línea WT no ven afectada su inducción en presencia de los inhibidores, implicando que no necesitan la vía ER/c-Src/Erk y quedando en consonancia con el dato de que la mutación ERID-I no afectaba su respuesta hormonal. En el mismo sentido en la línea DBD los genes JUN, MYC y CDKN1A no ven afectada su expresión inducida hormonalmente en presencia de los inhibidores. En cambio la línea celular DBD si ve comprometida la inducción de FOS cuando ICI o PP2 son añadidos, señalando a ER y c-Src como implicados en su activación. Indicando que al bloquear la vía de unión directa al DNA (DBD), el PR mutado induce este gen a través de una vía de señalización no usada por el WT.

Por otro lado, observamos como los genes GAS6, DUSP1 y TGF $\alpha$  inducidos en la línea DBD se ven afectados por el uso de los inhibidores ICI (de ER $\alpha$ ) y PP2(de Src), pero no por PD (de Erk). Este resultado indica que la regulación de estos genes por hPR<sub>B</sub>-DBD no necesitaría de la participación de Erk, habiendo eliminado esta dependencia que si mostraba el hPR<sub>B</sub> salvaje para activar estos genes.

También observamos como mientras la cascada ER/c-Src/Erk es clave en la inducción de HSD11b2 para un hPR<sub>B</sub> salvaje en la línea WT, el mutante DBD adquiere inmunidad a los inhibidores manteniendo la inducción de este gen.

Como vemos, no todos los genes dónde hemos determinado que la señalización es clave mediante estudios con el mutante ERID ven bloqueada su expresión exclusivamente cuando usamos ICI (antagonista del E2) como vemos en GRB14 o PCAF. Otros aunque afectados por ERID permanecen invariables al uso de ICI pero no a PP2 (bloquea c-Src), como CDKN1A. Si como se ha definido en la literatura existen dos modos en que podrían iniciar los efectos no genómicos de la progesterona, uno por la formación del complejo triple hPR<sub>B</sub>/ER $\alpha$ /c-Src (Ballaré, 2003) y otro directo con PR/c-Src (Boonyaratanakornkit, 2001), nuestros resultados confirmarían su existencia y determinarían genes inducidos a través de una u otra vía.

En resumen, los resultados muestran una alta correlación entre los datos obtenidos mediante la línea mutante ERID y el uso de inhibidores, y nos permitirían señalar que genes

como CCND1 o MMTV necesitarían la participación del receptor de estrógenos para iniciar la cascada, mientras GRB14 o PCAF no. También veríamos que genes tales como MYC o BIRC3 no necesitarían de los efectos de la cascada MAPK [Tabla T6].

**T6**

		AFECTADOS POR LOS INHIBIDORES								
WT		ICI (ERα)	PD (ERK)	PP2 (SRC)	-	ICI (ERα)	PD (ERK)	PP2 (SRC)	-	DBD
AFECTADOS POR ERID <sub>mut</sub>	SI		CCND1 GAS6 GRB14 HSD11b2 MMTV PCAF		AKAP13	GAS6		GAS6		
	NO		STAT5a TGFα THBS1		SAP30		TGFα			
					CDKN1A BIRC3	DUSP1 FOS		DUSP1 FOS		CDKN1A
			DUSP1		FOS JUN MYC				JUN MYC	
										AFECTADOS POR ERID <sub>mut</sub>
										SI
										NO

**T7**

GENES	AFECTADO POR		INHIBICION ( ≥ 20%)							
	ERID	DBD	WT			DBD				
			ICI	PD	PP2	ICI	PD	PP2		
AKAP13	X	√								
BIRC3	X	√	*	*						
CCND1	√	√	23% 6h	24% 6h	32% 6h					
DUSP1	X	X (↑)	*	48% 2h *	22% 2h	51% 2h			35% 2h	
FOS	X	X (↑)			*	32% 2h			75% 2h	
GAS6	√	X	25% 6h	22% 6h	32% 6h	20% 6h *			22% 6h *	
GRB14	√	√	*	27% 6h *	33% 6h *					
HSD11B2	√	√	33% 6h	39% 6h	43% 6h					
JUN	X	X								
MMTV	√	√	63% 6h	71% 6h	68% 6h					
MYC	X	X			*			*		
PCAF	√	√	*	24% 6h	55% 6h					
CDKN1A	√	X	-	-	-	*			*	
SAP30	√	√	*	*	*					
STAT5a	√	√		50% 6h	30% 6h					
TGFα	√	X (↑)	37% 6h	49% 6h *	50% 6h				62% 6h *	
THBS1	√	√	*	49% 6h	*					

\* Basal Bajo en T0, respecto WT

\* Basal Alto en T0, respecto al WT

**Tabla T6.** Tabla resumen de las reducciones en la expresión de RNA en presencia de ciertos inhibidores en las líneas variantes en respuesta a progesterona y su relación con el dominio del hPR<sub>B</sub> ERID.

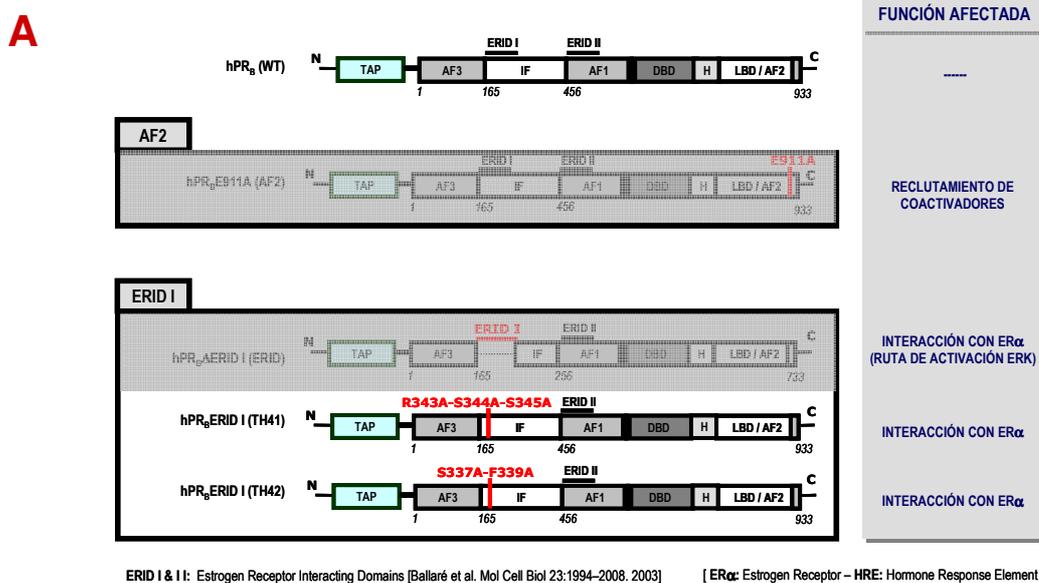
**Tabla T7.** Tabla resumen de los dominios implicados en la inducción de cada gen estudiado en Microarrays, RT-PCR y PCR en tiempo real. La agrupación tiene en cuenta si el gen candidato se encontró mostrando una expresión reducida en relación a la línea WT al tiempo de máxima expresión por progesterona.

## CONSTRUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES EXPRESANDO NUEVAS FORMAS MUTADAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

### R.7.1 – MUTANTES ADICIONALES DE INTERACCIÓN CON hER<sub>α</sub>

Como fue ampliamente demostrado (Ballaré, 2003) la progesterona puede activar la ruta de transducción de señales Src/p21Ras/Erk en células humanas de cáncer de mama a través de la interacción de su receptor nuclear con hER $\alpha$  y este con c-Src, descubriéndose así un entrecruzamiento funcional crucial entre hormonas ováricas. Experimentos posteriores identificaron el dominio de hPR<sub>B</sub> responsable para la asociación con hER $\alpha$ , llamándolo ERID-I (REF Ceci). Recientemente esta identificación ha sido más precisa, determinando *in vitro* los residuos responsables de esta interacción (Thomas, Tesis 2007) mediante experimentos de doble híbrido en levaduras.

A semejanza del mutante de delección hPR-ERID,, dónde bloqueamos la ruta citoplasmática ER/Src/Erk inducida por progesterona, pero con la ventaja de ser mutaciones en residuos puntuales, establecimos dos nuevos mutantes. Mediante mutagénesis dirigida se crearon dos construcciones virales diferentes, con el mismo propósito anterior de evitar la interacción hPR<sub>B</sub>-hER $\alpha$  al mutar dos grupos de residuos previamente identificados como defectivos en su interacción mediante los ensayos de doble híbrido en levaduras. Mutamos a Alaninas los residuos R343A-S344A-S345A (TH41<sub>mut</sub>) y S337A-F339A (TH42<sub>mut</sub>) [Fig. R14-A]..

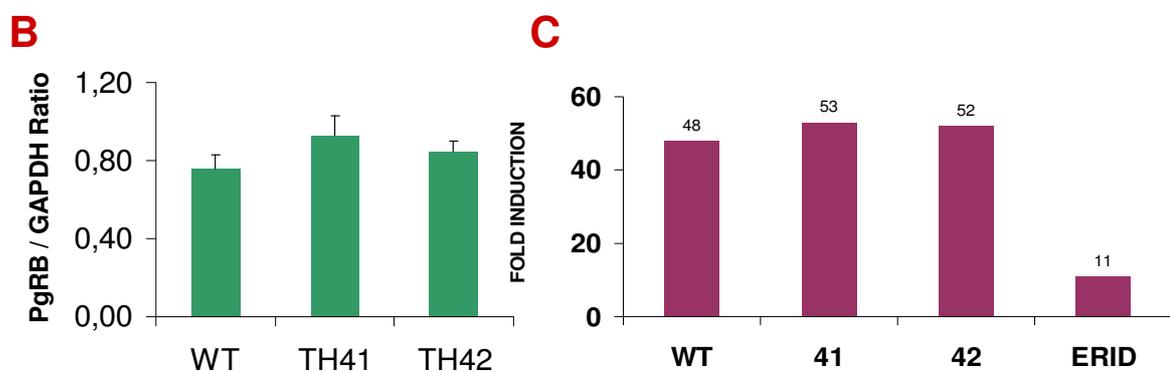


**FIGURA 14. Mutantes Puntuales De La Región ERID-I. (A)** Representación esquemática de las construcciones recombinantes del hPR<sub>B</sub>. AF, activation function; ERID, ER interaction domain; DBD, DNA binding domain; H, hinge region; IF, inhibitory function; LBD, ligand binding domain; TAP, tandem affinity purification peptide.

Siguiendo el mismo protocolo que para demás líneas celulares generadas, infectamos células TYML25 a diferente carga viral portando las dos nuevas variantes. Para comprobar que las líneas establecidas seleccionadas por FACS a niveles de 6-10% de GFP, expresaban la versión mutada del hPR<sub>B</sub> en la misma proporción que la WT, comparamos los niveles de transcrito. Observamos como las dos nuevas líneas TYML25.R343A-S344A [TH41] y TYML25.S337A-

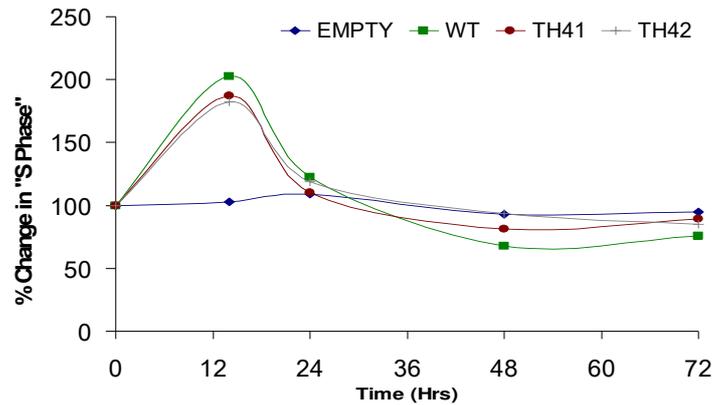
F339A [TH42] mostraban un nivel de expresión de la construcción hPR<sub>B</sub> ligeramente mayor que la línea WT [Fig. R14-B].

Si analizamos la competencia transcripcional de los mutantes puntuales en el dominio ERID en respuesta a progestina, mediante la inducción del gen reportador MMTVLuc, podremos saber si los nuevos mutantes tienen comprometido este efecto *in vivo*. Encontramos que ninguno de las nuevas líneas mutantes (TH41 o TH42) vio comprometida su actividad transcripcional para MMTV, mostrando unas 50 veces de inducción comparables a las 48 observadas con el WT [Fig. R14-C]. En cambio, como ya sabíamos, la línea ERID si mostró una reducción clara de su capacidad transcripcional con sólo 11 veces de incremento en la actividad luciferasa en respuesta a progestina.



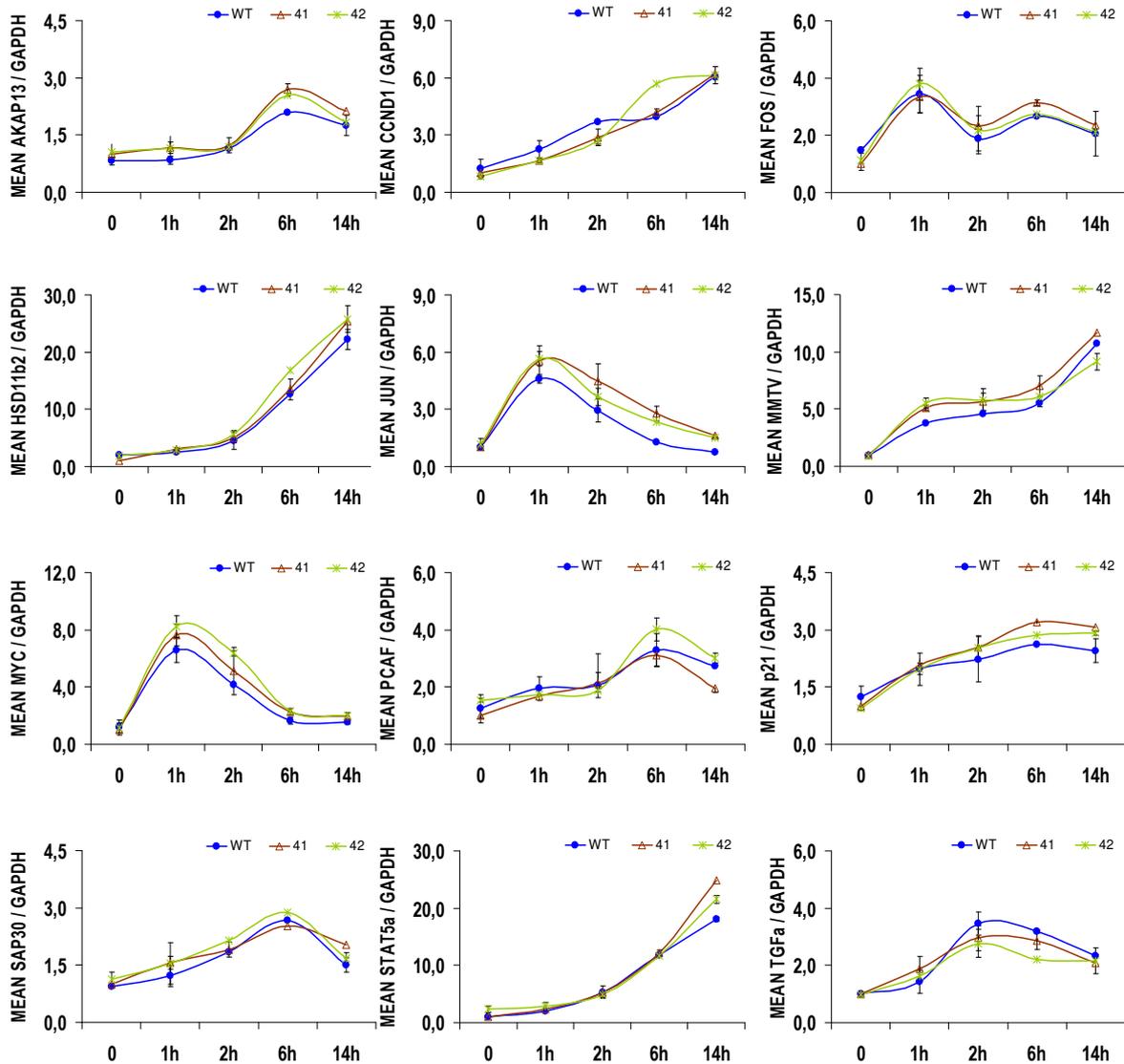
**FIGURA 14. Mutantes Puntuales De La Región ERID-I. (B)** Niveles de expresión de mRNA para hPR<sub>B</sub>. Las células TYML25 expresando hPR<sub>B</sub> o las formas mutadas, fueron recogidas para la extracción del RNA total. Analizamos la expresión del mRNA de hPR<sub>B</sub> (para comparar niveles) por RT y PCR en tiempo real con oligos específicos. Los oligos específicos para el cDNA de GAPDH son usados como control. **(C)** Transactivación del gen reportero MMTVLuc por progestina en células estables WT, TH41, TH42, y ERID (de TYML25). Tras 48 horas en un medio sin suero añadimos R5020 10nM. Medimos la actividad luciferasa en extractos celulares 24 horas después de la cuantificación proteica para normalizar. Mostramos las veces de inducción de células tratadas con R5020 respecto etanol, como media de dos experimentos.

En relación a la inducción de rutas de señalización que conduce a un incremento de la proliferación celular inducida por progestina, medimos la habilidad proliferativa en un ensayo de tinción con yoduro de propidio. Tras una inducción a diferentes tiempos de 14-24-36-48h con progestina (10nM), con una sincronización previa por privación de suero de 48 horas, las líneas TH41 y TH42 mostraron el mismo pico de inducción de células en fase S tras 14h con progestina [Fig. R14-D]. Este resultado indicaba que las mutaciones puntuales del dominio ERID-I no eliminaban la capacidad del hPR<sub>B</sub> de mediar proliferación, cosa que si conseguía el mutante de delección ERID-I. Este ensayo era indicativo de que estas mutaciones no afectaban a la capacidad del PR de inducir efectos no-genómicos.

**D**

**FIGURA 14. Mutantes Puntuales De La Región ERID-I. (D)** Efectos de los mutantes de hPR<sub>B</sub> en la proliferación celular inducida por progesterona en células estables de cáncer de mama. Las células son crecidas 24 horas en medio libre de suero, seguidas por incubaciones de 14-24-48-72 horas con R5020 10nM o etanol. La distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular se evalúa por FACS de células teñidas con ioduro de propidio. El gráfico muestra el porcentaje de células en fase S, como media de dos muestras independientes llevadas en paralelo.

Finalmente, con objeto de saber si las nuevas mutaciones puntuales de la región ERID-I afectaban la activación por hormona de genes identificados como afectados por el mutante de delección hPR-ERID, recogimos muestras de ARN de las líneas celulares tras 1-2-6-10h horas de inducción hormonal. Usando oligos específicos para 12 genes regulados por la línea ERID, medimos por RT-PCR en tiempo real las cinéticas de tiempo de las líneas TH41 y TH42 para estos genes. Los genes FOS, JUN, MYC y p21 no afectados por la línea ERID tampoco lo estaban en ninguno de los nuevos mutantes. Aquellos genes afectados parcialmente en ERID, como HSD11b2, MMTV o STAT5a mostraron exactamente la misma cinética que la línea WT. El resto de genes elegidos por mostrarse inactivos tras inducción hormonal en la línea ERID, como AKAP13, CCND1, PCAF, SAP30 o TGF $\alpha$  no se vieron afectados por las mutaciones de las líneas TH41 y TH42 [Fig. R14-E]. De modo que ninguno de los genes testeados reveló un comportamiento anómalo o deficiente en cuanto a su inducción por progesterona, en comparación con la línea portadora del hPR<sub>B</sub> salvaje.

**E**

**FIGURA 14. Mutantes Puntuales De La Región ERID-I. (E)** Perfiles de expresión para 17 genes diana a lo largo del tiempo. Las células salvaje WT y mutantes TH41, TH42 fueron cultivadas durante 48 horas con medio blanco con suero charcolizado, 24 horas sin suero, y durante 12-6-10 horas con R5020 10nM. El mRNA total fue recogido, para analizar su expresión en los genes elegidos por RT y PCR en tiempo real usando primers específicos. Como control usamos oligos específicos para el cDNA de GAPDH.

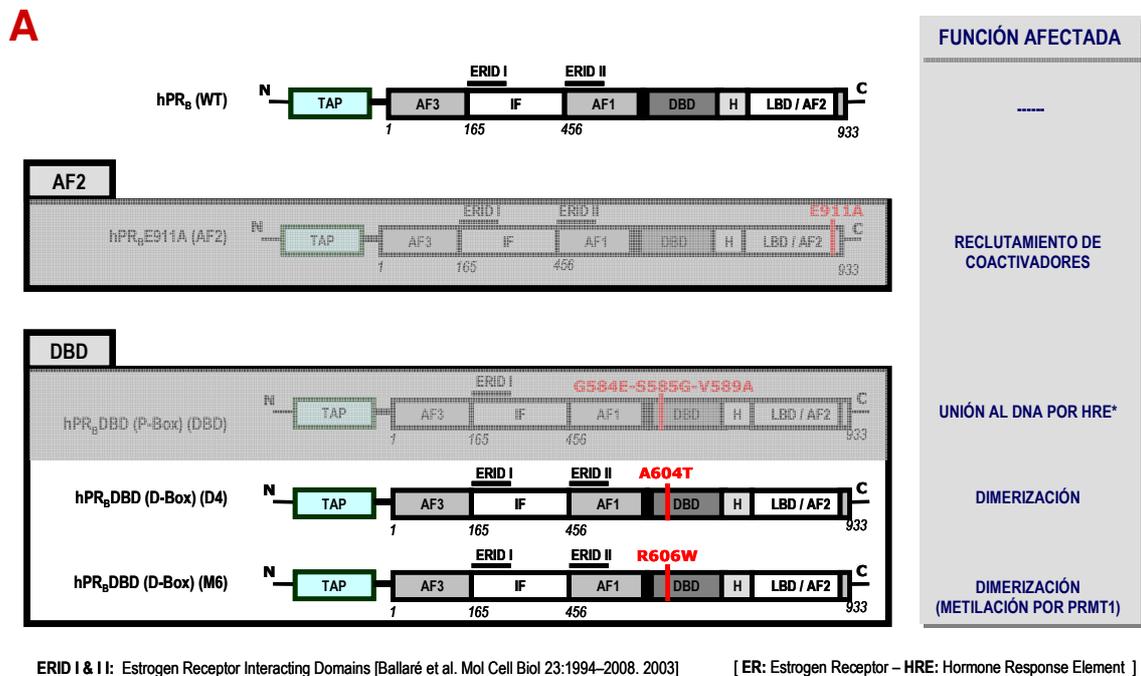
En definitiva, ninguno de los ensayos llevados a cabo demostró que las líneas celulares TH41 o TH42 vieran comprometida su función transcripcional como habríamos esperado tras los resultados de los ensayos *in Vitro*, dónde estos mutantes fueron seleccionados por no interacciona con hER $\alpha$ .

## R.7.2 – MUTANTES DE DIMERIZACIÓN

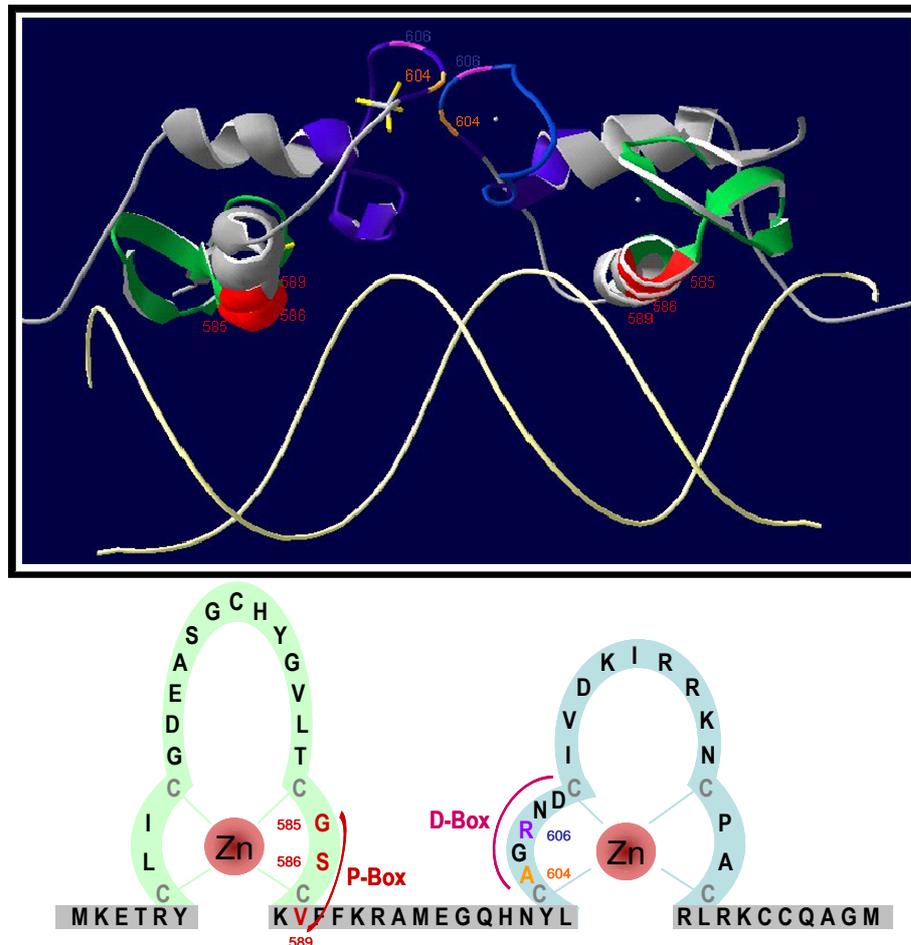
La ruta clásica de transcripción de genes inducida por progesterona empieza con la unión de la hormona a PR, provocando un cambio conformacional en este que promueve su disociación de un precomplejo con múltiples chaperonas, su dimerización y la unión a

secuencias específicas (PREs) dentro del promotor de ciertos genes diana. El dominio de unión a DNA (DBD) del PR que estructuralmente consiste en dos átomos de Zinc tetrahedricamente coordinados por residuos conservados de cisterna, tiene un papel clave en las últimas fases del proceso regulador mediante sus cajas D (de dimerización) y P (por unión a PREs). El homodimero PR-DBD se forma por varias interacciones directas entre residuos o mediadas por moléculas de agua. Las cajas de dimerización D (Aa 604-608) de ambos PR interactúan entre Arg606-Asp608 y Ala604-Ile610 (Roemer, 2006).

Con objeto de analizar el papel de la dimerización en la regulación génica por progesterona, construimos dos mutantes defectivos para el proceso de dimerización. Mediante mutagénesis dirigida sobre el vector retroviral hPR-WT cambiamos los residuos de la caja D [Fig. R15-A] implicados en la interacción directa PR-PR, A604T y R606W [Fig. R15-B].



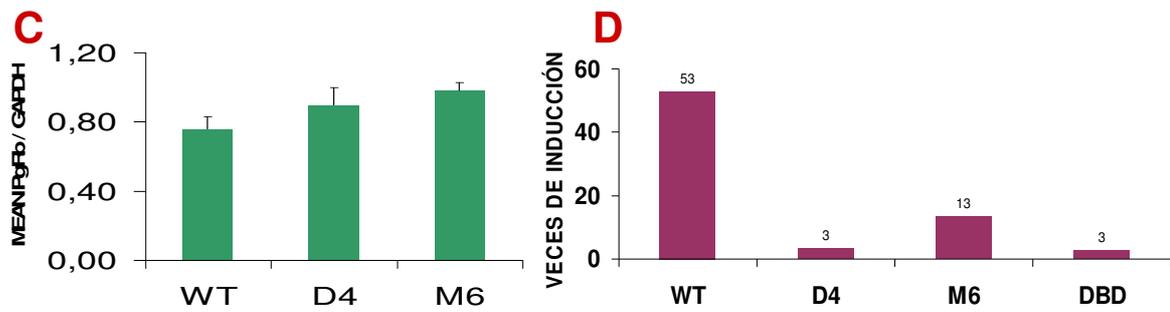
**FIGURA 15. Mutantes Puntuales De La Caja D (Dimerización) En El Dominio De Unión A DNA (DBD).** (A) Representación esquemática de las construcciones recombinantes del hPR<sub>b</sub>. AF, activation function; ERID, ER interaction domain; DBD, DNA binding domain; H, hinge region; IF, inhibitory function; LBD, ligand binding domain; TAP, tandem affinity purification peptide.

**B**

**FIGURA 15. Mutantes Puntuales De La Caja D (Dimerización) En El Dominio De Unión A DNA (DBD).** (B) Diagrama tridimensional de la estructura del dominio de unión a DNA (DBD) interaccionando con el DNA. *Diagrama superior.* Estructura modelada con SwissPDB Viewer. *Diagrama inferior.* Representación de la región de los dedos de Zinc dónde se sitúan las cajas P y D del dominio de unión a DNA (DBD) en el PR<sub>B</sub>.

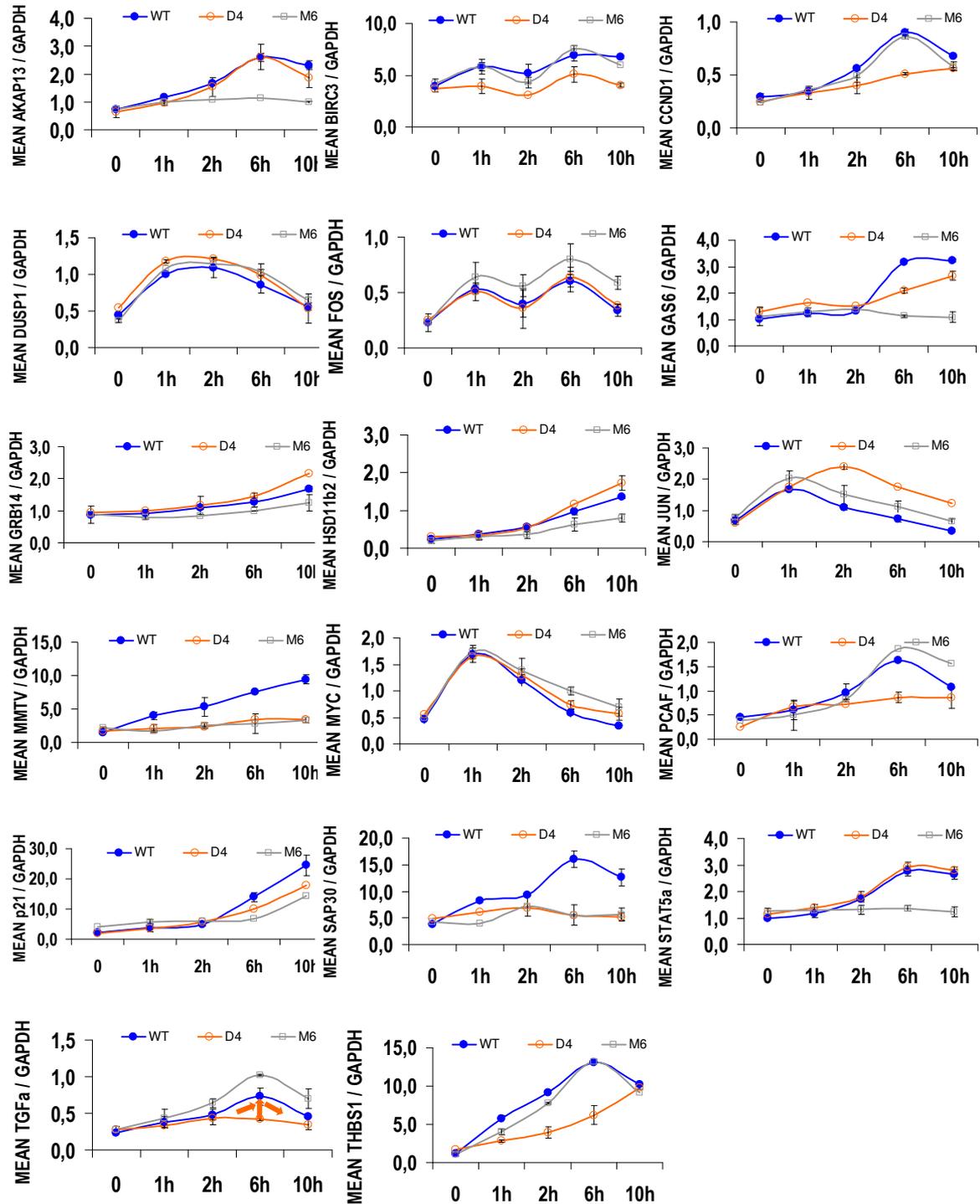
Para posteriormente producir partículas virales conteniendo las dos nuevas construcciones e infectar la línea TYML25. Tras la separación de las células GFP positivas mediante FACS, analizamos los niveles de expresión de transcrito de las líneas TYML25.A604T [D4] y TYML25.R606W [M6]. Observamos como las dos nuevas líneas D4 y M6 reflejaban unos niveles ligeramente incrementados respecto a la línea WT [Fig. R15-C].

Cuando analizamos la actividad transcripcional del promotor integrado MMTV para las nuevas líneas variantes en respuesta a progestina, comprobamos como ambas eran incapaces de promover la activación del MMTV en respuesta a R5020, confirmando la importancia de la dimerización en la respuesta a hormona de este promotor [Fig. R15-D]. Aunque todas las líneas celulares testadas en el ensayo afectaban la inducción del gen luciferasa, a diferencia de D4 o DBD con 3 veces de inducción, la línea M6 aún conservaba una ligera inducción de 13 veces. Resultados similares entre la línea D4 y DBD, indicarían que tanto dimerización como unión al DNA son necesarias para la transactivación de MMTV.



**FIGURA 15. Mutantes Puntuales De La Caja D (Dimerización) En El Dominio De Unión A DNA (DBD). (C)** Niveles de expresión de mRNA para hPR<sub>B</sub>. Las células TYML25 expresando hPR<sub>B</sub> o las formas mutadas, fueron recogidas para la extracción del RNA total. Analizamos la expresión del mRNA de hPR<sub>B</sub> (para comparar niveles) por RT y PCR en tiempo real con oligos específicos. Los oligos específicos para el cDNA de GAPDH son usados como control. **(D)** Transactivación del gen reportero MMTVLuc por progesterina en células estables WT, D4, M6 y DBD (de TYML25). Tras 48 horas en un medio sin suero añadimos R5020 10nM. Medimos la actividad luciferasa en extractos celulares 24 horas después de la cuantificación proteica para normalizar. Mostramos las veces de inducción de células tratadas con R5020 respecto etanol, como media de dos experimentos.

Con el propósito de conocer como la dimerización afecta a la regulación transcripcional de otros genes diana, mediante cinéticas de tiempo a 1-2-6-10h horas tratamos con progesterona las líneas celulares D4 y M6 en paralelo a la línea con hPR<sub>B</sub> salvaje. Usando oligos específicos para 17 genes regulados por progesterona, medimos por RT-PCR en tiempo real el transcrito de estos genes en D4 y M6, mostrando patrones de regulación diferentes según el gen y el mutante analizado. Un 50% de los genes analizados mostró el mismo comportamiento para ambos mutantes, bien por una inducción inalterada (DUSP1, FOS, GRB14 o MYC) o por eliminar parcial o completamente la expresión del gen (GAS6, MMTV, p21 o SAP30). Del resto de genes, 4 (AKAP13, HSD11b2, JUN o STAT5a) vieron comprometida su expresión en la línea M6 y otros 5 genes (BIRC3, CCND1, PCAF, TGF $\alpha$  o THBS1) en D4 [Fig. R15-E]. En mayor detalle, comentar que para el mutante D4 la cinética de activación transcripcional del oncogen JUN esta retrasada (a 2h) en relación al WT o M6 y de inducción es mayor. El gen implicado en la inhibición de apoptosis BIRC3 se ve afectado parcialmente al igual que el gen de arresto celular GAS6. Curiosamente, el gen THBS1 no muestra un pico de expresión a 6 horas aunque mantiene un crecimiento gradual de su expresión alcanzando a 10h los niveles mostrados en el WT. Para el caso del mutante M6, vemos una nula respuesta del gen GAS6 inducida por hormona, y como BIRC3 se ve afectado parcialmente en cuanto a sus niveles de expresión aunque mantiene los dos picos máximos a 1 y 6h. Además, notamos como el oncogen FOS y el factor de crecimiento TGF $\alpha$  mostraban unos niveles de expresión mayores a los del WT. Comportamiento, que ya habíamos visto con la línea celular DBD en estos mismos genes.

**E**

**FIGURA 15. Mutantes Puntuales De La Caja D (Dimerización) En El Dominio De Unión A DNA (DBD). (E)** Perfiles de expresión para 17 genes diana a lo largo del tiempo. Las células salvaje WT y mutantes M4, D6 fueron cultivadas durante 48 horas con medio blanco con suero charcolizado, 24 horas sin suero, y durante 12-6-10 horas con R5020 10nM. El mRNA total fue recogido, para analizar su expresión en los genes elegidos por RT y PCR en tiempo real usando primers específicos. Como control usamos oligos específicos para el cDNA de GAPDH.

Agrupando los genes según el tipo de regulación transcripcional que han mostrado en cada uno de los mutantes de dimerización generados respecto al WT, tendríamos 3/5 de los

genes en el mismo grupo para ambos mutantes y el resto en grupos diferentes. Así genes como JUN, FOS, MYC, DUSP1 y HSD11b2 no están afectados por las mutaciones de dimerización en ninguno de los mutantes, a diferencia de GAS6, SAP30 o p21 cuya activación esta comprometida al afectar la dimerización [Tabla T8]. Por otro lado, genes como BIRC3, GRB14, MMTV, PCAF, STAT5a, TGF $\alpha$  o THBS1 muestran una diferente regulación para cada mutante.

Si comparamos las agrupaciones realizadas de D4 y M6 con el mutante DBD previamente descrito, encontraremos un 50% de semejanza entre DBD y M6 con genes sobreexpresados como FOS y TGF $\alpha$ , similares como MYC o no inducidos como AKAP13-STAT5a, y sólo alcanzaremos a emparejar el 30% de los genes DBD con D4, en relación a similares como MYC o no inducidos como CCND1 y PCAF.

Para conocer cuantos de los genes identificados como regulados con necesidad de que hPR<sub>B</sub> se una directamente al DNA, gracias a los datos con el mutante DBD, se afectan por los residuos mutados de dimerización para hPR, agrupamos estos en función de ambos parámetros. La figura muestra que en todos los genes dónde el hPR<sub>B</sub> no requiere unirse directamente al DNA, ambos mutantes de dimerización coinciden en la regulación de estos genes tanto por no afectar su expresión (CDKN1A, GAS6) como alterando negativamente (DUSP1, FOS, HSD11b2, MYC, TGF $\alpha$ ) [Tabla T9]. Es decir, cuando la mutación hPR<sub>B</sub>-DBD afecta a la expresión de genes, las mutaciones de dimerización coinciden en su efecto de la misma manera. En cambio, si la activación transcripcional del gen diana requiere la unión sobre los PREs, los mutantes de dimerización coinciden en 10/17 genes estudiados, cinco por ambos mutantes a la vez y otros cinco sólo por un mutante.

Estos resultados indicarían que al menos uno de los residuos mutados de la caja D interpreta algún otro papel en la activación transcripcional directa sobre los promotores diana. Aunque el mecanismo exacto no se conoce, datos de un reciente artículo que atribuyen al residuo Arg606 de la caja D en el dominio DBD del receptor nuclear huérfano HNF4 una función adicional, vendrían a confirmar nuestra teoría (Barrero, 2006). De este modo, al papel clásico en dimerización, se le añade que la metilación de la arginina 606 por la metiltransferasa PRMT1 provoca el aumento posterior de afinidad por su sitio de unión en el DNA del promotor.

En resumen, si analizamos en conjunto todos los datos obtenidos con las cinéticas de tiempo para mutantes ERID-DBD-D4-M6 podremos construir una tabla indicando la posible vía regulatoria de estos genes. La tabla [Tabla T9] mostraría cuatro categorías según los genes se

hubieran visto afectados en su inducción tras el tratamiento hormonal por las mutaciones en los dominios del receptor de progesterona DBD (elimina la vía directa a través de PREs), ERID (elimina la interacción con ER $\alpha$  y la activación de la cascada MAPK), D4/M6 (evitan la dimerización) y AF2 (evita el reclutamiento de coactivadores).

Un **primer** gran grupo se habrían visto afectados por los mutantes DBD y el ERID, de modo que necesitarían la colaboración sinérgica intacta de ambas rutas para inducirse. De ellos, la mitad vio mermada su expresión por alguna o las dos mutaciones que afectaban a la dimerización. Genes como MMTV o SAP30 necesitarían de todos estos dominios intactos del hPR<sub>B</sub> para ser expresados en respuesta a hormona. Un **segundo** grupo incluiría aquellos genes, en dónde la actividad transcripcional directa del hPR<sub>B</sub> mediante el dominio DBD es clave, pero ni la activación de la ruta MAPK a través de la interacción con ER $\alpha$  ni las mutaciones en el segundo Zinc Finger de la caja D de dimerización alteran su expresión inducida por hormona. Serían genes como JUN o BIRC3. Un **tercer** grupo estaría compuesto por aquellos genes dónde el dominio DBD del hPR<sub>B</sub> no es vital para su expresión inducida, pero si la activación de la vía extranuclear de cascadas de kinasas Erk. Esta categoría incluiría genes regulados dónde la caja D del hPRB ejerce alguna función, como CDKN1A o GAS6, y aquellos dónde estos residuos no son esenciales, como HSD11b2 y TGF $\alpha$ . Finalmente, el último **cuarto** grupo vendría a contener 3 genes (DUSP1, FOS, MYC) que para ser inducidos en respuesta a hormona no necesitarían la mediación de hPR<sub>B</sub> a través de ninguno de los últimos dominios estudiados DBD, ERID, D4 ni M6. Englobamos en estas cuatro categorías podríamos englobar a aquellos genes afectados total o parcialmente por la mutación del residuo 911 del AF2 del hPR<sub>B</sub>.

**T8**

M6				D4			
BETTER THAN / TO WT	SIMILAR	LOWER	NO INDUCTION	BETTER THAN / TO WT	SIMILAR	LOWER	NO INDUCTION
FOS TGFa	BIRC3 CCND1 DUSP1 JUN MYC PCAF THBS1	GRB14 HSD11b2 CDKN1A	AKAP13 GAS6 MMTV SAP30 STAT5a	JUN	AKAP13 DUSP1 FOS GRB14 HSD11b2 MYC STAT5a	BIRC3 GAS6 CDKN1A	CCND1 MMTV PCAF SAP30 TGFα THBS1

DBD			
BETTER THAN / TO WT	SIMILAR	LOWER	NO INDUCTION
FOS TGFa	GAS6 MYC CDKN1A	HSD11b2 THBS1	AKAP13 CCND1 GRB14 JUN MMTV PCAF SAP30 STAT5a

**T9**

		AFECTADOS POR DBD <sub>mut</sub>	
		SI	NO
AFECTADOS POR	D4	CCND1 <sup>(2)(3)</sup> PCAF <sup>(3)</sup> THBS1 <sup>(3)</sup>	
	M6	AKAP13 <sup>(5)</sup> STAT5a <sup>(5)</sup>	
	D4=M6	MMTV SAP30 <sup>(2)</sup>	CDKN1A <sup>(3)(5)</sup> GAS6 <sup>(6)</sup>
	D4 y M6 NINGUNO	BIRC3 <sup>(3)</sup> GRB14 <sup>(2)(5)</sup> JUN <sup>(4)</sup>	DUSP1 FOS <sup>(1)(6)</sup> HSD11b2 <sup>(5)</sup> MYC TGFα <sup>(1)(6)</sup>

DBD (1) Sobreexpresión (2) Represión  
 D4 (3) Parcialmente (4) Sobreexpresión  
 M6 (5) Parcialmente (6) Sobreexpresión

**Tabla T8.** Tablas de agrupación de genes según su comportamiento en las líneas celulares variantes en relación a la línea salvaje. Las categorías son Represión, sin Inducción, menor, Similar y Mayor.

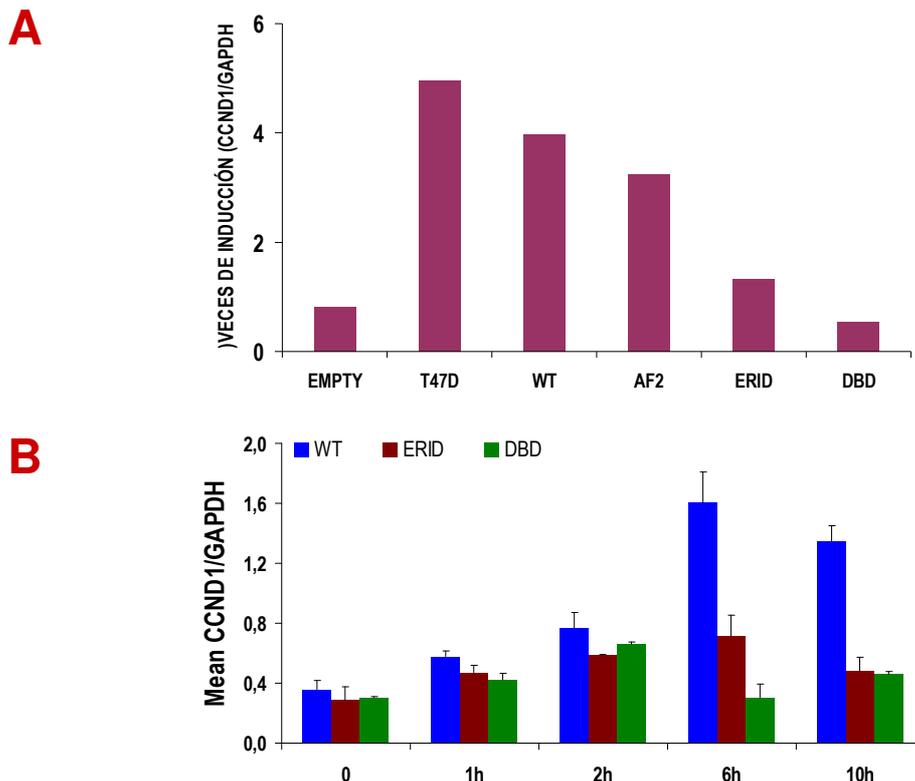
**Tabla T9.** Tabla resumen de los dominios implicados en la inducción de cada gen estudiado en PCR en tiempo real. La agrupación tiene en cuenta si el gen candidato se encontró mostrando una expresión reducida en relación a la línea WT al tiempo de máxima expresión por progesterona.

### R.8.1 – EXPRESIÓN DE CCND1 Y SU RELACIÓN CON PROLIFERACIÓN

Diversas pruebas indican que la progestina esta involucrada en controlar tumorigenesis de glándula mamaria tanto en pacientes como en animales experimentales. En la línea celular humana T47D (modelo de células de cáncer de mama con hER y hPR) las progestinas inducen progresión celular a través de un ciclo de división celular, seguida por arresto de crecimiento en la fase G1 del segundo ciclo. La hormona induce la expresión de mRNA de diversos genes reguladores de crecimiento celular, incluyendo Ciclina D1 y Ciclina E, en una manera dependiente de la ruta MAPK. Dando un papel esencial a la actividad de Ciclina D1 para la progresión desde la fase G1 a S (Skildum, 2005).

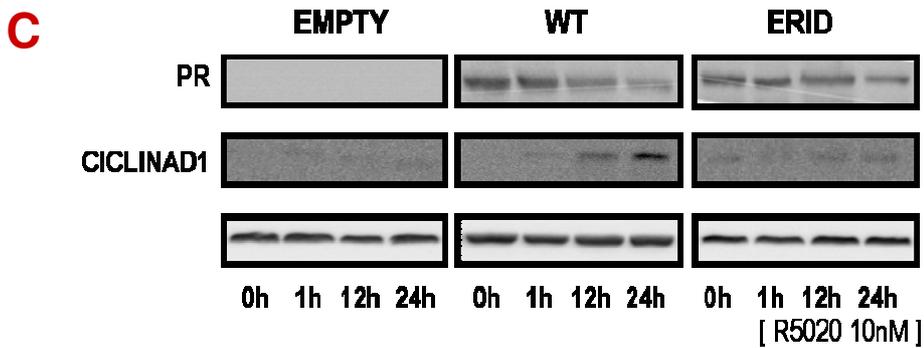
Para comprobar si los dominios mutados en las líneas celulares generadas afectan a la regulación de Ciclina D1, medimos los niveles de mRNA tras 6 horas de tratamiento con progestina. Las líneas celulares EMPTY-WT-AF2-ERID-DBD-T47D fueron privadas de suero durante 2 días como método de arresto celular y entonces tratadas con 10nM de R5020. Dos dominios mutados del hPR<sub>B</sub> provocaron una disminución en la capacidad de regular la expresión de Ciclina D1 tras el tratamiento hormonal. Estas líneas celulares deficientes fueron la línea ERID, como esperábamos por su deficiencia en la inducción de ER $\alpha$ /Src/Erk, y sorprendentemente, la línea celular DBD (mutada la región de unión a DNA) [Fig. R16-A]. Sugiriendo que tanto la actividad transcripcional de hPR<sub>B</sub>, como la activación de la ruta extranuclear de MAPK son requeridas para la regulación de Ciclina D1 en respuesta a progestina.

Pocas son las pruebas que relacionan la vía genómica clásica de reconocimiento de PREs de ciertos promotores diana con la regulación de Ciclina D1. Con objeto de demostrar que estas vías directas también juegan un papel relevante en la inducción de proliferación, analizaremos la cinética de tiempo para la regulación de Ciclina D1 en la líneas mutantes DBD y ERID. Al medir los niveles de transcrito para Ciclina D1 producidos tras 1-2-6h con R5020 demostramos como la líneas variantes tienen comprometida la transcripción, a diferencia del WT dónde existe una clara acumulación tras 2-6h de tratamiento [Fig. R16-B]. Indicándonos finalmente, la importancia del modo de acción clásico del hPR<sub>B</sub> en la regulación de Ciclina D1.



**FIGURA 16. Regulación Transcripcional Del Gen CCND1.** (A) Niveles de expresión de mRNA para Ciclina D1. Las células estables generadas expresando hPR<sub>B</sub> o las forma mutadas, fueron recogidas para la extracción del RNA total. Analizamos la expresión del mRNA de Ciclina D1 por RT y PCR en tiempo real con oligos específicos. Los oligos específicos para el cDNA de GAPDH son usados como control. (B) Perfil de expresión para el gen diana Ciclina D1 a lo largo del tiempo. Las células salvaje WT y mutante DBD fueron cultivadas durante 48 horas con medio blanco con suero charcolizado, 24 horas sin suero, y durante 1-2-6-10 horas con R5020 10nM. El mRNA total fue recogido, para analizar su expresión en los genes elegidos por RT y PCR en tiempo real usando primers específicos. Como control usamos oligos específicos para el cDNA de GAPDH.

Con objeto de confirmar las evidencias que señalan a las acciones no genómicas de activación citoplasmática de kinasas del hPR<sub>B</sub> como claves para la progresión de G1 a S de células de cáncer de mama en respuesta a progestina, medimos los niveles de la proteína Ciclina D1. Cuando analizamos la expresión de la proteína reguladora de ciclo celular Ciclina D1, observamos que el WT muestra un incremento de la expresión tras 12-24 horas con R5020, mientras la línea celular mutante ERID no mostró ninguna acumulación de proteína [Fig. R16-C]. Indicando que la expresión de Ciclina D1 requiere del modo de acción del hPR<sub>B</sub> perdido por el mutante ERID, al ser incapaz de interactuar con hER $\alpha$  y, consecuentemente activar la ruta de MAPK que le llevaría a un incremento en la expresión de Ciclina D1.



**FIGURA 16. Regulación Transcripcional Del Gen CCND1. (C)** Análisis por Western Blot de la expresión de Ciclina D1 en las formas recombinantes de hPR<sub>B</sub> WT y ERID. Hibridamos 100 µg de extracto de cada línea celular, obtenidos dejar a las células 24 horas en medio sin suero y tratarlas 1-2-24 horas con R5020 10nM, con un anticuerpo contra Ciclina D1.

Concluimos que cuando hPR<sub>B</sub> no puede activar kinasas falla al entrar a fase S en respuesta a progestina, por no ser capaz de expresar y acumular niveles adecuados de Ciclina D1, de modo que en la entrada en fase S inducida por progestina (18-24h) la activación ERα/Src/Erk juega un papel esencial aunque no único.

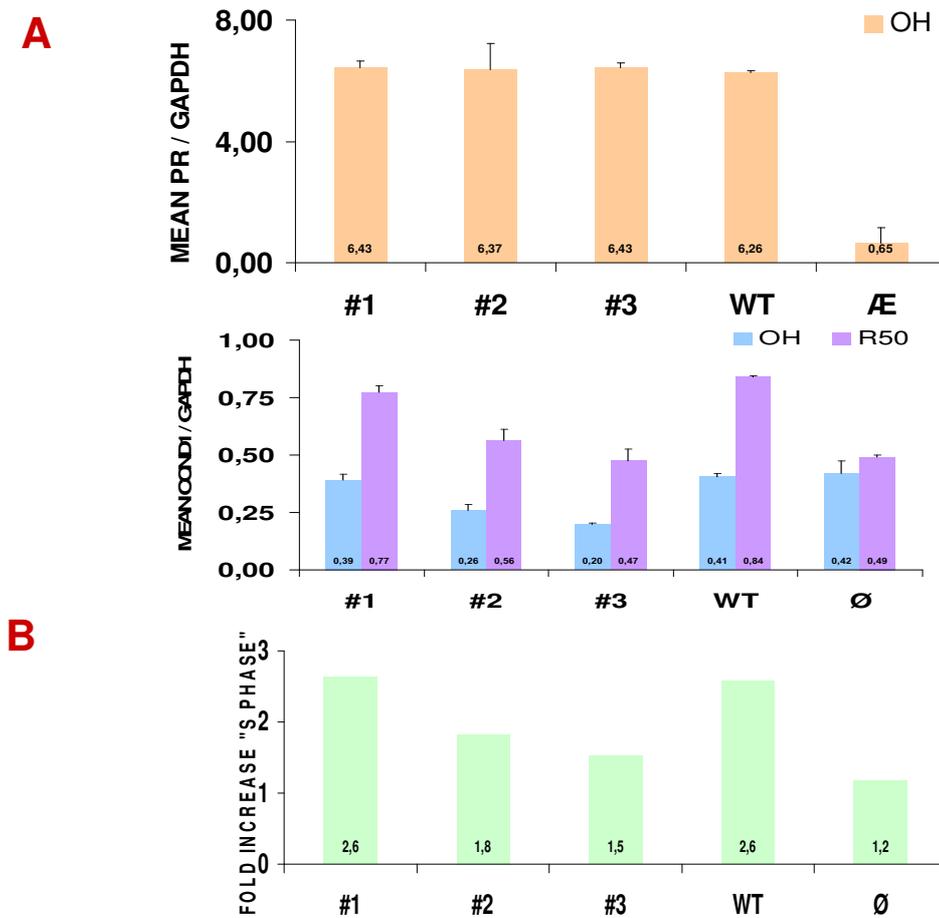
En resumen, los efectos de inducción de ciclo celular promovidos por hPR<sub>B</sub> en respuesta a progestina requieren el sinergismo de ambos modos de acción del receptor, tanto activación de la vía p42/p44 MAPK como de reconocimiento de PREs. Teniendo la regulación del promotor de Ciclina D1 un papel relevante en la mediación de estos efectos proliferativos.

### R.8.2 – EFECTOS DE LA ELIMINACIÓN DE CCND1

Los resultados con las líneas celulares variantes nos han permitido ver una clara correlación entre la expresión de CCND1 y los efectos en proliferación. Para confirmar la importancia clave de la expresión de Ciclina D1 en relación directa con proliferación celular inducida por hormona en líneas celulares de cáncer de mama, usaremos un SiRNA contra esta proteína reguladora clave. Con este propósito, produciremos partículas virales siguiendo el protocolo de SIGMA (Ver Material y Métodos) para infectar la línea celular WT. Una vez infectadas las células y seleccionada la población infectada gracias al marcador de resistencia a Neomicina, analizamos la expresión de Ciclina D1 por PCR cuantitativa, y el crecimiento celular inducido por progestina. La infección de WT con los diferentes SiRNAs contra CCND1, mostró tasas de inhibición para la expresión del mRNA de Ciclina D1 del 52% [#3], 37% [#2] y 5% [#1] [Fig. R17-A]. El tratamiento con R5020 indicó que sólo la línea infectada con el SiRNA#1 fue capaz de recapitular a los niveles alcanzados por el WT sin infectar, de hecho la inhibición basal de CCND1 con esta construcción no alcanzo mas del 5%. Respectivamente, las construcciones

#2 y #3 tras el tratamiento hormonal mostraron valores reducidos en un 56% y 44% en relación al WT.

En un ensayo de tinción por yoduro de propidio como los anteriormente descritos, observamos como la proliferación del WT fue inhibida tras la infección con los SiRNAs contra CCND1 #2 y #3, donde se impide la inducción de ciclo celular por hormona, al notar una clara disminución en la inducción del número de células en fase S desde las 2.6 veces de la línea celular sin infectar a las 1.8 y 1.5 veces de #2 y #3 respectivamente [Fig. R17-B]. Además cuanto mayor es la inhibición del transcrito para Ciclina D1, menor es la inducción hacia fase S.

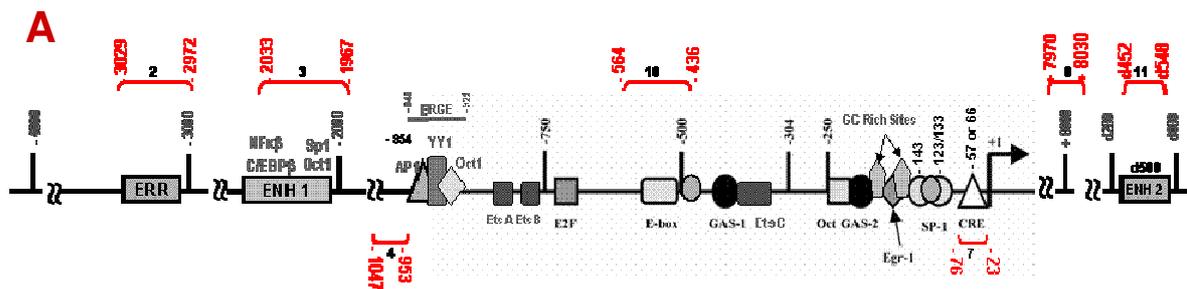


**FIGURA 17. Relación De Ciclina D1 Con Proliferación. (A)** Determinación de la disminución en la expresión de Ciclina D1 tras la infección con un SiRNA interferente (Sigma). Después de 48 horas el medio fue reemplazado a medio fresco sin suero. Tras un día en condiciones libres de suero, las células fueron incubadas con 10nM R5020 durante 6 horas y el RNA total fue preparado., generado el cDNA y usado como muestra para PCR en tiempo real usando primers específicos de hPR<sub>B</sub> y Ciclina D1. Cada valor fue corregido por el gen actina humano y expresado como las veces de abundancia relativa de RNA sobre el tiempo cero. Los valores representan la media y la desviación estándar de dos experimentos llevados a cabo por duplicado. **(B)** Ensayo de proliferación para demostrar que el SiRNA de interferencia para Ciclina D1 compromete los efectos proliferativos por inducción hormonal. Las células WT fueron infectadas con SiRNAs contra Ciclina D1 (Sigma) en medio MEM. Después de 48 horas el medio fue reemplazado por fresco sin suero. Tras un día en condiciones libres de suero, las células fueron incubadas con 10mM R5020 durante 16 horas y la capacidad proliferativa medida tras la tinción con yoduro de propidio. Los valores representan la media del porcentaje de células en fase S y la desviación estándar de dos experimentos llevados a cabo por duplicado.

En resumen, los experimentos de silenciamiento en células humanas de cáncer de mama confirmaron la correlación entre la expresión de CCND1 y la proliferación celular, señalando a CCND1 como un potencial objetivo terapéutico para tratar cáncer de mama.

### R.8.3 – REGULACIÓN DEL PROMOTOR DE CCND1

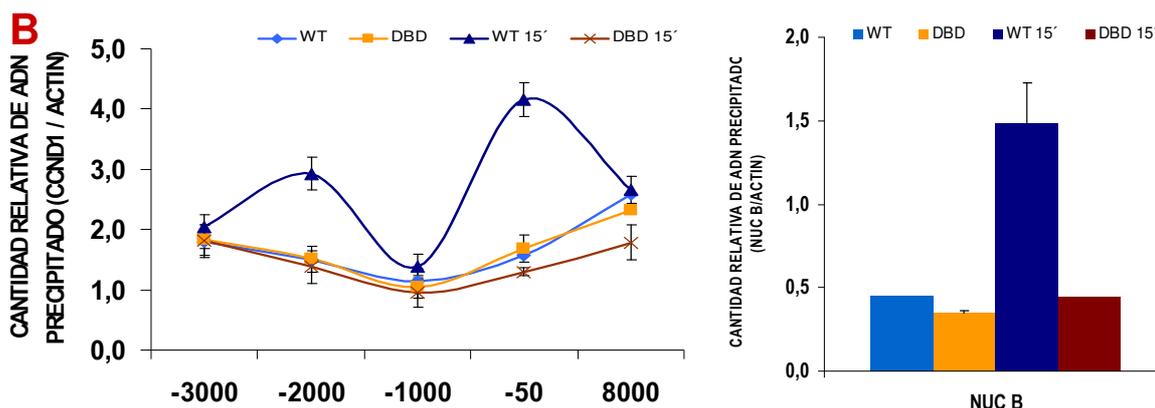
Las hormonas esteroideas inducen la expresión del mRNA de Ciclina D1 predominantemente a nivel transcripcional en células humanas de cáncer de mama, aunque el mecanismo genético involucrado para la regulación génica de CCND1 no ha sido completamente dilucidado, porque la región promotora de este gen no contiene elementos de respuesta a hormona (HREs). Diversas regiones del promotor de CCND1 sensibles a estrógenos han sido mapeadas por diferentes autores, incluyendo elementos de respuesta a AMPc (CRE) y sitios Sp1 (posición -57), un sitio AP1 (-954), sitios ricos en GC (-110 y -143) y una región llamada ERGE (elemento de respuesta a estrógenos G1) con potenciales sitios de unión para AP1, YY1 y Oct1 (-3000), además de posibles regiones potenciadoras (-2000, +500) [Fig. R18-A]. Actualmente, no existen evidencias de cómo se lleva a cabo la regulación de CCND1 en respuesta a progesterona en células humanas de cáncer de mama.



**FIGURA 18. Dominios De hPR<sub>B</sub> Implicados En La Activación Del Promotor De CCND1. (A)** Representación esquemática de la región del promotor de Ciclina D1 con la localización de los sitios potenciales de unión para ER $\alpha$ .

Con objeto de caracterizar la regulación de la expresión génica de CCND1 por progesterona, analizamos el reclutamiento del receptor de progesterona al promotor endógeno mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Usando un anticuerpo contra el epitopo Flag del hPR<sub>B</sub> recombinante, analizamos el reclutamiento de este en respuesta a R5020 tras 15 minutos. Para el análisis del gen de CCND1 cubrimos una extensa región del promotor mediante el escaneo de 5 amplicones entre -3000 y -50bp, otro centrado en +8000 en el intron 4, y el último amplicon cubriendo una secuencia a 500bp corriente abajo de la secuencia codificadora. El análisis por ChIP de las líneas celulares WT y DBD mostró que el hPR<sub>B</sub> de la línea WT fue reclutado tras 15 minutos de tratamiento hormonal a las regiones potenciadora 1 (ENH1) en -2000, y a la región situada a -50bp, ambas ricas en sitios putativos de unión para Sp1 [Fig. R18-B]. El hPR-DBD no fue reclutado en ninguna de las regiones analizadas.

Como control de los experimentos de ChIP para CCND1, confirmamos el reclutamiento de hPR<sub>B</sub> en respuesta a hormona en el promotor modelo MMTV, que contiene 5 HREs. Usando primers específicos para el Nucleosoma B del MMTV, encontramos como el hPR-WT es reclutado normalmente en respuesta a hormona, y la mutación de la caja P del dominio de unión a PRes del hPR-DBD evita esta asociación [Fig. R18-B]. Este resultado demuestra que el tratamiento con R5020 induce la interacción de hPR<sub>B</sub> sobre las regiones promotoras de CCND1 a -50 y -2000.

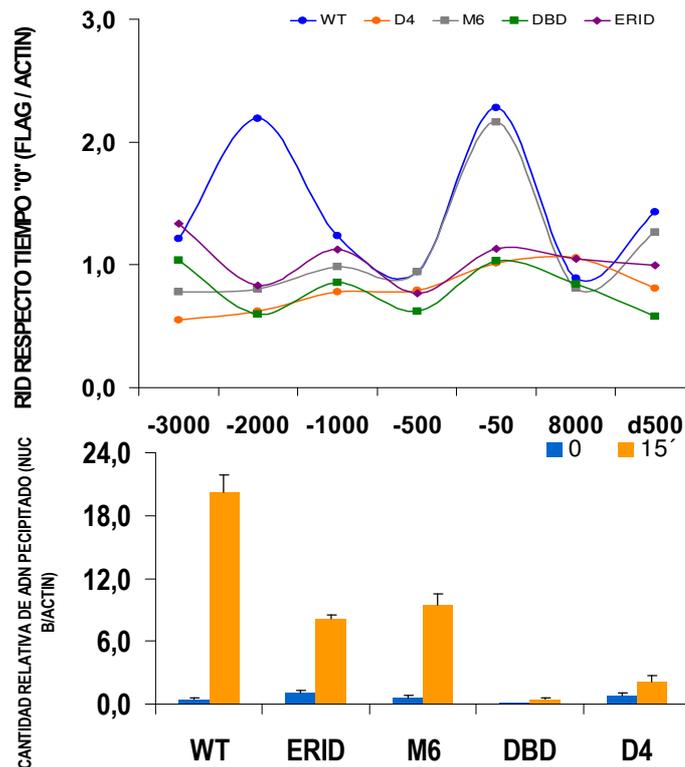


**FIGURA 18. Dominios De hPR<sub>B</sub> Implicados En La Activación Del Promotor De CCND1. (B)** Análisis por PCR en tiempo real cuantitativo para experimentos de ChIP. Las células generadas WT, DBD fueron tratadas o no con R5020 10nM durante 15 minutos, recogidas, y usadas para un experimento de ChIP con el anticuerpo contra Flag. Los fragmentos de DNA precipitados son llevados a un análisis por PCR en tiempo real para testear la presencia de las secuencias correspondientes al promotor MMTV, Ciclina D1 y el gen actina como control. Las veces de enriquecimiento de la secuencia diana fue calculada en relación a tiempo cero. Los valores representan la media y la desviación estándar de dos experimentos llevados a cabo por duplicado.

Adicionalmente, tratando de determinar si la activación de cascadas de señalización, como ocurre con la activación de CCND1 por estradiol, esta involucrada en la regulación del gen de Ciclina D1 e incluso, para determinar si la dimerización juega algún papel, hicimos un nuevo ChIP para las líneas WT-DBD-ERID-M6-D4 en el mismo tiempo de tratamiento hormonal. El análisis mostró que el hPR-WT era reclutado a -50 y -2000bp, y como hPR-DBD tenía impedido este reclutamiento [Fig. R18-C]. Tampoco encontramos en ninguna de las regiones promotoras analizadas la presencia de D4<sub>mut</sub> o hPR-ERID, indicando la importancia de la dimerización como señal del cambio conformacional sufrido por el hPR<sub>B</sub> tras la unión del ligando y el papel clave que juega la activación de la ruta de kinasas. Sorprendentemente, el hPR<sub>B</sub>-M6 de la línea celular M6 fue detectado en la región -50bp tras los 15 minutos de R5020, pero no en la región potenciadora 1 (Enh1) situada a -2000bp. Esto implicaba que la mutación en M6 impide el mecanismo regulador por el cual el hPR<sub>B</sub> ejerce su acción en el dominio potenciador, y como manteniendo inalterado el reclutamiento sobre la región -50bp, este mutante induce la expresión del gen para CCND1.

También en este caso usamos como control del ChIP, el reclutamiento de hPR<sub>B</sub> en respuesta a hormona sobre el Nucleosoma B del promotor MMTV. Se confirmó el reclutamiento de hPR-WT, como las mutaciones en M4<sub>mut</sub> o hPR-DBD evitan esta asociación, y como los mutantes D6<sub>mut</sub> y hPR-ERID afectan solo parcialmente el reclutamiento [Fig. R18-C]. Además, este resultado mostró como el tratamiento con R5020 promueve el reclutamiento sobre MMTV, correlacionándose bastante bien con los resultados de expresión de MMTV en respuesta a hormona [Fig. R7-A] [Fig. R7-B].

**C**



**FIGURA 18. Dominios De hPR<sub>B</sub> Implicados En La Activación Del Promotor De CCND1. (B)** Análisis por PCR en tiempo real cuantitativo para experimentos de ChIP. Las células generadas WT, DBD fueron tratadas o no con R5020 10nM durante 15 minutos, recogidas, y usadas para un experimento de ChIP con el anticuerpo contra Flag. Los fragmentos de DNA precipitados son llevados a un análisis por PCR en tiempo real para testear la presencia de las secuencias correspondientes al promotor MMTV, Ciclina D1 y el gen actina como control. Las veces de enriquecimiento de la secuencia diana fue calculada en relación a tiempo cero. Los valores representan la media y la desviación estándar de dos experimentos llevados a cabo por duplicado.

En conclusión, la progesterona podría inducir la expresión del gen de Ciclina D1 en células de cáncer de mama por unión directa de hPR<sub>B</sub> o a través de otros factores transcripcionales al promotor en una región situada a -50bp del inicio de transcripción, requiriendo la activación de la cascada extranuclear de señalización MAPK y la homodimerización previa a su acción como factor transcripcional. Además, la región potenciadora 1 (Enh1) situada a -2000bp corriente arriba del +1, demostró tener un papel de apoyo en la expresión inducida de Ciclina D1.





# Discusión

## EXPRESIÓN DE FORMAS MUTADAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA HUMANO EN hBCC

### D.1.1.- SISTEMA DE EXPRESIÓN RETROVIRAL PARA hPR

Muchos artículos coinciden en la importancia del receptor de progesterona como un factor transcripcional fundamental como mediador de los efectos hormonales de la progesterona en útero y mama. Algunos de estos, destacan la importancia de la isoforma B del receptor sobre la isoforma A, por su capacidad transcripcional directa en los llamados efectos genómicos y como activador de las cascadas de señalización en los efectos alternativos, mediando la regulación génica por progesterona. Unas pocas decenas de artículos, identifican regiones clave en los dominios de la proteína para la unión de coreguladores, ligando, al DNA,.... Finalmente, no existen más de tres autores que hayan analizado globalmente la red génica inducida por progesterona en células de cáncer de mama y/o útero expresando la isoforma B bien transitoriamente o de un modo inducido. Pues bien, nuestro objetivo era conseguir expresar de forma estable la isoforma B del receptor de progesterona y otras formas mutadas en ciertos dominios considerados funcionalmente relevantes, en líneas celulares de cáncer de mama, para determinar los modos de acción del hPR<sub>B</sub> en la regulación de estas redes génicas inducidas por progesterona.

Con este propósito usamos un sistema retroviral (pRAVFlag) que nos permitía controlar la cantidad de PR que expresaríamos así como también introducía un péptido señal en el extremo N-terminal de la proteína expresada de modo que facilitaba la inmunodetección y purificación de complejos, y finalmente permitía la coexpresión independiente de una proteína fluorescente GFP facilitando la identificación de las células transducidas.

Los ensayos funcionales de la construcción recombinantes transitoriamente transfectada, mostraron que el receptor hormonal se expresaba con un tamaño de 15Kd superior al del receptor endógeno debido a la etiqueta TAP fusionada al extremo-N de nuestro hPR<sub>B</sub>. También comprobamos que esta etiqueta no alteraba los efectos transcripcionales normales ejercidos sobre el promotor MMTV (ampliamente estudiado en nuestro laboratorio) en respuesta a progestina, ni la inducción de proliferación celular de fibroblastos o células de cáncer de mama, llegando a movilizar hasta a un 40% de las células tratadas, de modo idéntico a las células control con un hPR<sub>B</sub> no marcado. Asimismo, como la literatura sobre proliferación mediada por

progesterona describe, el tratamiento con un inhibidor específico de la ruta de las MAP kinasas (PD980599) bloqueó la proliferación inducida por hormona de ambos hPR<sub>B</sub>s.

En resumen, podemos afirmar que marcar el hPR<sub>B</sub> con una señal TAP no afecta negativamente a su función celular mediada por progesterona.

#### **D.1.2.- FUNCIONALIDAD DE hPR<sub>B</sub> MUTANTES**

Una vez habíamos determinado que el sistema de expresión era capaz de expresar una proteína funcional, nos preguntamos si podríamos construir hPR<sub>B</sub> deficientes en los diferentes modos de acción celular al mutar ciertos residuos posiblemente relevantes para estos fines. Buscamos diferenciar los dos posibles caminos de actuación bien la activación transcripcional directa o la activación de las rutas de señalización recientemente descritas. En nuestro laboratorio, Ballaré (Ballaré, 2003) describió una región implicada en la activación de la ruta de la MAPK a través de la interacción con el receptor de estrógenos (ERID1-**ERID**), y Gong (Gong, 1997) un residuo implicado en el reclutamiento de coreguladores claves para mediar efectos de activación transcripcional (E911A-**AF2**). Nuestra contribución en este punto, fue la de crear un nuevo mutante incapaz de mediar efectos transcripcionales directos al evitar la unión directa con las secuencia específicas de reconocimiento (PREs) localizadas en los promotores de ciertos genes diana para la regulación por progesterona (Caja P-**DBD**).

Tras clonar estos tres hPR<sub>B</sub>s mutantes en el sistema de expresión elegido, quisimos investigar la actividad transcripcional de las variantes en respuesta a progestina sobre el promotor MMTV en fibroblasto y en células de cáncer de mama. En este ensayo confirmamos la incapacidad de los mutantes afectados en transcripción (AF2 y DBD) de inducir la expresión del promotor MMTV, y la habilidad inalterada del mutante ERID en inducir estos efectos directos.

En resumen, los mutantes utilizados creaban contextos regulatorios deficientes dónde poder relacionar la implicación del dominio regulador del hPR<sub>B</sub> con la regulación génica por progesterona, bien a través de la interacción hPR<sub>B</sub>-ER $\alpha$  o por la capacidad transcripcional del hPR<sub>B</sub>.

### D.2.1 – POBLACIONES ESTABLES DE CÉLULAS EXPRESANDO hPR<sub>B</sub>

Tras comprobar la viabilidad del sistema de expresión, y el potencial de los mutantes como sensores informativos sobre los modos regulación génica llevada a cabo por el hPR<sub>B</sub>, planeamos estudiar todos estos efectos en un entorno estable en células de cáncer de mama.

De modo que, usamos las construcciones retrovirales para conseguir células dónde el gen recombinante hPR estuviese establemente integrado a unos niveles semejantes a los endógenos de la línea parental T47D. Con este propósito elegimos las células de cáncer de mama T47Dy (descritas por Horwitz como desprovistas de PRs), a las cuales les electroporamos una copia del promotor MMTV fusionado con un gen reportero de luciferasa, previamente a la inserción viral en su genoma de nuestras construcciones. Un punto fundamental del proceso de integración de las construcciones, consistió en usar cantidades virales diferentes y crecientes para la infección de la célula diana, con el fin de asegurar la semejanza entre las líneas, y la copia única integrada en el genoma celular.

La expresión de hPR<sub>B</sub> recombinante mostrada por todas las líneas celulares fue de igual magnitud entre las tres líneas celulares expresando formas mutadas (AF2, ERID y DBD) del hPR<sub>B</sub> y la línea salvaje, con respecto a los niveles endógenos de expresión de hPR<sub>B</sub> de la línea parental T47D, como comprobamos a nivel de mRNA y proteína. En la misma medida que el hPR<sub>B</sub> endógeno para la línea parental, nuestros hPR<sub>B</sub> recombinantes mostraban una localización eminentemente nuclear. Como era de esperar, ninguna de las mutaciones realizadas en los dominios funcionales del hPR<sub>B</sub> afectaban a la localización basal de la proteína expresada.

De modo que, las líneas celulares generadas muestran tasas de expresión y una localización para hPR<sub>B</sub> similar para todas ellas y con respecto a la línea parental T47D.

### D.2.2.- CLONES INDIVIDUALES VERSUS POOL CELULAR

Con la premisa de evitar posibles efectos variables entre las líneas celulares heterogéneas, causados por integraciones distintas en sitios del genoma, separamos células individuales aprovechando el marcador fluorescente GFP expresado por nuestras células infectadas.

Por otro lado, también éramos conscientes de que la gran desventaja de este sistema clonal sería la pérdida de una visión del comportamiento promedio que te ofrece una población heterogénea, y que elegir células individuales implicaría estudiar el comportamiento de un solo contexto celular, pudiendo ser particular por el sitio de integración, una mutación fortuita o una recombinación.

Los clones individuales generados desde la línea salvaje, nos mostraron que existía una alta correlación entre los niveles de expresión de hPR<sub>B</sub> y su actividad transcripcional en la inducción del promotor reportero MMTVLuc. Los efectos proliferativos de las células de cáncer de mama en respuesta a progesterona mediados a través de las cascadas de señalización MAPK.

La obtención de clones individuales de la línea celular deficiente ERID, expresando un hPR<sub>B</sub>-ERID mutante de delección para el dominio de interacción con ER $\alpha$ , nos demostró la alta variabilidad funcional entre los diversos clones. La capacidad de inducción del gen reportero MMTVLuc en respuesta a progesterona fue completamente dispar entre los clones analizados, incapacitándonos objetivamente para elegir alguno de ellos como el comportamiento de acción real ejercido por un hPR<sub>B</sub>-ERID.

En resumen, aunque los niveles de expresión en los clones fueron comparables entre sí, la inducción del gen reportero fue tan diversa que no pudimos determinar cual era el comportamiento real del mutante ERID, o que clon representaría mejor los resultados obtenidos con la población no clonal. Esto implicaba que tendríamos que elegir clones particulares para cada mutante de PR de forma subjetiva, basados en la inducción de MMTV y otro parámetro parcial.

Tras estos estudios con clones individuales descartamos usarlos, puesto que corríamos el riesgo de que su comportamiento fuese causado por el lugar de integración de la construcción en el genoma, por las posibles mutaciones, recombinaciones con el gen endógeno u otros efectos particulares que pudiera experimentar una sola célula.

### **D.2.3 - ESTABILIDAD A DE LA EXPRESIÓN A LARGO PLAZO**

Otra de las premisas por las que nos decantamos, en principio, por hacer clones individuales era la posibilidad patente de poder elegir un clon que mostrara estabilidad para la expresión de hPR<sub>B</sub> a lo largo del tiempo. Ya que pensamos, que una población heterogénea

tendría más posibilidades de eliminar la expresión recombinante por la diferente adaptabilidad celular. Uno de los clones, el A1-WT, demostró mantener la expresión de hPR<sub>B</sub> tras tres meses en cultivo.

Por otro lado, los indicios de una menor estabilidad a lo largo del tiempo para la expresión de hPR<sub>B</sub> en pools celulares, quedaron inciertos tras separar de nuevo las células. Estos pools resorteados permanecieron positivos para GFP durante al menos 3 meses de cultivo, manteniendo su expresión estabilizada para hPR<sub>B</sub> y GFP. La disminución del número de células positivas tras la primera separación celular pudo deberse al porcentaje de precisión (95%) de la técnica de separación celular por FACS, permitiendo incluir algunas células negativas que podrían mostrar ventajas de crecimiento respecto a las células infectadas. Por otro lado, una segunda separación partiendo de porcentajes de más células positivas nos ha permitido conseguir altas precisiones de separación y una mayor estabilidad del número de células positivas a lo largo del tiempo.

En resumen, las poblaciones celulares no clonales muestran el comportamiento promedio de cada mutación, evitando estudiar casos particulares por el sitio de integración, las recombinaciones o las mutaciones fortuitas que pueden suceder en una célula individual, efectos que quedan diluidos en un pool celular. Además, el pool celular mantiene la misma estabilidad de expresión para hPR<sub>B</sub> a lo largo del tiempo que un clon individual.

## ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL EN RESPUESTA A PROGESTERONA

### D.3.1.- IMPLICACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DEL PROMOTOR DE MMTV

La caracterización de las líneas celulares construidas midiendo la respuesta a progesterona del gen reportero MMTVLuc, tanto a nivel de transcrito como de actividad luciferasa, nos indicó que las mutaciones de los tres dominios estudiados altero la expresión de este promotor. Tanto la delección de la región ERID (de interacción con  $ER\alpha$ ) como las mutaciones puntuales de los dominios AF2 (Activation Function 2) y DBD (DNA binding domain) alteraron la inducción de MMTV por  $hPR_B$ . Este resultado indicaba que tanto la actividad transcripcional directa de  $hPR_B$ , como la activación de la cascada de señalización  $ER\alpha/c$ -Src/Erk, eran esenciales para el modo de acción del  $hPR_B$  en este promotor. La influencia de la ruta citoplasmática MAPK en la actividad transcripcional del promotor, revelada por la inducción reducida del reportero MMTVLuc en la línea celular ERID, fue confirmada por el uso del inhibidor químico PD (de la activación de ERK). Tanto deleccionar el dominio de interacción con  $ER\alpha$  del  $hPR_B$ , como bloquear la progresión de la ruta MAPK con un inhibidor químico reducían la expresión de la proteína luciferasa del gen reportero en respuesta a progesterona.

Paralelamente, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en la línea celular de cáncer de mama T47MVL, el laboratorio describió el reclutamiento del complejo Erk/ $hPR_B$ /Msk al nucleosoma B del promotor MMTV tras 15 minutos de tratamiento hormonal (Vicent, 2006). Y como el bloqueo de la cascada ER/cSrc/Erk en respuesta a progesterona por el mutante  $hPR_B$ -ERID, impide el reclutamiento y la fosforilación de  $hPR_B$  en el promotor MMTV.

También confirmamos mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina la implicación directa del dominio DBD en el reclutamiento de  $hPR_B$  sobre los PREs de la región del Nucleosoma B en el promotor MMTV, debido a que la triple mutación evitaba estos contactos. La delección del dominio ERID del  $hPR_B$  también eliminaba el mecanismo de inducción del promotor MMTV, pero no por evitar la unión directa con el DNA sino por afectar a eventos posteriores implicados en la activación, como el reclutamiento del complejo Erk/Msk y la fosforilación de la Histona H3 en Ser10 (H3Ser10).

### D.3.2 - ACTIVACIÓN GÉNICA A TRAVÉS DE MEDIADORES TRANSCRIPCIONALES

En la caracterización posterior sobre el comportamiento de los dominios funcionales de hPR<sub>B</sub> sobre la activación de promotores, sin PREs conocidos en sus secuencias promotoras, miramos la activación de genes dónde se creía que el hPR podía bajar por factores mediadores como Ap1 o Sp1.

La inducción de p21 (CDKN1A) ocurre a través de los mediadores transcripcionales Sp1. Se ha descrito que hPR<sub>B</sub> es reclutado junto a Sp1 en el tercer y cuarto de los seis sitios de unión descritos para el promotor de p21 en respuesta a progesterona. Como esperaríamos, los resultados de RT-PCR confirmaron que la activación transcripcional de p21 en respuesta a progesterona no se está afectada por la mutación de hPR<sub>B</sub> en el dominio de unión a DNA (DBD).

También, se ha descrito que la activación en respuesta a hormona de Ciclina D1 (CCND1) podría deberse al reclutamiento del complejo hPR<sub>B</sub>/AP1 sobre secuencias específicas de reconocimiento para AP1. Aquí, en cambio notamos como el dominio DBD del hPR<sub>B</sub> estaba relacionado con la interacción con factores mediadores como AP1.

En resumen, mostramos como la región DBD del hPR<sub>B</sub> previamente descrita como de interacción con las secuencias PREs del promotor, esta implicada en la regulación del gen CCND1, a priori descrito como desprovisto de PREs y activado a través de la interacción hPR<sub>B</sub>/AP1. De este modo, nos planteamos que si que podría existir la participación del hPR<sub>B</sub> por unión directa con el DNA, aunque aún no descritas, o bien el dominio mutado DBD también está implicado en la interacción con el factor transcripcional AP1. Además, advertimos como la activación de MAP kinasas es fundamental en la expresión de Ciclina D1, e incluso para p21 como veremos mas adelante.

De este modo, la teoría propuesta por el laboratorio de que el hPR<sub>B</sub> modula la inducción del reportero MMTVLuc en respuesta a hormona por interacción directa con los PREs, se complementaría con la necesaria participación de la activación de la vía de las MAPK a través de la interacción hPR<sub>B</sub>-ER $\alpha$ .

### **D.3.3.- PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR PROGESTERONA**

La inducción de proliferación en células de cáncer de mama como respuesta a la estimulación por progesterona es un efecto descrito en la literatura como resultado único de la activación de cascadas de señalización. Se ha descrito que en respuesta a progestina, múltiples clones de células de cáncer T47D, las cuales expresan la isoforma B del hPR, actúan en una manera bifásica: las células completan un ciclo de división y entonces se arrestan en fase G1

(Groshong, 1997). En este estudio hemos determinado como la cascada de señalización de las MAPK iniciada con la interacción hPR<sub>B</sub>/ER $\alpha$ /c-Src es determinante mediando estas acciones proliferativas inducidas por progesterona. En los ensayos de ciclo celular con la línea celular mutante ERID, comprobamos la incapacidad de responder al estímulo hormonal con la movilización celular hacia fase S, a diferencia de la línea salvaje sin inhibidores que manifestó un claro incremento en el número de células en esta fase tras 14 horas con R5020. La misma incapacidad proliferativa mostraron las líneas celulares salvaje WT o la parental T47MVL tratadas con un antagonista de ER $\alpha$  o un inhibidor de Erk, aún en presencia de R5020.

Por otro lado, hemos visto que las mutaciones en la región AF2 no alteraban los efectos proliferativos en respuesta a hormona, pero en cambio los tres aminoácidos mutados pertenecientes a la caja P del dominio DBD incapacitaban al hPR<sub>B</sub> para inducir la proliferación en respuesta a hormona. Esta incapacidad se manifestó como una incapacidad en la progresión de las células hacia fase S tras el estímulo hormonal.

En resumen, nuestros experimentos habían incluido a las acciones transcripcionales directas del receptor mediante contactos con el DNA como claves en la mediación de efectos proliferativos en respuesta a hormona. Eso significaba que existía algún gen(es), que controlaban la proliferación, dónde el dominio DBD del hPR<sub>B</sub> era clave es su regulación. Estudios adicionales sobre este tema en el capítulo VIII muestran al gen para Ciclina D1 como un candidato idóneo para mediar la proliferación inducida por progesterona, puesto que su expresión se ve afectada por los mismos mutantes de hPR que alteran la respuesta proliferativa a hormona..

### D.4.1.- FOSFORILACIÓN DE hPR<sub>B</sub> INDUCIDA POR PROGESTERONA

Ya hemos comprobado la importancia de las acciones no genómicas del receptor de progesterona en algunos de sus efectos, como en proliferación celular o por activación génica de MMTV, Ciclina D1, p21, ... Otro de los efectos mediados por la activación de la cascada de señalización MAPK inducida por progesterona, es la fosforilación del mismo hPR<sub>B</sub> en las serinas 20, 294 o 345. La fosforilación de la Ser294, juega un papel regulador de ciertas acciones del receptor implicadas en su degradación por el 26S-proteosoma (Lange, 2000).

La demostración de que cualquiera de los hPR<sub>B</sub>s, a excepción del hPR<sub>B</sub>-ERID, podía fosforilarse en el residuo 294 implicó que las proteínas recombinantes podían sufrir los mismos procesos reguladores por fosforilación que un hPR<sub>B</sub> endógeno. Por otro lado, obviamente, no podíamos detectar la fosforilación o ausencia de ella en la línea celular ERID debido a que la delección incluía al posible residuo fosforilado 294 diana del anticuerpo usado para la detección de la fosforilación.

También hemos descrito, como en la línea celular salvaje encontramos que a los 10 minutos de tratamiento con progesterona la presencia de pPR<sup>294</sup> y pMsk formando parte del complejo de activación del promotor MMTV. En resumen, el hPR<sub>B</sub> recombinante expresado en las líneas celulares sufría la fosforilación en Ser294 inducida por hormona, participando de la inducción del gen MMTV.

Como ya habíamos mencionado, la progesterona causa la activación de MAPK a través de la interacción citoplasmática de hPR<sub>B</sub> con ER $\alpha$ . Uno de los estudios llevados a cabo en el laboratorio por Ballaré (Ballaré, 2003), definió la región ERID del dominio IF (Inhibitory Function) como clave para la activación de MAPK consecuencia de la formación del complejo hPR<sub>B</sub>/ER $\alpha$ /cSrc. La implicación de este dominio del hPR en un contexto celular estable dónde la construcción mutante estuviera insertada en el genoma, era el siguiente paso lógico para evidenciar la falta de activación de MAPK como respuesta rápida a progesterona.

La detección de pERK y pPR<sup>294</sup> en la línea salvaje, y las formas mutadas en los dominios AF2 y DBD tras 10 minutos de tratamiento hormonal, implicaba que las líneas celulares iniciaban las cascadas de señalización MAPK y que estas eran las responsables de la fosforilación de los receptores. Sin embargo, la delección ERID no indujo la expresión de pERK

tras 10 minutos de tratamiento hormonal demostrando el hecho de la participación del dominio ERID en la activación de la vía citoplasmática.

#### **D.4.2.- SEÑALIZACIÓN POR MAP KINASAS**

Un hecho que nos llamó la atención, fue el detectar niveles disminuidos en la inducción de la fosforilación de ERK en cualquiera de las líneas estudiadas en relación con la línea parental T47MVL tras el mismo tiempo de tratamiento hormonal. Mostrando, una cascada de señalización defectuosa con niveles de inducción reducidos en respuesta a estímulos hormonales y, quizás también para otros estímulos no hormonales.

Se ha descrito que los factores de crecimiento regulan el crecimiento celular iniciando las rutas intracelulares de transducción de señal mitogénica durante la progresión del cáncer. En este sentido, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un estímulo no hormonal que también induce la cascada de MAPK, e incluso de forma más robusta y sostenida. Observamos, al igual que con el estímulo hormonal, unos niveles claramente disminuidos de la forma activa de p42/p44 Erk comparados con los de línea parental T47MVL. Este resultado implicaba que, por algún motivo desconocido, en las líneas procedentes de T47Dy los estímulos no inducen la vía MAPK con la misma fuerza que en la línea parental T47D. Aunque los niveles de expresión de pErk se mostraban menores, la disminución no parecía afectar ciertos efectos del hPR<sub>B</sub> mediados por acciones citoplasmáticas como la proliferación, la autofosforilación,...inducidas por progesterona.

#### **D.4.3.- EXPRESIÓN ENDÓGENA DE hER**

La confirmación de la expresión reducida de hER $\alpha$  tanto a nivel proteico como de mRNA en las líneas T47Dy y sus derivadas, podría implicar una regulación génica defectiva en respuesta a estradiol y, quizás, podría relacionarse con la disminución de la activación de MAPK en respuesta a progesterona.

La incapacidad de las líneas provenientes de T47Dy para inducir la expresión de mRNA de uno de los genes clásicamente estudiados (pS2) por su respuesta a estradiol, implicaba que la reducida cantidad de ER $\alpha$  presente en las células no era suficiente para mediar la regulación génica por estradiol.

Por otro lado, aunque los niveles de ER $\alpha$  presentes en la línea celular T47Dy fueran reducidos, sabemos que el complejo citoplasmático hPR<sub>B</sub>/ER $\alpha$ /c-Src encontrado en respuesta a

progesterona implica a sólo un 5% del hPR total de la célula. Además, hemos observado como el tratamiento con ICI (antagonista de ER) provocaba una disminución de los efectos transcripcionales sobre MMTV inducido por progestina, y como detectamos la formación del complejo citoplasmático. De modo, que es improbable que los niveles reducidos de ER $\alpha$  sean la causa de la disminución de pErk, aunque de existir la relación bien sería independiente de la activación de MMTV o de los efectos de proliferación, o tal vez la cantidad reducida de pErk es suficiente.

En resumen, la cantidad disminuida de hER $\alpha$  presente en las líneas celulares es incapaz de llevar a cabo la regulación del gen pS2 en respuesta a estradiol, sin embargo es suficiente para implicarse de las acciones de hPR $B$  en respuesta a progestina.

Finalmente, que la expresión de ER $\alpha$  estuviera disminuida en las células T47Dy podría ser un mecanismo puntual fortuito, o haber afectado a otras proteínas o una adaptación celular para sobrevivir con niveles endógenos reducidos de hPR. El artículo que describió por primera vez la línea T47Dy, indicaba que un evento “fortuito e indefinido” había eliminado la expresión, exclusivamente, de hPR (Sartorius, 1994).

## ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN GÉNICA EN RESPUESTA A PROGESTERONA

### D.5.1.- LÍNEA SALVAJE VERSUS LÍNEA PARENTAL (MICROARRAYS)

El uso de una herramienta como el microarray te permite identificar genes que responden a un estímulo, por otro lado el tener líneas celulares mutantes nos permite identificar el dominio responsable del hPR<sub>B</sub> para cada acción. El uso combinado de ambas herramientas nos ofreció la posibilidad de identificar aquellos genes que responden a progesterona según el dominio responsable en el hPR<sub>B</sub>. En unas condiciones celulares comparables y reproducibles, al tener el mismo background todas las líneas creadas la única diferencia es que dominio del hPR<sub>B</sub> esta mutado.

Tres hibridaciones en la plataforma con muestras duplicadas separadas en el tiempo nos permitieron identificar genes de interés en cáncer de mama implicados en ciclo celular, transducción de señales, regulación de cromatina o transcripción que se inducían a las 6 horas de tratamiento hormonal.

El filtraje estadístico de los datos obtenidos en la plataforma del microarray por el programa estadístico TIGR-Mev basado en SAM ( $p=0,01$ ), nos mostró 36 genes regulados a 6 horas del tratamiento con progesterona con inducciones  $-1.5 \leq X \leq 1.5$  para la línea portadora del hPR<sub>B</sub> salvaje (Ver figura [Fig. R9-A]). La mayoría de estos genes se mostraron como inducidos positivamente tras el tratamiento hormonal, y sólo unos pocos dieron un patrón de represión en respuesta a hormona. Esto apoya la idea de que la isoforma B es fundamentalmente un activador transcripcional positivo y su papel como regulador negativo sólo ocurre en contextos particulares.

La comparación de los datos del array entre la línea salvaje WT y la línea parental T47MVL nos indicaba que en sólo divergían en un 35% de los genes inducidos por ambas líneas. Recientemente, se ha publicado (Clarke, 2005) que la expresión de hPR<sub>A</sub> en un contexto celular sin la otra isoforma regula un reducido grupo de genes diana influenciando efectos de adhesión celular y morfología. De modo que, la divergencia entre la línea salvaje y la parental podría deberse a la expresión endógena de la isoforma A por la línea parental T47MVL. Aunque si incluyéramos un 23% de genes que se inducían por ambas líneas pero que el paquete

estadístico no considero estadísticamente significativos por la variabilidad del duplicado, aunque con inducciones mayores a 1.4, hablaríamos de divergencias de un 15%.

#### **D.5.2.- LÍNEA SALVAJE VERSUS LÍNEAS MUTANTES (MICROARRAYS)**

En relación con los dominios implicados en la regulación génica por hPR<sub>B</sub>, quedo patente que 3/4 de los genes inducidos por la línea salvaje dejaban de hacerlo cuando mutábamos los dominios ERID o DBD. Estos dominios se mostraron claves para el establecimiento de la red génica en respuesta a hormona, para genes involucrados en crecimiento y ciclo celular como GRB14 o CDC14B.

La mutación en el dominio AF2 también afectó a unos 3/4 de los genes, aunque para este dominio la alteración se mostró como parcial en la inducción al estímulo hormonal. Demostrándose que si este dominio estaba implicado en el reclutamiento de coactivadores, los genes podían seguir expresándose aún con la falta de este(os) coactivadores específicos, aunque en menor medida. Esta podía ser una explicación, aunque la patente variabilidad entre las muestras para AF2 del array, implicaban una baja significación estadística y de ahí que muchos de los genes mostrarán verse parcialmente afectados.

Por otro lado, inesperadamente encontramos como el dominio mutado DBD reprimía significativamente ciertos genes inducidos por la línea salvaje en respuesta a R5020, genes codificando factores de crecimiento (SAP30), inhibidores de apoptosis (BIRC3) o proteínas implicadas en ciclo celular (CCND1).

En resumen, la progesterona es un regulador crítico de un amplio abanico de funciones celulares, reflejado en una respuesta transcripcional de un diverso grupo de genes diana a 6 horas. Genes inducidos por una regulación transcripcional directa y/o por rutas de señalización citoplasmática dominan las dianas de progestina a 6h.

#### **D.5.3.- MICROARRAY VERSUS RT-PCR**

El estudio de 31 genes detectados en el microarray por Realtime-PCR nos permitió confirmar los datos obtenidos en 29 de los 31. Entre los genes del estudio habíamos incluido 6 genes que el programa estadístico no había encontrado significativos por la variabilidad de las muestras, aunque hubieran sido inducidos en ambos duplicados. La inducción hormonal en el experimento de RT-PCR de genes como FOS, HSD11b2, MUCL2, SOS1, QSCN6, y STAT5a demostró que aunque ofrece una gran fiabilidad (99%) de los datos también puede ocultar

algunos datos relevantes. En definitiva, habíamos buscado el máximo equilibrio entre reproducibilidad y fiabilidad asumiendo la pérdida de un pequeño porcentaje de datos relevantes.

#### **D.5.4.- IMPLICACIÓN DE LOS DOMINIOS DEL hPR<sub>B</sub>**

La verificación de los datos del microarray nos capacito para agrupar los genes según el dominio responsable en el hPR<sub>B</sub> implicado en su regulación.

Por comparación con la línea salvaje WT expresando un hPR<sub>B</sub> totalmente funcional, determinamos que la mutación del dominio **DBD** provocaba que genes como Cilcina D1 no se indujeran, otros como el oncogén Fos se sobreexpresasen y un pequeño grupo fueran inducidos con este hPR<sub>B</sub>-DBD como GAS6 (Ver tabla [\[Tabla T2\]](#)). Tan drástica alteración de la red génica por la mutación en el dominio DBD nos hizo plantearnos si las ligeras diferencias de expresión de hPR<sub>B</sub> entre las líneas celulares sería un factor decisivo para tener en cuenta al interpretar los datos de regulación transcripcional. Usando una línea celular expresando una doble concentración de hPR<sub>B</sub>-DBD, determinamos como un aumento de concentración de un hPR<sub>B</sub> deficiente no implicaba que este activara nuevos genes, en algún caso si que aumentaba el valor de la inducción. Anecdóticamente, el gen HSD11b2 que muestra una inducción reducida en este mutante, en las cinéticas de tiempo posteriores veremos como se induce perfectamente, demostrando que existe alguna discordancia y que los datos van siendo más fiables conforme miramos más con detalle.

Otro de los dominios importantes en la regulación génica en respuesta a progesterona pasaba por la implicación de la región **ERID** en la mediación de las acciones no genómicas del hPR<sub>B</sub>. Con esta mutación observamos como sólo 1/5 de los genes inducidos por progesterona no necesitaban de la actuación de esta región, así el encogén Fos o la quinasa dependiente de ciclina (CDKL1). Significativamente, se había demostrado como la mayoría de la regulación génica por progesterona pasaba esencialmente por una activación de las señales citoplasmáticas.

Como esperábamos, el dominio **AF2** que no esta descrito como directamente implicado en el modo de acción del hPR<sub>B</sub>, sino mas bien como una región relevante por su papel potenciador de la transcripción al reclutar ciertos coactivadores, no mostró una inhibición total de la expresión de los genes afectados. Sólo un 20% de los genes afectados por la mutación no fueron inducidos (como Fos), los demás mostraban inducciones menores (como Gas6) a las del WT. Ahora bien, la importancia general reguladora de este dominio quedo clara al haber

detectado que la inducción de sólo un 15% de los genes (como CDKN1A) no se alteraba ni parcial ni totalmente.

En resumen, se había demostrado como la regulación génica inducida por progesterona pasaba necesariamente por los dominios DBD y ERID del hPR<sub>B</sub>, implicando a las acciones genómicas y no-genómicas descritas.

## PATRONES GÉNICOS DE ACTIVACIÓN EN EL TIEMPO

Como paso siguiente a la determinación del dominio responsable de la regulación génica, buscábamos conocer la cinética temporal de estos fenómenos en ciertos genes relevantes.

Las cinéticas temporales de inducción génica estudiadas a 1-2-6-10h de tratar con progesterona nos mostraron curvas de activación gradualmente incrementadas a lo largo del tiempo para la línea salvaje, en genes como MMTV o p21, y otras con picos de inducción máxima a 1 o 6 horas, en genes como MYC o SAP30, respectivamente (Ver tabla [Tabla T4]).

### D.6.1.- RED GÉNICA DE RESPUESTA TARDÍA Y PROGRESIVA

El gen de expresión tardía  $TGF\alpha$  que se habían mostrado sobreexpresados en la línea **DBD** según los resultados anteriores [Tabla T5], puso de manifiesto un pico de expresión a 6 horas de tratamiento. Además, **FOS** (aún siendo de expresión temprana) mostró una sobreexpresión a 6 hora, como la experimentada a 1 hora. Todo ello indicaba que los niveles de expresión incrementados para estos dos genes en respuesta a progesterona, guardaba relación con el dominio **DBD** mutado. Como ya comentamos antes, quizás se debe a que la caja P mutada del **DBD** es responsable no solo de la unión al DNA, sino también de la magnitud de su actividad bien por reclutar coreguladores o por un mecanismo represor directo de unión al secuencias de DNA opuesto al extranuclear.

En relación con la regulación efectuada por el **hPR<sub>B</sub>-AF2** confirmamos la teoría de un efecto parcial en la disminución de la expresión de la regulación génica, como queda patente en las cinéticas temporales para genes como **GAS6** o **PCAF**, dónde el patrón es exactamente el mismo de la línea salvaje pero con menores valores. También notamos como aún siendo un dominio no directamente relacionado con la unión al DNA, su implicación en la activación transcripcional es importante como demuestra el hecho de que la mitad de los genes estudiados muestren cinéticas disminuidas o no inducidas. Ya que esperábamos que todos los afectados por **AF2** lo fueran porque **hPR** actúa como factor transcripcional, así estos genes deberían estar también afectados por **DBD** o porque **PR** actúa a través de otros factores (**Sp1**,...). Lo contrario no es necesariamente cierto, ya que puede ser un factor transcripcional pero no depender de **AF2**.

En cuanto al dominio **ERID**, notamos como sólo el gen BIRC3, relacionado con inhibición de apoptosis, no requería de la mediación de este dominio del hPR<sub>B</sub> para inducir su expresión. Que de los genes de respuesta tardía sólo uno no se viera afectado en su activación por la mutación en este dominio, implicaba un papel fundamental en la mediación de inducción de redes génicas tardías en respuesta a progesterona.

#### **D.6.2.- RED GÉNICA DE RESPUESTA RÁPIDA O TEMPRANA**

Por otro lado, el estudio sobre la influencia de los dominios estudiados del hPR<sub>B</sub> en la activación de genes tempranos en respuesta a progesterona, mostraba cinéticas para FOS, JUN, MYC y DUSP1 con picos máximos a 1 hora de tratamiento. Como el dominio **DBD**, podía sobreinducir las curvas de expresión de genes como FOS y DUSP1 muy por encima de la del WT como ocurría en el gen de activación tardía (6h) TGF $\alpha$ . Además los dominios **ERID** y **AF2** no parecían ejercer ningún papel en la regulación de genes tempranos, como indicaba que ninguno de los mutantes alterase la expresión de genes como DUSP1, JUN, FOS o MYC. Quizás, se deba a que estos genes de inducción temprana no requieren que entre en juego la activación de MAP Kinasas. Adicionalmente, tampoco se ven alterados negativamente por el mutante DBD indicando la teoría de que existen otros dominios o mecanismos a los estudiados que regulan la expresión de estos genes. El hecho de que la mutación DBD haya sobreinducido dos de los genes tempranos, también apoya la teoría de que evitar que el DBD pueda unirse a los PREs provoca una potenciación de los mecanismos que regulan estas inducciones, bien a través de otras cascadas de kinasas activadas y/o mediante la mediación de factores transcripcionales como Sp1, Ap1...

En resumen, la expresión génica en respuesta a progesterona requiere de la participación del dominio DBD para la unión al DNA con motivo de la regulación génica tanto para genes tardíos (6h). Y el dominio ERID, relacionado con la activación de la ruta ER/c-Src/Erk, no es relevante en la regulación transcripcional de genes tempranos (1h).

Adicionalmente, estas curvas nos sirvieron para reconfirmar los resultados anteriores sobre activación génica, al poder comparar a 6 horas de tratamiento las inducciones génicas en respuesta a progesterona de los datos del Microarray, la RT-PCR posterior y esta última tanda cinéticas.

#### **D.6.3.- DOMINIOS DE hPR Y SUS MODOS DE ACCIÓN**

Como compendio de todos los datos obtenidos hasta el momento se construyó una tabla resumen [Tabla T5], que mostraba los dominios **ERID** y **DBD** eran esenciales para mediar la

mayoría de los efectos necesarios en la regulación génica de los genes estudiados. Y como el dominio **AF2** es sustancialmente necesario en la mediación de la actividad transcripcional.

En unos pocos de los genes tardíos estudiados el mecanismo sería diferente, ya que bien no precisan de la activación de la cascada de señalización (MAPkinasa) BIRC3, CDKL1... o bien no necesitan la unión a PREs como modo de regulación los CDKN1A, HSD11b2... En cuanto a los genes tempranos JUN, FOS, MYC... los dominios ERID y DBD del hPR<sub>B</sub> no se mostraron esenciales como mediadores de su regulación. De modo que, ni su regulación en respuesta a progesterona se debe a la unión directa de hPR<sub>B</sub> sobre las secuencias PREs del promotor, ni la cascada de señalización propuesta ER/c-Src/Erk es necesaria, apoyando la idea de una regulación alternativa.

Estos datos apoyarían el modelo del doble efecto para la activación de genes tardíos, incluyendo la activación transcripcional por unión de hPR<sub>B</sub> a secuencias promotoras específicas (PREs) o a través de otros factores transcripcionales (Sp1, Ap1, C/EBP $\beta$ , NF $\kappa$ -B), sinergizando con la activación citoplasmática de la ruta de las MAPKS iniciada con la interacción hPR<sub>B</sub>-ER $\alpha$ . Y finalmente, el reclutamiento de la maquinaria transcripcional y los coreguladores en el complejo nuclear de activación en el promotor.

Hasta el momento, habíamos definido un conjunto de genes que requerían de la activación de cascadas de señalización, iniciadas con la interacción citoplasmática hPR<sub>B</sub>/ER $\alpha$ . Además, habíamos detectado varios genes sobreinducidos en comparación al mismo estímulo en la línea WT cuando mutábamos el dominio DBD del hPR<sub>B</sub>. Entonces, como utilidad para entender la implicación de las cascadas de señalización en la inducción de genes por el hPR<sub>B</sub> y los sobreexpresados por el hPR<sub>B</sub>-DBD, hemos usado una batería de inhibidores químicos, como PD (bloquea Erk), ICI (antagonista de ER $\alpha$ ) y PP2 (bloquea Src). Dos tablas resumen lo encontrado, la tabla [Tabla T6] muestra que inhibidor afecta a la expresión de los genes y su correlación con el dominio ERID, y la tabla [Tabla T7] en que porcentaje los inhibidores afectan la inducción.

### D.7.1.- DOMINIO ERID VERSUS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN

Aquellos genes que habíamos catalogado como de regulación dependiente del dominio ERID, de modo que requieren la activación de kinasas, tuvieron una expresión disminuida con cualquiera de los inhibidores analizados. Este resultado confirmaba el hecho de que la mutación en ERID realmente estaba ejerciendo el efecto esperado de bloqueo del complejo iniciador de la ruta no genómica del hPR<sub>B</sub>. Adicionalmente, aquellos genes, principalmente genes tempranos, que no vieron afectada su inducción por progesterona en la línea ERID, tampoco veían afectada su inducción por la presencia de los inhibidores testados, apoyando la idea de mecanismos alternativos a los expuestos en este estudio.

### D.7.2.- DOMINIO DBD VERSUS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN

En relación con los genes sobreexpresados en la línea mutante **DBD**, determinamos como los inhibidores de ER $\alpha$  (ICI) y Src (PP2) bloqueaban parcialmente la inducción de los genes tempranos DUSP1 y FOS. Pero el inhibidor corriente abajo de la ruta estudiada PD (Erk), no impedía la acción de la progesterona como regulador de la expresión de estos genes. Que los inhibidores de ER $\alpha$  y Src bloquearan, en parte, la inducción de estos genes pero no el inhibidor de Erk, indicaba que la regulación por progesterona de FOS y DUSP1 implica al complejo citoplasmático PR<sub>B</sub>/ER $\alpha$ /c-Src pero inician una ruta de señalización diferente de MAP kinasa, quizás PI3K/AKT,...

En otro orden, descubrimos como la mutación del dominio DBD también provocaba que genes como el HSD11b2 inducido por la línea salvaje con influencia de la cascada descrita, dejara de regularse a través de esta cascada. Es decir, la inducción de la expresión de este gen por progesterona en la línea DBD no seguía la misma vía citoplasmática o en menor medida que la línea WT. Demostrando que la mutación puntual en la caja P del dominio de unión a PREs (DBD) de hPR<sub>B</sub>, haciendo al hPR<sub>B</sub> buscar otro mecanismo de activación de ciertos genes. Mecanismo que en el caso del gen HSD11b2 ha sido descrito por Subtil-Rodríguez (Tesis, 2007) como dependiente de dos vías de señalización, MAPKs y JAK/STAT, con dos zonas de reclutamiento para hPR<sub>B</sub>, una región proximal con PREs y otra distal necesitando del factor transcripcional STAT5a como responsable del reclutamiento de hPR<sub>B</sub>. Por lo tanto, la coordinación del reclutamiento de hPR<sub>B</sub>, no directo a DNA, mediado por Stat5a y la señalización citoplasmática, de la ruta JAK/STAT y un poco de MAPK inducidas por progesterona, son críticas para regular la expresión del gen HSD11b2 en células de cáncer de mama.

Otros genes mostraron el papel de la delección del dominio **ERID** del hPR<sub>B</sub>, en el sentido de no sólo afectar al bloqueo de la activación de la cascada de señalización. Es decir, encontramos que el dominio ERID relevante para la activación de AKAP13 o CDKN1A, lo es no sólo por bloquear la cascada de kinasas descrita, sino de otros efectos no determinados. Además encontramos como el gen DUSP1, no ERID-dependientes, sufrían una reducción de su expresión al bloquear Src y Erk, indicando la posibilidad de que no todos los efectos citoplasmáticos del hPR<sub>B</sub> siguieran la ruta mediada por ER $\alpha$ , dejando la puerta abierta al complejo hPR<sub>B</sub>/c-Src.

### D.8.1.- MUTACIONES PUNTUALES DE INTERACCIÓN CON hER $\alpha$

La determinación In Vitro por experimentos de doble híbrido de los residuos puntuales de interacción con ER $\alpha$  en el dominio ERID del hPR<sub>B</sub> (Tesis Thomas, 2007), nos llevaron a trasladar estas residuos al sistema retroviral de expresión In Vivo dónde este hPR<sub>B</sub> mutado estuviera integrado en el genoma de células de cáncer de mama que no expresan PR endógeno.

Para comprobar si era cierto, y para tener un mutante de función ERID pero más limpio, llevamos cabo la creación de las líneas celulares TH41 y TH42 expresando niveles similares de estas proteínas mutadas a las de la línea salvaje, no mostraron su actividad transcripcional comprometida para MMTV como si ocurría con el mutante de delección ERID en respuesta a progesterona, ni tampoco una alteración en la inducción proliferativa. Estos resultados estaban demostrando que las mutaciones puntuales del dominio ERID, parecían no alterar la función no-genómica de hPR<sub>B</sub>.

Intentando saber si las mutaciones puntuales en este dominio ERID afectaban a la expresión de genes descritos como ERID-dependientes, estudiamos las cinéticas temporales de 12 genes elegidos. Ninguno de los genes que se habían mostrado dependientes de la región ERID como HSD11b2, PCAF, CCND1,... mostraron una mínima expresión en respuesta a progesterona en alguna de las nuevas líneas mutantes TH41 o TH42.

En definitiva, ninguno de los ensayos funcionales demostró que las líneas celulares TH41 o TH42, y en su extensión las mutaciones puntuales en el dominio ERID, tuvieran comprometida sus funciones como habríamos esperado de hPR<sub>B</sub> deficientes en su interacción con hER $\alpha$ .

**D.9.1.- PAPEL DE LA DIMERIZACIÓN**

El dominio de unión a DNA (DBD) del hPR<sub>B</sub> tiene un papel clave en la activación transcripcional directa de genes, a través de su caja P, responsable de la interacción con las secuencias PREs de los promotores, y por la caja D, responsable de la dimerización del receptor tras la unión del ligando como paso anterior a la unión al DNA.

Ya habíamos demostrado la importancia funcional de la caja P, puesto que el mutante DBD consiste en 3 cambios en dicha caja, pero poco ha sido descrito en la literatura sobre la caja D. Así pues, buscando determinar la relevancia de la dimerización en el modo de actuación del hPR<sub>B</sub>, creamos dos nuevas líneas celulares en los residuos clave de esta caja de dimerización A604T (D4) y R606W (M6).

La activación transcripcional del promotor integrado MMTV en las nuevas células D4 y M6, se mostró deficiente para ambas líneas en respuesta a progestina, completamente nula en D4 y ligeramente inducida para M6. En ambos casos, se confirmaba la importancia de la dimerización en respuesta a hormona para este promotor. Esto coincide con, estudios posteriores de reclutamiento por ChIP que han demostrado que el hPR<sub>B</sub>-D4 no es reclutado al nucleosoma B del MMTV y hPR<sub>B</sub>-M6 mantiene algo de reclutamiento [Fig. R18-B/C].

El siguiente paso, fue determinar la relevancia de la dimerización en la activación de ciertos genes diana seleccionados. Vimos como en un 70% de genes analizados mostraron verse regulados de la misma manera por ambos mutantes D4-M6, genes como FOS o TGF $\alpha$  demostraban que la caja D no era esencial para mediar su regulación, y en cambio para los genes GAS6 o SAP30 las mutaciones de caja D comprometían su expresión.

**D.9.2.- P-BOX VERSUS D-BOX**

Habíamos visto que existía una alta coincidencia 70% entre M6-D4, demostrando la importancia de la dimerización. Sin embargo, tras cruzar los datos obtenidos por todos los mutantes que afectan al dominio DBD, encontramos similitudes entre el 45% de los genes inducidos por M6-DBD y un 30% para el caso de D4-DBD. Podría ser que algunos genes van por unión al DNA, pero no requieren dimerización o que si requieren la dimerización pero no necesitan la unión al DNA.

Curiosamente, un efecto similar de sobreinducción de los genes FOS y TGF $\alpha$  en respuesta a progesterona que habíamos encontrado en la línea celular con el dominio DBD, observamos con la línea M6.

En resumen, estos resultados divergentes nos indican que al menos uno de los residuos mutados de la caja D, probablemente el 606, interpreta algún otro papel en la activación transcripcional directa sobre los promotores diana. Aunque el mecanismo exacto no se conoce, datos de un reciente artículo atribuyen al residuo homólogo Arg606 de la caja D del receptor nuclear huérfano HNF4 una función adicional por metilación (Barrero, 2006). De este modo, al papel clásico del residuo para mediar dimerización, se le añadiría que la metilación de la arginina 606 por la metiltransferasa PRMT1 provoca el aumento de afinidad por la unión con DNA.

## IMPPLICACIÓN DE LOS DOMINIOS EN LA REGULACIÓN GÉNICA POR PROGESTERONA

### D.10.1.- DOMINIOS FUNCIONALES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN GÉNICA POR PG

Cruzando todos los datos de cinéticas de tiempo para las líneas WT y las variantes ERID-DBD-AF2-D4-M6, se construyó una tabla [Tabla T10] indicando la posible vía regulatoria de cada gen, según el papel del dominio de hPR<sub>B</sub>, y otra mostrando subjetivamente de cantidad expresada por cada gen para cada mutante [Tabla T11].

Las tablas mostrarían cuatro categorías según los genes se hubieran visto afectados en su inducción tras el tratamiento hormonal por las mutaciones en los dominios del receptor de progesterona DBD (elimina la vía directa a través de PREs), ERID (elimina la interacción con ER $\alpha$  y la activación de la cascada MAPK), D4/M6 (evitan la dimerización) y AF2 (evita el reclutamiento de coactivadores).

- Un **primer** gran grupo se habrían visto afectados por los mutantes DBD y el ERID, de modo que necesitarían la colaboración sinérgica intacta de ambas rutas para inducirse. De ellos, la mitad vio mermada su expresión por alguna o las dos mutaciones que afectaban a la dimerización. Genes como MMTV o SAP30 necesitarían de todos estos dominios intactos del hPR<sub>B</sub> para ser expresados en respuesta a hormona.

- Un **segundo** grupo incluiría aquellos genes, en dónde la actividad transcripcional directa del hPR<sub>B</sub> mediante el dominio DBD es clave, pero ni la activación de la ruta MAPK a través de la interacción con ER $\alpha$  ni las mutaciones en el segundo Zinc Finger de la caja D de dimerización alteran su expresión inducida por hormona. Serían genes como JUN o BIRC3.

- Un **tercer** grupo estaría compuesto por aquellos genes dónde el dominio DBD del hPR<sub>B</sub> no es vital para su expresión inducida, pero si la activación de la vía extranuclear de cascadas de kinasas Erk. Esta categoría incluiría genes regulados dónde la caja D del hPR<sub>B</sub> ejerce alguna función, como CDKN1A o GAS6, y aquellos dónde estos residuos no son esenciales, como HSD11b2 y TGF $\alpha$ .

- Un **cuarto** grupo vendría a contener 3 genes (DUSP1, FOS, MYC) que para ser inducidos en respuesta a hormona no necesitarían la mediación de hPR<sub>B</sub> a través de ninguno de los últimos dominios estudiados DBD, ERID, D4 ni M6.

Englobados en estas cuatro categorías podríamos englobar a aquellos genes afectados total o parcialmente por la mutación del residuo 911 del AF2 del hPR<sub>B</sub>.

## T.10

		AFECTADOS POR DBD <sub>mut</sub>	
		SI	NO
AFECTADOS POR	D4	CCND1 <sup>(2)(3)</sup> PCAF <sup>(3)</sup> THBS1 <sup>(3)</sup>	
	M6	AKAP13 <sup>(5)</sup> STAT5a <sup>(5)</sup>	
	D4=M6	MMTV SAP30 <sup>(2)</sup>	CDKN1A <sup>(3)(5)</sup> GAS6 <sup>(3)</sup>
	D4 y M6 NINGUNO	BIRC3 <sup>(3)</sup> GRB14 <sup>(2)(5)</sup> JUN <sup>(4)</sup>	DUSP1 FOS <sup>(1)(6)</sup> HSD11b2 <sup>(5)</sup> MYC TGFα <sup>(1)(6)</sup>

DBD (1) Sobreexpresión (2) Represión  
 D4 (3) Parcialmente (4) Sobreexpresión  
 M6 (5) Parcialmente (6) Sobreexpresión

## T.11

		RESPUESTA A PROGESTERONA				
		ERID	AF2	DBD	D4	M6
GENES	AKAP13	0	2	1	2	0
	BIRC3	0	0	2	1	2
	CCND1	0	0	1	1	2
	DUSP1	2	2	3	2	2
	FOS	2	0	3	2	3
	GAS6	0	2	3	1	0
	GRB14	0	1	1	2	1
	HSD11b2	0	2	2	2	1
	JUN	2	3	3	3	2
	MMTV	1	1	0	0	0
	MYC	2	3	2	2	2
	PCAF	2	2	2	1	2
	CDKN1A	2	2	3	1	1
	SAP30	0	1	1	0	0
	STAT5a	0	0	0	2	0
	TGFα	0	0	3	2	3
	THBS1	0	1	1	1	2

Inducción comparando con el WT

MEJOR (3) SIMILAR (2) MENOR (1) NULA (0)

**Tabla T10.** Tabla resumen de los dominios implicados en la inducción de cada uno de los 17 genes estudiados en PCR en tiempo real. La agrupación tiene en cuenta si el gen candidato se encontró mostrando una expresión reducida en relación a la línea WT al tiempo de máxima expresión por progesterona.

**Tabla T11.** Tabla resumen de los dominios implicados en la inducción de cada uno de los 17 genes estudiados por PCR en tiempo real. La agrupación tiene en cuenta el comportamiento de cada gen en las líneas celulares variantes en relación a la línea salvaje. Las categorías son Represión, Sin Inducción, Menor, Similar y Mayor.

**D.11.1.- EXPRESIÓN DE CCND1 Y SU RELACIÓN CON PROLIFERACIÓN**

Sabemos que uno de los efectos inducidos por la progesterona es la inducción de la progresión celular desde la fase G0/G1 hasta la fase S. Y se ha descrito que la ruta de las quinasas es la responsable directa de estos fenómenos (Skildum, 2005), además de haber sido ya comprobado en nuestra línea WT usando inhibidores de la vía MAPK como PD en ensayos de proliferación previos. Nuestros experimentos de proliferación, usando las líneas variantes, mostraron que tanto el dominio ERID como DBD (P-box) son claves en la mediación de estos efectos proliferativos. Era de esperar en la línea ERID, a causa de la deficiente inducción de la cascada de señalización descrita, y en correlación con los resultados con el inhibidor químico PD. Ahora bien que la línea celular DBD tampoco fue capaz de inducir proliferación en respuesta a hormona, implicaba que este dominio de unión al DNA ejercía un papel relevante en la mediación de estos efectos a través de hPR<sub>B</sub>. Extrapolando, podíamos sugerir que tanto la actividad transcripcional de hPR<sub>B</sub>, como la activación de la ruta extranuclear de MAPK eran necesarias para la inducción de proliferación en respuesta a progestina como ya habíamos demostrado.

Se ha descrito que la expresión de Ciclina D1 es uno de los factores claves en la mediación del paso de las células en proliferación de las fases G0/G1 hacia fase S. Correlacionando la importancia de Ciclina D1 con los efectos proliferativos en respuesta a progesterona, encontramos sobradas evidencias que confirmaban esta relación. Encontramos que las mutaciones en ERID y DBD afectaban a la expresión de mRNA de Ciclina D1, que a nivel de proteína la línea testada ERID no acumulaba cantidades semejantes al WT tras 24 horas de tratamiento hormonal, e incluso que cinética de tiempo para DBD mostraba curvas deficientes para la expresión de mRNA. En resumen, la expresión de Ciclina D1 requería del modo de acción del hPR<sub>B</sub> perdido por los mutantes ERID y DBD. Además, la no acumulación de Ciclina D1 implicaba una nula respuesta proliferativa al tratamiento con progesterona. De modo que, la incapacidad de interactuar con hER $\alpha$  y con los PREs, incapacita a estos hPR<sub>B</sub>s mutantes para incrementar la expresión de Ciclina D1 que llevaría a proliferación.

En resumen, los efectos de inducción de ciclo celular promovidos por hPR<sub>B</sub> en respuesta a progestina requieren el sinergismo de ambos modos de acción del receptor, tanto la activación de la vía p42/p44 MAPK como el reconocimiento de PREs y la activación transcripcional directa.

Teniendo la regulación del promotor de Ciclina D1 un papel relevante en la mediación de estos efectos proliferativos.

#### **D.11.2.- EFECTOS DE LA ELIMINACIÓN DE CCND1**

Como prueba de la correlación entre Ciclina D1 y proliferación usamos un SiRNA contra el gen CCND1 para bloquear su expresión en la línea salvaje. De las tres construcciones usadas dos de ellas consiguieron bajar la cantidad de Ciclina D1 lo suficiente como para alterar el paso de células de la fase G0/G1 hacia S inducido por progesterona. Demostramos como una inhibición de un 50% de la expresión de CCND1 era capaz de mantener la inducción de la proliferación en valores similares a los de una línea celular control sin receptor de progesterona, y como la línea salvaje inducía muy por encima de todas las demás

En resumen, los experimentos de silenciamiento en células humanas de cáncer de mama confirmaron la correlación entre la expresión de CCND1 y la proliferación celular, señalando a CCND1 como un potencial objetivo terapéutico para tratar cáncer de mama.

#### **D.11.3.- REGULACIÓN DEL PROMOTOR DE CCND1**

Una vez hemos determinado la importancia de Ciclina D1, el siguiente paso sería ahondar en el mecanismo molecular oculto de la regulación génica de su gen. Se ha descrito que el promotor no contiene HREs, y se han definido regiones potencialmente sensibles para estrógenos, regiones a -57bp con sitios de reconocimiento Sp1 y CRE, a -954bp con sitios Ap1, una región potenciadoras a -2000bp con sitios Sp1, NF $\kappa$ -B y Oct1, y una región llamada ERGE con sitios solapados para Ap1, Yy1 y Oct1. A partir de estas regiones intentamos diseñar un mapa que mostrara como se lleva a cabo la regulación de CCND1 en respuesta a progesterona, de la que hasta ese momento no existían claras evidencias.

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en las líneas celulares salvaje y mutantes, tras 15 minutos de tratamiento hormonal, nos mostraron como hPR<sub>B</sub> era encontrado en la región potenciadora 1 (ENH1) rica en sitios Sp1, Oct1, NF $\kappa$ -B, C/EBP $\beta$  a -2000bp y a una región situada a -50bp con sitios de reconocimiento para Sp1, Oct1, CRE. Además, encontramos el reclutamiento del hPR<sub>B</sub>-M6 en la región a -50bp pero no a la región Enh1 a -2000bp, implicando al residuo mutado de este PR como relevante para el reclutamiento a esta región promotora distal. E indicando que las dos regiones de promotor requieren modos de acción diferentes del hPR<sub>B</sub>, una de las cuales ha sido eliminada con el mutante M6.

Finalmente ninguno de los otros mutantes hPR<sub>B</sub>-DBD, hPR<sub>B</sub>-ERID, hPR<sub>B</sub>-D4 fue reclutado en alguna de las 7 regiones escaneadas del promotor de CCND1, indicando la importancia de la unión al DNA en la activación de este gen (aún sin sitios PREs reconocidos), el valor de la dimerización en el residuo 604 como señal del cambio conformacional sufrido por el hPR<sub>B</sub> tras la unión del ligando, y el papel clave que juega la activación de la ruta de kinasas.

En resumen, el reclutamiento de hPR<sub>B</sub> y hPR<sub>B</sub>-M6 al promotor de CCND1 tras 15 minutos de tratamiento hormonal que implica una regulación positiva de la expresión de este gen, provocará la expresión de mRNA alcanzando un pico a 6 horas, una acumulación de proteína 12 horas después y efectos en proliferación visibles tras 14-16 horas.

Como habíamos descrito anteriormente en el laboratorio y en este mismo trabajo, encontramos a hPR<sub>B</sub> era reclutado en el Nucleosoma B del MMTV tras 15 minutos de tratamiento hormonal. Adicionalmente, observamos como ninguno de los hPR<sub>B</sub>s mutados recapitulaban hacia el promotor, aunque notamos un reclutamiento parcial de los mutantes hPR<sub>B</sub>-ERID y hPR<sub>B</sub>-M6. De modo que, demostramos como el tratamiento con progesterona promueve el reclutamiento sobre MMTV, correlacionándose perfectamente con los resultado de expresión de MMTV en respuesta a hormona anteriormente descritos.

En conclusión, proponemos que la progesterona induce la expresión Ciclina D1 en células de cáncer de mama por unión directa o indirecta a través de factores transcripcionales (quizás Sp1) al promotor en una región situada a -50bp del inicio de transcripción, requiriendo la activación de la cascada extranuclear de señalización MAPK y la homodimerización previa a su acción como factor transcripcional. Además, la región potenciadora 1 (Enh1) situada a -2000bp corriente arriba del +1, podría tener un papel de apoyo en la expresión inducida de Ciclina D1.





# Conclusiones

## Análisis De Los Dominios Funcionales Del Receptor De Progesterona En Líneas Celulares Estables De Cáncer De Mama

- 1) La expresión del hPR salvaje o formas mutadas, fusionadas a un péptido marcador en el extremo amino terminal, en células de cáncer de mama T47Dy desprovistas de hPR endógeno, se ha demostrado útil para estudiar la funcionalidad de los distintos dominios del receptor sobre los patrones de expresión génica en respuesta a hormona.
- 2) Nuestros estudios se han realizado con las poblaciones de células eficientemente infectadas con el vector de expresión de hPR y GFP, puesto que los clones individuales podrían tener desviaciones respecto al comportamiento normal o promedio difíciles de controlar.
- 3) Los distintos mutantes creados presentaban las características esperadas. **DBD** no se une ni activa promotores que contienen HREs, como el MMTV; **AF2** no activa eficientemente el promotor modelo MMTV; **ERID** es incapaz de mediar los efectos citoplasmáticos que conducen a la activación de la proliferación.
- 4) Nuestros experimentos han revelado, además, que el dominio **ERID** también es necesario para la activación completa del MMTV, debido a la implicación de la ruta hPR/ER/cSrc/Erk/Msk1 en la alteración de la cromatina de este promotor, y que las mutaciones en **DBD** también afectan la capacidad del receptor para mediar la activación hormonal de la proliferación celular.
- 5) Los resultados de microarrays requieren ser validados por Real-time PCR. Estudiar la expresión génica a un único tiempo de tratamiento hormonal puede enmascarar el comportamiento real. Un seguimiento cinético de la expresión ha demostrado ser una aproximación más válida.
- 6) El comportamiento génico general de las líneas deficientes respecto al salvaje sería: **AF2**, la mayoría de los genes se afectan parcialmente, algunos pierden la inducción y en genes concretos es similar. **DBD** y **ERID**, la mayoría pierde la inducción, en algunos menor y en pocos similar. De modo que, la mayoría de los genes requieren de la unión directa de hPR al DNA y del dominio de interacción con ER, supuestamente para inducción de MAPK. Así ocurre con los genes MMTV, CCND1, STAT5 $\alpha$ , PCAF,...
- 7) La línea variante DBD es más eficaz que la salvaje en inducir algunos genes (DUSP1, FOS, TGF $\alpha$ ). Aunque el mecanismo es incierto, hemos desvelado que los inhibidores para ER $\alpha$  (ICI) y cSrc (PP2) afectan a la ruta de activación.

**8)** Los genes estudiados de respuesta rápida a hormona (FOS, MYC, JUN, DUSP1), no se muestran afectados negativamente por ningún mutante, implicando un mecanismo de activación alternativo.

**9)** El uso de inhibidores de la ruta citoplasmática ER/cSrc/MEK/Erk permite profundizar en el posible mecanismo de activación de ciertos genes por hormona. Hemos encontrado ciertas discrepancias entre los genes afectados por la delección de la región ERID y el uso antagonista de ER $\alpha$  (ICI).

**10)** Dos nuevos mutantes de hPR en la D-box, supuestamente afectando la dimerización, tienen comportamientos equivalentes según el gen estudiado, así como con el mutante DBD previo. En general el mutante A604T presenta más coincidencias con el DBD que el R606W.

**11)** Evidenciamos una alta correlación entre la afectación de los mutantes **DBD** y **ERID** sobre la expresión de CCND1 y la inducción de proliferación. Ciclina D1 (CCND1) podría ser el principal regulador de proliferación por progesterona.

**12)** Estudios preliminares parecen indicar que hPR es reclutado en, al menos, dos regiones del promotor CCND1, y esta unión depende del dominio **DBD**.





# **Material y Métodos**

# MATERIALES

REACTIVO	CONCENTRACIÓN DE USO	CASA COMERCIAL
R5020	10nM	PerkinElmer Life Sciences
ICI 182,780 (ICI)	-	Tocris
PD 98059 (PD)	-	Calbiochem
PP2	-	-

ANTICUERPO	DILUCIÓN DE USO		CASA COMERCIAL
	Inmunofluorescencia	WB	
Flag (M2)	1:200	1:8000	Sigma
$\alpha$ -Tubulina	-	1:2000	Sigma
PR (H190)	1:250	1:1000	SantaCruz Biotech
pPR (Ab12)	1:250	1:1000	NeoMarkers
ERK (C-14)	-	1:1000	Santacruz Biotech
pERK (E10)	1:200	1:2000	Cell Signaling
ER $\alpha$ (HC20)	1:250	1:1000	SantaCruz Biotech
c-Src (Src2)	-	1:1000	SantaCruz Biotech
Ciclina D1 (AB40754)	1:100	1:1000	Abcam
H3-pSer10	-	1:1000	Upstate

## PLÁSMIDOS

**pMMTV:** Este plásmido reportero contiene el promotor MMTV fusionado con un gen de luciferasa y fue construido en el laboratorio por (Beato, ).

**pSG5-PR<sub>B</sub>:** Este vector de expresión para hPR<sub>B</sub> fue cedido amablemente por Pierre Chambon (Kastner, 1990).

**pSG5-PR<sub>B</sub> $\Delta$ ERID:** Este vector de expresión para hPR<sub>B</sub>- $\Delta$ ERIDI (delección de la región ERID-I (dominio de interacción con el receptor de estrógenos)) fue construido en el laboratorio por Cecilia Ballaré (Beato, 2001).

**pSG5-PR<sub>B</sub>E911A**: Este vector de expresión para hPR<sub>B</sub>-E911A (cambia un residuo de ácido glutámico por una alanina en el dominio de activación 2 (AF2)) fue construido en el laboratorio por Wenrong Gong (Beato, 1997).

**pRAVFlag**: Este vector de expresión retroviral conteniendo un tag TAP, consistente en un tag de proteína A, un lugar específico de corte para la proteasa del virus etch del tabaco (TEV), y un epítipo flag, fue cedido amablemente por Xuedong Liu (Knuesel 2003).

**pRAVFlag.hPR<sub>B</sub>**: El clonaje se hizo insertando un fragmento de hPR<sub>B</sub> cortado con EcoRI/NotI del plásmido pBAC2cp.HA-hPR<sub>B</sub> en el plásmido retroviral pRAVFlag.

**pRAVFlag.hPR<sub>B</sub>-ΔERID**: El clonaje se hizo insertando un fragmento de hPR<sub>B</sub>-ΔERID cortado con EcoRI/NotI del plásmido pSG5.hPR<sub>B</sub>ΔERID en el plásmido retroviral pRAVFlag.

**pRAVFlag.hPR<sub>B</sub>-AF2**: El clonaje se hizo insertando un fragmento de hPR<sub>B</sub>-ΔERID cortado con EcoRI/NotI del plásmido pSG5.hPR<sub>B</sub>E911A en el plásmido retroviral pRAVFlag.

**pRAVFlag.hPR<sub>B</sub>-DBD**: Se hizo una mutagénesis a partir del plásmido retroviral pRAVFlag.hPR<sub>B</sub> usando el protocolo proporcionado por Stratagene®, cambiando los residuos G584E, S585G y V589A.

**pRAVFlag.hPR<sub>B</sub>-D4**: Hicimos una mutagénesis a partir del plásmido pRAVFlag.hPR<sub>B</sub> usando el protocolo proporcionado por Stratagene®, cambiando el residuo A604T.

**pRAVFlag.hPR<sub>B</sub>-M6**: Hicimos una mutagénesis a partir del plásmido pRAVFlag.hPR<sub>B</sub> usando el protocolo proporcionado por Stratagene®, cambiando el residuo R606W.

# MÉTODOS

## M.1.- CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS HORMONALES

Las células de cáncer de mama T47D y T47D-MMTVLuc (T47MVL) [Truss 1995] son rutinariamente crecidas en medio DMEM, suplementado con un 10% de suero fetal bovino FBS, 2mM de L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células T47Dy (clon de la línea celular T47D que no expresa hPR; Sartorius 1994), que fueron usadas para generar las células TYML25 (línea celular derivada de T47Dy con una copia integrada del reportero MMTVLuc) expresando bien el hPR<sub>B</sub> salvaje o los mutantes hPR<sub>B</sub>-ERID, hPR<sub>B</sub>-DBD, hPR<sub>B</sub>-AF2, hPR<sub>B</sub>-D4 y hPR<sub>B</sub>-M6 son crecidas en medio MEM suplementado con un 7% FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para los experimentos, las células son sembradas en medio sin rojo fenol suplementando con 10% de suero charcolizado (DCC/FBS), y 24h después el medio es reemplazado por medio fresco sin suero. Dos días después en estas condiciones libres de suero, las células son tratadas con R5020 (10nM) o etanol para los diferentes tiempos. Cuando fue necesario el inhibidor ICI (10nM) fue añadido simultáneamente, o PD (50nM), PP2 (25nM) fueron también añadidos pero 1 hora antes del tratamiento hormonal.

## M.2.-WESTERN BLOT

Preparamos los extractos de las células transfectadas o estables con los plásmidos de expresión codificando las formas del receptor de progesterona en un Tampón de Lisis (25mM Tris pH 7.4, 1%SDS, 1 mM EDTA pH 8, 1mM EGTA pH 8) suplementado con inhibidores de proteasas (2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 20 mM β-Glicerol fosfato, 2mM NaVO<sub>4</sub> y un Cocktail de inhibidores de proteínas (Roche)), determinando las concentraciones de proteínas por microensayos de proteínas por BCA (Pierce). Cargamos la misma cantidad de proteína en geles SDS al 8% de bisacrilamida, transferimos a membranas de nitrocelulosa, e incubados con los anticuerpos correspondientes. A continuación, incubamos con anticuerpos de cabra contra IgGs de ratón conjugados con peroxidasa (HRP) (para anticuerpos primarios monoclonales, a una dilución 1:3000) o contra IgG de conejo (dilución 1:4000). Finalmente, determinamos la inmunoreactividad usando una reacción de quimioluminiscencia ECL (Amershan) siguiendo las instrucciones del fabricante, para ser revelado usando una cámara Fujifilm.

### **M.3.-ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN**

Para transfecciones transitorias plaqueamos  $3,5 \cdot 10^5$  células en placas de 6 pocillos y usamos el sistema de transfección por Lipofectamina (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada pocillo usamos 3  $\mu\text{g}$  del plásmido reportero y 6  $\mu\text{g}$  de los vectores de expresión, reemplazamos el medio OPTIMEM tras 6 horas por un medio con antibióticos y con rojo fenol (red MEM / red DMEM). Y tras dos días en condiciones sin suero, las células son incubadas durante 16 horas con R5020. Tras esta incubación, las células son recogidas en Reporter Buffer Lysis (Promega) y medimos la cantidad de proteína con el kit MicroBCA (Pierce). Ajustamos los lisados a una concentración equivalente de proteína, y medimos la actividad luciferasa usando el kit Luciferase Assay (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **M.4.- ENSAYO DE LUCIFERASA**

Las líneas celulares salvaje y mutantes son sembradas por triplicado a  $3,5 \cdot 10^5$  células/pocillo en una placa de 6 pocillos y crecidas durante 16 horas antes de tratarlas con o sin 10nM de R5020 durante 24 horas. Finalmente, la actividad luciferasa es medida usando el kit para ensayos de luciferasa (Promega) con un luminómetro (Dynex).

### **M.5.- GENERACIÓN DE LÍNEAS ESTABLES POR INFECCIÓN RETROVIRAL**

Generamos el stock de virus infectivos al transfectar los plásmidos pVSVG (10 $\mu\text{g}$ ; codificando un gen de la envuelta proteica), pRAVFlag (15 $\mu\text{g}$ ; conteniendo la señal de empaquetamiento) o sus construcciones derivadas en la línea celular empaquetadora GP2293 ( $3 \cdot 10^6$  células/ placa 100mm; conteniendo los genes gag y pol), recogemos el sobrenadante durante 72 horas y concentramos las partículas virales por ultracentrifugación (26000 rpm ; 90 minutos) en el fondo de un tubo cónico Beckman con un 20% de sacarosa. Resuspendemos el pellet con medio MEM y añadimos las partículas virales a diferentes MOIs a los pocillos conteniendo 350.000 células sembradas en una placa de 6 pocillos del día anterior. Las células infectadas son espinoculadas por centrifugación durante 2 horas a 1200 rpm. Mantenemos durante 24 horas el medio con lo virus. Finalmente, las células de cáncer de mama estables expresando los TAP-hPR<sub>B</sub> o los mutantes son obtenidas por separación celular acorde a sus niveles de GFP usando un separador celular FACSVantage SE (Becton Dickinson).

### **M.6.- ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y/O DISTRIBUCIÓN DE CICLO**

Las células son cultivadas en placas de 100mm en medio blanco libre de esteroides sin suero durante 48 horas para arrearlas antes del tratamiento con R5020 (10nM) durante 16-24-48-72 horas, con sólo el diluyente de la hormona (etanol, 0,05%), o 1 hora antes con el inhibidor. Tras la incubación las células son tratadas con bromodeoxyuridina (BrdU) durante 2 horas a 37°C en el mismo medio sin esteroides, recogidas, fijadas con etanol al 70% en PBS y desnaturizado el DNA con 0,5% BSA/HCl 6N disuelto en agua. Seguidamente, las células son procesadas para la detección inmunocitoquímica del BrdU incorporado usando un anticuerpo anti-BrdU (Pharmlngen), y después un anticuerpo secundario peroxidasa-FITC. Las células en proliferación (llevando a cabo la replicación del DNA a la vez que la BrdU se incorpora) son medidas por FACS. Cuando medimos porcentaje de células en ciclo celular, seguimos el mismo protocolo pero sin añadir BrdU tras el tratamiento hormonal, y si añadimos ioduro de propidio tras lavar con PBS las células desnaturizadas, dejándolo toda la noche a 4°C. En algunos casos un se uso un inhibidor específico de la activación de la kinasa Erk (MEK). El inhibidor (PD98059) es disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 50 $\mu$ M y guardado en alícuotas a 20°C. El tratamiento con PD98059, o cantidades equivalentes de DMSO (control) son añadidas 1 hora antes del tratamiento hormonal.

## **M.7.- LOCALIZACIÓN SUBCELULAR // MICROSCOPIA CONFOCAL**

Las células WT crecidas en MEM (Life Technologies) suplementado con 7% FCS, veinticuatro horas antes del ensayo se cambian a MEM sin rojo fenol y 7% suero charcolizado CCD-FBS. Las plaqueamos en cubres de cristal durante 30 horas en un medio libre de suero. Y ya tratadas o no con R5020 (10nM) durante 5-10 minutos. Las células son lavadas dos veces en PBS frío, fijadas durante 15 minutos a 4°C en 4% de paraformaldehído disuelto en PBS, permeabilizadas en PBS conteniendo 0,2% de Triton X-100 y bloqueadas en PBS conteniendo 3% de BSA. Incubadas con anticuerpos conjugados a Alexa Fluor 488-555 (Molecular Probes), teñidas con 4,6-diamino-2-fenillindolina (DAPI) (marcador de núcleos) y montadas sobre los portas usando SlowFade (Molecular Probes). Finalmente, la microscopia es llevada a cabo usando un microscopio Carl Zeiss AxioVert S100, y las imágenes generadas por el programa SoftWoRx (Applied Precision)

## **M.8.- ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA**

Los ensayos ChIP fueron llevados a cabo como fue descrito por Strutt (1999), pero usando cromatina de las células TYML25 expresando hPR<sub>B</sub>-WT o, cuando es indicado, los mutantes, cultivados y tratados como ya hemos descrito. Los controles para interacciones no

específicas de DNA fueron llevados a cabo por usando anticuerpos no relacionados de ratón o conejo (Sigma). Para cada experimento, las PCRs o PCRs en tiempo real fueron hechas con diluciones del material de partida para determinar el rango de amplificación. Y los genes de  $\beta$ -globina o actina usados como control.

## **M.9.- PURIFICACIÓN SECUENCIAL POR TAP // INMUNOPRECIPITACIÓN POR FLAG**

Cinco placas de 150mm de las células TYML25-WT (TAP-hPR<sub>B</sub>-IRES-GFP) son crecidas al 90% de confluencia ( $\cong 10 \cdot 10^7$  células) y tratadas con 100pM con R5020 ( $10^{-8}$ ) durante 5 minutos. Las células entonces son lavadas dos veces con tampón salino de fosfato (PBS), escrapeadas en 5ml de PBS-EDTA (1mM), congeladas en N<sub>2</sub> líquido, y lisadas en 5ml de Tampón de Lisado (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, y 15% glicerol) suplementado con inhibidores de proteasa (1 mM fenilmetilsulfóxido, 0.7  $\mu$ g/ml pepstatina A, 2  $\mu$ g/ml aprotinina, 2 mM NaF, y 1 mM NaVO<sub>4</sub>). Cuantificamos los lisados y llevamos a cabo la unión usando la relación de 20  $\mu$ l de resina sefarosa-IgG Fast Flow (Amershan Biosciences) por cada 20  $\mu$ g de proteína marcada. Incubamos los lisados con la resina durante 3 h a 4°C, lavamos 3 veces con 500  $\mu$ l de tampón salino con Tween 20, y lavamos una vez más con 200  $\mu$ l de Tampón TEV (Invitrogen). Las proteínas marcadas son separadas de las beads usando 50 unidades de la proteasa TEV (Invitrogen) en 200  $\mu$ l de volumen de reacción durante la noche a 4°C. Recogemos los sobrenadantes de la reacción con TEV conteniendo el hPR cortado y los complejos de interacción. Lavamos las beads dos veces con 150  $\mu$ l del tampón TEV. Entonces, los sobrenadantes y los lavados son combinados y el producto es purificado por unión a 50  $\mu$ l de un gel de resina de alta afinidad anti-Flag M2 (Sigma) durante 4 h a 4°C. Finalmente, lavamos tres veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado, y eluimos con el péptido Flag

## **M.10.- EXTRACCIÓN DE RNA // RT-PCR // PCR EN TIEMPO REAL**

La obtención de RNA fue llevada a cabo usando el kit de extracción de RNA RNeasy RNA (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA fue generado de 100ng de RNA total usando el sistema de síntesis de hebras primarias (Invitrogen). Usamos 1 $\mu$ g de cDNA como muestra para la RT-PCR siguiendo el protocolo proporcionado en el kit cDNA (Sigma). Cuando se indica, la cuantificación del producto génico fue hecha por PCR en tiempo real

usando el sistema SYBR Green (Roche) para el LightCycler 480 (Roche) en placas de 384 pocillos. Cada valor fue corregido por el gen GAPDH humano y expresado con unidades relativas.

1 mg/ml en tampón de lavado.

## **M.11.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados fueron analizados por el test de la t de student y sólo las diferencias entre dos medias con una  $p < 0,05$  fueron tomadas como significativas.

## **M.12.- MICROARRAYS Y ANÁLISIS DE DATOS**

Las muestras fueron procesadas por la unidad de Microarrays del Centro de Regulación Genómica (CRG). Los datos sin tratar fueron procesados usando MARGE, y en una implementación desarrollada en CRG llamada LIMMA, un paquete analítico estadístico para microarrays de Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) que esta corriendo en el entorno de programación R. Los análisis de factores discriminantes fueron generados usando una aplicación del programa FADA. A las intensidades de los genes les fue sustraído el fondo (tomando la media de las intensidades de canales y la media del fondo). Los spots con intensidades  $< 2$  veces del fondo local en uno o ambos canales filtrados por fluorescencia (Cy3 o Cy5) y también los controles, fueron excluidos de la normalización, y fueron referidos como “no fiables”. Se aplico un algoritmo para la normalización dependiente de la intensidad usando un factor  $f=0.2$  para todos los experimentos. Los ratios normalizados de  $\text{Log}^2$  fueron escalados así que todos ellos tuvieran la misma media absoluta y desviación estándar a lo largo de todos los arrays, para dar el mismo peso a cada gen, y no sólo debido a la magnitud del ratio de expresión. El valor de rango estadístico computado B de todas las hibridaciones duplicadas fue usado para determinar los genes con cambios significativos. Consideramos los genes que mostraron unas inducciones de regulación positiva o negativa de 1.5 veces relativas a la muestra control con un valor de rango B superior al 90th percentil como significativo. El valor de los cambios o el cambio relativo en el número de copias fue calculado como  $2^{\text{Log}2\text{Ratio}}$ , si el valor del ratio era  $> 0$ , o  $2^{-1/\text{Log}2\text{Ratio}}$ , si este era  $< 0$ . Finalmente, para hacer el análisis estadístico de los datos, hemos usado un recurso web libre, un paquete de programas para la gestión de datos de microarrays y análisis de TM4 obtenidos de TIGR (<http://www.tigr.org/software/>).



# **Bibliografía**

- Altucci, L., Addeo, R., Cicatiello, L., Dauvois, S., Parker, M.G., Truss, M., Beato, M., Sica, V., Bresciani, F., and Weisz, A. (1996). 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene* 11, 2315-2324.
- Ames, J.B., Tanaka, T., Ikura, M., and Stryer, L. (1995). Nuclear magnetic resonance evidence for Ca(2+)-induced extrusion of the myristoyl group of recoverin. *J. Biol. Chem.* 52, 30909-30913.
- Ankrapp, D.P., Bennett, J.M., and Haslam, S.Z. (1998). Role of epidermal growth factor in the acquisition of ovarian steroid hormone responsiveness in the normal mouse mammary gland. *J. Cell. Physiol.* 2, 251-260.
- Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P., and Richards, G. (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 655-662.
- Assoian, R. K. (1997). Anchorage-dependent cell cycle progression. *J. Cell Biol.* 136, 1-4.
- Aupperlee, M.D., Smith, K.T., Kariagina, A., and Haslam, S.Z. (2005). Progesterone receptor isoforms A and B: temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development. *Endocrinology* 8, 3577-3588.
- Bagowski, C.P., Myers, J.W., and Ferrell, J.E., Jr. (2001). The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 40, 37708-37714.
- Bain, D.L., Franden, M.A., McManaman, J.L., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B. (2001). The N-terminal region of human progesterone B-receptors: biophysical and biochemical comparison to A-receptors. *J. Biol. Chem.* 26, 23825-23831.
- Ballare, C., Uhrig, M., Bechtold, T., Sancho, E., Di Domenico, M., Migliaccio, A., Auricchio, F., and Beato, M. (2003). Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1994-2008.
- Bamberger, A.M., Bamberger, C.M., Gellersen, B., and Schulte, H.M. (1996). Modulation of AP-1 activity by the human progesterone receptor in endometrial adenocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 12, 6169-6174.
- Barrero, M.J. and Malik, S. (2006). Two Functional Modes of a Nuclear Receptor-Recruited Arginine Methyltransferase in Transcriptional Activation. *Mol. Cell* 24, 233-243.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 3, 335-344.
- Beato, M., Herrlich, P., and Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 6, 851-857.
- Belandia, B., Latasa, M.J., Villa, A., and Pascual, A. (1998). Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the beta-amyloid precursor protein gene. *J. Biol. Chem.* 46, 30366-30371.
- Belandia, B., Orford, R.L., Hurst, H.C., and Parker, M.G. (2002). Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *EMBO J.* 15, 4094-4103.
- Berrevoets, C.A., Doesburg, P., Steketee, K., Trapman, J., and Brinkmann, A.O. (1998). Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor

with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor2). *Mol. Endocrinol.* 8, 1172-1183.

Bigler, J., and Eisenman, R.N. (1995). Novel location and function of a thyroid hormone response element. *EMBO J.* 22, 5710-5723.

Boonyaratanakornkit, V., Scott, M.P., Ribon, V., Sherman, L., Anderson, S.M., Maller, J.L., Miller, W.T., and Edwards, D.P. (2001). Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol. Cell* 2, 269-280.

Carroll, J.S., Liu, X.S., Brodsky, A.S., Li, W., Meyer, C.A., Szary, A.J., Eeckhoute, J., Shao, W., Hestermann, E.V., Geistlinger, T.R. *et al.* (2005). Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* 1, 33-43.

Castro-Rivera, E., Samudio, I., and Safe, S. (2001). Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *J. Biol. Chem.* 33, 30853-30861.

Catelli, M.G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J.M., Baulieu, E.E., Feramisco, J.R., and Welch, W.J. (1985). The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J.* 12, 3131-3135.

Chalbos, D., Chambon, M., Ailhaud, G., and Rochefort, H. (1987). Fatty acid synthetase and its mRNA are induced by progestins in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 21, 9923-9926.

Chambon, P. (2004). How I became one of the fathers of a superfamily. *Nat. Med.* 10, 1027-1031.

Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 5548, 1866-1870.

Chen, H., Tini, M., and Evans, R.M. (2001). HATs on and beyond chromatin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2, 218-224.

Chlebowski, R.T., Hendrix, S.L., Langer, R.D., Stefanick, M.L., Gass, M., Lane, D., Rodabough, R.J., Gilligan, M.A., Cyr, M.G., Thomson, C.A. *et al.* (2003). Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 24, 3243-3253.

Cicatiello, L., Addeo, R., Sasso, A., Altucci, L., Petrizzi, V.B., Borgo, R., Cancemi, M., Caporali, S., Caristi, S., Scafoglio, C. *et al.* (2004). Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7260-7274.

Cook, S. J., Aziz, N. & McMahon, M. (1999). The repertoire of Fos and Jun proteins expressed during the G1 phase of the cell cycle is determined by the duration of mitogen-activated protein kinase activation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 330-341.

De Vivo, I., Hankinson, S.E., Colditz, G.A., and Hunter, D.J. (2003). A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res.* 17, 5236-5238.

- DeFranco, D.B. (1999). Regulation of steroid receptor subcellular trafficking. *Cell Biochem. Biophys.* 1, 1-24.
- Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J. & Saltiel, A. R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 7686–7689.
- Dunn, K.L., and Davie, J.R. (2003). The many roles of the transcriptional regulator CTCF. *Biochem. Cell Biol.* 3, 161-167.
- Edwards, D.P., Wardell, S.E., and Boonyaratanakornkit, V. (2002). Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1-5, 173-186.
- Edwards, D.P., Weigel, N.L., Nordeen, S.K., and Beck, C.A. (1993). Modulators of cellular protein phosphorylation alter the trans-activation function of human progesterone receptor and the biological activity of progesterone antagonists. *Breast Cancer Res. Treat.* 1-2, 41-56.
- Fantl, V., Richards, M.A., Smith, R., Lammie, G.A., Johnstone, G., Allen, D., Gregory, W., Peters, G., Dickson, C., and Barnes, D.M. (1990). Gene amplification on chromosome band 11q13 and oestrogen receptor status in breast cancer. *Eur. J. Cancer* 4, 423-429.
- Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I., and Dickson, C. (1995). Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev.* 19, 2364-2372.
- Finidori-Lepicard, J., Schorderet-Slatkine, S., Hanoune, J., and Baulieu, E.E. (1981). Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 5820, 255-257.
- Giangrande, P.H., Kimbrel, E.A., Edwards, D.P., and McDonnell, D.P. (2000). The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3102-3115.
- Gillett, C., Fantl, V., Smith, R., Fisher, C., Bartek, J., Dickson, C., Barnes, D., and Peters, G. (1994). Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res.* 7, 1812-1817.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 6305, 132-138.
- Gong, W., Chavez, S., Beato, M. (1997). Point Mutation in the Ligand-Binding Domain of the Progesterone Receptor Generates a Transdominant Negative Phenotype. *Mol. End.* , 1476-1485.
- Goodrich, J.A., Hoey, T., Thut, C.J., Admon, A., and Tjian, R. (1993). *Drosophila* TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell* 3, 519-530.
- Gottlicher, M., Heck, S., and Herrlich, P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.* 7, 480-489.
- Govindan, M.V., Devic, M., Green, S., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1985). Cloning of the human glucocorticoid receptor cDNA. *Nucleic Acids Res.* 23, 8293-8304.
- Groshong, S.D., Owen, G.I., Grimison, B., Schauer, I.E., Todd, M.C., Langan, T.A., Sclafani, R.A., Lange, C.A., and Horwitz, K.B. (1997). Biphasic regulation of breast cancer cell growth by

progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1). *Mol. Endocrinol.* 11, 1593-1607.

Grossman, S.R., Deato, M.E., Brignone, C., Chan, H.M., Kung, A.L., Tagami, H., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 5617, 342-344.

Haas, D., White, S.N., Lutz, L.B., Rasar, M., and Hammes, S.R. (2005). The modulator of nongenomic actions of the estrogen receptor (MNAR) regulates transcription-independent androgen receptor-mediated signaling: evidence that MNAR participates in G protein-regulated meiosis in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Endocrinol.* 8, 2035-2046.

Hartig, E., and Cato, A.C. (1994). In vivo binding of proteins to stably integrated MMTV DNA in murine cell lines: occupancy of NFI and OTF1 binding sites in the absence and presence of glucocorticoids. *Cell. Mol. Biol. Res.* 7-8, 643-652.

Haslam, S.Z., Osuch, J.R., Raafat, A.M., and Hofseth, L.J. (2002). Postmenopausal hormone replacement therapy: effects on normal mammary gland in humans and in a mouse postmenopausal model. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1, 93-105.

Haslam, S.Z., and Shyamala, G. (1981). Relative distribution of estrogen and progesterone receptors among the epithelial, adipose, and connective tissue components of the normal mammary gland. *Endocrinology* 3, 825-830.

Horwitz, K.B., and McGuire, W.L. (1978). Nuclear mechanisms of estrogen action. Effects of estradiol and anti-estrogens on estrogen receptors and nuclear receptor processing. *J. Biol. Chem.* 22, 8185-8191.

Hovey, R.C., Trott, J.F., and Vonderhaar, B.K. (2002). Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1, 17-38.

Hovland, A.R., Powell, R.L., Takimoto, G.S., Tung, L., and Horwitz, K.B. (1998). An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 10, 5455-5460.

Huang, X., Atwood, C.S., Moir, R.D., Hartshorn, M.A., Vonsattel, J.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1997). Zinc-induced Alzheimer's A $\beta$ 1-40 aggregation is mediated by conformational factors. *J. Biol. Chem.* 42, 26464-26470.

Imhof, M.O., and McDonnell, D.P. (1996). Yeast RSP5 and its human homolog hRPF1 potentiate hormone-dependent activation of transcription by human progesterone and glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2594-2605.

Iwasaki, T., Chin, W.W., and Ko, L. (2001). Identification and characterization of RRM-containing coactivator activator (CoAA) as TRBP-interacting protein, and its splice variant as a coactivator modulator (CoAM). *J. Biol. Chem.* 36, 33375-33383.

Jacobsen, B., Richer, J., Schittone, S., Horwitz, K.B. (2002). New Human Breast Cancer Cells to Study Progesterone Receptor Isoform Ratio Effects and Ligand-independent Gene Regulation. *J. Biol. Chem.* 277, 27793-27800.

Jensen, E.V. (2004). From chemical warfare to breast cancer management. *Nat. Med.* 10, 1018-1021.

- Johnson, J.L., Beito, T.G., Krco, C.J., and Toft, D.O. (1994). Characterization of a novel 23-kilodalton protein of unactive progesterone receptor complexes. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1956-1963.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 5, 1603-1614.
- Kester, H.A., van der Leede, B.M., van der Saag, P.T., and van der Burg, B. (1997). Novel progesterone target genes identified by an improved differential display technique suggest that progestin-induced growth inhibition of breast cancer cells coincides with enhancement of differentiation. *J. Biol. Chem.* 26, 16637-16643.
- Kimmick, G.G., and Muss, H.B. (1998). Endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer Treat. Res.* 231-254.
- King, R.W., Glotzer, M., and Kirschner, M.W. (1996). Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol. Biol. Cell* 9, 1343-1357.
- Knotts, T.A., Orkiszewski, R.S., Cook, R.G., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (2001). Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 11, 8475-8483.
- Kost, S.L., Smith, D.F., Sullivan, W.P., Welch, W.J., and Toft, D.O. (1989). Binding of heat shock proteins to the avian progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3829-3838.
- Krusekopf, S., Chauchereau, A., Milgrom, E., Henderson, D., and Cato, A.C. (1991). Cooperation of progestational steroids with epidermal growth factor in activation of gene expression in mammary tumor cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1-3, 239-245.
- Krust, A., Kastner, P., Petkovich, M., Zelent, A., and Chambon, P. (1989). A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 14, 5310-5314.
- Knuesel, M., Wan, Y., Xiao, Z., Holinger, E., Lowe, N., Wang, W., Liu, X. (2003). Identification of Novel Protein-Protein Interactions Using A Versatile Mammalian Tandem Affinity Purification Expression System. *Molecular & Cellular Proteomics.* 11, 1225-1233.
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R., and Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 6, 941-951.
- Labriola, L., Salatino, M., Proietti, C.J., Pecci, A., Coso, O.A., Kornblihtt, A.R., Charreau, E.H., and Elizalde, P.V. (2003). Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1095-1111.
- Lange, C.A. (2004). Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol. Endocrinol.* 2, 269-278.
- Lange, C.A., Shen, T., and Horwitz, K.B. (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 3, 1032-1037.
- Lavoie, J. N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R. & Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 20608-20616.

- Lee, J.W., Lee, Y.C., Na, S.Y., Jung, D.J., and Lee, S.K. (2001). Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. *Cell Mol. Life Sci.* 2, 289-297.
- Leo, C., and Chen, J.D. (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 1, 1-11.
- Li, X., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (2003). Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3763-3773.
- Losel, R., and Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 46-56.
- Lukas, J., Bartkova, J., and Bartek, J. (1996). Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* 12, 6917-6925.
- Madauss, K.P., Deng, S.J., Austin, R.J., Lambert, M.H., McLay, I., Pritchard, J., Short, S.A., Stewart, E.L., Uings, I.J., and Williams, S.P. (2004). Progesterone receptor ligand binding pocket flexibility: crystal structures of the norethindrone and mometasone furoate complexes. *J. Med. Chem.* 13, 3381-3387.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signalregulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185.
- Masui, Y. (2001). From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* 1, 1-17.
- Masui, Y., and Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 2, 129-145.
- Melvin, V.S., Roemer, S.C., Churchill, M.E., and Edwards, D.P. (2002). The C-terminal extension (CTE) of the nuclear hormone receptor DNA binding domain determines interactions and functional response to the HMGB-1/-2 co-regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 28, 25115-25124.
- Mestas, S.P., and Lumb, K.J. (1999). Electrostatic contribution of phosphorylation to the stability of the CREB-CBP activator-coactivator complex. *Nat. Struct. Biol.* 7, 613-614.
- Meyer, M.E., Pornon, A., Ji, J.W., Bocquel, M.T., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1990). Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor. *EMBO J.* 12, 3923-3932.
- Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Bottero, D., Varricchio, L., Nanayakkara, M., Rotondi, A., and Auricchio, F. (2002). Sex steroid hormones act as growth factors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1-5, 31-35.
- Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M., and Auricchio, F. (1998). Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.* 7, 2008-2018.
- Mimnaugh, E.G., Chavany, C., and Neckers, L. (1996). Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin. *J. Biol. Chem.* 37, 22796-22801.

- Moilanen, A.M., Poukka, H., Karvonen, U., Hakli, M., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (1998). Identification of a novel RING finger protein as a coregulator in steroid receptor-mediated gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5128-5139.
- Monsalve, M., Wu, Z., Adelmant, G., Puigserver, P., Fan, M., and Spiegelman, B.M. (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol. Cell* 2, 307-316.
- Moore, M.R., Zhou, J.L., Blankenship, K.A., Strobl, J.S., Edwards, D.P., and Gentry, R.N. (1997). A sequence in the 5' flanking region confers progestin responsiveness on the human c-myc gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 4, 243-252.
- Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., and Conneely, O.M. (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 17, 9744-9749.
- Murphy, L.O., and Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.* 5, 268-275.
- Murphy, L. O., MacKeigan, J. P. & Blenis, J. (2004). A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Mol. Cell. Biol.* 24, 144–153.
- Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C. & Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products<sup>2</sup>. *Nature Cell Biol.* 4, 556–564.
- Musgrove, E.A., Hamilton, J.A., Lee, C.S., Sweeney, K.J., Watts, C.K., and Sutherland, R.L. (1993). Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3577-3587.
- Musgrove, E.A., Swarbrick, A., Lee, C.S., Cornish, A.L., and Sutherland, R.L. (1998). Mechanisms of cyclin-dependent kinase inactivation by progestins. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1812-1825.
- Narayanan, R., Adigun, A.A., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (2005). Cyclin-dependent kinase activity is required for progesterone receptor function: novel role for cyclin A/Cdk2 as a progesterone receptor coactivator. *Mol. Cell. Biol.* 1, 264-277.
- Narayanan, R., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (2005). Human progesterone receptor displays cell cycle-dependent changes in transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2885-2898.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 5240, 1354-1357.
- Osborne, C.K., Zhao, H., and Fuqua, S.A. (2000). Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J. Clin. Oncol.* 17, 3172-3186.
- Osman, R.A., Andria, M.L., Jones, A.D., and Meizel, S. (1989). Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2, 828-833.
- Owen, G.I., Richer, J.K., Tung, L., Takimoto, G., and Horwitz, K.B. (1998). Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *J. Biol. Chem.* 17, 10696-10701.

Pages, G. et al.(1993) Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc.Natl Acad. Sci. USA* 90, 8319–8323.

Petkovich, M., Brand, N.J., Krust, A., and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 6147, 444-450.

Pierson-Mullany, L.K., and Lange, C.A. (2004). Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10542-10557.

Poukka, H., Aarnisalo, P., Santti, H., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2000). Coregulator small nuclear RING finger protein (SNURF) enhances Sp1- and steroid receptor-mediated transcription by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1, 571-579.

Proietti, C., Salatino, M., Rosembliit, C., Carnevale, R., Pecci, A., Kornblihtt, A.R., Molinolo, A.A., Frahm, I., Charreau, E.H., Schillaci, R., and Elizalde, P.V. (2005). Progesterins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4826-4840.

Ptashne, M., and Gann, A.A. (1990). Activators and targets. *Nature* 6282, 329-331.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods (Orlando)* 24, 218–229

Qiu, M., and Lange, C.A. (2003). MAP kinases couple multiple functions of human progesterone receptors: degradation, transcriptional synergy, and nuclear association. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2-5, 147-157.

Qiu, M., Olsen, A., Faivre, E., Horwitz, K.B., and Lange, C.A. (2003). Mitogen-activated protein kinase regulates nuclear association of human progesterone receptors. *Mol. Endocrinol.* 4, 628-642.

Ratajczak, T., Hlaing, J., Brockway, M.J., and Hahnel, R. (1990). Isolation of untransformed bovine estrogen receptor without molybdate stabilization. *J. Steroid Biochem.* 5, 543-553.

Raymoure, W.J., McNaught, R.W., Greene, G.L., and Smith, R.G. (1986). Receptor interconversion model of hormone action. II. Nucleotide-mediated conversion of estrogen receptors from nonsteroid binding to the lower affinity binding state. *J. Biol. Chem.* 36, 17018-17025.

Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Manning, N.G., Abel, M.G., Wolf, D.M., and Horwitz, K.B. (2002). Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 7, 5209-5218.

Richer, J.K., Lange, C.A., Manning, N.G., Owen, G., Powell, R., and Horwitz, K.B. (1998). Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. Progesterone receptors regulate signal transducers and activators of transcription expression and activity. *J. Biol. Chem.* 47, 31317-31326.

Roemer, S.C., Donham, D.C., Sherman, L., Pon, V.H., Edwards, D.P., and Churchill, M.E. (2006). Structure of the progesterone receptor-deoxyribonucleic acid complex: novel interactions required for binding to half-site response elements. *Mol. Endocrinol.* 12, 3042-3052.

Rowan, B.G., Garrison, N., Weigel, N.L., and O'Malley, B.W. (2000). 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8720-8730.

Sadowski, C.L., Henry, R.W., Lobo, S.M., and Hernandez, N. (1993). Targeting TBP to a non-TATA box cis-regulatory element: a TBP-containing complex activates transcription from snRNA promoters through the PSE. *Genes Dev.* 8, 1535-1548.

Sap, J., Munoz, A., Schmitt, J., Stunnenberg, H., and Vennstrom, B. (1989). Repression of transcription mediated at a thyroid hormone response element by the v-erb-A oncogene product. *Nature* 6230, 242-244.

Sartorius, C.A., Melville, M.Y., Hovland, A.R., Tung, L., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B. (1994). A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol. Endocrinol.* 10, 1347-1360.

Sartorius, C.A., Groshong, D.S., Miller, L.A., Powell, R., Tung, L., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B. (1994). New T47D Breast Cancer Lines for the independent study of progesterone B- and A-Receptors. Only Antiprogesterin-occupied B-Receptors are switched to transcriptional agonist by cAMP. *Cancer Research.* 54, 3868-3877.

Schairer, C., Lubin, J., Troisi, R., Sturgeon, S., Brinton, L., and Hoover, R. (2000). Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* 4, 485-491.

Schiff, R., Massarweh, S.A., Shou, J., Bharwani, L., Arpino, G., Rimawi, M., and Osborne, C.K. (2005). Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance: implicated role of growth factor signaling and estrogen receptor coregulators. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 10-20.

Schrader, W.T., Toft, D.O., and O'Malley, B.W. (1972). Progesterone-binding protein of chick oviduct. VI. Interaction of purified progesterone-receptor components with nuclear constituents. *J. Biol. Chem.* 8, 2401-2407.

Shen, T., Horwitz, K.B., and Lange, C.A. (2001). Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6122-6131.

Sheridan, P.L., Krett, N.L., Gordon, J.A., and Horwitz, K.B. (1988). Human progesterone receptor transformation and nuclear down-regulation are independent of phosphorylation. *Mol. Endocrinol.* 12, 1329-1342.

Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 5293, 1672-1677.

Shyamala, G., Yang, X., Silberstein, G., Barcellos-Hoff, M.H., and Dale, E. (1998). Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2, 696-701.

Singh, P., Coe, J., and Hong, W. (1995). A role for retinoblastoma protein in potentiating transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *Nature* 6522, 562-565.

Skildum, A., Faivre, E., and Lange, C.A. (2005). Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Endocrinol.* 2, 327-339.

Smid-Koopman, E., Blok, L.J., Kuhne, L.C., Burger, C.W., Helmerhorst, T.J., Brinkmann, A.O., and Huikeshoven, F.J. (2003). Distinct functional differences of human progesterone receptors A and B on gene expression and growth regulation in two endometrial carcinoma cell lines. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 1, 49-57.

Smith, C.L. (1998). Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol. Reprod.* 3, 627-632.

Smith, D.F. (2000). Chaperones in progesterone receptor complexes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1, 45-52.

Smith, D.F. (1993). Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Mol. Endocrinol.* 11, 1418-1429.

Smith, D.F., Baggenstoss, B.A., Marion, T.N., and Rimerman, R.A. (1993). Two FKBP-related proteins are associated with progesterone receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 24, 18365-18371.

Smith, L.D., and Ecker, R.E. (1969). Role of the oocyte nucleus in physiological maturation in *Rana pipiens*. *Dev. Biol.* 3, 281-309.

SPACH, C., and STREETEN, D.H. (1964). Retardation of Sodium Exchange in Dog Erythrocytes by Physiological Concentrations of Aldosterone, *In Vitro*. *J. Clin. Invest.* 217-227.

Stearns, T., Evans, L., and Kirschner, M. (1991). Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 5, 825-836.

Stein, B., and Yang, M.X. (1995). Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4971-4979.

Suen, C.S., Berrodin, T.J., Mastroeni, R., Cheskis, B.J., Lyttle, C.R., and Frail, D.E. (1998). A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 42, 27645-27653.

Tai, P.K., Maeda, Y., Nakao, K., Wakim, N.G., Duhring, J.L., and Faber, L.E. (1986). A 59-kilodalton protein associated with progestin, estrogen, androgen, and glucocorticoid receptors. *Biochemistry* 18, 5269-5275.

Takamoto, N., Zhao, B., Tsai, S.Y., and DeMayo, F.J. (2002). Identification of Indian hedgehog as a progesterone-responsive gene in the murine uterus. *Mol. Endocrinol.* 10, 2338-2348.

Takimoto, G.S., Hovland, A.R., Tasset, D.M., Melville, M.Y., Tung, L., and Horwitz, K.B. (1996). Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 23, 13308-13316.

Tanenbaum, D.M., Wang, Y., Williams, S.P., and Sigler, P.B. (1998). Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 11, 5998-6003.

Tjian, R., and Maniatis, T. (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 1, 5-8.

Tochio, H., Tsui, M.M., Banfield, D.K., and Zhang, M. (2001). An autoinhibitory mechanism for nonsyntaxin SNARE proteins revealed by the structure of Ykt6p. *Science* 5530, 698-702.

- Treier, M., Staszewski, L.M., and Bohmann, D. (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation *in vivo* is mediated by the delta domain. *Cell* 5, 787-798.
- Truss, M., Bartsch, J., Schelbert, A., Haché, R. J. G., and Beato, M. (1995). Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter *in vivo*. *EMBO J* 14, 1737-1751.
- Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 451-486.
- Tseng, L., Tang, M., Wang, Z., and Mazella, J. (2003). Progesterone receptor (hPR) upregulates the fibronectin promoter activity in human decidual fibroblasts. *DNA Cell Biol.* 10, 633-640.
- Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., and Evans, R.M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 7, 1255-1266.
- Van Diest, P.J., van der Wall, E., and Baak, J.P. (2004). Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J. Clin. Pathol.* 7, 675-681.
- Vicent, G., Ballaré, C., Nacht, S., Clausell, J., Subtil-Rodriguez, A., Quiles, I., Jordan, A., and Beato, M. (2006). Induction of progesterone target genes requires activation of Erk and Msk kinases and phosphorylation of histone H3. *Mol. Cell.*
- Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G.N., Kwok, G.R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Enmark, E., Gustafsson, J.A., Nilsson, S., and Kushner, P.J. (1999). The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol. Endocrinol.* 10, 1672-1685.
- Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J., and Evans, R.M. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 6098, 641-646.
- Weinstat-Saslow, D., Merino, M.J., Manrow, R.E., Lawrence, J.A., Bluth, R.F., Wittenbel, K.D., Simpson, J.F., Page, D.L., and Steeg, P.S. (1995). Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and *in situ* breast carcinomas from non-malignant lesions. *Nat. Med.* 12, 1257-1260.
- Williams, S.P., and Sigler, P.B. (1998). Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 6683, 392-396.
- Wong, C.W., McNally, C., Nickbarg, E., Komm, B.S., and Cheskis, B.J. (2002). Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 23, 14783-14788.
- Yamamoto, K., Hirose, S., Sakamaki, H., and Aoki, N. (1992). Frequent rearrangements of retinoic acid receptor alpha gene and myl gene, and rare mutations of RAS and FMS genes in acute promyelocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* 4, 252-258.
- Yamamoto, K.R. (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* 209-252.
- Yu, Q., Geng, Y., and Sicinski, P. (2001). Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 6841, 1017-1021.



Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (1995). Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 8, 1029-1040.

Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (1994). Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. In vitro phosphorylation by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 49, 31034-31040.

Zhu, Y., Bond, J., and Thomas, P. (2003). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 5, 2237-2242.