

Tesis Doctoral

# Efectos del receptor de progesterona sobre la elongación transcripcional del gen bcl-x humano

Bertucci, Paola Yanina

2012-08-06

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

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

Cita tipo APA:

Bertucci, Paola Yanina. (2012-08-06). Efectos del receptor de progesterona sobre la elongación transcripcional del gen bcl-x humano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bertucci, Paola Yanina. "Efectos del receptor de progesterona sobre la elongación transcripcional del gen bcl-x humano". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-08-06.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# **Efectos del Receptor de Progesterona sobre la elongación transcripcional del gen *bcl-x* humano**

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

**Paola Yanina Bertucci**

Directores de tesis: Dra. Adali Pecci y Dr. Guillermo Pablo Vicent

Consejero de estudios: Dra. Adali Pecci

Laboratorio de Receptores Nucleares y Cromatina, IFIBYNE-CONICET

Buenos Aires, 2012

# Resúmenes

---

# Efectos del Receptor de Progesterona sobre la elongación transcripcional del gen *bcl-x* humano

Los Receptores de Esteroides (SRs) regulan la expresión génica mediante su interacción con Elementos de Respuesta a Hormona (HREs) ubicados en las regiones promotoras de sus genes blanco. Según el modelo clásico de activación transcripcional, los SRs reclutan complejos que relajan el estado de la cromatina favoreciendo, así, los pasos tempranos de la transcripción. Sin embargo, a partir del uso de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación masiva (ChIP-seq), se encontró que una gran parte de los sitios de unión de los SRs al ADN se encuentra ubicada en regiones intragénicas. Adicionalmente, algunos de los complejos modificadores de la cromatina asociados a los efectos de los SRs en las regiones promotoras de sus genes blanco, también fueron encontrados favoreciendo la elongación transcripcional a lo largo de las regiones transcribibles. El objetivo de esta tesis es estudiar el posible efecto de los SRs unidos a las regiones intragénicas sobre la elongación de la Pol II en genes endógenos. Para esto se utilizaron células humanas T47D tratadas con el progestágeno sintético R5020 y al gen *bcl-x* como modelo de estudio. Los resultados mostraron que el Receptor de Progesterona (PR) se recluta únicamente a sitios intragénicos, conjuntamente con las histonas acetiltransferasas CBP y GCN5 y el factor positivo de elongación P-TEFb. El reclutamiento de estos factores correlaciona con un aumento en la acetilación de las histonas, el desplazamiento parcial de los nucleosomas, un aumento en la abundancia de la Pol II principalmente en el extremo 3' del gen y una mayor procesividad de la Pol II a lo largo del mismo. En su conjunto los resultados presentados en este trabajo sugieren que la modulación de elongación de la Pol II en *bcl-x* humano supondría un nuevo mecanismo de regulación de la expresión génica mediada por el PR.

**Palabras clave:** ARN Polimerasa II, Receptor de Progesterona, *bcl-x*, elongación, CBP, GCN5, P-TEFb, nucleosoma

# Effects of the Progesterone Receptor on transcriptional elongation of human *bcl-x* gene

Steroid Receptors (SRs) regulate gene expression through their interaction with the Hormone Response Elements (HREs) located in the promoter regions of their target genes. The classical mechanism of SR transcriptional activation explains that the SRs recruit modifying complexes to these regions, which in turn open the target chromatin thus, favoring the first steps of gene transcription. However, recently developed genome wide technologies, as ChIP-seq, revealed that a main part of SRs binding sites are located in intragenic regions. Additionally, some chromatin modifying complexes classically found in the promoter regions of the SRs target genes were also found favoring the elongation process. In this sense, it was proposed that changes in the chromatin context in intragenic regions would affect Pol II elongation. The aim of this thesis is to analyze the putative effect of the SRs bound to their intragenic sites on Pol II elongation in hormone-regulated endogenous genes. To tackle this, we used T47D human breast cancer cell line treated with the synthetic progestin R5020 and *bcl-x* as a gene model. The results showed that, after the progestin addition, the Progesterone Receptor (PR) is recruited together with the acetyltransferases CBP and GCN5 and with the elongation factor P-TEFb to different binding sites distributed along the intragenic region of *bcl-x* gene. The recruitment of these factors correlates with an increase of histone acetylation levels, the partial decrease in nucleosome occupancy and the improvement of Pol II processivity along this gene. All together, these results suggest a new mechanism which involves the PR control of endogenous Pol II elongation.

**Palabras clave:** RNA Polimerase II, Progesterone Receptor, *bcl-x*, elongation, CBP, GCN5, P-TEFb, nucleosome

# Índice

---

ÍNDICE.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	11
ABREVIATURAS.....	27
INTRODUCCIÓN .....	30
<b>1.    La transcripción génica en organismos eucariotas</b> .....	31
1.1.    La iniciación transcripcional.....	32
1.2.    Elongación transcripcional .....	34
1.3.    Procesamiento de los pre-ARNm .....	36
<b>2.    Cromatina y transcripción génica</b> .....	37
2.1.    Mecanismos de modificación del contexto cromatínico .....	39
2.1.1. Enzimas modificadoras de las histonas.....	39
Acetilación de histonas .....	40
Metilación de histonas .....	41
2.1.2. Complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP.....	447
2.1.3. Chaperonas de histonas .....	45
<b>3.    Acoplamiento entre la transcripción, el procesamiento de los ARNm y el contexto cromatínico</b> .....	45
<b>4.    La regulación de la transcripción génica</b> .....	50
4.1.    Los receptores de esteroides (SRs).....	51
4.1.1. Efectos no genómicos de los SRs .....	52
4.1.2. Efectos genómicos de los SRs.....	54
4.1.3. Distribución de los HREs a lo largo del genoma.....	56
4.1.4. Nuevos mecanismos de acción de los SRs .....	58
<b>5.    El gen <i>bcl-x</i> como modelo de estudio</b> .....	59
OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	62
MATERIALES Y MÉTODOS .....	64

<b>1. Progestágeno</b> .....	65
1.1. Agonista del R5020.....	65
<b>2. Cultivo de células</b> .....	65
2.1. Materiales para el cultivo de células.....	65
2.2. Línea celular .....	65
2.3. Protocolo de tratamientos de la línea celular .....	65
<b>3. Plásmidos utilizados</b> .....	66
3.1. Sub-clonados.....	66
3.1.1. Hibridación de los oligonucleótidos .....	66
3.1.2. Fosforilación del inserto .....	67
3.2. Preparación del vector .....	67
3.2.1. Apertura del plásmido.....	67
3.2.2. Desfosforilación del vector .....	67
3.2.3. Purificación del plásmido.....	67
3.3. Ligación.....	68
3.4. Análisis de los sub-clonados.....	68
3.4.1. Preparación de bacterias competentes .....	68
3.4.2. Transformación de bacterias competentes .....	69
3.4.3. Purificación de los plásmidos por mini-preparación .....	69
3.4.4. Chequeo de los insertos y secuenciación .....	70
3.5. Amplificación de los plásmidos por maxi-preparación .....	70
<b>4. Transfecciones transientes por lipofección</b> .....	71
<b>5. Determinación de las actividades enzimáticas</b> .....	72
5.1. Determinación de la actividad enzimática $\beta$ -Galactosidasa .....	72
5.2. Determinación de la actividad de Luciferasa .....	72



<b>6.</b>	<b><i>Knock downs</i> mediante ARNs pequeños interferentes .....</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>Tratamientos con inhibidores farmacológicos.....</b>	<b>73</b>
7.1.	TSA.....	73
7.2.	DRB.....	74
7.3.	Cicloheximida.....	74
7.4.	$\alpha$ -amanitina .....	74
7.5.	PD98059.....	74
<b>8.</b>	<b>Extracción del ARN total de los cultivos celulares .....</b>	<b>75</b>
8.1.	Trizol.....	75
8.2.	Kit RNeasy Plus .....	75
<b>9.</b>	<b>Reacción de retro-transcripción.....</b>	<b>76</b>
<b>10.</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....</b>	<b>77</b>
10.1.	primers y programas utilizados.....	78
<b>11.</b>	<b>Evaluación de la transcripción proximal y distal .....</b>	<b>78</b>
11.1.	primers y programas utilizados.....	79
<b>12.</b>	<b>Evaluación de la tasa de la elongación transcripcional .....</b>	<b>81</b>
<b>13.</b>	<b>Co-inmunoprecipitaciones .....</b>	<b>82</b>
<b>14.</b>	<b>Ensayos de Western Blot .....</b>	<b>83</b>
14.1.	Preparación y cuantificación de las muestras .....	83
14.2.	Electroforesis y transferencia a membrana de PVDF.....	83
14.3.	Incubación con anticuerpos y revelado.....	84
14.3.1.	Anticuerpos utilizados .....	84
<b>15.</b>	<b>Inmuno Precipitación de la Cromatina (ChIP) .....</b>	<b>85</b>
15.1.	<i>Crosslinking</i> .....	85
15.2.	Extracción de la cromatina .....	86

15.3. Sonicación.....	86
15.4. Evaluación de la calidad de los fragmentos de cromatina.....	87
15.5. Preclareado de la cromatina.....	87
15.6. Inmuno-Precipitación (IP).....	88
15.6.1. Anticuerpos utilizados.....	88
15.7. Elución.....	89
15.8. <i>Descrosslinking</i> .....	89
15.9. Extracción del ADN.....	89
15.10. qPCR.....	89
15.10.1. <i>Primers</i> y programas utilizados.....	90
<b>16. Análisis estadístico de los datos.....</b>	<b>92</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>93</b>
<b>1. Caracterización del efecto del R5020 sobre la expresión del gen <i>bcl-x</i>.....</b>	<b>94</b>
1.1. Efecto del R5020 sobre la transcripción de <i>bcl-x</i> en células T47D.....	94
1.2. El efecto del R5020 sobre la transcripción de <i>bcl-x</i> es a nivel transcripcional.....	95
1.3. La inducción transcripcional es independiente de la síntesis proteica.....	96
<b>2. Caracterización de los sitios de unión del PR en <i>bcl-x</i>.....</b>	<b>97</b>
2.1. Sitios de unión del PR en <i>bcl-x</i> en células T47D.....	97
2.2. Los sitios intragénicos de unión del PR en <i>bcl-x</i> responden al tratamiento hormonal, fuera de su contexto endógeno.....	100
2.3. Activación y cinéticas de reclutamiento del PR.....	101
<b>3. Participación de las HATs en la inducción transcripcional de <i>bcl-x</i> por el tratamiento con R5020.....</b>	<b>104</b>
3.1. Acetilación de histonas.....	105
3.2. Participación de las HATs.....	106
3.3. Reclutamiento de las HATs.....	108

3.4. Interacción PR-HATs.....	113
3.5. Densidad de nucleosomas .....	114
<b>4. Reclutamiento de factores de elongación.....</b>	<b>116</b>
4.1. Reclutamiento de P-TEFb .....	116
4.2. Interacción P-TEFb-PR .....	118
<b>5. Efectos del PR sobre la elongación Transcripcional.....</b>	<b>119</b>
5.1. Distribución de la ARN Pol II .....	119
5.2. Transcripción proximal y distal.....	121
5.3. Análisis de la velocidad de la Pol II.....	122
<b>6. Transcripción Proximal y Distal de otros genes.....</b>	<b>124</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>128</b>
1. Distribución de los HREs y <i>loopings</i> transcripcionales.....	126
2. La activación del PR y su efecto en la inducción del <i>bcl-x</i> .....	133
3. Las pausas transcripcionales y el remodelado de la cromatina.....	134
4. Acetilación de SRs.....	136
5. Modulación de la elongación transcripcional de la Pol II.....	136
6. Regulación de la elongación en otros genes.....	146
7. Posibles efectos asociados a la regulación de la elongación transcripcional .....	148
<b>RESÚMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>152</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>154</b>

# Agradecimientos

---

# Mis directores de tesis

---

**Ada**, ¡cuántas cosas, cuánto tiempo! ¡No sé cómo empezar, estoy tan agradecida! Gracias por apoyarme con cada una de mis ideas, por darme libertad de pensamiento, de trabajo, de tiempos, por ocuparte por mí, por saber entender mis necesidades y hacer todo de tu parte para poder hacerme sentir bien y ayudarme. Gracias por cada discusión que tuvimos, por cada empujón, por sostenerme mil veces, por guiarme a lo largo de este trabajo. Gracias por enseñarme a calcular los moles, por bancarme cada uno de mis caprichos, por sentarte conmigo a preparar soluciones, por entusiasmarte y entusiasmarme con cada experimento nuevo, por “descompensarnos” juntas. Gracias por tu generosidad, por tu honestidad, por abrirme mil puertas y no cerrarme ninguna. Te voy a extrañar muchísimo. GRACIAS MILES, MILLONES.

**Genio (Guille)**, no sabés qué importante fue tu intervención para mí en todo sentido, en la ciencia y en la vida. Me enseñaste a trabajar y a pensar, me tuviste infinita paciencia, me cuidaste cada vez que sentiste que era necesario, me guiaste, me empujaste y también, me retaste. Por cada charla, por cada discusión, por cada paper que me trajiste para leer el minuto siguiente a que saliera publicado, por cada idea. Por cada vez que me hiciste reír hasta llorar, ¡fueron tantas, tantas, tantas veces! Por haberme ayudado a ir a Barcelona, por nuestras “peleas” por usar las cosas que son “tuyas y sólo tuyas”. Por confiar en mí, por todo el esfuerzo que te impliqué. Te quiero muchísimo (no salgas corriendo) y te estoy eternamente agradecida. ¡¡GRACIAS POR TODO!!

## La profe

---

**Ana Lerner**, mi gran profe de inglés y mi amiga, sabés todo lo que te debo. Ni más ni menos, ¡hiciste posible lo imposible! Por tu paciencia, por acomodarte a mí mil veces, de muchas maneras. Por los cafecitos, tus brownies, las tortitas de coco y las exquisitas galletitas que compartiste conmigo. Por abrirme tu vida y tomar la mía. Por aceptar un desafío tan arduo. Por decir que soy la mejor alumna que tuviste, me contó un pajarito, me siento orgullosa por semejante halago, sobre todo, viniendo de la mejor profesora del mundo. Ana, te voy a agradecer para siempre lo que hiciste por mí, nunca me hubiera animado a tener la entrevista sin tu ayuda, y me lo hubiera perdido. ¿Cuántas cosas hubieran sido distintas? Pero estuviste y las cosas son como son. Estás y vas a estar siempre conmigo, espero que me visites en algún viajecito de los tuyos. Te quiero muchísimo y te agradezco enormemente haberme abierto las fronteras del mundo, me diste alas.

## Mis compañeros y amigos del labo

---

¡Al **Equipo!** Chicas, no puedo pensar en una vida sin ustedes al lado, ¡me las voy a tener que llevar conmigo! ¡Tantas cosas! Empezando por haberme hecho sentir súper cómoda en el labo, por haber cambiado por completo el aire, por ponerle buena onda y anécdotas, por nuestras salidas a correr (si le podemos decir así), por contar con ustedes en cada momento difícil que pasé, por compartir y festejar juntas las cosas lindas que nos fueron pasando. Por quererme tal cual soy. Por nuestras meriendas de millones de palabras y calorías, por nuestras cenas, por cada festejo, por cada mail que nos mantuvo juntas mientras estábamos lejos. Por hacerme sentir valorada. Equipo, son una parte súper importante de mi vida. **Vicki**, por haber remado juntas el peor de los escenarios y por ser esa persona en quien poder confiar y

descansar sin pensarlo dos veces. Por enseñarme el “si no estoy yo, estás vos”, contar con vos para cada cosa, saber que podía no ir porque estabas vos, por enseñarme a pedir y a dar. Por nuestra amistad que crece día a día a pasos agigantados. Por haber sabido entenderme tantas veces, por hacer siempre la pregunta perfecta. Por haberme acompañado, tan firmemente, durante todo este último período de tantas cosas. Por estar orgullosa de mí y hacermelo saber. Por abrirnos las puertas de tu casa tantas veces pero, por sobre todo, por haberte abierto vos y compartido tu vida con nosotras. Jirafita, ¡te voy a estar esperando del otro lado del mundo! **Ojitos**, por ser la persona más buena y adaptable, por estar siempre, pase lo que pase, por ser tan generosa en todos los sentidos. Por cada charla, por abrirte, por permitirme abrirme, por estar siempre atenta a mí, porque nada se te pasa, por estar siempre, firme, para cuando uno te necesita. Por nuestros meses de amistad “intensivos”, por cada una de las mil veces que nos quedamos hablando hasta las 4 de la mañana, por hacerme reír hasta en las situaciones más complicadas. Por ser mi gran compañera, amiga, hermana gemela. Gracias también por los millones de favores que me hiciste en el labo ¡Cuánto te quiero! **A las dos**, por nuestro retiro espiritual en Gesell, por cada una de las charlas, cada ataque de risa, cada chiste, cada caminata, cada foto. Por los mil mates compartidos, cenas, almuerzos, tesitos, tortas, helados y calefones. Por haber estado conmigo en esos días, en un momento con tantas cosas. **Sid**, ¡loca! ¡Mi amiguita hermosa! Por las miles de horas que pasamos juntas tratando de escribir y estudiar, por cada charla, por nuestras clases de cerámica y de pilates con la mala onda de la profe. Por el gordo Jopete y por despatarrarte en nuestro gym nuevo mientras hacías abdominales. Por ponerle amor e ingenuidad a una vida llena de cosas difíciles. Por ser tan demostrativa, por pensar en mí, por dejarme acompañarte en cada uno de tus pasos y por acompañarme en los míos. Por esa famosa práctica por Skype, no me la voy a olvidar nunca, ¡qué mal la pasé! ¡Y qué bien me hizo! Cuánto ayudó. Por empujarme, por cada una de tus palabras. Por no poder estar ni una semana separadas porque nos “deprimimos”. Ani, sos lo más, ¡sabés cuánto te quiero! **Equipo**, mi vida tiene un antes y un después de conocerlas. Las

recontra mil quiero (¿hasta el “infinito multicolor?”). ¡¡¡Gracias por el aguante nocturno pre-entrega!!!

**Ajo**, por ofrecerte siempre para ayudarme, por cada vez que dejaste lo que estabas haciendo para contestar mis preguntas. Por confiar en mí. Por ser una persona tan interesante y compartir cada una de las cosas que te hacen así. Por ser mi compañerito de “Doc Pecci” y bancarme con todas mis cosas. Por cada mail que mandaste y que guardo en una carpeta aparte. Por tu creatividad, por tus intereses, por tu sencillez en tantas cosas. Por nuestros tantos mates.

**Chocha**, por haber sido mi mentora en el labo, por recibirme en Barcelona con la mejor de las buenas ondas y facilitarme mi primera reunión con Guille, que no fue fácil. Por estar siempre atenta a mis cosas, por ofrecer una mano cada vez que la necesité, por haberte incorporado en mi trabajo con todas las pilas, ¡por haber traído al mundo a mis amigotas Larita y Cami! Por mis tappers, ¡que los adoro! ¡Y que pienso llevar conmigo! ¡Por ocuparte de todo!

**Diego**, por escucharme y darme tu opinión, por tu enorme ayuda con las estadísticas!

**Marto**, ¡¡¡Groso!!!! Sos lo más, ya lo sabés. Aunque no hayas querido venir a trabajar conmigo en mi tema “súper molecularoso”, sabés que es un placer tenerte en el labo. Responsable, divertido, inteligente, compañero, bien predispuesto, “chiquito”, las tenés todas, aprovechalo. Por compartir con el Equipo los secretos más femeninos y no quejarte, jeje.

**Dieguito**, pibín, sabes que te quiero mucho. Gracias por tus preguntas, por tu buena onda, por ponerle la cuota de alegría y silvatina al labo. Por los abrazos del último tiempo. Suerte en tus proyectos. Es una alegría que hayas decidido quedarte con nosotros para el doctorado.

**Lautaro**, dado que ahora nos llevamos súper bien y ya no nos “peleamos” hace mucho, quiero agradecerte por haberme incorporado en tu proyecto de los A-homos, fue muy lindo hacer algo con ustedes.



**Solcito**, por abrirnos las puertas de tu casa una y mil veces. Por los ping pong, las carreras de autitos, las picadas y la fondue. Por haber sumado tanto a nuestros encuentros extra labo. Por tu predisposición constante para ayudar. Sos una persona hermosa.

**Nati R.**, ¡Loca linda! A vos te escribo poco porque no nos despedimos, nos vamos a ver pronto del otro lado del océano. Pero, quería agradecerte por las charlas compartidas, por tratar de hacer del labo un lugar mejor y con mas recursos. Por tu fuerza, tu empuje, tus ideas, tus intereses diversos. Por compartir la lectura.

**Caro**, por preguntarme siempre por mis cosas y por esas deliciosas tortas con las que nos deleitaste cada día.

**Nadi**, por incentivar-me a aprender alemán, ¡ahora no me queda otra! Por tu tranquilidad, por adaptarte a nosotros y aguantarnos.

**Juli**, por las largas y divertidas charlas que tuvimos mientras pipeteaba y ¡me distraías!

**Pau**, mi nuevo amigo! Por todas las muchisimas horas compartidas en “La pecera”, por nuestras charlas.

**Mariela**, por cuidar a mis bebitas cuando no estaba. Por ayudarnos, por tu buena predisposición.

**José**, a vos también gracias por la paciencia, por haberte bancado que te eche de mi mesada muchas veces : ) Por sacarnos trabajo, ¡se necesitaba! Por todas las cosas que escuchaste en el labo jejeej ¡Pobre Jose! Qué manera de aguantar a las cotorras (¡que incluyen a AJO!)

**Edith**, por la relación que pudimos armar, a pesar de tantas diferencias que tuvimos. Gracias por saber disculparme por las cosas que no hice bien y por tratar de acercarte. Por nuestro proyecto “mamas involucradas” compartido, por las discusiones productivas, por tus consejos y nuestras charlas con tinte “filosófico”.

# Los otros labos de Bs.As.

---

**Labo ARK.** Les tengo que agradecer a cada uno de ustedes por las millones de veces que les pedí cosas, por las mil veces que les pedí ayuda, por las cientos de veces que les hice preguntas, que les pedí un cosejo, una opinión o un protocolo. Siempre bien predispuestos y con la mejor de las buenas ondas. **Petry**, por tus chistes, tu ingenio, tu buena onda, tu empuje, los momentos compartidos, las cenas, las pelis. **Nachis**, porque todavía te agradezco cuando me llevaste de los pelos a rendir aquel final, te debo una enorme. Por cada vez que me acerqué a preguntarte o a pedirte algo y tuviste la mejor de las buenas ondas para ayudarme. Po los momentos que compartiremos en Heidelberg. A **Lu**, por ser tan dulce, por haberle aportado al labo una enorme cuota de buena onda y generosidad que se siente cada vez que voy de visita. A **Vale**, por todo, ¡sos una diosa! ¡Qué harían todos sin vos! Por ayudarme cada vez que necesité, por ponernos de acuerdo sin problemas en este trabajo en el que ambas formamos parte. Por prestarnos tu hermosa casa, por prestarme a Jackito, por ser una divina. Te adoro. **Celi**, por estar siempre predispuesta a dar una mano. **ARK**, por ser un modelo a seguir, por tu generosidad, por tu tiempo, por tu valoración. Por cada charla que diste y que disfruté. Por tu enorme ayuda con mi doctorado, en todos los sentidos, ¡GRACIAS!

**Labo Vazquez-de Siervi y Labo Correa-Bermúdez**, chicos, ¡gracias a todos! **Geral**, por estar siempre presente y preocuparte por mí, por valorarme siempre y haberme cumplido un sueño tan lindo. **Pao, Belén, Flor y Mechi** (Por toda la ayuda y buena predisposición de siempre. Por la buena onda, las charlas por preguntarme por mis cosas y ponerse contentas cuando me salen bien). **Sabri, Cris, Javi, Felipe, Chino, Charli, Elba, Adriana, Susi y Marian**. Por la buena onda, por el esfuerzo diario, por adaptarnos a los pocos espacios. Por las charlas, los mates, los seminarios. Por cada cosa que me prestaron, por cada cosa compartida.

**Labo Fede, Martín, Lu, Gime, a todos** gracias por haber estado cada vez que fui a romper por alguna cosa. **Fede**, por tratar de optimizar todo lo que se te pasa por adelante, por hacerme sentir acompañada en el intento de tener un labo mejor. Por tus pilas, por tratar de contagiarnos el amor por lo que hacemos, por empujarnos, por las charlas y los mates. Por tu infinita ayuda con los clonados, por tu genuina alegría por cada cosa que sale bien, por tu empuje.

**Labo Dante, Lucas, Carola, a todos** gracias por cada vez que subí por laburo, por mates o a charlar. Por hacerme sentir súper cómoda. Por la ayuda y la buena onda. **Andrea Pozzi**, ¡¡Gaby!! ¡¡Sos tan linda!! Por todos los proyectos juntas, por confiar en mí, por ayudarme y poner todas las pilas. Por estar siempre atenta, por ser tan divertida y dispuesta. ¡Un placer trabajar con vos y tenerte cerca! ¡Te quiero mucho loca!

**Labo Coso**, gracias a todos por cada cosa en la que me ayudaron. **Dai**, por ser lo más! Por nuestras charlas y por estar siempre atenta. **Omar**, ante todo gracias por tu sinceridad y tu coherencia. Por nuestra charla en el avión.

## Barcelona

---

**Silvinita**, ¡Tengo tantas cosas que agradecerte! Por haberme compartido cada una de tus soluciones, tus pipetas, ¡las 317! Por ayudarme una y mil veces, por pasarme cada protocolo, por bancarte mis millones de preguntas. Por abrirme las puertas de tu casa, por las charlas compartidas, los almuerzos juntas. Por ser divertida, sencilla, compañera. Por ser una mujer súper fuerte, entera y completa. Por los experimentos que hiciste para ayudarme, por hacerme todo más fácil y ser una parte tan importante de este proyecto.

**Cecita**, ¡te volví loca! Y siempre estuviste con la mejor predisposición. Por ayudarme, por facilitarme tantas cosas. Por ser una persona sencillamente genial.

**Labo Miguel**, A **Miguel**, por haberme dado la posibilidad de ir a su laboratorio. A **los chicos** por haberme hecho sentir tan pero tan cómoda, por aguantarme mil horas ahí metida, en SU labo. Por ayudarme, por responderme mis mil dudas, por haberle puesto la mejor de las ondas a mis estadías. **Jofre** y **Lauri**, por toda la ayuda que me dieron, por aguantar el genio y hacerme reír. **Diana** y **Ale**, por nuestras charlas, por ser tan cálidas y hacerme sentir como en casa. A **Francois** y a **Roni**, por haberme tenido tanta paciencia. A **Mijael**, por ser el más simpático, por acercarte e hablar conmigo cuando estaba tímida por mi inglés, por hacerme sentir cómoda cada vez que voy. **Roser!** Por ser alguien tan especial, por irradiarlo.

**Juan Valcarcel**, por ser un modelo de persona y reconciliarme con el ambiente científico. Por tu generosidad, por tu idea de la ciencia, que tanto tiene para enseñarle a todos. Por abrirme las puertras de tu laboratorio con la mayor de las libertades. Por haberme dedicado tiempo, por haberme escuchado y ayudado con mi proyecto. Por tu empuje para ir al EMBL, por tu carta de recomendación, te lo voy a agradecer para siempre. Con toda mi admiración, ¡INFINITAS GRACIAS!

**Labo Juan**, a cada uno de los chicos que me hizo sentir parte, por ser tan generosos, por prestarme todo, por contestar todas mis dudas, por ponerle tanta onda, por cada bienvenida y cada despedida que nos hicieron, por ser tan lindas personas. **Cami**, por tu dulzura y tu naturalidad. **Elias**, por nuestras charlas, por escucharme y hacerme sentir tan cómoda. **MP**, por tus consejos, tus pilas y tu buena onda. **Joao**, por ser una de las personas más divertidas e inteligentes que conozco. **Ramón**, por tu infinita amabilidad, por tu paciencia y tu buena predisposición. **Belén**, por ayudarme una y mil veces.

# Aquellos que también me ayudaron tanto

---

**Jorge y Anabel**, difícilmente encuentre un caso como el de ustedes. Se ocuparon de mí, respondieron cada uno de mis mails y estuvieron firmes, ocupándose de un asunto totalmente ajeno. Es imposible agradecerles lo suficiente, fueron un sostén enormísimo para mí y una ayuda invaluable en un momento complicado. Por el acto de mayor bondad, de la forma más genuina, les estoy enormemente agradecida.

**Marcelo Rubinstein**, mi primer director y mi tutor. Por tu forma de pensar, por tu enormísima e interminable inteligencia. Por tu tiempo, nuestras charlas, por ayudarme, aconsejarme y escucharme. Por ir a mi póster en cada congreso compartido.

**Manu de la Mata**, ¡Manu! ¡Te volví loco! Gracias por tus respuestas kilométricas a mis preguntas kilométricas. Gracias por recibirnos en tu casa cada año (a vos, a **Albi** y a **Justi**).

**Abel**, por tu interminable paciencia. Por tu genuina ayuda con el Triplex, por responderme los muchos mails, por juntarte conmigo para ayudarme. ¡Muchísimas gracias!

A **Martín Monte**, por prestarme, muy gentilmente, los plásmidos de HDACs.

# Mi familia

---

**Mamá**, ¡Cuántas cosas! Por escucharme, por preocuparte por mí, por tratar de acercarte. Por estar orgullosa de quien soy y por hacérmelo saber. Por haber estado firme conmigo en cada situación que te necesité, con ese enorme amor de madre. Por los miles de mimos. Por nuestras caminatas, almuerzos, meriendas y cenas, por las horas y horas de charlas y de gym compartidas. Por estar siempre pensando la manera de ir a visitarme cuando esté afuera. ¡Te voy a estar esperando para recorrer el mundo juntas! ¡Te quiero muchísimo!

**Papá**, por ser la persona que durante todos estos largos años me puso adelante de sí mismo, por su generosidad, por su honestidad, por compartir conmigo cada paso de este doctorado, por estar al tanto, por hacer posible cada uno de mis viajes. Por ser mi Rudi, mi Rudilfo, mi Rudolf, mi médico personal. Por entenderme, quererme tal y cual soy, por valorarme y hacermelo sentir. Papi, gracias por la contención y aguante de los últimos meses, por tu paciencia, por darme mis espacios y respetar mis tiempos. Gracias por apoyarme y ponerte feliz por mí, por dejar tu felicidad de lado, para disfrutar de la mía. No sabés cuánto te quiero y te agradezco cada cosa que hiciste y hacés por mí.

**Yayos**, sin palabras para mis yayos. Son mi vida, los amo, los necesito y siempre están conmigo. Cada almuerzo, cada cena preparada con amor, cada visita, cada rato juntos. Por criarme, por amarme, por enseñarme y tenerme paciencia. Por preocuparse siempre por mí, por sufrir cuando sufro y estar felices cuando estoy contenta. Por cada favor que me hicieron, por contar siempre con ustedes. Por acompañarme toda la vida, agarrándome de la mano. Porque van a vivir conmigo para siempre.

**Julián**, hermanito mío. Siempre admirado con la vida, siempre preguntándote cosas, siempre queriendo saber el por qué e inventando experimentos imposibles, dudando, pensando. Por cada momento que pasamos juntos, por nuestras discusiones, nuestros reencuentros, nuestras muchas horas de estudio. ¡Por acompañarme al labo tantas veces y portarte tan bien! Sos mi solcito, te adoro y te extraño cada día.

**Tiu**, ¡por cada vez que me rompí y me arregalste! Por estar siempre pendiente, por creer que soy la persona más inteligente del mundo (Tiu, definitivamente no lo soy) y contárselo a todos. Por sentirte orgullosa de mí, por disfrutar de mis logros. Por haberme llevado por el camino del Pilates, que tan bien me hace día a día para sentirme bien.

**Yoli**, por una vida compartida, por nuestros espacios, nuestras escapadas, nuestras charlas, nuestras visitas al palacio de Aysa, por nuestras miles de vacaciones juntas, por tu paciencia, por tu amor, por cuidar a mi papá. Por prestarnos el Gesellino que tan bien le hizo al Equipo!

**Dani**, ¡qué hubiera sido mi vida sin vos! Por tu ayuda, tus energías, por tu resiliencia, por tus ganas, por tu estilo de hacer las cosas bien, por confiar en mí para contarme tus cosas, ¡por ser un ejemplo de mujer! Por tu fuerza.

**Perli**, por estar SIEMPRE. Por acompañarme en cada momento importante de mi vida. Por cuidar a mi mamá y a Juli.

**Anita**, por estar siempre pendiente de cada uno de nuestros pasos, por estar cerca. Por acompañarme en cada paso de mi doctorado, a pesar de las distancias.

**Carli**, por haberme abierto las puertas de tu casa y de tu vida, por darme un espacio, por hacerme sentir tan bien. Por estar atenta a mí y a cada una de mis cosas. ¡Te quiero hermosa!

**Agus, Celu, Lucho y flia**, por cada uno de los momentos compartidos. Por ser todos unos dulces y acompañarme en esta etapa de tantas maneras.

## Mis amigos “de afuera”

---

**Naty F, Qu y Pu**, por haberme acompañado en todo momento, por saber que cuento con ustedes para cada cosa que necesito. Por todos los momentos compartidos: Arecos, Burelas, Bucarellis, Besares, facu, cumpleaños, cenas, charlas, pelis, mates, etc. Por las miles de veces que me empujaron en los momentos de mayores dudas, por escucharme y darme alternativas, por bancarme en todo. Porque las adoro. **Natín**, por haber estado absolutamente siempre dispuesta a ayudarme y haber sido un enorme ejemplo, de muchas cosas. Por haber

compartido los momentos más difíciles y también las charlas más superfluas. Por cada abrazo de contención. Por abrirme las puertas de tu casa una y mil veces. **Qu**, Por haber estado tan cerca mío cada vez que te necesité. Por nuestras largas charlas, por escucharme. Porque para mí sos un sol, es difícil que puedas saber cuánto te quiero. **Pupin**, por ser una persona tan hermosa, dulce y brillante. Por esa manito que estuvo conmigo en un momento tan raro para mí. Por haber hecho siempre el comentario indicado para abrirme los ojos, por hacerme tan pero tan bien.

**Mauge**, ¡¡¡¡amigota hermosa!!!! Uff, ¡tantas cosas! Por escuchar mis mil historias, por contarme las tuyas. Pos cada salida, cada visita, cada momento juntas. ¡Cuántos años! Por tus correcciones “literarias” del librito y de la tesis. Por bancarme siempre en todas. Por saber que estás, que dejarías cualquier cosa si te necesito. ¡Te quiero tanto amiga! Ahh y por venirte a Heidelberg conmigo (te estoy metiendo un poquito más de presión, jeje).

**Lea**, ¡amigazo de la vida! Por estar siempre, por tus pilas, tus ganas, por quererme como soy. Por tantos tantos años, de tantas cosas. Por cuidarme y entenderme. Te súperrrrrrrr quiero amiqui.

**Meli**, ¡vos sí que me entendés! Por tener una vida de locos y de dedicación como la mía, por poner todo de vos para cada cosa, por ser un ejemplo. Por valorarme, por pensar que soy una genia, me da risa. Por compartir una vida conmigo. Por cada vez que nos encontramos y siento que te vi el día anterior. Por esa confianza irrompible que hay entre nosotras. Sos lo más Mel hermosa!

**Male**, Por tu paciencia, por querer verme siempre, por escucharme y acompañarme, por aconsejarme mil veces, por todas las cosas que vivimos, por todo. Te quiero amiga.



**Emi**, por nuestro hermoso reencuentro! Por acompañarme durante este último período de mi tesis, por empujarme e insentivarme para seguir para adelante. Por haber sido mi compañera de tantas cosas de la vida.

**Checha**, ¡amiga de largos trechos de estudio y de caminatas! Por todo, porque sé que estás, por tu valoración, tu empuje y tu admiración, que no escondés nunca.

**Maru y Juan**, por cada vez que nos recibieron, por los juegos, las juntadas, las visitas, ¡¡por mi sobri!!! Por cada recomendación, ¡los quiero!

## A los que me cuidaron

---

**Pau**, por por abrirme el mundo y ayudarme a relajarme. Por enseñarme a escucharme, a valorarme y a seguir delante, por mostrarme caminos alternativos. Por ayudarme a ser yo misma, no sabés qué bien me hacés y cuanto te quiero y agradezco todas, y cada una, de las cosas en las que me ayudaste.

**Lily**, por tu genuino interés en lo que hago, por tus preguntas constantes al respecto, por nuestras largas charlas. Por ser una médica genial.

**Sergio**, por bancarme tanto!! Por mis muchos mensajitos, por aguantar mis inseguridades, por atenderme a cualquier hora, en cualquier día. Por estar siempre, hace tantos años.

**Mara**, por hacerme sentir tanto mejor, por ponerme pilas y empujarme en cada clase. Por controlarme cada vez que faltó y obligarme a recuperar. Por darme el gusto “contra tu voluntad”, casi siempre. Por tu espontaneidad, nuestras charlas y ataques de risa. Por ser una persona tan dulce, por estar siempre atenta a mi vida y compartirme la tuya.

## A las instituciones

---

CNBA, por estar presente en mi vida, en cada cosa que hago.

UICC, por otorgarme la beca que hizo posible que vaya a Barcelona la primera vez.

IFIBYNE-CONICET, por darme la posibilidad de hacer mi doctorado.

Departamento de QB, por aceptarme en el doctorado y darme el lugar de trabajo.

UBA, por ser una excelente universidad, que nada tiene que envidiarle a ninguna. Es un orgullo haber hecho la carrera y el doctorado en esta institución.

CRG, por ser el lugar más hermoso para hacer ciencia y por recibirme cada año.

## A mi futuro director y mi futuro grupo

---

Detlev, por ser una excelente persona además de ser humildemente brillante. Gracias por entender cada una de mis necesidades y por toda la ayuda que me estás dando para facilitar mi viaje. Por haberme elegido para formar parte de tu grupo, lo cual es un enorme privilegio.

A todos, por recibirme tan cálidamente y hacerme pasar una entrevista genial.

Por ser mi motor para defender esta tesis.

# A Mariano

---

Es imposible agradecerte lo suficiente. Me enseñaste a pensar, a trabajar, a mirar de una manera distinta y a medir mis tiempos. Me acompañaste en cada paso de mi carrera. Me valoraste a cada minuto, con cada idea. Me hiciste partícipe de tus proyectos, te involucraste en los míos y confiaste en mí.

Me abrazaste en cada momento en el que me sentía mal, me empujaste cada vez que quería parar, me sostuviste todas las veces que tambaleé y me diste fuerza mil veces. Me ayudaste a estar más tranquila, a tomarme la vida de otra manera y a poder disfrutar de lo que hago, de cada cosa.

Porque a tu lado crecí, en todos los sentidos.

“ . . . estamos en un mundo tan singular, que el vivir sólo es soñar; y la experiencia me enseña que el hombre que vive sueña lo que es hasta despertar.” Gracias por enseñarme a despertar y a hacer realidad mis sueños.

Por cada uno de los miles de hermosos momentos juntos, por cada uno de nuestros viajes, por cada proyecto de vida compartido, por todo lo que la peleamos para salir adelante.

Con todo mi amor, **esta tesis es para vos.**

# Abreviaturas

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora 1
AR	Receptor de andrógenos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenocín tri-fosfato
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Seroalbúmina bovina
CTD	Dominio carboxilo terminal
CKD7	Quinasa Dependiente de la Ciclina 7
CDK9	Quinasa Dependiente de la Ciclina 9
DBD	Dominio de unión al ADN
DRB	5,6-dicloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ER	Receptor de Estrógenos
ERK1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares
ES	Error estándar
FACT	Factor facilitador de la transcripción
FT	Factor de transcripción
FGT	Factor general de transcripción
GR	Receptor de Glucocorticoides
H2A	Histona canónica H2A
H2A.Z	Variante de la histona canónica H2A
H2B	Histona canónica H2B
H3	Histona canónica H3
H4	Histona canónica H4
HAT	Histonas Acetiltransferasas
HP1	Proteína de heterocromatina 1
HRE	Elemento de respuesta a hormona
Hsp	Proteínas del <i>shock</i> térmico
LBD	Dominio de unión al ligando
LUC	Luciferasa
Lys	Lisina
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MMTV	Promotor del virus de tumor mamario de ratón
MR	Receptor de Mineralocorticoides

NFκB	Factor nuclear kappa-B
NRs	Receptores nucleares
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPEP	Pausado proximal al región promotor
PIC	Complejo de pre-iniciación
Pol II	ARN Polimerasa II
PoliA	Señal de poliadenilación
PR	Receptor de Progesterona
P-TEFb	Factor Positivo de Elongación Transcripcional b
R5020	Progestágeno sintético
RAR	Receptor de Ácido Retinoico
Rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SFB	Suero fetal bovino
siARNs	ARN de interferencia
SR	Receptor de hormonas esteroides
STAT	Activadores de la transcripción y transductores de señales
TATA	Caja TATA
TFIIA	Factor General de Transcripción II A
TFIIB	Factor General de Transcripción II B
TFIID	Factor General de Transcripción II D
TFIIE	Factor General de Transcripción II E
TFIIF	Factor General de Transcripción II F
TFIIS	Factor General de Transcripción II S

# Introducción

---

# 1. La transcripción génica en organismos eucariotas

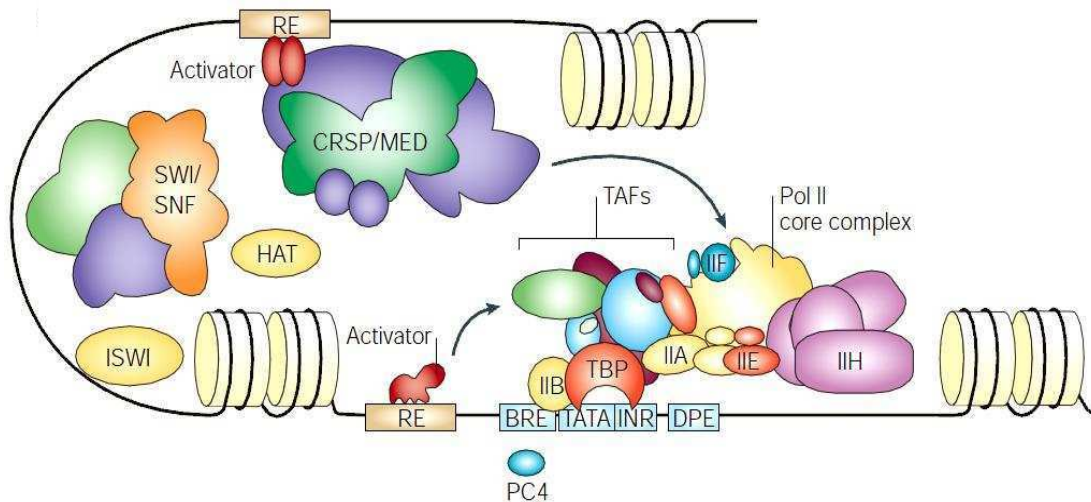
La información necesaria para la síntesis de todas las proteínas celulares se encuentra almacenada en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN), particularmente, en regiones que denominamos genes. La expresión de cada uno de estos genes ocurre como consecuencia de diversos procesos bioquímicos que se encuentran sumamente regulados y conservados en todos los dominios de la vida, lo cual ha dado lugar al llamado “dogma” de la biología molecular. Este dogma propone que la información genética, presente en la molécula heredable y replicable del ADN, es transmitida a moléculas de ARN mensajeros (transcripción) y que esta información es luego traducida en proteínas (traducción). Por lo tanto, la regulación de la expresión de los genes es fundamental para el correcto desarrollo, crecimiento y supervivencia de todos los organismos, ya que determina qué proteínas y en qué cantidades van a estar presentes en cada tipo celular en un momento determinado.

La transcripción de los genes codificantes para proteínas, en células eucariotas, es llevada a cabo por la ARN Polimerasa II (Pol II) mediante un proceso complejo que presenta diferentes etapas: la iniciación, la elongación y el procesamiento de los pre-ARN mensajeros. Esta enzima presenta un dominio conservado en su subunidad mayor, el dominio carboxilo terminal (CTD) que está compuesto por la repetición de una determinada secuencia de siete amino ácidos: Tyrosina-Serina-Prolina-Threonina-Serina-Prolina-Serina (Y-S-P-T-S-P-S). En mamíferos la Pol II contiene 52 repeticiones de esta secuencia, en moscas 45 y en levaduras 26 [15]. Las modificaciones postraduccionales del CTD juegan un rol esencial en la regulación de su actividad y, como consecuencia, son indispensables en cada una de estas etapas de la transcripción génica.



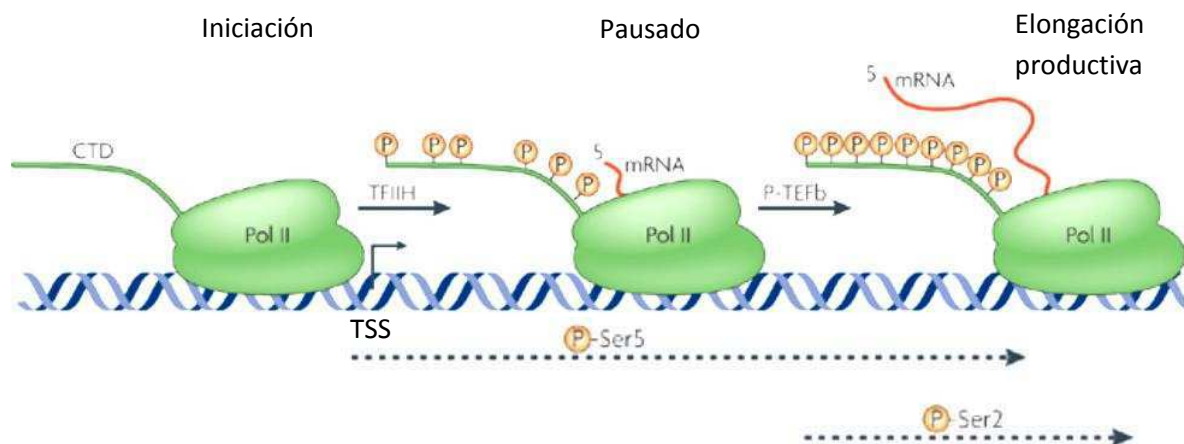
## 1.1. La iniciación transcripcional

El primer paso en la transcripción génica ocurre mediante el reconocimiento de una determinada región promotora y la formación del complejo de pre-iniciación (PIC), el cual se encuentra compuesto por los factores generales de la transcripción (FGTs), la Pol II y por diversos co-factores [16, 17]. Los factores generales de la transcripción TFIIA, TFIIB y TFIID reconocen secuencias específicas del ADN, proximales al promotor, como son la caja TATA (TATA), el elemento de respuesta a TFIIB, el elemento iniciador y el elemento promotor. TFIIF se une a la ARN Polimerasa II y ayuda al reclutamiento de esta enzima a la región promotora. TFIIE se une al factor TFIIH y favorece su reclutamiento a la región promotora. A su vez, TFIIH abre el ADN y permite el acceso de la Pol II a este templado [18] (Figura 1).



**Figura 1: Formación del PIC en células eucariotas.** La formación del PIC comienza con el reconocimiento de secuencias específicas del ADN de la región promotora por los factores generales de la transcripción TFIIA, TFIIB y TFIID. Estas secuencias son la caja TATA (TATA), el elemento de respuesta a TFIIB (BRE), el elemento iniciador (INR) y el elemento promotor (DPE). Una vez reclutados estos factores, el factor general de la transcripción TFIIF favorece la unión de la ARN Polimerasa II a esta región (Imagen obtenida de 4).

La Pol II que conforma el PIC no es transcripcionalmente activa y para activarse requiere de un cambio conformacional que se produce como consecuencia de la fosforilación de los residuos Serina (Ser) 5 de su dominio CTD (Figura 2). Esta fosforilación es catalizada por la quinasa dependiente de la Ciclina 7 (CKD7), que es la subunidad catalítica de TFIIF [19]. Una vez que la Pol II está fosforilada en sus residuos Ser 5 se produce la iniciación de la transcripción y el escape de la Pol II de la de la región promotora. En estas condiciones, la Pol II transcribe entre 20 y 40 nucleótidos y se pausa [20]. Esta pausa, que se conoce como el pausado de la elongación proximal al promotor, se encuentra regulada por factores negativos de la elongación como por ejemplo, el Factor Negativo de la Elongación (NELF) y el Factor Inductor de la Sensibilidad a DRB (DSIF) que impiden que la Pol II continúe transcribiendo. Este paso de pausado es limitante en regulación de la elongación transcripcional *in vivo* y funciona como un punto de control previo al comienzo de la elongación productiva [21-23]. La transición entre la fase de pausado y de elongación productiva de la Pol II es consecuencia del reclutamiento del Factor positivo de la Elongación Transcripcional b (P-TEFb), que se encuentra compuesto por la quinasa dependiente de ciclina 9 (CDK9) y las ciclinas T1, T2 o K, entre otras [24, 25]. P-TEFb fosforila a los complejos negativos de la elongación NELF y DSIF, produciendo su liberación del templado de ADN y fosforila también a los residuos Ser 2 del CTD de la Pol II [25, 26]. Esta fosforilación de la Pol II produce un cambio conformacional que la libera del estado de pausado y le permite entrar en la fase de elongación transcripcional productiva (Figura 2).



**Figura 2: Las etapas transcripcionales asociadas a la Pol II.** La Pol II presenta cambios en el grado de fosforilación del dominio CTD durante las etapas de iniciación, elongación y terminación de la transcripción. Durante la formación del PIC la Pol II se encuentra desfosforilada. Luego, por fosforilación de las Ser 5 del CTD, por el factor general de transcripción TFIID, se inicia la transcripción, pausándose 20-40 nucleótidos río abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS). La etapa de elongación productiva ocurre tras el reclutamiento del factor P-TEFb, que fosforila a las Ser 2 del CTD [12].

## 1.2. La elongación transcripcional

La eficiencia de la elongación productiva está caracterizada por la modulación de los dos parámetros que la determinan: la tasa de elongación y la procesividad.

La tasa de elongación corresponde a la velocidad media con la que la Pol II lleva a cabo el proceso catalítico de polimerización de nucleótidos, medido en número promedio de nucleótidos añadidos por unidad de tiempo (kb/min). La tasa de elongación es un parámetro difícil de determinar en genes endógenos, sin embargo, mediante la utilización de diversas técnicas [27-30] se estimó que la velocidad de la Pol II oscila en el rango de 1.1 and 6 kb/min. Sin embargo, en un estudio reciente, Marcello y colaboradores encontraron que la velocidad de esta enzima puede llegar a valores de 100 kb/min [31].

La procesividad, por su parte, está relacionada con la capacidad de la Pol II de recorrer un molde de ADN en forma continua, sin disociarse del mismo, y se mide como el número promedio de nucleótidos añadidos por evento de iniciación. La procesividad de la Pol II se ve

afectada a lo largo de los genes por pausas y arrestos transcripcionales [24] que afectan su capacidad de translocar río abajo y, en consecuencia, de transcribir los genes enteros favoreciendo su disociación del molde de ADN.

A pesar de que el papel de los factores negativos de la elongación está muy bien caracterizado durante la etapa de transición entre el pausado y la elongación productiva de la Pol II [22, 23, 32], experimentos *in vitro* mostraron que la presencia de NELF/DSIF también conlleva al pausado de la Pol II en distintos puntos a lo largo de los genes. En estos casos, al igual que ocurre en la región de pausado de la Pol II proximal al promotor, el pausado en las regiones internas de los genes sería revertido por la presencia del factor positivo de elongación P-TEFb [21-23, 33, 34]. Otro mecanismo que regula las pausas transcripcionales está asociado con la modificación de la cromatina por factores remodeladores dependientes de ATP y modificadores covalentes de histonas que abren o relajan la estructura de la cromatina e, indirectamente, favorecen el pasaje de la Pol II a lo largo de los genes [35-40].

Mason y Kevin Struhl encontraron en levaduras que una baja tasa de elongación genera la disociación prematura de la Pol II del templado de ADN, reduciendo la procesividad de la misma. Por lo tanto, propusieron que existe una correlación positiva entre el tiempo en que la Pol II está asociada al ADN en un determinado lugar del gen y su tendencia a disociarse del mismo [41]. De esta manera, los parámetros que determinan la eficiencia de la elongación transcripcional están asociados, ya que una reducida tasa de elongación puede traer como consecuencia una reducida procesividad. Sin embargo, estos mismos autores demostraron que ambos parámetros son funcionalmente distintos y, al menos, parcialmente separables *in vivo*. Por ejemplo, demostraron que el complejo nuclear involucrado en la elongación transcripcional THO y el complejo Spt4, que presenta diversos roles durante transcripción y recluta factores de elongación co-transcripcionalmente, son relevantes en el control de la procesividad de la Pol II pero no en la regulación de su tasa de elongación. Estos datos sugerirían que ambos complejos participan en la estabilidad de la Pol

II unida al ADN pero no en su habilidad de translocar río abajo a lo largo del gen. De hecho estos autores no encontraron ningún factor involucrado en la modulación de la velocidad de esta enzima y propusieron que este parámetro sería determinado intrínsecamente por la actividad enzimática de la Pol II.

### 1.3. Procesamiento de los pre-ARNms

El procesamiento de los pre-ARNm incluye los pasos de: *Capping*, Corte y empalme (*Splicing*) y Corte y poliadenilación.

#### *Capping*

El *capping* es un proceso por el cual se produce la adición de un capuchón o caperuza al extremo 5' del pre-ARN mensajero, que los protege de su degradación. Este capuchón es, en realidad, un nucleótido GTP modificado (7 metil-guanosina) [42] que es adicionado al pre-ARN por una enzima específica que se asocia a la CTD de la Pol II durante los pasos tempranos de la transcripción [12].

#### *Splicing y Splicing alternativo*

La transcripción de los pre-ARNm genera transcriptos que contienen tanto regiones exónicas como intrónicas. Las regiones exónicas son aquellas que quedan contenidas en el ARNm maduro, mientras que las intrónicas deben ser removidas mediante el proceso de *splicing*.

La maquinaria de *splicing* reconoce cuatro secuencias básicas que están presentes en los pre-ARNm, se ensambla sobre ellas secuencialmente y así, produce la eliminación de los intrones y la siguiente unión entre exones [43]. Estos cuatro sitios son: el sitio dador de *splicing* (o sitio 5'), el sitio de "ramificación", un trecho rico en pirimidinas y el sitio aceptor de *splicing* (o sitio 3').

Una variante muy común del *splicing* es el *splicing* alternativo, que ocurre cuando sólo algunos exones o regiones exónicas son incluidas en los ARNm maduros. Lo que permite que a partir de un mismo gen, se produzcan más de un transcripto maduro y, en consecuencia, más de una isoforma proteica. Se estima que el 92% de los genes humanos pueden generar isoformas proteicas como producto del *splicing* alternativo [11].

Existen diversos tipos de *splicing* alternativo, dependiendo de cuál es la región que es retenida o eliminada en el ARNm maduro. En algunos casos, existen exones enteros que son incluidos o excluidos del ARNm maduro, en otros casos sólo ciertas regiones exónicas son las que pueden quedar o no representadas en el ARN maduro (Sitio 5' alternativo y Sitio 3' alternativo) y a veces, una región intrónica puede ser retenida.

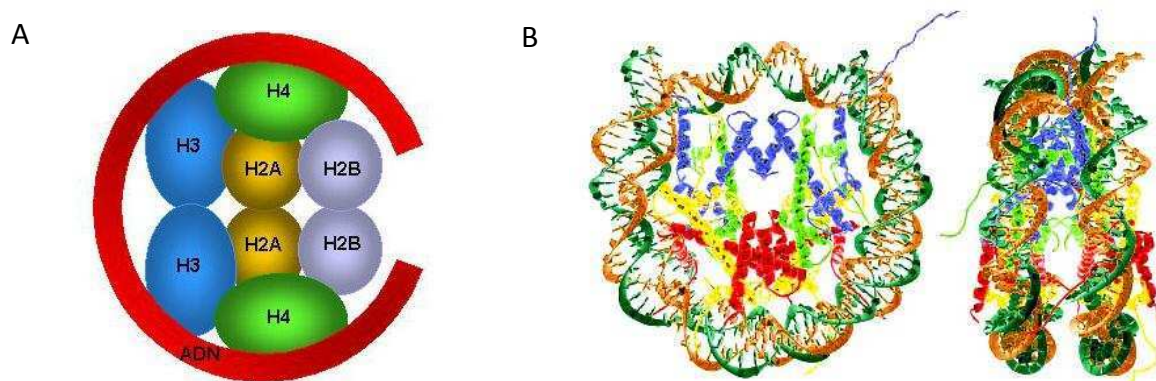
### Corte y poliadenilación

Una vez que la Pol II llega al extremo 3' de los genes, transcribe la señal de corte y poliadenilación lo cual induce el corte del pre-ARNm y la adición secuencial de nucleótidos de adenina a su extremo 3' OH por la enzima Poli A Polimerasa (PAP). Esta "cola de poli A", al igual que la caperuza adicionada al extremo 5' del mensajero, protege al transcripto maduro de su degradación.

## 2. Cromatina y transcripción génica

El ADN no se encuentra desnudo dentro del núcleo sino que forma parte de complejos núcleo-proteicos que constituyen la cromatina. Ésta actúa como una plataforma dinámica de control de los diferentes procesos involucrados en el flujo de la información genética.

La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma que se encuentra constituido por octámeros de proteínas específicas denominadas Histonas. Un nucleosoma “típico” está constituido por dos dímeros de las histonas canónicas H2A-H2B y dos dímeros H3-H4 sobre los cuales se enrollan 147 pares de bases de ADN (Figura 3). Cada histona posee un dominio globular central que participa en la interacción entre las diferentes histonas y de éstas con el ADN. El conjunto de las ocho regiones globulares forma el *core* del nucleosoma por sobre el cual protruyen los dominios amino-terminales de estas proteínas, ricos en amino ácidos básicos. En particular, la histona H2A posee un extremo carboxilo-terminal, de aproximadamente 37 amino ácidos, que también se extiende por fuera del *core* del nucleosoma. Estos extremos protruyentes o “colas” de histonas no contribuyen con la estructura individual del nucleosoma, pero son determinantes en el control de la expresión génica.



**Figura 3: Estructura del nucleosoma.** **A.** En rojo se esquematiza el ADN que se enrolla sobre el *core* del nucleosoma formado por dos histonas H3 (representadas en azul), dos histonas H4 (representadas en verde), por dos histonas H2A (representadas en amarillo) y por dos histonas H2B (representadas en lila). **B.** Representación de un nucleosoma en tres dimensiones. Las histonas se representan en azul, verde, rojo y amarillo y el ADN en verde oscuro y ocre. Se observan los extremos amino-terminales de las histonas que protruyen por fuera del nucleosoma.

## 2.1. Mecanismos de modificación del contexto cromatínico

En las células eucariotas, la estructura de la cromatina juega un papel clave como regulador de la transcripción génica. Hasta el momento, hay descritos tres mecanismos involucrados en su regulación: i) la modificación post-traducciona de las “colas” de las histonas, mediante enzimas modificadoras covalentes de histonas; ii) el reposicionamiento de los nucleosomas o su disociación parcial o total mediado por complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP y iii) la desestabilización de los dímeros H2A-H2B o de los nucleosomas por chaperonas de histonas.

### 2.1.1. Enzimas modificadoras de las histonas

Las modificaciones post-traduccionales de las colas protruyentes de las histonas, descritas hasta el momento, incluyen: la acetilación o metilación en residuos lisinas (Lys, K) y argininas (Arg, R), la fosforilación en serinas (Ser, S) y treoninas (Thr, T) y la biotinilación, ubiquitinación, ribosilación y sumoilación en Lys, entre otras (Figura 4)

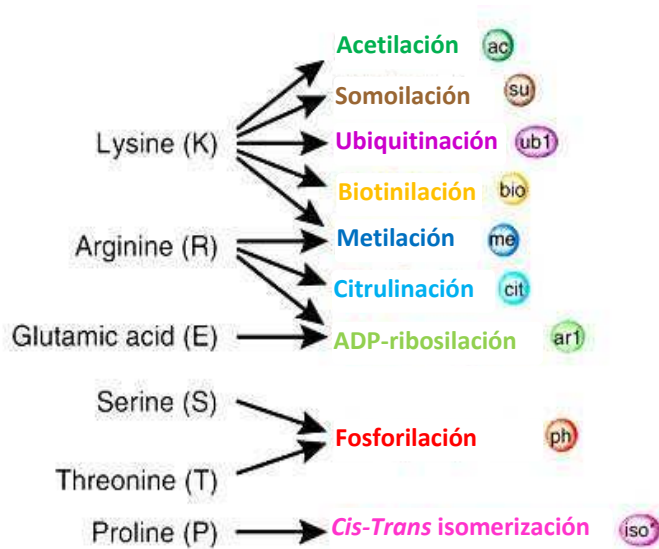


Figura 4: Modificaciones post-traduccionales de los residuos de las histonas [4]



Cada una de estas modificaciones post-traduccionales de las histonas es catalizada por una determinada familia de enzimas, por ejemplo: la acetilación es mediada por las Acetiltransferasas de histonas (HATs), la metilación por metiltransferasas de histonas y la fosforilación por ciertas quinasas. Sin embargo, la especificidad de estas marcas es aún mayor, ya que se requieren enzimas diferentes para la misma modificación post-traduccionales de distintos residuos, por ejemplo, la histona H3 es acetilada en el residuo Lys 14 por la HAT GCN5 y la H4 en su residuo Lys 16 por la HAT MOF pero no a la inversa.

Hace una década se propuso que las combinaciones de modificaciones de histonas podrían generar un “código de histonas”, que sería leído por diversas proteínas encargadas de transformar ese lenguaje químico en variadas funciones biológicas [7, 45, 46]. En este sentido, se describieron numerosos factores y complejos que presentan dominios de reconocimiento específicos involucrados en la “lectura” de ese código, como es el caso de los factores que presentan dominios de reconocimiento de histonas metiladas (cromodominios) como es el caso de la Proteína de Heterocromatina 1 (HP1) que reconoce la H3K9me3 y de los factores que presentan dominios que reconocen y se unen a histonas acetiladas (bromodominios) como es el caso de la ATPasa BRG1 [45, 47].

## Acetilación de histonas

La acetilación de las histonas es regulada por la acción contrapuesta de dos tipos de enzimas: las HATs que producen la acetilación de las histonas y las desacetilasas de histonas (HDACs) que revierten esta modificación. El equilibrio dinámico entre estas dos actividades determina el nivel de acetilación de la cromatina en las regiones génicas y como consecuencia, regula los niveles de la expresión génica.

La acetilación de las histonas genera la disminución de la carga positiva de los aminoácidos básicos de las colas de las histonas, desfavoreciendo su afinidad por la molécula del ADN que se encuentra cargada negativamente. Por lo tanto, como consecuencia de esta modificación post-traduccionales se genera una estructura de la cromatina más relajada o

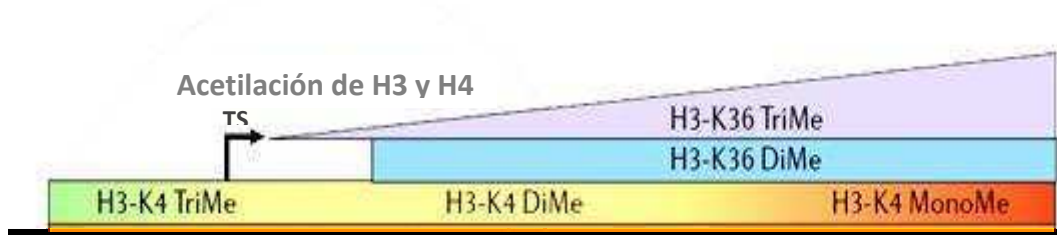
abierta que favorece el acceso de la maquinaria transcripcional a las regiones génicas. A su vez, la acetilación de las histonas también genera una plataforma de unión que favorece el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP que presentan bromodominios [48-50]. Estos remodeladores, ejercen un efecto directo sobre los nucleosomas, produciendo la apertura de la estructura de la cromatina y el consecuente reclutamiento de más HATs [51]. De esta manera, el efecto de los remodeladores de la cromatina, reclutados mediante la acetilación de histonas, genera una retroalimentación positiva sobre el efecto inductor de la transcripción. A su vez, la propia acetilación de las histonas también favorece el reclutamiento de HATs, ya que algunas de estas enzimas, como GCN5 y PCAF, presentan bromodominios de reconocimiento de las colas de las histonas acetiladas [49, 52]. Por lo tanto, la acetilación de las colas de las histonas está generalmente asociada a los cambios que se producen en el estado de la cromatina de genes que se inducen en respuesta a un estímulo.

Las HDACs también son reclutadas a los genes durante la modulación de la expresión génica, formando parte de complejos represores de la transcripción [53] que actúan contrarrestando el efecto de la acetilación y cerrando el contexto cromatínico. Sin embargo, se encontró que muchos genes requieren de un equilibrio dinámico entre acetilación y desacetilación, por lo que la acción de las HDACs puede ser también requerido para la activación transcripcional [54].

## Metilación de histonas

La metilación de las colas de las histonas en sus lisinas o argininas por las enzimas metil transferasas es otra de las marcas mejor caracterizadas hasta el momento. Está ampliamente descrito que las Lisinas de las histonas H3 y H4 puede ser metiladas una, dos o tres veces (mono-, di- o tri-metilación) afectando al proceso transcripcional de distintas maneras. Por ejemplo, la di-metilación en lisina 9 y la tri-metilación de lisina 27 de la H3 (H3K9me2 y H3K27me3) han sido encontradas principalmente asociadas al silenciamiento

transcripcional [55] mientras que genes activos presentan di- y tri-metilación en lisina 4 de histona H3 (H3K4me3) en las regiones promotoras y regiones cercanas junto a la di- y tri-metilación en lisina K36 de histona H3 (H3K36me2 y H3K36me3, respectivamente) presente mayoritariamente en las regiones 3' de los genes [9] (Figura 5).



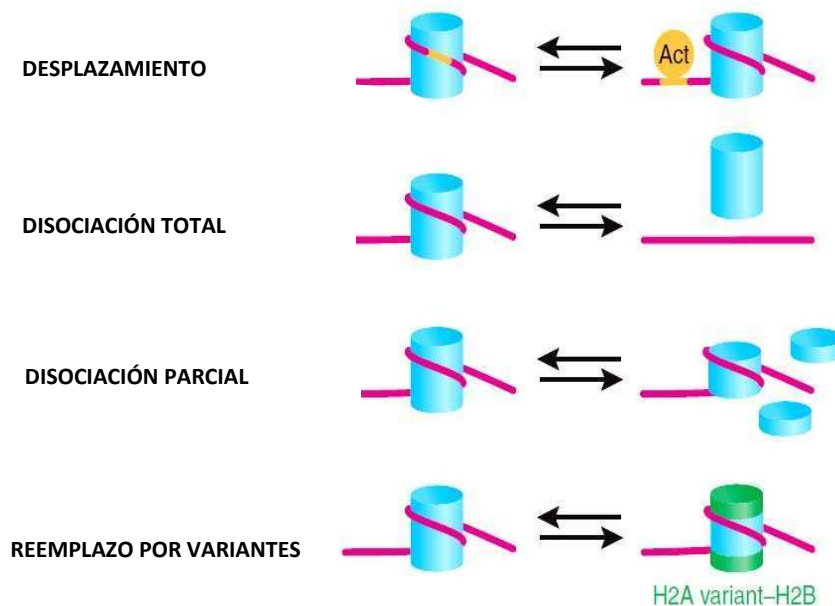
**Figura 5: Patrón típico de las marcas de las histonas en un gen activo.** Las regiones promotoras de los genes activos, presentan generalmente a las histonas H3 y H4 acetiladas y a la H3 metilada en su Lisina 4 (en verde). En la región interna de estos genes, en cambio, la H3 se encuentra di-metilada en su Lisina 4 (en amarillo) y di- y tri-metilada en su lisina 36 (en turquesa y lila, respectivamente), aunque la primera se encuentra representada a lo largo de toda la región intragénica, la trimetilación lo hace en forma creciente en el desde el 5' al 3' del gen [9].

## 2.1.2. Complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP

Los Complejos Remodeladores de la Cromatina dependientes de ATP presentan una subunidad ATPasa conservada, perteneciente a la súper-familia de proteínas SNF2, que es la responsable de utilizar la energía almacenada en las moléculas de ATP en la modificación de la estructura de la cromatina.

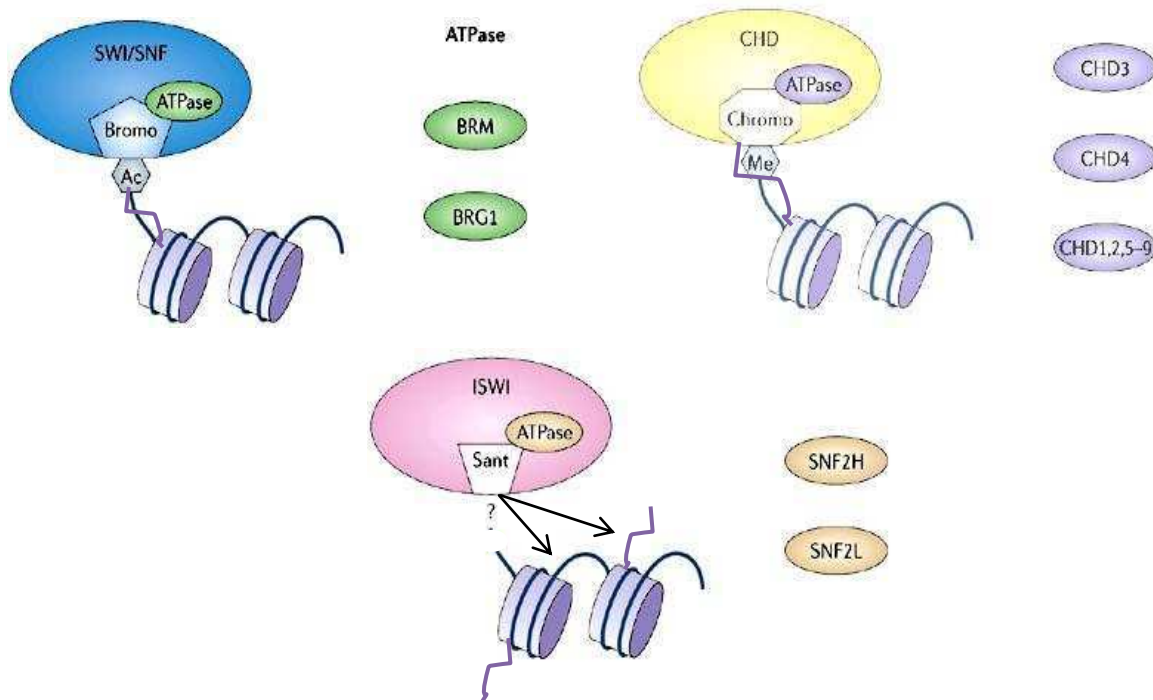
En los organismos eucariotas, existen cinco familias de remodeladores dependientes de ATP descritas hasta el momento: SWI/SNF, Iswi, NURD/Mi-2/CHD, INO80 y Swr1 [56].

Estas familias de complejos remodeladores de la cromatina pueden actuar mediante tres mecanismos de acción diferentes: i) la movilización de los nucleosomas sobre el ADN (desplazamiento); ii) su disociación parcial (de los dímeros H2A-H2B) o total de los nucleosomas del ADN y iii) el cambio en la composición de histonas de los nucleosomas que ocurre, generalmente, durante la replicación celular. Este último caso incluye la reposición de las histonas canónicas (H2A, H2B, H3 y H4) por variantes de histonas que se depositan independientemente de la replicación celular (por ejemplo H2AZ y H3.3) [57, 58] (Figura 6).



**Figura 6: Modos de remodelado de los nucleosomas.** Los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP pueden favorecer la accesibilidad del ADN mediante el desplazamiento o disociación de los nucleosomas enteros, mediante la disociación de los dímeros H2A-H2B o bien por el reemplazo de las histonas canónicas por sus variantes [8].

Las subunidades catalíticas de los complejos remodeladores dependientes de ATP presentan, en sus extremos carboxilo terminales, dominios únicos de reconocimiento de marcas o regiones específicas de las histonas. Por ejemplo, los miembros de la familia de remodeladores SWI/SNF contienen uno o más bromodominios y por lo tanto, se encuentran asociados a contextos cromatínicos en los que las histonas están acetiladas [49, 59]. Por su parte, los remodeladores CDH presentan un cromodominio que reconoce histonas metiladas y los ISWI, un dominio Sant que reconoce las colas de las histonas, independientemente de sus modificaciones y al ADN *linker*, que es el ADN separa a un nucleosoma del siguiente [6] (Figura 7).



**Figura 7: Remodeladores de la cromatina dependientes de ATP.** Las tres familias de remodeladores de la cromatina dependientes de ATP SWI/SNF, CHD y ISWI contienen un único tipo de dominio de reconocimiento de histonas: bromodominio, cromodominio o dominio Sant, respectivamente. A la derecha de cada familia de remodeladores se grafican los dominios ATPasa característicos de cada una de ellas [6]

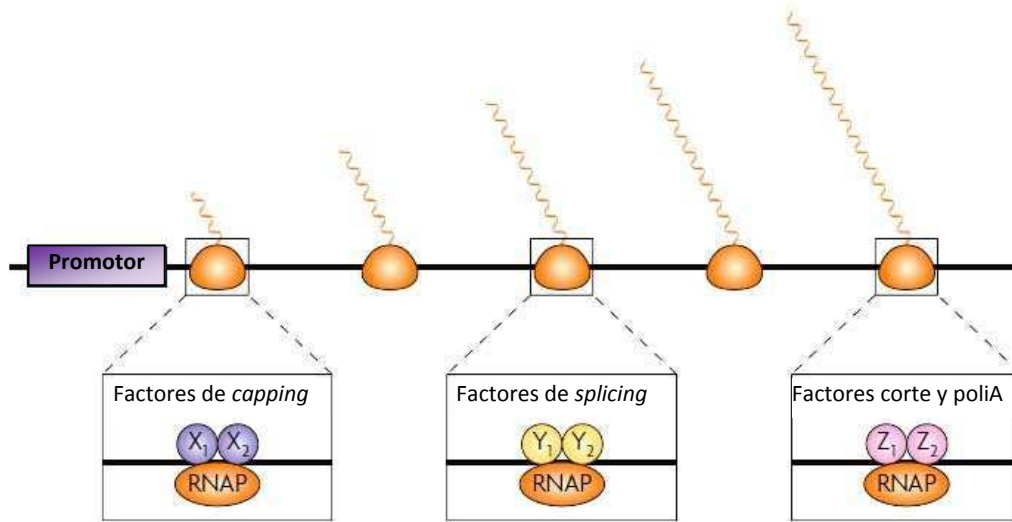
### 2.1.3. Chaperonas de histonas

Las chaperonas de Histonas están involucradas en la dinámica de ensamblaje/desensamblaje de las Histonas, principalmente, asociada a la replicación celular [60]. Sin embargo, numerosas evidencias revelaron que estas chaperonas se encuentran también involucradas en los cambios en el contexto cromatínico asociados a la transcripción [61, 62] mediante la desestabilización de los dímeros H2A-H2B, como consecuencia de la acetilación de las histonas [63, 64] o bien actuando en combinación con los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP [62]. Se sabe también que estas chaperonas pueden desestabilizar los nucleosomas produciendo su disociación del ADN.

## 3. Acoplamiento entre la transcripción, el procesamiento de los pre-ARNm y el contexto cromatínico

Durante muchos años la transcripción y el procesamiento de los pre-ARNm fueron concebidos como procesos independientes que ocurren de manera continuada en el núcleo celular. Sin embargo, numerosas evidencias demostraron que las reacciones de *capping*, *splicing*, *splicing* alternativo y poliadenilación están fuertemente acopladas a la transcripción [65-69]. El papel central en el acoplamiento entre la transcripción y el procesamiento del ARNm lo ocupa el dominio CTD de la Pol II, que actúa como una plataforma de reclutamiento de factores reguladores de ambos procesos. Durante el inicio de la transcripción, la Pol II fosforilada en los residuos Ser 5, recluta a los factores involucrados en la adición de la caperuza de 7' metil guanosina que producen el *capping* del transcrito naciente [7]. Posteriormente, tras la acción del factor P-TEFb, el cambio en el estado de

forforilación de la Pol II genera su disociación de estos factores y la asociación con factores de *splicing* que actúan en forma co-transcripcional [70-73]. Finalmente, en la región de corte y poliadenilación, se producen nuevos cambios en la composición del complejo transcripcional, favoreciendo el reclutamiento de factores involucrados en este proceso (Figura 8).

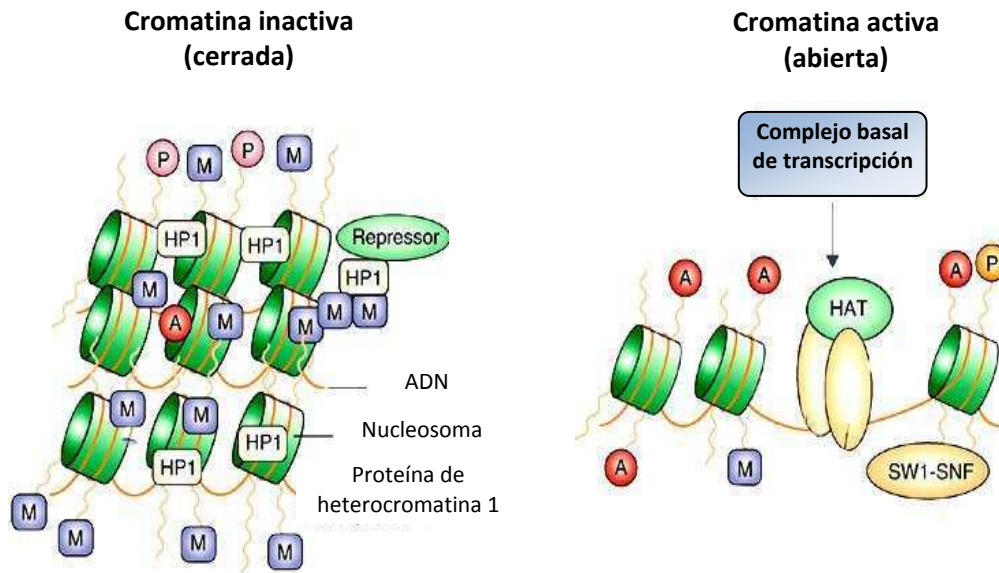


**Figura 8: Acoplamiento entre los pasos del procesamiento del ARN.** Numerosos factores involucrados en el procesamiento del pre-ARN son reclutados co-transcripcionalmente por la Pol II, específicamente, mediante la unión de éstos con el CTD [14].

Sin embargo, como se mencionó previamente, los genes se encuentran inmersos en un determinado contexto cromatínico, el cual participa como un actor más en el acoplamiento en la transcripción génica.

La influencia de la estructura de la cromatina sobre la regulación de los pasos tempranos de la transcripción es, hasta el momento, el efecto mejor caracterizado [56]. Se demostró que, ante un determinado estímulo, la maquinaria modificadora de la cromatina es

reclutada a las regiones promotoras de los genes blanco, en donde favorece el desplazamiento de los nucleosomas, la exposición de ciertas secuencias reguladoras del ADN y genera marcas de histonas asociadas a la activación transcripcional (Figura 9).



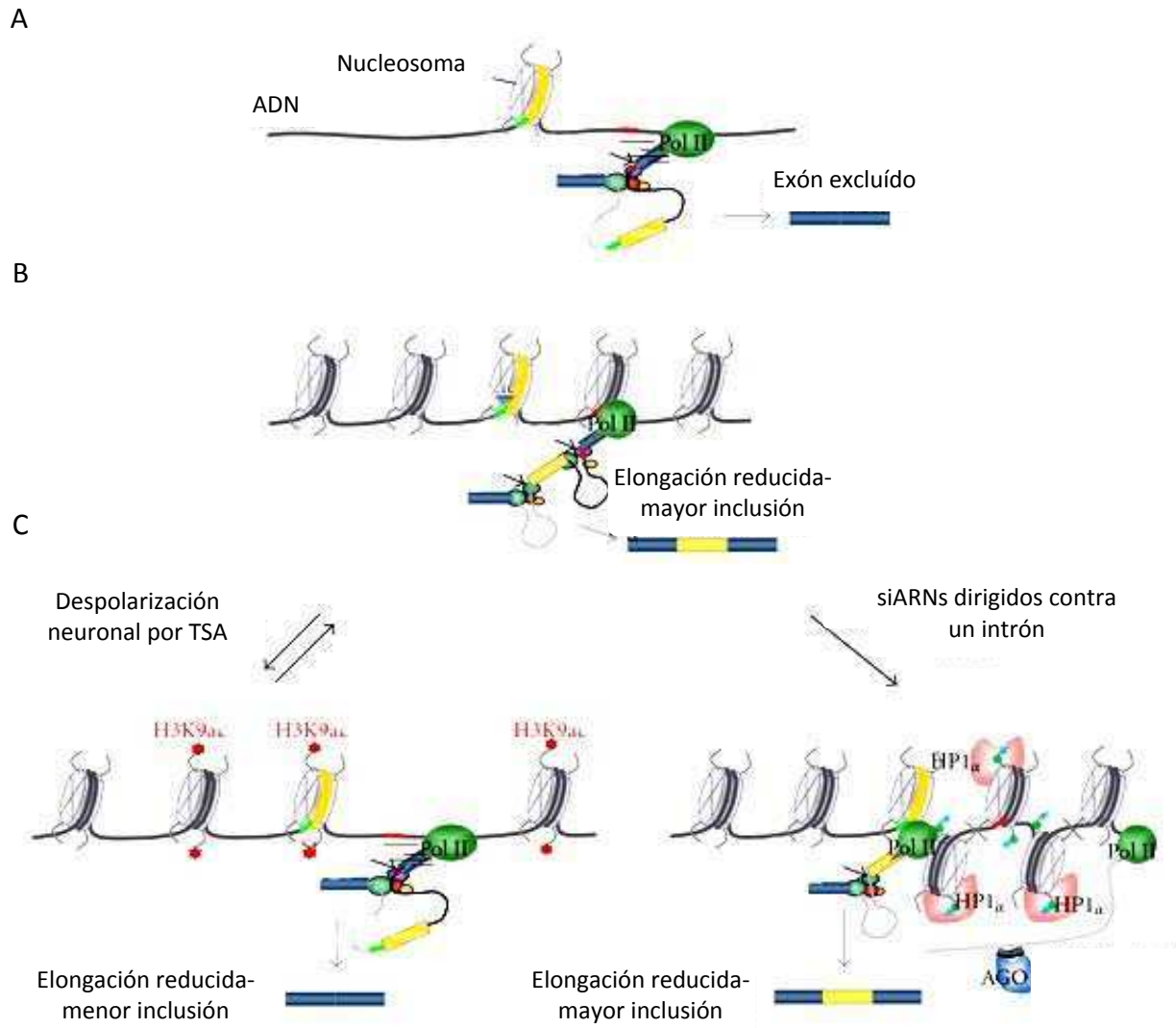
**Figura 9: Los complejos modificadores de la cromatina favoreciendo la formación del PIC.** Cuando la región promotora de un gen se encuentra inmersa en un estado cromatínico “cerrado” las secuencias de reconocimiento para los FGT quedan inaccesibles. Por lo tanto, la apertura de la cromatina por enzimas modificadoras de ésta favorecen la exposición de las secuencias de reconocimiento para los FGT y, así, se favorece la formación del PIC y la iniciación de la transcripción génica [5].

No obstante, existe un creciente número de evidencias que muestran que estas maquinarias también juegan un rol relevante en el control del proceso de elongación de la Pol II en las regiones intragénicas [39, 63, 76-79]. Se demostró que el complejo de acetilación de histonas KAT y las HATs GCN5, PCAF y Nua4 estimulan el pasaje de la Pol II a lo largo de los genes durante la elongación transcripcional, alterando los contactos entre el ADN y las histonas [80-83] y favoreciendo el reclutamiento de otros factores remodeladores de la cromatina [84]. En este sentido se describió tanto *in vitro* [84, 85] como *in vivo* [85] que el



complejo remodelador de la cromatina SWI-SNF y las chaperonas Asf1 y FACT (*facilitates chromatin transcription*) están implicados en el desensamblado de los nucleosomas durante la elongación transcripcional [32, 61, 86].

La estructura de la cromatina también afecta los pasos del procesamiento del pre-ARNm modulando, por ejemplo, el *splicing* alternativo de dos formas distintas: i) mediante el reclutamiento de factores reguladores del *splicing*, como por ejemplo, el del regulador de *splicing* PTB causado por la tri-metilación de la lisina 36 de la histona H3 (modelo de reclutamiento) [74] y ii) mediante la modulación de la tasa de elongación y/o la procesividad de la Pol II, como consecuencia del estado del templado de cromatina, lo cual otorga diferentes ventanas temporales para la exposición de sitios de *splicing*, capaces de competir entre sí, y el reconocimiento de los mismos por el *spliceosoma* (modelo de acoplamiento cinético) [87]. Por ejemplo, se demostró que los cambios en la estructura de la cromatina en el gen *cd44*, causados por el factor remodelador SWI/SNF, regulan el *splicing* alternativo de este gen, de acuerdo al modelo de acoplamiento cinético. En este mismo sentido, recientemente se demostró que la reducción de la tasa de elongación de la Pol II producida por la transfección de ARNs interferentes (siRNAs), dirigidos contra regiones intrónicas del gen *fibronectina* humano, provoca marcas de heterocromatina intragénicas que afectan el *splicing* alternativo de manera opuesta al tratamiento con agentes que promueven la hiperacetilación de las histonas (Figura 10) [88, 89]. Adicionalmente, varios trabajos pusieron en relevancia el papel primordial que ejercen el posicionamiento de nucleosomas y las diferentes marcas de histonas sobre la regulación del *splicing* [74, 90-92]



**Figura 10: Acomplamiento del contexto cromatínico, la elongación de la Pol II y el *splicing* alternativo según el modelo cinético.** A. Una baja densidad de nucleosomas favorece la elongación de la Pol II y por lo tanto, la exclusión del exón alternativo (en amarillo) del gen *fibronectina* humano. B. Una mayor densidad nucleosomal genera un enlentecimiento de la Pol II y, por lo tanto, mayor tiempo para que el exón alternativo sea reconocido por la maquinaria de *splicing* y, así, se produzca la inclusión del mismo en el ARN. C. La despolarización de células neuronales por el tratamiento con TSA dispara la acetilación de las histonas, en regiones intragénicas y la descompactación de la cromatina, favoreciendo la elongación de la Pol II y, como consecuencia, la exclusión del exon alternativo. D. La transfección de siARNs dirigidos contra regiones intrónicas, río abajo de un exon alternativo, promueve la condensación de la cromatina, desfavoreciendo la elongación de la Pol II y, como consecuencia, favoreciendo la inclusión del exon alternativo [13].

Nuevas evidencias en el campo del acomplamiento transcripcional mostraron que ciertos factores de *splicing* también son capaces de favorecer el reclutamiento de factores

generales de la transcripción *in vivo* [93] y la elongación transcripcional [94] y que el proceso de terminación transcripcional favorece la iniciación de la transcripción [95] completándose, así, un ciclo de retroalimentación positiva sobre la inducción de la expresión génica.

## 4. La regulación de la transcripción génica

Los estímulos externos son recibidos por las células mediante la activación de determinadas cascadas de señales que involucran la activación de ciertos factores de transcripción (FT) y como consecuencia, la modulación del patrón de expresión génica.

El mecanismo clásico de acción de los FTs propone que, una vez activados, se unen a secuencias específicas presentes en las regiones promotoras y *enhancers* de sus genes blanco y, desde allí, regulan su expresión génica mediante el reclutamiento de una diversidad de co-factores asociados. En términos generales, los co-factores son enzimas que participan en la reorganización de la cromatina y que forman un puente entre los FTs unidos al ADN y la maquinaria basal de transcripción. Éstos se clasifican, dependiendo de la acción que ejercen sobre el proceso transcripcional como co-activadores o co-represores. Los co-activadores son un grupo de proteínas estructural y funcionalmente muy diversas que estimulan la transcripción génica mediante la apertura de la estructura de la cromatina. Algunas de las actividades enzimáticas que se encontraron asociadas a estos factores son la actividad acetil y metiltransferasa de histonas y la de remodelación de la cromatina dependiente de ATP [96, 97], previamente descrita. Por su parte, los co-represores son proteínas que generalmente poseen actividades opuestas a la de los co-activadores, como el caso de la desacetilación de las histonas, resultando en una compactación de la cromatina, con la consecuente inhibición de la transcripción [96].

La mayoría de los co-factores no son específicos sino que pueden regular la actividad de diversos factores de transcripción [98]. Sin embargo, el nivel de expresión y de actividad de los mismos es altamente dependiente del tipo de tejido y del contexto celular [97], siendo

entonces, elementos fundamentales de la regulación de la expresión génica. En ese sentido, el control espacio-temporal de los niveles de co-moduladores activos forma parte del mecanismo de regulación “fina” de respuesta específica a los FTs.

#### 4.1. Los receptores de esteroides (SRs)

Las hormonas esteroides son compuestos lipofílicos derivados de colesterol que conforman una estructura de cuatro anillos correspondientes al núcleo esteroideo y actúan como mensajeros químicos regulados por el sistema nervioso central. Estas hormonas se dividen en cinco grupos de acuerdo a su función biológica (Figura 11): los glucocorticoides que controlan el metabolismo de energía (hidratos de carbono, proteínas y lípidos), la respuesta al estrés y tienen efectos sobre el sistema inmune, la función cerebral y el sistema cardiovascular; los mineralocorticoides que regulan el balance de agua y electrolitos en el organismo; los progestágenos, cuya principal función es el mantenimiento de la preñez; los andrógenos que determinan las características sexuales masculinas y los estrógenos cuya función es determinar las características sexuales femeninas.

Los receptores de esteroides (SRs) son una familia de FTs regulados por la unión a las hormonas esteroides. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de los Receptores Nucleares (NRs), que incluye también al Receptor de Vitamina C y al PPAR, por ejemplo. En los vertebrados, la familia de los SRs está formada por seis miembros: el Receptor de Progesterona (PR), el Receptor de Estrógenos (ER), el Receptor de Andrógenos (AR), el Receptor de Glucocorticoides (GR) y el Receptor de Mineralocorticoides (MR) [99]. Dependiendo del tipo de receptor, su localización en el estado de equilibrio (en ausencia de ligando) puede llegar a ser mayoritariamente citoplasmática o predominantemente nuclear [100]. En este sentido, mientras que el ER y el PR son preponderantemente nucleares [101, 102] el GR, MR y AR se localizan mayormente en el citoplasma [103, 104].

El mecanismo de activación de los SRs involucra la interacción con el ligando y la disociación de chaperonas que los mantienen en estado inactivo [Bresnick et al., 1989; Scherrer et al., 1990]. Luego, una vez activados y en el núcleo, los complejos ligando-receptor regulan la transcripción de sus genes blanco. Uno de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica mediada por los SRs involucra la unión directa de éstos los elementos de respuesta a hormona (HREs) en el ADN.

Dado que los SRs favorecen, mayoritariamente, cambios en los patrones de expresión génica, sus efectos han sido históricamente denominados como *efectos genómicos* [105]. Sin embargo, hace algún tiempo se encontró que los SRs también son capaces de regular vías de señalización celular, independientemente de la modulación de la expresión génica, efectos a los cuales se los denominó *efectos no genómicos*.

#### 4.1.1. Efectos no genómicos de los SRs

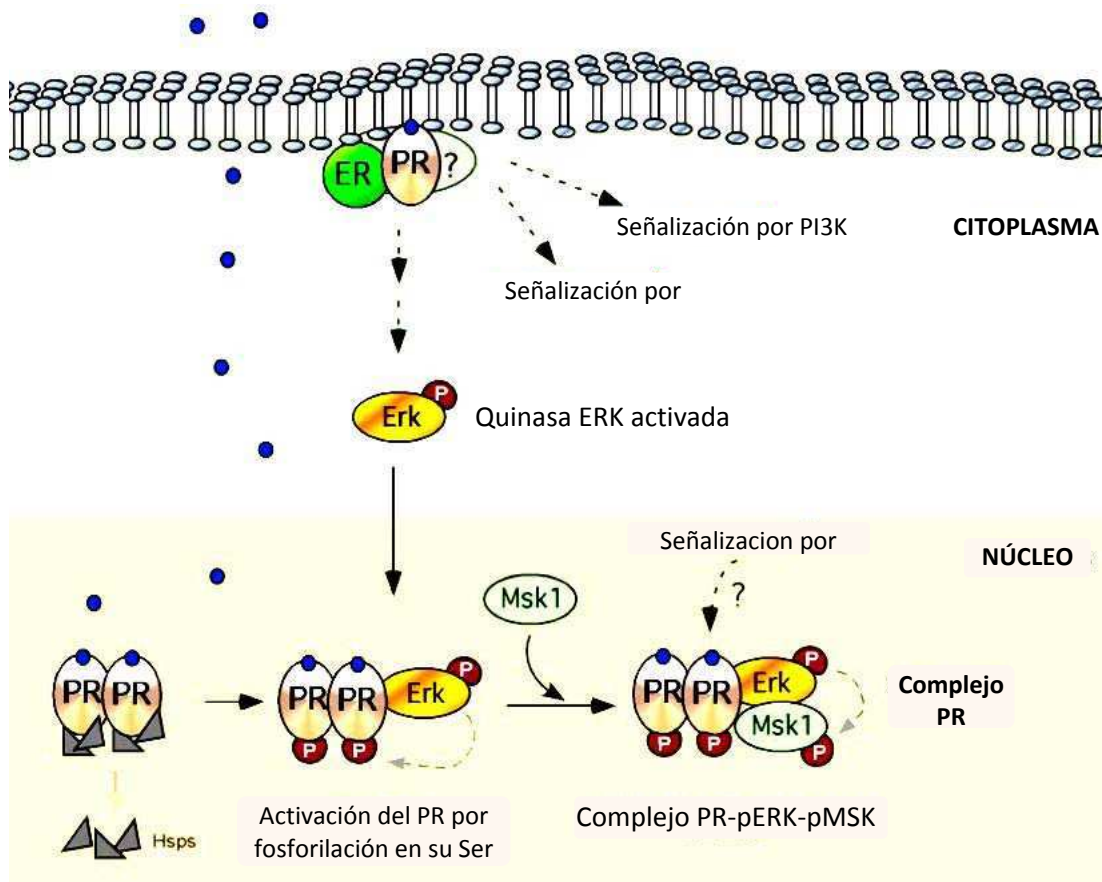
Las hormonas esteroides son capaces de inducir efectos no transcripcionales mediante la interacción directa con proteínas de membrana o incluso a través de su receptor, independientemente de la función de éste como factor de transcripción [106-108]. Por ejemplo, los estrógenos activan las vías de señalización de Src/P21ras/ERK y PI3K/Akt, por interacción directa del ER con Src y con la subunidad reguladora p110 de PI3K, respectivamente [109, 110], siendo la activación de estas quinasas un paso esencial para la inducción de la proliferación dependiente de estrógenos en células tumorales humanas. Los progestágenos también tienen la capacidad de activar estas cascadas de señalización por la interacción del PR con Scr así como a través de la formación de un complejo ternario entre PR, ER y Src [111, 112]. La relevancia de la activación del camino Scr/MAPKs para la función proliferativa de los progestágenos en células epiteliales mamarias, se demostró con la

utilización de un mutante del PR que carece de la capacidad de activar esta vía de señalización [113].

Los SRs también interactúan con otras vías de señalización como son las de: CiclinaA/CKD2, JAK/STAT y la vía activada por el Receptor de EGF. La activación de la vía CiclinaA/CKD2, por ejemplo, potencia la actividad transcripcional del ER [114] y aumenta la expresión de los genes blanco de progestágenos [115-118].

Desde hace varios años se sabe que la activación de quinasas, a través de los *efectos no genómicos*, de los SRs es sumamente relevante en la regulación de los procesos transcripcionales mediados por estos receptores. Por ejemplo, en células tumorales mamarias humanas T47D se demostró que la activación de la quinasa ERK, luego del tratamiento de las células con progestágenos, produce la activación del PR por la fosforilación de su residuo Serina 294 (Figura 11) [119]. El rol de esta fosforilación del PR sobre su acción como FT fue principalmente estudiado durante la inducción del promotor del virus del tumor mamario murino (MMTV), en respuesta al tratamiento con el progestágeno R5020. En este modelo se demostró que la utilización de un inhibidor de la vía de señalización de ERK, que afecta la fosforilación en la Serina 294 del PR, bloquea la activación del promotor del MMTV, aún, cuando el PR es capaz de unirse a los HREs ubicados en esta región. Por lo tanto, se propuso que la inhibición de la inducción transcripcional del MMTV estaría asociada a la unión improductiva del PR a sus sitios blanco de unión, siendo incapaz de inducir la desrepresión de ese promotor [120]. El mecanismo de acción involucrado en este efecto se encontró a partir del descubrimiento de que una vez fosforilado, el PR forma un complejo activo con otras quinasas como son MSK y CDK2, las cuales también son reclutadas a la región promotora del MMTV, produciendo la fosforilación específica de las histonas que es un requisito para el remodelado del contexto cromatínico y la consecuente inducción de la transcripción del gen [120]. Por lo tanto, en vista de estas evidencias que demostraron la

necesidad de los *efectos no genómicos* del PR sobre su capacidad de llevar a cabo sus *efectos genómicos* como FT, esta clasificación está empezando a caer en desuso [10].

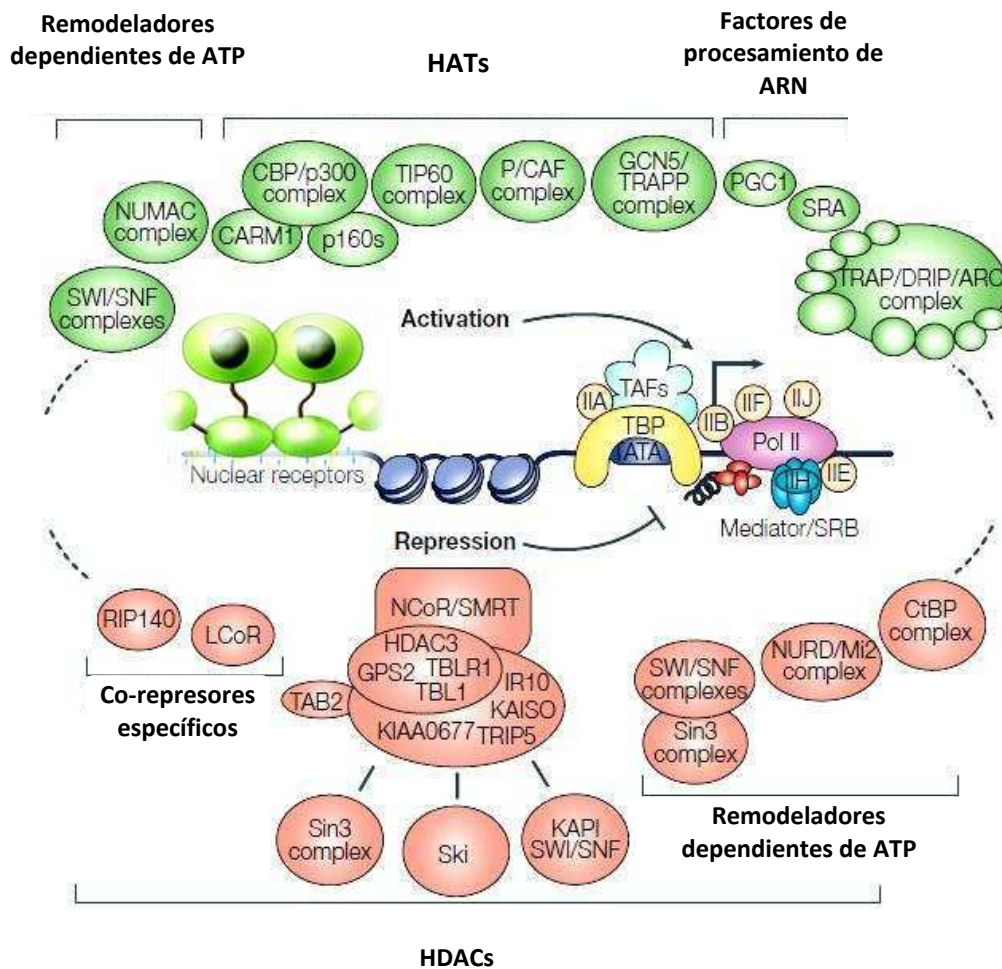


**Figura 11: Mecanismo de acción no genómico de los SRs.** Se describe el PR, como ejemplo. Los progestágenos se unen a sus receptores citoplasmáticos que están anclados a la membrana plasmática y unidos al ER, activan la vía Src/Ras/ERK y, como consecuencia, se produce la acumulación de pERK en el núcleo celular. A su vez, los progestágenos se unen al PR, se produce la disociación de las chaperonas a las que está unido y la fosforilación de una fracción del PR por pERK. pERK, además, fosforila a la quinasa MSK y la activa, formándose el complejo pPR/pERK/pMSK [10].

#### 4.1.2. Efectos genómicos de los SRs

Según el mecanismo clásico de regulación de la expresión génica mediada por los SRs, estos receptores, una vez activados por ligando, homodimerizan y se unen específicamente a los HREs ubicados en las regiones promotoras y *enhancers* de sus genes blanco [121]. La

unión directa de los SRs a los HREs provoca el reclutamiento secuencial de co-factores de la transcripción a estas regiones como son, por ejemplo, las HATs CBP y p300, los co-activadores SRC-1, SCR-2 y SRC-3, los co-represores NCoR y el SMRT [122] y la subunidad BRG-1 del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF [14, 123-125]. Dependiendo de los co-factores reclutados tras la unión de los SRs a los HREs el resultado es la inducción o la represión de la expresión de sus genes blanco (Figura 12).



**Figura 12: Mecanismo clásico de acción genómico de los SRs.** La regulación transcripcional mediada por los SRs requiere la participación de numerosos co-factores con diversas funciones y actividades enzimáticas. Los co-activadores (en verde) incluyen remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, HATs y factores involucrados en el procesamiento del pre-ARNm, que median la interacción con la Pol II. Los co-represores (en rojo) incluyen complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, Histonas deacetilasas y co-represores específicos como por ejemplo LCoR y RIP140.

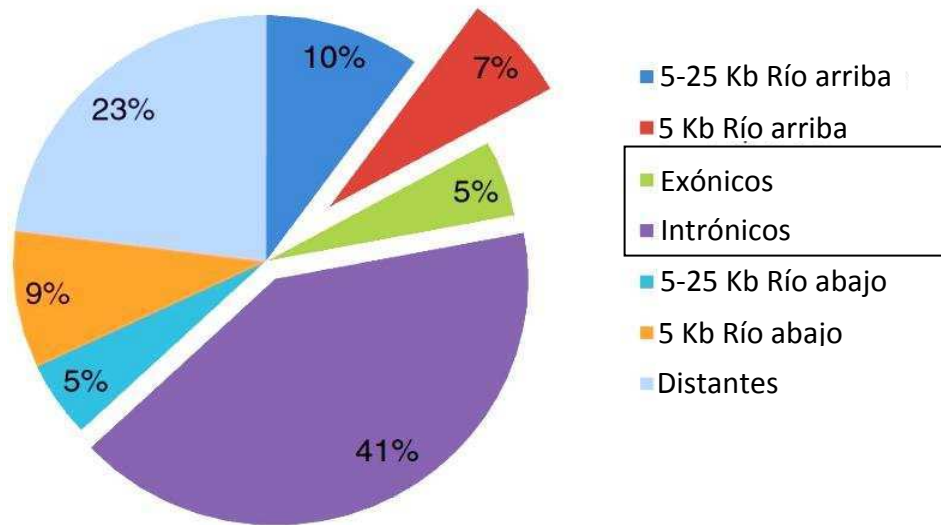


Cuando los SRs inducen la activación de la transcripción de un determinado gen, se produce el reclutamiento de HATs que afectan el contacto entre las histonas y el ADN y el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP que abren el contexto cromatínico en las regiones promotoras y *enhancers* de sus genes blanco. Por lo tanto, se produce la exposición de ciertas secuencias reguladoras del ADN, favoreciéndose la formación del PIC, la iniciación y, así, la inducción transcripcional.

Sin embargo, cada vez más evidencias muestran que esta visión clásica de la regulación transcripcional mediada por los SRs es insuficiente para explicar los cambios en la expresión de numerosos genes blanco de estas hormonas que no presentan HREs en las regiones promotoras y/o *enhancers*. En este sentido, durante la última década, una enorme cantidad de estudios realizados a nivel genómico (*genome wide*) permitieron ampliar, en profundidad, nuestro conocimiento acerca de la verdadera distribución de los sitios de unión de distintos FTs a lo largo del genoma.

### 4.1.3. Distribución de los HREs a lo largo del genoma

El uso de las nuevas tecnologías *genome wide* permitió ampliar enormemente nuestro conocimiento acerca de los mecanismos de acción de los receptores de esteroides y conocer la distribución real de sus sitios de respuesta en el genoma. Sorprendentemente, se observó que sólo una pequeña proporción de los genes directamente regulados por los receptores de esteroides poseen secuencias específicas de unión a sus regiones promotoras o *enhancers* [1, 126-130]. Por ejemplo, Welboren *et al.* encontraron, en células estimuladas con estrógenos, que sólo el 7 % de los sitios de unión al ER se encuentran en la región promotora de sus genes blanco, mientras que alrededor de un 46% de ellos se ubican en regiones intragénicas [1] (Figura 13).



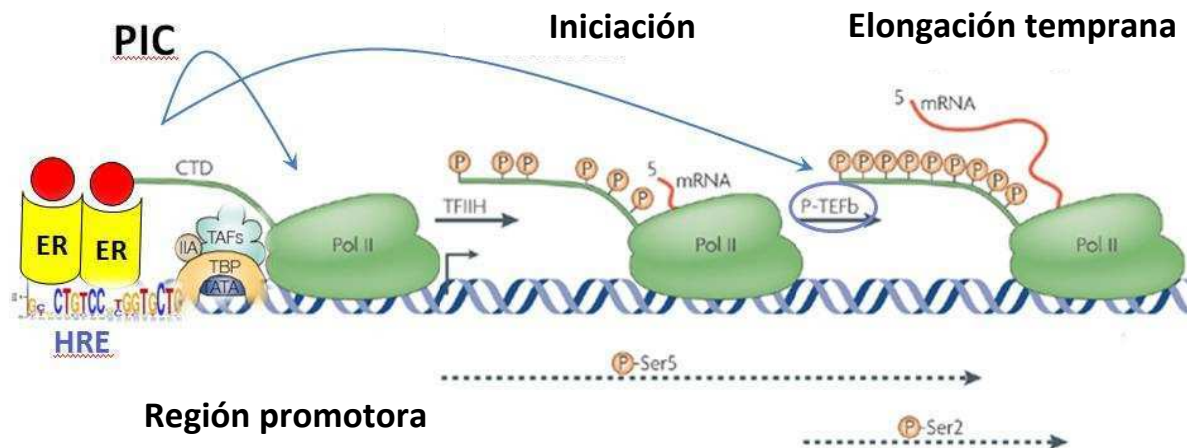
**Figura 13: Distribución genómica de los sitios de unión al ADN del ER.** La mayoría de los sitios de unión del ER an ADN son intragénicos (41% intrónicos y 5% en exónicos) o distantes a regions génicas (23%), mientras que sólo el 7% se encuentra ubicado en regiones promotoras [1]

Resultados similares se obtuvieron analizando otros NRs como son el AR, el GR y el PPAR [1, 128-130]. Estos resultados sugieren que la gran mayoría de los genes blanco de acción de los SRs podrían responder a otros tipos de mecanismos regulatorios, distintos a los clásicos mecanismos genómicos descritos previamente [133]. Por lo tanto, este conjunto de evidencias abrió un nuevo campo de investigación en el tema donde las grandes preguntas son: ¿qué función cumplen estos sitios de unión de los SRs intragénicos? ¿Actúan como *enhancers* tradicionales? ¿Tienen alguna otra función que aún desconocemos? Hasta el momento, se asoció a estos sitios interagénicos con la formación de bucles de cromatina o *loopings* transcripcionales [134] que se producen por la interacción de los SRs unidos a estos sitios distantes y los factores generales de la transcripción unidos a las regiones promotoras [2, 3].

#### 4.1.4. Nuevos mecanismos de acción de los SRs

Nuevas evidencias describen que existen múltiples niveles de acción de los SRs [10]. Hace ya más de una década, Lee y colaboradores sugirieron que el Receptor de Andrógenos, unido a la region promotora del gen del antígeno prostático específico (PSA) interactuaría con los factores TFIIH y P-TEFb y favorecía la elongación transcripcional [135]. Sin embargo, recién hace 4 años se describió el mecanismo mediante el cual los SRs unidos a las regiones promotoras de sus genes blanco son capaces de favorecer la elongación de la Pol II. Estos hallazgos surgieron de un trabajo realizado por Kininis y colaboradores en el que analizaron los cambios en los patrones de expresión génica asociados a la unión del ER a las regiones promotoras de sus genes blanco, luego del tratamiento de las células con estrógenos. Estos autores encontraron que la inducción transcripcional de estos genes, que se encuentran basalmente silenciados, ocurre en un 59% de los casos mediante la activación de la Pol II precargada y pausada (proximal al promotor) más que al reclutamiento de la misma a estas regiones. Este proceso involucra el reclutamiento dependiente de estrógenos de la subunidad quinasa CDK9 del factor positivo de la elongación P-TEFb, la fosforilación en las Ser 2 de la Pol II precargada y fosforilada en sus Ser 5 (Figura 14) y el desplazamiento de los complejos inhibitorios de la elongación NELF y DSIF, favoreciendo la elongación temprana [136].

Estos autores sugirieron que el control de la elongación mediada por los SRs unidos a los promotores de sus genes blanco sería un mecanismo predominante por sobre el clásico mecanismo de acción mediante el cual facilitan el ensamblado del PIC y la iniciación de la transcripción en estas regiones. Estos resultados revelaron un nuevo mecanismo de regulación de la expresión génica dependiente de señales extracelulares que podría ser aplicable a una diversidad de caminos de señalización celular [136].



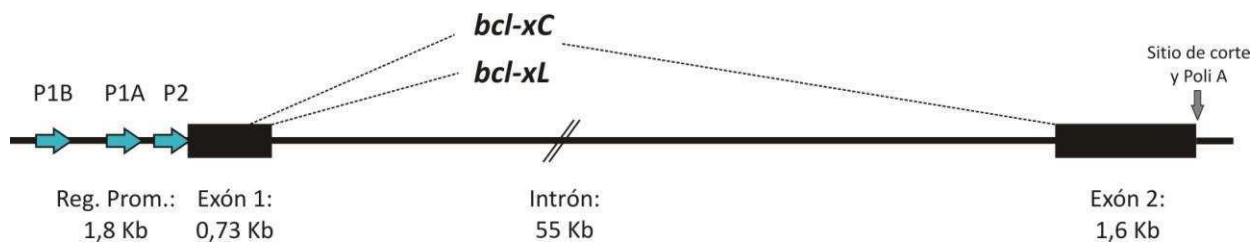
**Figura 14: El ER favorece la elongación temprana.** Una vez unido al ligando, el ER se une como dímero a los HREs ubicados en las regiones promotoras de sus genes blanco. Desde allí, no solo favorece el ensamblado del PIC sino también la elongación temprana de genes que presentan acumulación de la Pol II pausada proximalmente a la región promotora. Este mecanismo involucra el reclutamiento de P-TEFb, el consecuente desplazamiento de factores inhibitorios de la elongación y la fosforilación de la Ser2 del CTD.

## 5. El gen *bcl-x* como modelo de estudio

El gen *bcl2-11*, más conocido como *bcl-x*, pertenece a la familia de proteínas Bcl-2 de la cual, hasta el momento, se han identificado 24 miembros. Algunos miembros tienen funciones pro-apoptóticas y otros anti-apoptóticas, desempeñando un papel central en la regulación de la vía intrínseca de apoptosis. Los miembros pro-apoptóticos favorecen la permeabilidad de la membrana mitocondrial y, así, la liberación del citocromo C y de proteínas mitocondriales pro-apoptóticas que inducen la muerte de las células [137, 138]. Por su parte, los miembros anti-apoptóticos antagonizan este efecto, protegiendo a las células de la muerte.

En humanos, el gen *bcl-x* se encuentra ubicado en el cromosoma 20, está regulado por tres promotores alternativos: el promotor 1B (P1B), el promotor 1A (P1A) y el Promotor 2

(P2) y contiene, únicamente, dos exones (exón 1 y exón 2) separados por un largo intrón de 55 Kb (Figura 15). Este gen codifica para, al menos, dos isoformas de *splicing* alternativo generadas a partir de dos sitios donores de *splicing*: la isoforma larga Bcl-xL que protege a las células de apoptosis y la isoforma corta Bcl-xC que la induce de manera tal que pequeños cambios en la relación entre la expresión de estas isoformas resultan determinantes en el destino celular hacia la vida o la muerte.



**Figura 15: Esquema del gen *bcl-x* humano.** Los tres promotores se esquematizan con flechas celestes (P1B, P1A y P2), incluidos en la región promotora que presenta 1,8 Kb. Los exones se esquematizan con rectángulos negros (exón1: 0.73 Kb y exón2: 1,6 Kb) y el intrón con una línea negra (Intrón: 55 Kb).

Se sabe que el gen *bcl-x* murino está regulado por hormonas esteroideas en distintas líneas celulares. Por ejemplo, en células mamarias normales de ratón, el tratamiento con glucocorticoides tiene un efecto anti-apoptótico, al menos en parte, mediante la inducción de este gen y el cambio en la relación de abundancia de ambas isoformas, a favor de la antiapoptótica [139]. Por su parte, en células tumorales mamarias humanas T47D, los progestágenos tienen un efecto anti-apoptótico en el que la regulación de *bcl-x* juega un papel clave [140]. En esta línea celular, *bcl-x* presenta una alta actividad basal como se detectó mediante un ensayo de secuenciación profunda del ARN (ARN-Seq) de esta línea celular sin tratamiento hormonal, publicado por el laboratorio de Christopher Burge [11].

A partir de los datos obtenidos de un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina seguido de secuenciación profunda (ChIP-Seq) contra el Receptor de Progesterona, también realizado en células T47D tratadas con el progestágeno sintético R5020 (realizado por el grupo del Dr. Miguel Beato, en el Centro de Regulación Genómica de Barcelona, España) se localizaron los sitios de unión del PR en *bcl-x*, todos ellos exclusivamente ubicados en la región intragénica del gen (Ver en resultados).

# Objetivos e hipótesis de trabajo

---

Teniendo en cuenta que:

- Los SRs son capaces inducir cambios en el contexto cromatínico de las regiones promotoras de sus genes blanco mediante el reclutamiento local de complejos modificadores de la estructura de la cromatina.
- Los SRs pueden reclutar al factor de elongación P-TEFb a las regiones promotoras de sus genes blanco y favorecer la elongación temprana.
- Una gran proporción de los sitios de unión de los SRs se encuentran ubicados en regiones intragénicas, desconociéndose aún su función.
- Las mismas HATs y complejos remodeladores de la cromatina dependiente de ATP involucrados en la apertura del contexto cromatínico en las regiones promotoras, favorecen la elongación transcripcional de la Pol II a lo largo de los genes activos.
- Los cambios intragénicos en el contexto cromatínico modulan la elongación transcripcional de la Pol II.

#### OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la relevancia de los sitios de unión del PR, ubicados en regiones intragénicas del gen *bcl-x*, durante la regulación de su expresión en respuesta al tratamiento con progestágenos.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar el efecto del tratamiento con progestágenos sobre la expresión del gen *bcl-x* endógeno en células T47D.
- Caracterizar los sitios de unión del PR internos de este gen.
- Analizar el reclutamiento de maquinaria modificadora de la cromatina a los sitios intragénicos de unión del PR.
- Estudiar los cambios en el contexto cromatínico en estas regiones.
- Estudiar los posibles efectos del reclutamiento del PR a sus sitios intragénicos sobre la elongación de la Pol II.



# Materiales y Métodos

---

# 1. Progestágeno

---

## 1.1. Agonista del PR

El progestágeno comercial R5020 (St Louis, MO, USA) se disolvió en etanol absoluto (Merck, Argentina) para generar la solución madre ( $10^{-2}$  M), que se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

# 2. Cultivo de células

---

## 2.1. Materiales para el cultivo de células

**RPMI 1640** (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

**Tripsina** (Invitrogen Carlsbad, CA, USA)

**Suero fetal bovino (SFB)** (Internegocios S.A., Bs.As., Argentina)

**Insulina** (100 U/ml) Aspártica cedida gentilmente por Novo Nordisk Pharma Argentina S.A.

**Antibiótico-Antimicótico** de (Invitrogen #15240, Carlsbad, CA, USA)

## 2.2. Línea celular

**T47D**: línea celular proveniente de adenocarcinoma humano de epitelio glandular mamario, cultivada en medio RPMI (Invitrogen 42401), suplementado con 10% SFB, 5  $\mu\text{g/ml}$  Insulina y penicilina/streptomycin (1%).

## 2.3. Protocolo de tratamientos de la línea celular

Las células fueron plaqueadas en medio completo y en la densidad necesaria para cada experimento. Luego de 48 hs de crecimiento se aspiró el medio, se las lavó con PBS 1X, se les agregó medio fresco sin SFB y se las dejó, en estas condiciones, durante 14 a 16 horas. El R5020 fue utilizado en la concentración final de  $10^{-8}$  M. En todos los casos, los tratamientos

fueron asignados al azar a cada placa de células, y cada tratamiento se realizó, cada vez, por triplicado (3 réplicas independientes).

## 3. Plásmidos utilizados

---

**pCMV-LacZ:** vector conteniendo el gen de la  $\beta$ -galactosidasa bajo el promotor del citomegalovirus.

**pGL3-Promoter** (Promega): vector conteniendo el gen reportero luciferasa bajo el promotor del SV40. Utilizado para clonar secuencias *enhancer*.

### 3.1. Sub-clonados

Los fragmentos conteniendo cada uno de los sitios de unión del PR a *bcl-x* se obtuvieron de Invitrogen como oligonucleótidos simple cadena desalados, se aparearon y se sub-clonaron en un vector reportero pGL3 para el análisis de secuencias *enhancers*.

#### 3.1.1. HIBRIDIZACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Se disolvieron los oligonucleóticos en solución STE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM) en una concentración de 500nM. Se tomó 1 $\mu$ l de cada oligoligonucleótido a hibridizar (entre 9 y 10  $\mu$ g), se mezclaron y se llevaron a un volumen final de 20 $\mu$ l con 8  $\mu$ l de agua y 10  $\mu$ l de solución STE. La mezcla se desnaturalizó a 95-100°C seguido de enfriamiento en baño a temperatura ambiente. El fragmento de doble cadena resultante (de aproximadamente 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) se fosforiló para permitir la futura ligación con el vector.

### 3.1.2. FOSFORILACIÓN DEL INSERTO

La reacción de fosforilación se realizó según las instrucciones del fabricante (Promega). Los insertos se diluyeron 1:1000. Se tomaron 8  $\mu$ l de la dilución, se les agregó 1  $\mu$ l de la enzima T4 quinasa en la solución correspondiente, dejándose la reacción en un volumen final de 10  $\mu$ l durante 15-18 horas a 37°C.

## 3.2. Preparación del vector

### 3.2.1. APERTURA DEL PLÁSMIDO

3 $\mu$ g de plásmido pGL3 fueron incubados con 1.5  $\mu$ l de las enzimas de restricción SacI y XhoI, en la solución correspondiente en un volumen final de 30  $\mu$ l por 15-18 horas a 37°C .

### 3.2.2. DESFOSFORILACIÓN DEL VECTOR

Para disminuir la religación del vector, se procedió a la hidrólisis de sus extremos fosforilados mediante la adición de 1  $\mu$ l de SAP (fosfatasa alcalina), por 1 hora a 37°C.

### 3.2.3. PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

El plásmido linealizado se purificó mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,8% teñido con Bromuro de Etidio. Luego de la electroforesis se recortó la banda correspondiente al vector lineal, visualizándola en un transiluminador UV. La fracción del gel se colocó en un tubo limpio y se extrajo el plásmido con un kit de extracción (QIAquick PCR Purification Kit de Quiagen), según las instrucciones del fabricante. Se agregaron 3 volúmenes de solución QG por volumen de gel (100 mg = 100  $\mu$ l) y se incubó durante 10 minutos a 50°C, en bloque térmico, agitando cada 2 o 3 minutos, hasta que la agarosa estuvo disuelta. Se agregó 1 volumen de isopropanol, se mezcló y se colocó la mezcla en una columna. Se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad, se lavó con 750  $\mu$ l la solución correspondiente, se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad y se descartó el eluido. Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ l de

agua a 37°C libre de ADNsas y se colectó el eluido en un tubo limpio por centrifugación. Se utilizaron 30-50 ng de plásmido para la reacción de ligación.

### 3.3. Ligación

Se prepararon tubos de reacción en solución de ligación en presencia de ATP, 1 µl de Ligasa, 250 µg de inserto (proveniente de la dilución 1:1000) y 50 µg de vector lineal (en una relación de 5:1 a favor del inserto), llevándose a 10 µl finales con agua libre de ADNsas. La mezcla de reacción se incubó por 4 horas a 14°C.

En paralelo se prepararon un control de religación (vector sin inserto) y un control sin Ligasa.

### 3.4. Análisis de los sub-clonados

#### 3.4.1. PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Bacterias de la especie *Escherichia coli*, cepa DH5α fueron cultivadas en medio LB (10 g/l peptona; 5 g/l Extracto de levadura; 5 g/l NaCl) a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.3. U.A. a 5 ml de ese cultivo se le agregaron 100 ml de LB y se creció hasta una OD de 0.5 U.A. Posteriormente, el cultivo se mantuvo durante 10 minutos a 0°C y se centrifugó por 10 minutos a 3000g a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet bacteriano se resuspendió en 40 ml de solución TFBI (Acetato de potasio 30 mM; KCl 100 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; MnCl<sub>2</sub> 50 mM; Glicerol 15% pH 5.2). Luego, se dejó en hielo por 5 minutos y se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 3000g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 4 ml de TFB II (MOPS 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM; KCl 10 mM; Glicerol 15% pH 6.5). A continuación, las células se dejaron reposar en hielo durante 15 minutos para luego guardarlas a -70°C en alícuotas de 200 µl. Las bacterias se utilizaron a partir de las 48 horas de haber realizado este procedimiento.

### 3.4.2. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Se utilizaron 50 µl de bacterias *Escherichia coli* competentes por producto de ligación. Las bacterias competentes se descongelaron en hielo durante 10 minutos y posteriormente, en condiciones de esterilidad, se adicionaron 5 µl del producto de ligación. Las bacterias se incubaron 30 minutos en hielo y se les dio un *shock* térmico de 60 segundos a 42°C. Luego se incubaron nuevamente 10 minutos en hielo y luego se les agregó 1ml de medio LB sin antibiótico. Las bacterias se incubaron 30 minutos a 37°C en agitación y se centrifugaron por 2 minutos a 3000 rpm. Finalmente las bacterias se plaquearon en placas de agar-LB (LB + 15 g/L de Agar) con ampicilina 100 µg/ml y se incubaron durante 15-18 horas en la estufa, a 37°C.

### 3.4.3. PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS POR MINI-PREP

Se picaron colonias de las placas de de LB-Agar-Ampicilina, se colocaron en 5 ml de medio LB-ampicilina líquido y se incubaron durante 15-18 horas a 37°C en agitación. 1 ml de las bacterias se centrifugó y se resuspendió en 100µl de solución I (TrisHcl 25mM pH8, EDTA 10mM pH8). Las muestras se agitaron por 2 minutos y se incubaron por 5 minutos en hielo, luego se adicionaron 200µl de Solución II (NaOH 0,2M y SDS 1% p/v, preparada en el momento) y se incubaron por 5 minutos en hielo. Posteriormente, se adicionaron 150 µl de solución III a 0 C (Acetato de potasio 3 M; Acético glacial 11.5 %). Se incubaron nuevamente por 5 minutos en hielo, se centrifugaron 15 minutos a 13.000 rpm, se transfirieron los sobrenadantes a tubos limpios y se les agregó 1 µl de RNAsa H. Luego, se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y se purificaron los plásmidos mediante una extracción de Fenol (saturado enTris-HCl pH=8:Cloroformo (1:1), precipitandolos con 2 volúmenes de EtOH 100%. Los pellet se lavaron con EtOH 70% y se resuspendieron en 50 µl de agua libre de ADNsas.

#### 3.4.4. CHEQUEO DE LOS INSERTOS Y SECUENCIACIÓN

Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción SacI y XhoI a fin de corroborar la presencia de los insertos. Posteriormente, aquellos que resultaron positivos se secuenciaron en la empresa Macrogen.

### 3.5. Amplificación de los plásmidos por maxi-preparación

Los minicultivos obtenidos fueron cultivados durante 36-48 horas en 400 ml de Terrific Solución (Peptona 1.33 % p/v; extracto de lavadura 2.675 % p/v; Glicerol 0.4 %;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.26 % p/v;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.39 % p/v) con 100  $\mu\text{g/ml}$  de Ampicilina (Bagó). Se centrifugaron las bacterias 15 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las bacterias fueron resuspendidas en 10 ml de Solución I (Tris-HCl 25 mM; EDTA 10 mM pH 8), se agitaron durante 5 minutos y se les agregó 20 ml de Solución II (NaOH 0.2 M; SDS 1 % p/v). Luego se mezcló por inversión y se dejó a 0°C por 20 minutos. Posteriormente se colocaron 15 ml de Solución III (Acetato de potasio 3 M; Acético glacial 11.5 %), se mezcló por inversión por 5 minutos a 0°C, y se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm a 4°C. Al sobrenadante se le agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló, y dejó 20 min a 20°C. Se centrifugó 1 hora a 5000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 3 ml de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8), se agregó igual volumen de LiCl 5 M (0°C), se mezcló por inversión y centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos en frío. Se colectó el sobrenadante, se le agregó igual volumen de isopropanol, se mezcló y centrifugó 5 min a 10000 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó, el pellet fue resuspendido en 0.5 ml de TE y se agregó 1  $\mu\text{l}$  de ARNsa A 20 mg/ml incubándolo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó igual volumen de polietilenglicol 13 % (PEG) en NaCl 1.6 M, se mezcló y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 400 ml de TE y se dejó resuspender por 15-18 horas a 4°C. Se realizaron extracciones con 1 volumen de fenol saturado en TE (una vez), 1 volumen fenol (saturado en TE):cloroformo

(1:1) (2 veces) y 1 volumen cloroformo (una vez). Se agregó 0.1 volumen de Acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de ETOH 100 %. Se dejó 20 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Por último, se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm, se lavó con 70 % ETOH y se resuspendió el pellet en 200-500  $\mu\text{l}$  de TE. La concentración de ADN obtenida se cuantificó, a partir de una alícuota, con el espectrofotómetro Gene Quant *pro*.

## 4. Transfecciones transientes por lipofección

---

Las células T47D fueron transfectadas en forma transitoria mediante el método de Lipofección (lípidos catiónicos). Se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se plaquearon  $6.10^4$  células en placas de 6 pocillos y se las dejó crecer en medio sin antibiótico, por 14-16 horas. Por un lado cada pocillo se lavó con PBS y se le agregaron 2 ml de RPMI sin SFB y sin antibiótico. Por otro lado, se prepararon dos tubos: en el tubo 1 la Lipofectamina 2000 se resuspendió en medio Optimem. En el tubo 2 se colocó medio optimem junto con 2.5  $\mu\text{g}$  del plasmido correspondiente y 2.5  $\mu\text{g}$  pRSV-LacZ. Luego de 5 minutos se mezclaron en igual proporción los tubos (el tubo 1 en el tubo 2), se esperaron 20 minutos y se agregó la mezcla, gota a gota, en cada pocillo de células a transfectar. Las células se incubaron 6 hs a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera húmeda conteniendo  $\text{CO}_2$  4.5 %. A continuación, se reemplazó el medio por RPMI completo (con 10 % de SFB y antibiótico-antimicótico) y se dejaron en la estufa gaseada por 36 horas. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se les agregó medio sin SFB y se las dejó por 14-16 horas en estas condiciones hasta que fueron tratadas con vehículo o con R5020  $10^{-8}$  M. Luego de los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS y se lisaron con 150  $\mu\text{l}$  de Solución de Lisis (Cell Culture Lysis Reagent E153A, Promega). A continuación los lisados se transfirieron a



tubos Eppendorf limpios, se centrifugaron 15 minutos a 4°C a 13000 rpm y se trasvasaron los sobrenadantes (extractos) a un tubo limpio.

## 5. Determinación de las actividades enzimáticas

---

Los extractos se utilizaron para enzayar las distintas actividades enzimáticas:

### 5.1. Determinación de la actividad de la enzima $\beta$ -Galactosidasa

Esta determinación se realizó mediante un método colorimétrico. A 25  $\mu$ l provenientes de cada muestra, se le agregaron 350  $\mu$ l de Solución Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM; KCl 10 mM;  $\text{MgSO}_4$  1 mM;  $\beta$ -Mercaptoetanol 0.27%). Luego de 5 minutos a temperatura ambiente se le agregaron 75  $\mu$ l de orto-nitro-fenil-galactopiranosido (ONPG 4 mg/ml, Sigma) y se incubaron a 37°C hasta observar la aparición de color amarillo (entre 30 y 120 minutos, aproximadamente). La reacción se detuvo (en todas la muestras al mismo tiempo) con 187.5  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M y se determinó la absorbancia a 415 nm con un espectrofotómetro DU serie 500 (Beckman). Cada muestra se determinó por duplicado y se utilizó, como blanco de reacción, la solución de ensayo.

### 5.2. Determinación de la actividad Luciferasa

Se realizó utilizando el kit Luciferase Assay System (Promega, E1501); entre 20 y 30  $\mu$ l de extracto fueron incubados con igual volumen del Solución de ensayo (*Luciferase assay Solución*, Promega), en oscuridad parcial, y se cuantificó la actividad de luciferasa durante 30-60 segundos, en un luminómetro Glucomax Multi (Detection System) Promega.

## 6. *Knock Downs* mediante ARNs pequeños interferentes

---

Se transfectaron células T47D con lipofectamina 2000 (Invitrogen) en medio Optimem (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Se plaquearon  $6 \cdot 10^4$  células en placas de 6 pocillos y se las dejó crecer en 2 ml de medio sin antibiótico, por 14-16 horas.

Se prepararon dos tubos: en el tubo 1 se agregó el OPTIMEM junto con la Lipofectamina 2000. En el tubo 2 se colocó medio OPTIMEM junto con los si ARNs (50 nM) a transfectar. Luego de 5 minutos se mezclaron en igual proporción los tubos (el tubo 1 en el tubo 2), se esperaron 20 minutos y se agregó la mezcla, gota a gota, en cada pocillo de células a transfectar. Las células se incubaron a una concentración de si ARNs de 50 nM por 48 hs a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo CO<sub>2</sub> 4.5 %. Posteriormente, se aspiró el medio de transfección, se lavaron las células con PBS y se les agregó medio sin SFB y se las dejó por 14-16 horas en estas condiciones hasta que fueron tratadas con vehículo o con R5020  $10^{-8}$  M por el tiempo correspondiente para cada experimento. Luego de los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS y se colectaron las soluciones correspondientes, dependiendo del ensayo a realizar.

## 7. Tratamientos con inhibidores farmacológicos

---

### 7.1. TSA

La tricostatina A (TSA, Sigma) se disolvió en etanol absoluto para preparar una solución madre de 5 mg/ml. La solución fue agregada directamente al medio de cultivo para

alcanzar la concentración final de 165 a 500 nM. A las placas de células control se les agregó un volumen equivalente de etanol absoluto (vehículo).

## 7.2. DRB

El análogo al ATP 5,6-dicloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol DRB (Calbiochem, 287891) se disolvió en DMSO para preparar una solución madre 30 mM. La solución fue agregada directamente al medio de cultivo para alcanzar la concentración final de 50-100 uM. A las placas de células control se les agregó un volumen equivalente de DMSO (vehículo).

## 7.3. Cicloheximida

La Cicloheximida se disolvió en agua para preparar una solución madre de 10 mg/ml. La solución fue agregada directamente al medio de cultivo para alcanzar la concentración final de 10 ug/ml. A las placas de células control se les agregó un volumen equivalente de etanol absoluto (vehículo).

## 7.4. α-amanitina

La α-amanitina (Sigma, A2263) se disolvió en etanol absoluto para preparar una solución madre de 1 mg/ml. La solución fue agregada directamente al medio de cultivo para alcanzar la concentración final (2,5 µg/ml). A las placas de células control se les agregó un volumen equivalente de etanol absoluto (vehículo).

## 7.5. PD98059

El PD98059 (Calbiochem, 513000) se disolvió en DMSO para preparar una solución madre de 20 mM. La solución fue agregada directamente al medio de cultivo para alcanzar la concentración final (5 uM). A las placas de células control se les agregó un volumen equivalente de etanol absoluto (vehículo).

## 8. Extracción del ARN total de los cultivos celulares

---

### 8.1. Trizol

Para obtener el ARN de las células T47D se utilizó el reactivo TRIZOL (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, las células fueron colectadas en 1 ml de Trizol (por pocillo de placa de 6 pocillos). Luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 0.2 ml de cloroformo por ml de trizol utilizado y se mezcló vigorosamente por 15 segundos. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 2-3 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo para luego precipitar el ARN. Esto se logró agregando 0.5 ml de isopropanol por ml de trizol inicial, las muestras se mezclaron y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó por 15 minutos a 12000 rpm y el pellet resultante se lavó con 1 ml de EtOH 75 % y se centrifugó por 5 minutos a 7500 rpm a 4°C. El ARN se resuspendió en 50 µl de agua libre de ARNsas. La concentración de ARN obtenido se determinó mediante la cuantificación de una alícuota de la muestra, en un espectrofotómetro Gene Quant *pro*. Se verificó también que la relación  $OD_{260}/OD_{280}$  comprendiese el rango 1,7 – 2, lo que indica una buena pureza del ARN total obtenido.

En caso de ser necesario se controló la integridad del ARN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa 1% p/v.

### 8.2. Kit RNeasy Plus

Para determinados experimentos fue necesario obtener un ARN total de mejor pureza (libre de ADN genómico). Para ello se utilizó el Kit RNeasy Plus (QUIAGEN) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las células provenientes de cada pocillo de placa de 6 pocillos, se colectaron con 350 µl de Solución de lisis RLT ( $\beta$ -Mercapto Etanol 1%) con ayuda de un

rastrillo. Los lisados se transfirieron a un tubo limpio, se los homogeneizó con jeringa (con aguja 19G) y se los agitó por 1 minuto. Luego, se los transfirió a una columna de *gDNA Eliminator*, que retiene el ADN de la muestra, mientras que permite la elución del ARN. Se centrifugó por 30 segundos a 10000 rpm a temperatura ambiente y se agregó igual volumen de etanol 70%. Luego de mezclar la muestra, se transfirió a una columna RNeasy y se centrifugó por 30 segundos a 10000 rpm a temperatura ambiente, reteniéndose el ARN en la columna. Posteriormente se realizaron lavados con las soluciones de lavado indicadas por el fabricante y se eluyó el ARN con 40 µl de agua libre de ARNsas. La concentración de ARN obtenido se determinó mediante la cuantificación de una alícuota de la muestra, en un espectrofotómetro Gene Quant *pro*. Se verificó también que la relación OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> comprendiese el rango 1,7 – 2, lo que indica una buena pureza del ARN obtenido.

## 9. Reacción de retro-transcripción

---

Para obtener ADNc a partir del ARN obtenido se realizaron ensayos de retro-transcripción (RT). Para esto los ARNs fueron incubados por 5 minutos a 50-55°C y posteriormente se tomaron entre 1 y 1,5 µg de ARN total. Se les agregaron 25 ng/ml de oligonucleótidos al azar (*Random primers*) (Invitrogen), dNTPs 1mM (Invitrogen), transcriptasa reversa MMLV (Promega) 200 U e inhibidor de ARNsas RNasin (Promega, N2511) 40 U, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, se llevó la muestra de ARN a un volumen final de 7 µl con agua destilada libre de ARNsas y los oligonucleótidos al azar. Las muestras se desnaturalizaron por calentamiento a 70°C durante 5 minutos en termocicladora. Luego, para evitar la renaturalización, la muestra se colocó inmediatamente en hielo y se esperó hasta que se enfríe. Finalmente se agregaron 10 µl de la mezcla conteniendo el resto de los reactivos y se llevó a cabo la reacción utilizando el

siguiente programa en termocicladora: 60 minutos a 37°C para que ocurra la retro-transcripción y 5 minutos a 95°C con el fin de inactivar la enzima.

## 10. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

---

Las qPCRs en tiempo real se realizaron en los cicladores Eppendorf Mastercycler Realplex y ADN Engine Opticon (MJ Research). Las muestras de ADNc fueron diluídas (1/5 a 1/200), según el producto a amplificar. Paralelamente a las muestras se prepararon curvas de calibración, obtenidas por ocho diluciones seriadas 1:2 a partir de una dilución 1:4 de una mezcla de todas las muestras a medir. De estas diluciones, se utilizaron 5 µl para la reacción de PCR, a los cuales se les agregó la mezcla de reacción conteniendo MgCl 3, 4 o 5 mM<sub>2</sub> (Invitrogen), dNTPs 0,25 mM (Invitrogen), Taq polimerasa (Invitrogen) 1,25 U y 1 µM de cada oligonucleótido específico para la secuencia a amplificar. A fin de visualizar los productos formados, a cada reacción se le agregaron 0,025 µl de SYBR Green (Roche) en dilución 1/30 en DMSO y agua para llevar a volumen.

En cada PCR se evaluó la curva de *melting* para confirmar la especificidad de la amplificación y, además, los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa.

Para todas las qPCRs se utilizaron programas que comenzaron con: 2 minutos de desnaturalización a 95°C, seguidos por ciclos repetidos según se indican en la tabla I y finalizando con 5 minutos de extensión final de 72°C.

## 10.1. *Primers* y programas utilizados

Gen	Primers	Ciclos	Mg <sup>++</sup> (mM)
<i>bcl-xL</i>	Fw: GGTATTGGTGAGTCGGATCG Rev: TTCCACAAAAGTATCCCAGC	95°C 15" 66°C 20" 72°C 25"	4
<i>bcl-xS</i>	Fw: CAGAGCTTTGAACAGGAT Rev: GGTCATTTCCGACTGAAG	95°C 15" 58°C 20" 72°C 25"	3
<i>bcl-xtot</i>	Fw: CAGGGACAGCATATCAGAGC Rev: TTCCGACTGAAGAGTGAG	95°C 15" 58°C 20" 72°C 25"	4
<i>gapdh</i>	Fw: GAGTCAACGGATTTGGTC Rev: TTGATTTTGGAGGGATCTCG	95°C 15" 58-68°C 20" 72°C 25"	4

**Tabla I: Detalle de los oligonucleótidos utilizados en las distintas qPCR.** Se indican secuencia, temperatura y tiempo de cada ciclo y concentraciones de Mg<sup>++</sup> utilizados.

## 11. Evaluación de la transcripción proximal y distal

Se plaquearon  $3 \cdot 10^4$  células en placas de 6 pocillos y se las dejó crecer en medio RPMI completo por 48 horas. Luego, se lavaron las células con PBS y se les agregaron 2 ml de medio RPMI sin SFB. Luego, se incubaron por 14-16 horas a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo CO<sub>2</sub> 4.5 % hasta que fueron tratadas con vehículo o con R5020  $10^{-8}$  M por distintos tiempos (0, 15, 30 60 minutos).

Finalizados los tratamientos, el ARN se extrajo con el Kit de extracción de ARN Kit RNasy Plus (QUIAGEN), según el protocolo detallado anteriormente (en la sección *Extracción de ARN total de cultivos celulares*, sub-sección *Con Kit*). A partir del ARN proveniente de cada muestra se realizaron los ensayos de RT (detallados en la sección *Ensayo de retro-transcripción*). Se incluyó, para cada muestra, un control sin enzima MMLV, para controlar la posible amplificación de contaminación con ADN genómico.

Los ADNc resultantes fueron luego amplificados por PCR en tiempo real con los *primers* correspondientes a regiones proximal y distal (Tabla II), únicamente presentes en mensajeros inmaduros. El valor del pre-ARNm para cada amplicón fue calculado sustrayendo los valores de los controles sin RT y los resultados se expresaron como relaciones Amplicón Proximal/Amplicón distal (P/D). A su vez, cada uno fue normalizado contra el gen *gapdh* para analizar su tendencia individual.

### 11.1. *Primers* y programas utilizados

Gen		Primers	Ciclos	Mg <sup>++</sup> (mM)
<i>bcl-x</i>	Proximal	Fw: GGAAAGCGTAGACAAGGAGATG Rev: TCACCCAACACAACAGAAAGAG	95°C 20" 63°C 20" 72°C 10"	4
	Distal	Fw: CCACCCTTAGCCCTTTACC Rev: GCATTGTTCCCATAGAGTTCC	95°C 20" 63°C 20" 72°C 10"	4
<i>ern1</i>	Proximal	Fw: GCAACAGGGAGTAAGGAC Rev: CATTTGAGGTTCTGAAGCG	95°C 20" 63°C 20" 72°C 10"	4
	Distal	Fw: CCAATCTCAGGGGACTTTAC Rev: AGGCTTATGTATCCAAGAATCC	95°C 20" 63°C 20" 72°C 10"	4



<i>tgfa</i>	Proximal	Fw: GAGTGGAGAGAAGCGAGTAGTC Rev: CAGGTAAGCAGGTAGGTGTAGG	95°C 20" 63°C 20" 72°C 10"	4
	Distal	Fw: AGTGGCTCTGTGCTTGTGG Rev: CCTTCCTCCCTACCCTCTCC	95°C 20" 63°C 20" 72°C 10"	4
<i>igf1</i>	Proximal	Fw: AGGGCTCTGGGATGGTCTC Rev: TGAGGCGGGACTACACC	95°C 20" 63°C 20" 72°C 10"	4
	Distal	Fw: GCTCCTTCCTCCACTCCTACC Rev: CTGAACCTCTGCTACACCAACC	95°C 20" 63°C 20" 72°C 10"	4
<i>vmp1</i>	Proximal	Fw: ACGGAATCTCACTCTGTCAC Rev: CCGAGGTCAGGAGTTCAAG	95°C 20" 68°C 20" 72°C 10"	4
	Distal	Fw: AGGCTGGAGTGTAGTGGTGTG Rev: GAGGTGGGAGGACTGCTTGAG	95°C 20" 68°C 20" 72°C 10"	4
<i>gapdh</i>		Fw: GAGTCAACGGATTTGGTC Rev: TTGATTTTGGAGGGATCTCG	95°C 15" 62.6°C 20" 72°C 25"	4

**Tabla II: Detalle de los oligonucleótidos utilizados en las distintas qPCR.** Se indican secuencia, temperatura y tiempo de cada ciclo y concentraciones de Mg<sup>++</sup> utilizados.

## 12. Evaluación de la tasa de la elongación transcripcional

---

Para esta determinación se utilizó la técnica de Singh y colaboradores [27]. Se plaquearon  $3 \cdot 10^4$  células en placas de 6 pocillos y se las dejó crecer en medio RPMI completo por 48 horas. Luego, se lavaron las células con PBS, se les agregaron 2 ml de medio RPMI sin SFB y se incubaron por 14-16 horas a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo CO<sub>2</sub> 4.5 %. Posteriormente, se sacó el medio de las placas y se les se les agregaron 2 ml de medio RPMI sin SFB con DRB 100 uM por tres horas. Cumplido este tiempo, se retiró el medio, se lavaron las células con PBS 1 X y se les volvió a adicionar medio RPMI sin SFB tratándolas con con vehículo o con R5020  $10^{-8}$  M por distintos tiempos.

Finalizados los tratamientos se se extrajo el ARN con el Kit de extracción de ARN Kit RNeasy Plus (QUIAGEN) según el protocolo detallado anteriormente (en la sección *Extracción de ARN total de cultivos celulares*, sub-sección *Con Kit*). A partir del ARN proveniente de cada muestra se realizaron los ensayos de RT (en la sección *Ensayo de retro-transcripción*). Se incluyó, para cada muestra, un control sin enzima MMLV para controlar la posible amplificación de contaminación con ADN genómico.

Los ADNc resultantes fueron luego cuantificados por PCR en tiempo real con los *primers* utilizados para el ensayo de evaluación de la transcripción proximal y distal. El valor del pre-ARNm para cada amplicón fue calculado sustrayendo los valores de los controles sin RT y se normalizó contra la expresión basal, previa al tratamiento con DRB.

# 13. Co-inmunoprecipitaciones

---

Se plaquearon  $5 \cdot 10^6$  células en placas de 15 cm y se las dejó crecer en medio RPMI completo por 48 horas. Luego, se lavaron las células con PBS, se les agregaron 15 ml de medio RPMI sin SFB y se incubaron por 14-16 horas a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo 4.5 % CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se trataron con vehículo o con R5020  $10^{-8}$  M por 60 minutos.

Las células se colectaron mediante rastrillado en PBS frío y se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm. El pellet de células se lisó con 200 µl de CytoBufer® (Novagen, cat. No. 71009) [141]; suplementado con inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem, San Diego, CA, USA). Luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente las muestras se centrifugaron nuevamente por 5 minutos a 13000 rpm a 4°C y se colectó el sobrenadante.

Posteriormente, se tomó 1 mg de proteínas totales y se llevó a un volumen de 200 µl con la solución de inmuno precipitación. En un primer paso, se realizó un *pre-clareado* de la muestra con el agregado de 15 µl de una solución de Proteína A/G plus agarosa (Santa Cruz, cat # sc-2003) en solución HEM (relación 2:1 respectivamente) y se mezcló por rotación durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se centrifugó por 3 minutos a 13000 rpm y se colectó el sobrenadante. A continuación, se realizó la inmunoprecipitación con 30 µl de la solución de Proteína A/G plus agarosa en la solución correspondiente y el anticuerpo correspondiente. Al sobrenadante se le agregó solución de siembra para ser luego analizado mediante ensayos de Western Blot. Por otro lado, el inmunoprecipitado (IP) fue lavado con TEGM (HEPES 10 mM pH 7.5; EDTA 1 mM; Molibdato de sodio 20 mM; Glicerol 5%; NaCl 50 mM), agitado y centrifugado por 3 minutos a 13000 rpm. Este procedimiento se repitió 3 veces. Por último, el inmuno precipitado se resuspendió en solución de siembra también sometido a los ensayos de Western blot.

# 14. Ensayos de Western Blot

---

## 14.1. Preparación y cuantificación de las muestras

Los extractos de proteínas totales fueron obtenidos de células T47D plaqueadas en placas de 6 pocillos, utilizando 150 µl de la solución de extracción de proteínas RIPA (Tris HCl 20 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, NaCl 137 mM, Glicerol 10 %, SDS 0,1 % p/v, deoxicolato de sodio 0,5 % p/v y tritón X100 1 %) suplementado con inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem, San Diego, CA, USA). Las muestras se congelaron a -70°C y se descongelaron en hielo, 3 veces consecutivas y luego se centrifugaron 30 minutos a 4°C a 13000 rpm.

Las proteínas presentes en el sobrenadante se cuantificaron por el método de Bradford [142], usando una curva de calibración hecha con concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) que comprenden el rango 0.2-5 µg/µl. El reactivo de Bradford está compuesto por 4 % p/v *Coomasie blue* G-250; 5 % Etanol y 8,5 % ácido fosfórico. A 30-50 µg de proteínas totales o de las muestras inmunoprecipitadas se les agregó solución de desnaturalización (Tris-HCl 40 mM pH 6.8; Glicerol 6 %; azul de bromofenol 0.006 % p/v; SDS 1 % p/v; β-Mercaptoetanol 1 %) y se las incubó 5 minutos a 100 °C, para completar el proceso de desnaturalización proteica.

## 14.2. Electroforesis y transferencia a membrana de PVDF

Las proteínas se concentraron en un gel concentrador (Acrilamida-bisacrilamida 3.9% (proporción 29:1); Tris-HCl 0,25 M pH 6.8; SDS 0.1 % p/v; persulfato de amonio 0.2 %; TEMED 0.075 %) y separaron en un gel separador (Acrilamida-bisacrilamida 6-12 % 29:1 (BioRad catálogo # 161-0156); Tris-HCl 375 mM pH 8.8; SDS 0.2 % p/v; persulfato de amonio 0.2 %; TEMED 0.075 %) por SDS-PAGE en un gel de 6-12 %, según el peso molecular de la

proteína a estudiar, durante 1.5 a 3 horas a voltaje constante de 80-150 Volts en Solución de corrida (Tris-HCl 25 mM pH 8.3; glicina 192 mM; SDS 0.1% p/v). Luego, las muestras se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durante 1.5-3 horas a 300 mA constantes en Solución de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8.3; glicina 192 mM; SDS 0.1 % p/v; Metanol 20 %). Se realizó una tinción de proteínas durante 5 minutos con rojo *Ponceau-S* al 0,1 % en ácido acético 5 % para verificar la eficiencia de la transferencia y facilitar el corte de las membranas para someterlas al revelado con diversos anticuerpos.

### 14.3. Incubación con anticuerpos y revelado

Luego de la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS 0,1 % *Tween* 20 (PBS-T) conteniendo 5 % de leche descremada (Molico o Purísima). Se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos, preparados en PBS-T conteniendo 3 % de leche descremada. Posteriormente, se realizaron: un lavado de 20 minutos y dos lavados de 5 minutos en PBS-T para luego incubar la membrana con el anticuerpo secundario, preparado en PBS-T conteniendo 3 % de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se realizaron nuevamente un lavado de 20 minutos y 2 lavados de 5 minutos con la misma solución. Finalmente, se reveló por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL+Plus System (GE Health Care, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) en el detector FujiFilm ImageReader LAS-1000.

#### 14.3.1. Anticuerpos utilizados:

##### PRIMARIOS

- **Anti-PR:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-7208, H190)
- **Anti-Bcl-x:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, SC S-18)

- **Anti-CPB:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-369, A-22)
- **Anti-GCN5:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-20698, H-75)
- **Anti-bTub:** Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, sc-9104, H235)
- **Anti-CDK9:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-484, C-20)

#### SECUNDARIOS

- **Anti-ratón** acoplado a peroxidasa (SIGMA, cat # A-4416, dilución 1/3000)
- **Anti-conejo** acoplado a peroxidasa (Bio-rad, dilución 1/5000)

## 15. Inmuno Precipitación de la Cromatina (ChIP)

---

Se plaquearon  $5 \cdot 10^6$  células en placas de 150 mm y se las dejó crecer en medio RPMI completo por 48 horas. Luego, se lavaron las células con PBS y se les agregó medio RPMI sin SFB. Luego, se incubaron por 14-16 horas a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo 4.5 % CO<sub>2</sub> hasta que fueron tratadas con vehículo o con R5020  $10^{-8}$  M por distintos tiempos.

### 15.1. *Crosslinking*

Se preparó el medio de *crosslinking* (RPMI sin SFB, 1 % Formaldehído), a partir de una solución de *crosslinking* (Hepes 50 mM pH 8, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, EGTA 0,5 mM, formaldehído 11 %).

Las placas de células fueron retiradas de la estufa, se les quitó el medio de cultivo, se agregó el medio de crosslinking y se sellaron con parafilm. Se incubaron 10 minutos a 37°C y se interrumpió el *crosslinking* por agregado de la Solución *Stop* (Glicina 2 M). Las muestras se incubaron 5 minutos temperatura ambiente, se aspiró el medio de *crosslinking*, se lavó dos veces con PBS frío y se colocaron rápidamente, las placas sobre hielo. A cada placa se le agregaron 2 ml PBS con inhibidores de proteasas (Coktel PIC, Roche). Se colectaron las células y se las pasó a un falcon de 15 ml. Se incubaron por 5 minutos en hielo, se centrifugaron 5 minutos a 5000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante.

## 15.2. Extracción de la cromatina

Se agregaron, a cada pellet celular, 2,5 ml de solución de Lisis I (Pipes 5mM pH 8, KCl 85mM, NP40 0.5%) con inhibidores de proteasas (Coktel PIC, Roche). Se incubaron por 10 minutos en hielo y se centrifugaron 5 min a 5000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 400 µl de solución de Lisis II (SDS 1 % p/v, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,1) y se incubaron en hielo por 10 minutos, antes de sonicar.

## 15.3. Sonicación

Las muestras se sonicaron por 7 minutos (30 segundos encendido y 30 segundos de apagado) a potencia máxima a 4°C, en el sonicador de baño Bioruptor (Diagenode). Posteriormente se dejaron un mínimo de 5 horas en hielo, para favorecer la precipitación del SDS y se centrifugaron por 10 minutos a máxima velocidad en frío. Los sobrenadantes se pasaron a tubos limpios.

## 15.4. Evaluación de la calidad de los fragmentos de cromatina

Se tomaron 30  $\mu$ l de cada sonicado, por duplicado (el resto guardó en hielo a 4°C) y se los llevó a un volumen de 400  $\mu$ l con Solución de Lisis II. Se agregaron 4  $\mu$ l de Proteinasa K (20  $\mu$ g/ $\mu$ l) y se los incubó por 14-18 horas a 65°C en un bloque térmico. Posteriormente se realizó una extracción con igual volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1) (Invitrogen) y se precipitó con el 10% de volumen de AcONa 5,2 pH 3M y 1ml de ETOH durante 30 minutos a -70°C. Luego de una centrifugación de 15 minutos de centrifugación a 12000 rpm a 4°C, se lavó el pellet con EtOH 70 %. El pellet se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua libre de ADNas y se cuantificó en el espectrofotómetro Gene Quant *pro*. Para analizar el tamaño del ADN sonicado se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bromuro de Etidio.

## 15.5. Preclareado de la cromatina

Se tomó el volumen correspondiente a 30  $\mu$ g de cromatina de cada muestra y se las llevó a 1,2 ml con Solución de Inmuno-Precipitación (Solución IP) (del Kit One day ChIP, Diagenode) con inhibidores de proteasas (PIC, Roche), considerando que la cromatina quedara diluída, como mínimo, en 10 vol de Solución IP.

Mientras tanto, se lavaron las bolitas de proteína A-agarosa con solución IP (Proteína A, Diagenode) y se bloquearon con BSA 0,05 % en rotación a 4°C, durante 15 minutos. Luego, las bolitas se distribuyeron en tubos limpios, a los cuales se les agregaron los 1,2 ml de cromatina en solución de IP. La cromatina se preclareó a 4°C en rotación durante 1 hora, se descartaron las bolitas luego de una centrifugación y los sobrenadantes se pasaron a tubos nuevos. Se tomaron 50  $\mu$ l para extraer los INPUTs y 1,1 ml para realizar la IP. A cada tubo de IP se le agregaron 2.5-5  $\mu$ g de anticuerpo específico, siempre utilizando un tubo control de la



IP con IgG control (agregando la misma cantidad de  $\mu\text{g}$  que de anticuerpo específico). Los tubos se incubaron en rotación, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 14-16 horas.

## 15.6. Inmuno-Precipitación (IP)

A las bolitas de proteína A-agarosa previamente bloqueadas se les agregó la cromatina incubada con los anticuerpos. Se incubó en rotación a  $4^{\circ}\text{C}$  por 3 hs. Luego de centrifugar, se realizaron 4 lavados con solución IP y uno con TE.

### 15.6.1. Anticuerpos utilizados:

- **Anti-PR:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-7208, H190)
- **Anti-CPB:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-369, A-22)
- **Anti-GCN5:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-20698, H-75)
- **Anti-H2A:** policlonal de conejo (este anticuerpo es proviene de una colaboracion con el Dr Stefan Dimitrov, Grenoble, France)
- **Anti-H3:** policlonal de conejo (Abcam, ab1791)
- **Anti-H4:** policlonal de conejo (este anticuerpo es proviene de una colaboracion con el Dr Stefan Dimitrov, Grenoble, France)
- **Anti-H4PanAc:** (Upstate, 06-866)
- **Anti-Pol II $\alpha$ :** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-899, N-20)
- **Anti-CDK9:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-484, C-20)
- **Anti-Cyc T1:** policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-10750, H-245)
- **Anti-SWI/SNF:** policlonal de conejo (Bethyl, A301-018A)
- **IgG:** Diagenode, kch-504-250

## 15.7. Elución

A cada tubo se le agregó 500 µl de solución de elución (SDS 1 % p/v, NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M) y se rotaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se centrifugaron y se pasaron los sobrenadantes a tubos limpios.

## 15.8. *Descrosslinking*

Se tomaron los INPUTs y se los llevó a 500 µl con solución de elución. Se agregaron, a todos los tubos (INPUTs y a los IPs), NaCl 20µl 5 M y se los incubó 14-18 horas 65°C. Luego, se agregaron 10 µl de EDTA 500 mM, 20 µl de Tris 1 M pH=6,5 y 3 µl de Proteinasa K 20 mg/ml, se incubaron por 1 hora a 45°C.

## 15.9. Extracción del ADN

Para extraer los ADNs se utilizó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó por el agregado de 1 µl de glucógeno + 0.1 volúmenes de acetato de amonio 5 M y 1 volúmen de EtOH 100 %, durante 30 minutos a -70°C. Se centrifugó a velocidad máxima durante 15 minutos y se lavaron los pellets con EtOH 70%. Luego, las IPs se resuspendieron en 20 µl y los INPUTS en 50 µl de agua libre de ADNasas.

## 15.10. qPCR

Se utilizaron 2 µl de los INPUTs e IPs para realizar las qPCR. Se detallan en la Tabla III los programas y oligonucleótidos utilizados.

### 15.10.1. *Primers* y programas de qPCR utilizados

Gen	Primers	Ciclos	Mg <sup>++</sup> (mM)
Reg 1	Fw: TGCTAGGGACAACAGGTGTATGCC Rev: CGGAAAGATGCTTGAGCCCAGGAG	95°C 10" 58°C 20" 72°C 10"	4
Reg 2	Fw: GCTGGACGCAATGGCTCAC Rev: GGCACAACCTCGGCTTACTG	95°C 10" 58°C 20" 72°C 10"	4
Reg 3	Fw: CTGGTGCTATTTGATGTGCTGCTC Rev: TGCTTGGGTGAGAAAGGATGTAGG	95°C 10" 58°C 20" 72°C 10"	4
Reg 4	Fw: CGCACCACCGCACTCCAG Rev: GGCTCGCACCTCCACACC	95°C 10" 58°C 20" 72°C 10"	4
Reg 5	Fw: ATCCACCACCCTCCAAAGAAAGAC Rev: GGCAGCAGACTCGTTACAGG	95°C 10" 58°C 20" 72°C 10"	4
Promotor 1B	Fw: GGTCCTGATGCCAGTCACTCAAG Rev: GCTTGTTCTGGGAGAGACGGC	95°C 15" 60°C 40" 72°C 20"	4
AB	Fw: CGGTGGCTCGGCGGGTAC Rev: ACAAAGACTGGGTGAGGGTGAGG	95°C 10" 58°C 20" 72°C 10"	4
Promotor 1A	Fw: GGGGTAAACTGGGGTCGCATTG Rev: GGGGTAAACTGGGGTCGCATTG	95°C 15" 58°C 40" 72°C 20"	4
Promotor 2	Fw: CCTGAAGCTCTTTCTCTCCCTTCAG	95°C 15"	4

	Rev: TCTCAGAGCAACCGGGAGCTGGTGGTTG	60°C 40" 72°C 20"	
5' spl	Fw: GGGGTAAACTGGGGTCGCATTG Rev: CAAGGCTCTAGGTGGTCATTCAGG	95°C 15" 60°C 40" 72°C 20"	4
Pico C2	Fw: CATTGAGATTTAGTAACAGACTTCACATGC Rev: AGTGAAAGAACTAAGCCTCAAGAAAGT	95°C 15" 60°C 40" 72°C 20"	4
Pico C1	Fw: TAGGGAGAGAATGTGTGCTCAGAAATG Rev: TAAGAATCATCAGAGCCTGTTGGACA	95°C 15" 60°C 40" 72°C 20"	4
Pico B1	Fw: AATTTAACATGCTGTGAAGTTGAATGC Rev: CAAGTAGGTGCTGTCCCATTTTACCAA	95°C 15" 60°C 40" 72°C 20"	4
3' spl	Fw: CCCACCCACCTACATCACTCTC Rev: CCAGCGGTTGAAGCGTTCC	95°C 15" 60°C 40" 72°C 20"	4
Pico A	Fw: GCCTGAATTTATCCACCTGTACG Rev: CTGTGTCTCCCACTAGAATGTCAGC	95°C 15" 60°C 20" 72°C 25"	4

**Tabla III: Detalle de los oligonucleótidos utilizados en las distintas qPCR.** Se indican secuencia, temperatura y tiempo de cada ciclo y concentraciones de Mg<sup>++</sup> utilizados.

# 16. Análisis estadístico de los datos

---

Los datos se expresaron como como la media  $\pm$  error estándar (ES).

Los análisis estadísticos de los datos se hicieron con el software STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc.). Primero se corroboró que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad y homocedacia usando las pruebas de Lilliefors y Bartlett respectivamente y, posteriormente se realizaron estudios de

- ANOVA de uno o dos factores, seguidas de pruebas *post hoc* de Tukey.
- Test *t-student*.

Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si  $p < 0,05$ . En todos los casos, los tratamientos con letras distintas (a,b,c y d) son significativamente distintos entre sí.

# Resultados

---

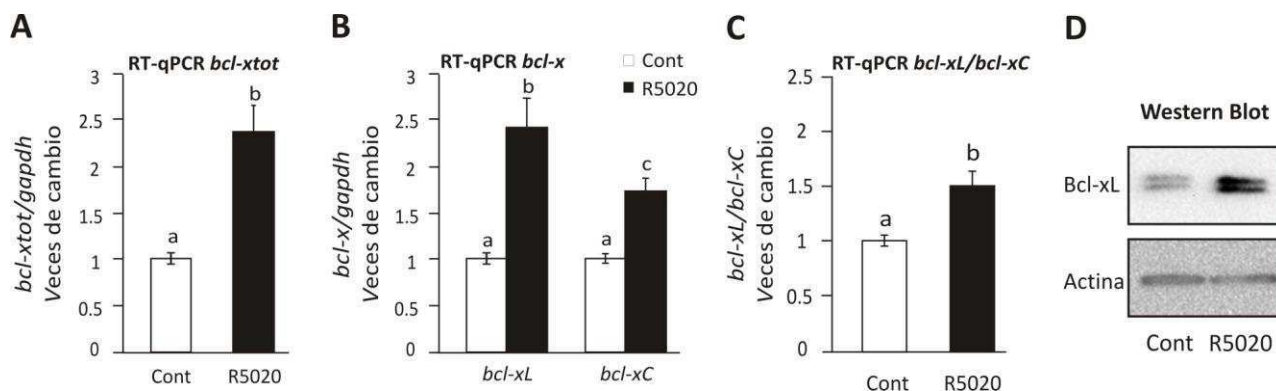
# 1. Caracterización del efecto del R5020 sobre la expresión del gen *bcl-x*

---

## 1.1. Efecto del R5020 sobre la transcripción de *bcl-x* en células T47D.

Estudios previos mostraron que el tratamiento con progestágenos modula la expresión del gen *bcl-x* tanto en células mamarias humanas [140]. Por lo tanto, como primer medida, se evaluó el efecto del progestágeno sintético R5020 sobre la expresión total de este gen en células tumorales mamarias humanas T47D. Para esto las células fueron tratadas por 6 horas con R5020  $10^{-8}$  M o vehículo (EtOH), se extrajo el ARN total y se analizó la expresión del gen *bcl-x* mediante RT-PCR en tiempo real, utilizando *primers* específicos. Los resultados muestran que la expresión total de *bcl-x* aumenta significativamente luego del tratamiento hormonal (Figura 16A).

Dado que los progestágenos tienen un efecto anti-apoptótico en la línea celular utilizada, nos preguntamos si el tratamiento hormonal podría modular no sólo la transcripción total de este gen sino también la expresión y abundancia relativa de sus isoformas de *splicing* alternativo. Para esto se analizó la expresión de ambas isoformas mediante RT-qPCR en las mismas condiciones experimentales. Los resultados muestran que tanto *bcl-xL* como *bcl-xC* son inducidas luego de 6 horas de tratamiento con R5020 (Figura 16B), pero que su relación de abundancias cambia significativamente en favor de la isoforma antiapoptótica (Figura 16C). El aumento de *bcl-xL* es también detectado a nivel proteico, lo cual concuerda con el efecto anti-apoptótico de los progestágenos en la línea celular T47D (Figura 16D) y el rol de *bcl-x* en este efecto [140].



**Figura 16:** El tratamiento con R5020 induce la expresión total de *bcl-x* y cambia la relación de abundancias entre sus isoformas de *splicing*. Se muestran los resultados del análisis de la expresión total (A.) y de las isoformas de *splicing* alternativo (B.) del gen *bcl-x*, mediante RT-qPCR, normalizada contra la expresión del gen *gapdh* en los tratamientos control y con R5020 por 6 horas. El gráfico muestra la media  $\pm$  ES para los niveles de *bcl-x/gapdh* (relativizados al control) de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b o c) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ). C. Se muestran los resultados del análisis de la expresión de las isoformas de *splicing* del gen *bcl-x* graficados como la relación de abundancias entre ambas isoformas (*bcl-xL/bcl-xC*), analizadas por RT-qPCR luego de 6 horas de tratamiento con R5020 o con vehículo. El gráfico muestra la media  $\pm$  ES para los niveles de *bcl-x L/bcl-xC* (relativizados al control) de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a o b) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ). D. Resultado de un Western Blot en el que se reveló la proteína Bcl-xL y  $\beta$ -Tubulina, como control de carga, a partir de células T47D tratadas con R5020 o vehículo por 18 horas.

## 1.2. El efecto del R5020 sobre la transcripción de *bcl-x* es a nivel transcripcional.

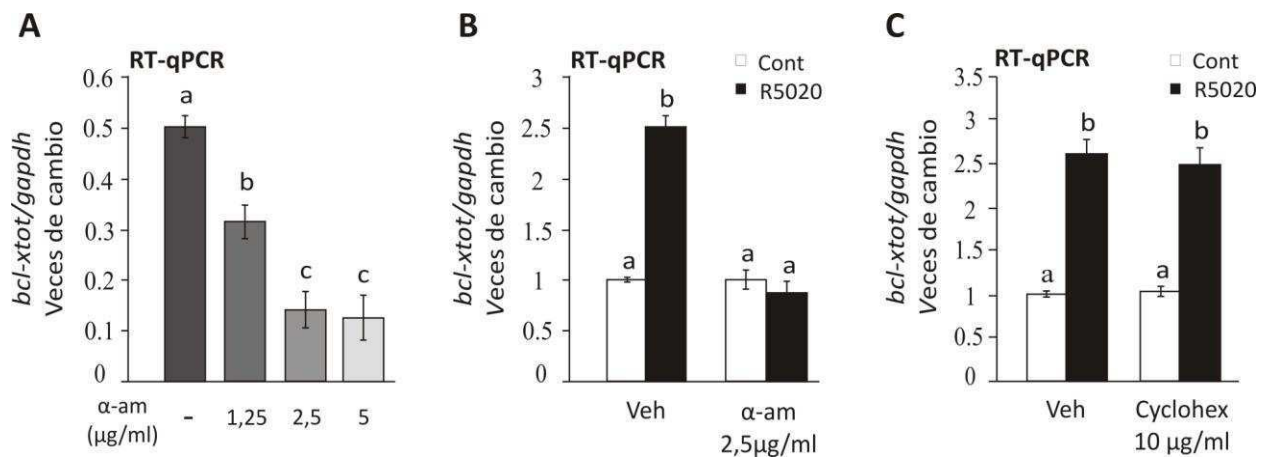
Con el fin de descartar posibles efectos del tratamiento hormonal a nivel de la estabilidad del ARNm, el paso siguiente fue analizar si el efecto inductor de *bcl-x* luego del tratamiento con R5020 se produce a nivel transcripcional. Para ésto las células se pre-trataron con el inhibidor de la transcripción  $\alpha$ -amanitina y luego con R5020 por 6 horas, en presencia del inhibidor. Previamente se eligió la concentración de  $\alpha$ -amanitina a utilizar como la menor concentración que tuviera un mayor efecto sobre la transcripción basal de *bcl-x*



(Figura 17A), resultando ser de 2,5  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados de la Figura 17B muestran que el pre-tratamiento con este inhibidor bloquea completamente la inducción de *bcl-x* causada por el R5020, lo cual descarta un efecto hormonal sobre la estabilidad del ARN mensajero de este gen.

### 1.3. La inducción transcripcional es independiente de la síntesis proteica.

Muchos de los efectos de las hormonas esteroides sobre la transcripción génica son indirectos, o sea que requieren de la regulación de la expresión de ciertos genes que, luego, afectan la expresión de otros. Como la hipótesis de este trabajo se basa en la capacidad del PR de modular directamente la elongación de la Pol II, la siguiente pregunta que nos hicimos fue si la inducción transcripcional de *bcl-x* se debe a un efecto directo del PR o si este efecto es dependiente de la traducción proteica. Para responder a esta pregunta, las células se pre-trataron con el inhibidor de la traducción Cicloheximida y luego con R5020 durante 6 horas. En la Figura 17C podemos ver que el aumento en los niveles de expresión de *bcl-x* por el tratamiento hormonal es independiente de la síntesis proteica, por lo que proponemos que el PR estaría actuando directamente sobre la transcripción de este gen.



**Figura 17: El R5020 produce cambios en la expresión de *bcl-x* en forma transcripcional e independiente de la síntesis proteica.** **A.** Se evaluaron distintas concentraciones de  $\alpha$ -amanitina ( $\alpha$ -am) sobre la expresión total del gen *bcl-x*. por RT-qPCR. **B.** Resultados correspondientes a la expresión de *bcl-xtot* en células control y pre-tratadas con  $\alpha$ -amanitina (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) **C.** Resultados correspondientes a la expresión de *bcl-xtot* en células control y pre-tratadas con Cicloheximida (10  $\mu\text{g/ml}$ ). En **B.** y **C.** los datos se relativizaron al control. En todos los casos se se muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b o c) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ).

## 2. Caracterización de los sitios de unión del PR en *bcl-x*

### 2.1. Sitios de unión del PR en *bcl-x* en células T47D

A partir de los datos obtenidos del ChIP-Seq contra el Receptor de Progesterona en células T47D tratadas con R5020 por 60 minutos, el cual se realizó en el laboratorio del Dr. Beato (CGR, Barcelona, España), se localizaron 12 sitios de unión del PR al gen *bcl-x* que son dependientes del tratamiento hormonal. Llamativamente, todos estos sitios están localizados en las regiones internas de este gen, 11 de ellos en la región intrónica y uno posicionado sobre el final del último exón (exón 2). Estos sitios de unión intragénicos serían los

mediadores de la inducción transcripcional de *bcl-x* en esta línea celular, luego del tratamiento hormonal, ya que el PR no se encontró unido en las regiones promotora ni *enhancer* de este gen (ubicadas hasta los 10 Kb río arriba de la región promotora) (Ballaré, C. *et al.*, manuscrito en revisión).

De todos los sitios encontrados, cinco de ellos presentan un reclutamiento mucho mayor del PR. Los mismos se denominaron según su posición en el gen (en Kilo-bases -Kb-) respecto al promotor 1A (P1A), que es el más utilizado en esta línea celular, como los sitios +2.2, +3.5, +42, +42.1 y +58; los cuatro primeros se encuentran ubicados en el intrón y el sitio +58, que es el que presenta mayor unión del PR luego de 60 minutos de tratamiento hormonal, es el que se encuentra ubicado sobre el final del último exón (Figura 18A).

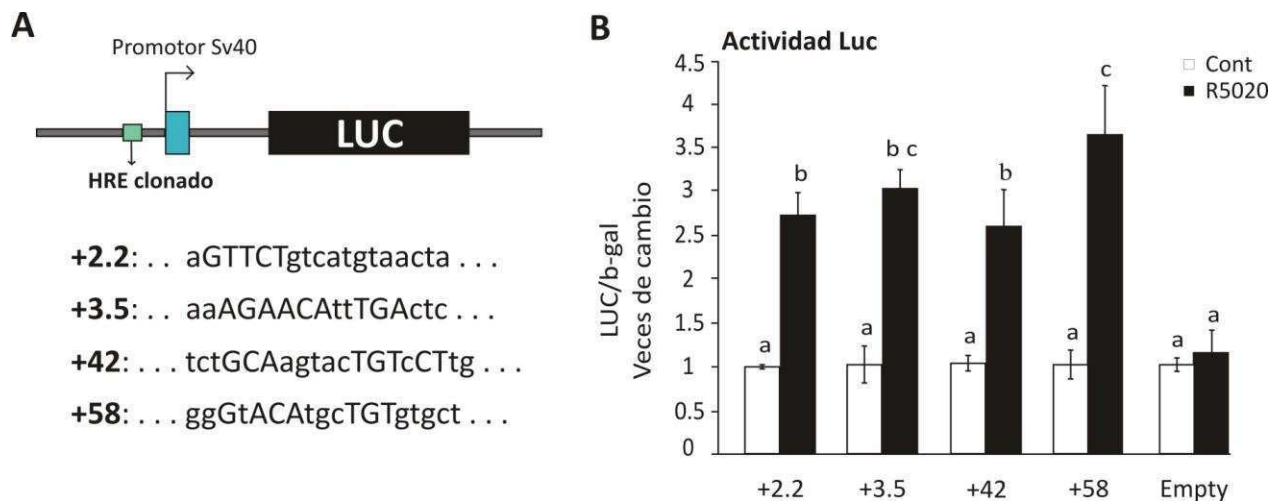
Con el objetivo de confirmar estos resultados, realizamos ChIPs en células T47D tratadas con R5020 por 0 y 60 minutos con el mismo anticuerpo que reconoce específicamente al PR utilizado para el ChIP-Seq. El ADN precipitado se purificó y se analizó mediante PCR cuantitativa en diversas regiones de *bcl-x* que incluyen cuatro de los cinco sitios de mayor unión del PR (+2.2, +3.5, +42 y +58), los distintos promotores y 3500 pb correspondientes a la región *enhancer*, analizada cada 500 pb (Figura 18B). El sitio +42 se tomó como representativo también del sitio +42.1 ya que se encuentran ubicados a menos de 200 pb el uno del otro y por lo tanto, no pueden ser resueltos con la sensibilidad de los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina. Mediante este experimento confirmamos que el PR no presenta unión basal en este gen y que, luego de 60 minutos de tratamiento hormonal, es reclutado diferencialmente a cada uno de los sitios analizados (Figura 18C), presentando mayores niveles de unión cuanto más cerca del 3' del gen se encuentre el sitio. A su vez, corroboramos que el PR no presenta unión a ninguno de los promotores que regulan este gen ni tampoco a la región *enhancer* analizada.



## 2.2. Los sitios intragénicos de unión del PR en *bcl-x* responden al tratamiento hormonal fuera de su contexto endógeno.

Como parte de la caracterización de los sitios de unión intragénicos del PR en *bcl-x*, decidimos analizar la capacidad de estos sitios de responder al tratamiento hormonal fuera de su contexto endógeno. Para esto, cada uno de ellos se clonó en un vector reportero (pGL3 Promoter), río arriba del gen de la Luciferasa (LUC) (Figura 19A). Luego, se realizaron co-transfecciones transientes de estos vectores y un vector de expresión de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa que se utilizó como control de transfección. Las células transfectadas se trataron con vehículo o con R5020 por 36 horas, posteriormente se realizó una extracción proteica con la solución de lisis adecuada y se analizó el grado de activación de la Luciferasa. La actividad de ambas enzimas se midió mediante los ensayos de actividad correspondientes y los niveles de actividad de LUC se normalizaron contra los de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa. Los resultados muestran que todos los sitios de unión del PR analizados son capaces de responder al tratamiento hormonal fuera de su contexto endógeno (Figura 19B), sugiriendo que dichas secuencias podrían ser *bona fide* HREs.

Asimismo, de este experimento también puede observarse que el grado de respuesta al tratamiento con progestágenos detectado, es similar entre los cuatro HREs analizados. Por lo tanto, la afinidad PR-ADN no sería, al menos completamente, la causa de las diferencias observadas por CHIP en los niveles de reclutamiento del PR a los distintos sitios. Estas diferencias podrían deberse a otros factores, por ejemplo, a diferencias en el contexto cromatínico basal presentes en cada uno de ellos.



**Figura 19: Capacidad de respuesta al tratamiento con progestágenos de los sitios de mayor unión del PR en *bcl-x* fuera de su contexto endógeno.** **A.** Esquema representativo de las secuencias clonadas en vectores pGL3 correspondientes a los sitios de unión del PR a *bcl-x* (representadas con un rectángulo verde), río arriba del promotor del Sv40 y del gen LUC. Las letras en mayúscula muestran las bases conservadas respecto al HRE consenso (TGTTCTnnnAGAACA). **B.** Se muestran los resultados del análisis de la actividad de LUC, relativizada a la de  $\beta$ -gal (actividad de LUC/actividad de  $\beta$ -gal: Actividad LUC) en células tratadas con R5020 o vehículo por 36 horas. El gráfico muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b o c) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ).

### 2.3. Activación y cinéticas de reclutamiento del PR

Para que el PR tenga la capacidad de activar la transcripción mediante su mecanismo clásico de acción en las regiones promotoras de sus genes blanco, debe ser previamente activado por la fosforilación en su Ser 294 por las quinasas ERK1/2 [120]. Esta fosforilación es indispensable para que el PR sea capaz de reclutar los co-factores necesarios que produce la apertura del contexto cromatínico en estas regiones. Teniendo en cuenta estos datos, nos preguntamos si la activación del PR por las quinasas ERK1/2 también sería relevante en la inducción transcripcional de *bcl-x* como consecuencia de la unión del PR a sus sitios de unión intragénicos.

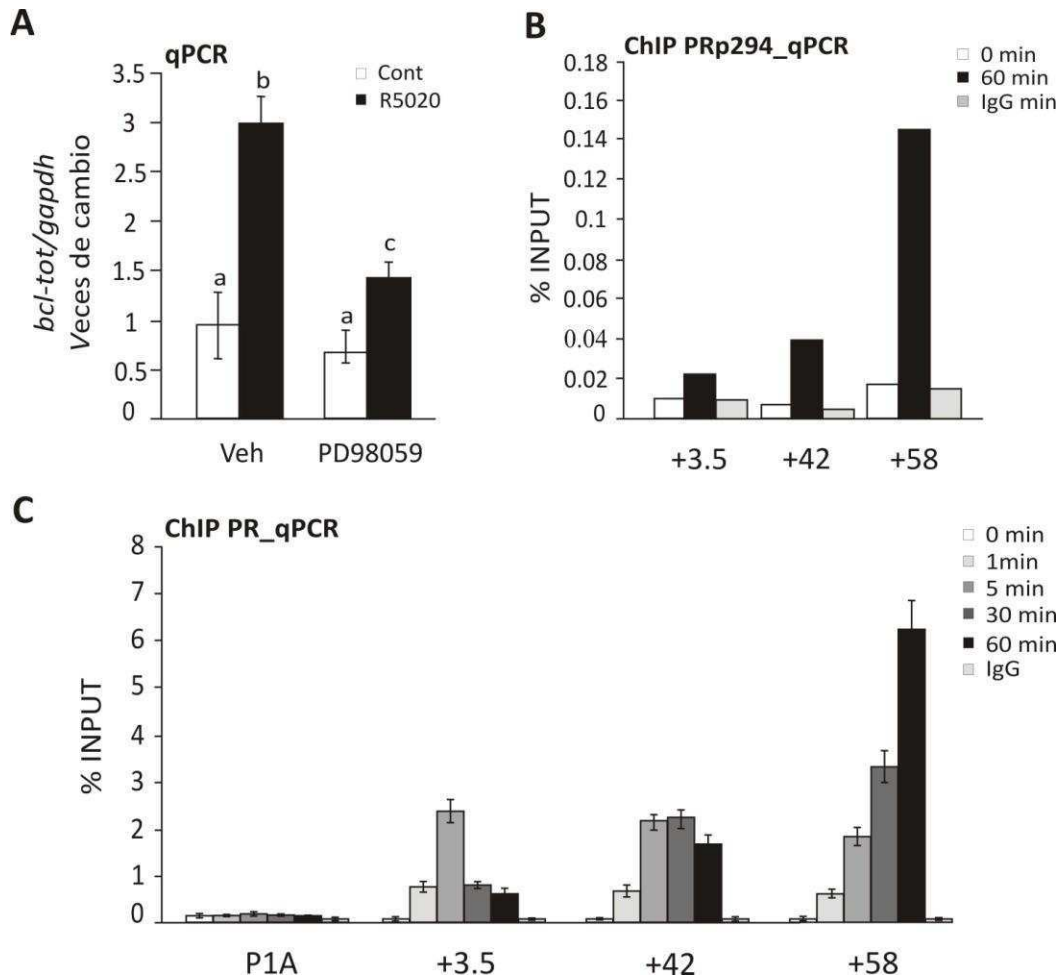
Para contestar esta pregunta, en primer lugar, analizamos el efecto del pre-tratamiento de las células con el inhibidor de la vía de señalización de ERK1/2 PD98059

sobre la expresión de *bcl-x* mediada por el progestágeno. Los resultados indican que la presencia del inhibidor de esta vía de señalización afecta significativamente la inducción de este gen como consecuencia del tratamiento hormonal, sugiriendo que la acción de estas quinasas estaría involucrada en su efecto sobre la transcripción de *bcl-x* (Figura 20A).

Dado que el tratamiento con PD98059 podría tener efectos indirectos sobre la inducción de *bcl-x*, no asociados a la actividad del PR, decidimos analizar si los receptores reclutados a los sitios intragénicos de unión del PR en *bcl-x* estarían activados por la fosforilación en su Ser 294. Para ésto, realizamos ChIPs utilizando un anticuerpo específico que reconoce al PR fosforilado en la Serina 294 y analizamos por qPCR el sitio +3.5, como representativo de los dos sitios más cercanos a las región promotora, el sitio +42 y el +58. A partir de este experimento, encontramos que el PR que se recluta a los sitios internos de unión en *bcl-x* estaría activado, al menos en parte, por esta fosforilación (Figura 20B). Además, el PR fosforilado presenta un patrón similar de unión al PR total, con un mayor reclutamiento cuanto más hacia el 3' del gen se encuentra el sitio. Por lo tanto, el PR unido a estos sitios sería capaz de reclutar maquinaria modificadora de la cromatina, al igual que lo hace en las regiones promotoras.

Dado que los niveles de reclutamiento del PR total y activado a los 60 minutos de tratamiento con R5020 son diferentes entre sus sitios de unión, nos preguntamos si estos también podrían presentar diferentes cinéticas de reclutamiento del PR. Para ésto analizamos por ChIP el reclutamiento de este receptor a los sitios +3.5, +42 y +58 a partir de células tratadas con R5020 por 0, 1, 5, 30 y 60 minutos. Como control negativo, analizamos la región promotora 1A, que no presenta unión de este receptor (Figura 20C). Los resultados de este experimento muestran que, a pesar de que el PR se encuentra unido desde el primer minuto luego de la adición de la hormona en los tres sitios analizados, cada uno de los ellos presenta una cinética de reclutamiento diferencial. El sitio +3.5 presenta un máximo transiente de

unión del PR a los 5 minutos de tratamiento al igual que el del sitio +42, con la diferencia de que este último mantiene sus niveles de PR unido hasta los 30 minutos de tratamiento hormonal, con una leve disminución en sus niveles de unión a los 60 minutos. El sitio +58, en cambio, presenta un aumento constante de la unión del PR, al menos, hasta a los 60 minutos de tratamiento hormonal.



**Figura 20: Activación y cinéticas de reclutamiento del PR en *bcl-x*:** **A.** Se muestran los resultados del análisis de la expresión de *bcl-xtot* normalizada contra la expresión del gen *gapdh* en los tratamientos control y R5020 por 6 horas, en presencia o ausencia del inhibidor de la actividad de ERK (PD 98059 o Veh). El gráfico muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b o c) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ). **B.** Niveles de unión del PR fosforilado en su Serina 294 a los sitios +3.5, +42 y +58 de *bcl-x*, determinados por ChIP en células T47D tratadas con R5020 por 60 minutos. Se muestra un experimento representativo. **C.** Cinéticas de reclutamiento del PR total en el promotor 1A y a los sitios +3.5, +42 y +58 de *bcl-x* obtenidas por ChIP realizados a partir de células tratadas por 0, 1, 5, 30 o 60 minutos con R5020. El gráfico muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes.



Hasta el momento, sabemos que, en células T47D, el gen *bcl-x* se encuentra basalmente activo [11] y que es inducido a nivel transcripcional e independientemente de la síntesis proteica por el tratamiento con R5020. Esta inducción de la expresión génica de *bcl-x* estaría mediada por la unión del PR a los sitios intragénicos presentes en este gen, ya que no se detectó unión del PR a las regiones promotora ni a *enhancers* (localizadas hasta 10 Kb) del mismo. Además, encontramos que el efecto de tratamiento hormonal sobre la expresión de *bcl-x* es dependiente de la actividad de la quinasa ERK y que el PR que es reclutado a estos sitios se encuentra, al menos parcialmente, fosforilado en su Ser 294, por lo cual podría tener efectos sobre el contexto cromatínico similares a los descritos en las regiones promotoras.

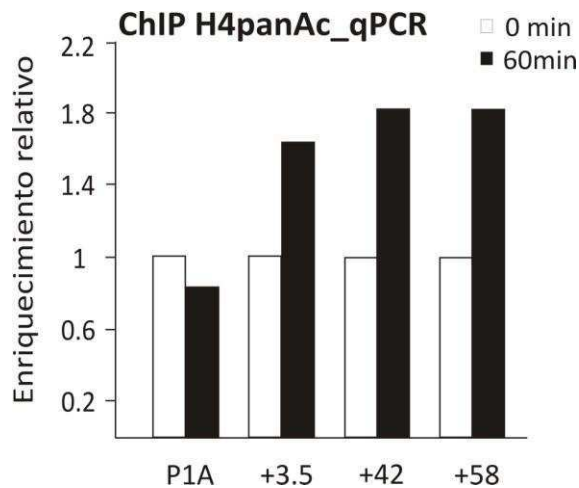
### 3. Participación de las HATs en la inducción de *bcl-x* por el tratamiento hormonal

---

Durante la inducción transcripcional mediada por los SRs, estos receptores producen el reclutamiento de diversas HATs a las regiones promotoras de sus genes blanco. Allí estas enzimas acetilan las histonas, favoreciendo la relajación de la cromatina de dos formas: directamente mediante la modificación del contacto entre el ADN y las histonas e, indirectamente, creando una plataforma de anclaje para los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP. Como consecuencia, se produce el desplazamiento o la disociación parcial o total de los nucleosomas en estas regiones.

### 3.1. Acetilación de histonas

Con el fin de analizar si la acetilación de las histonas podría estar involucrada en el efecto inductor del PR sobre la expresión de *bcl-x* decidimos determinar el grado de acetilación de la histona H4 en los sitios de unión del PR. Para ésto, realizamos ChIPs con un anticuerpo específico que reconoce la multiple acetilación de esta histona y amplificamos por qPCR las regiones correspondientes al promotor 1A y a los sitios +3.5, +42 y +58 (Figura 21). Los resultados indican que luego de 60 minutos de tratamiento con R5020, los niveles de acetilación de esta histona se ven incrementados en los sitios internos de unión del PR en *bcl-x*, pero no en la región promotora analizada.

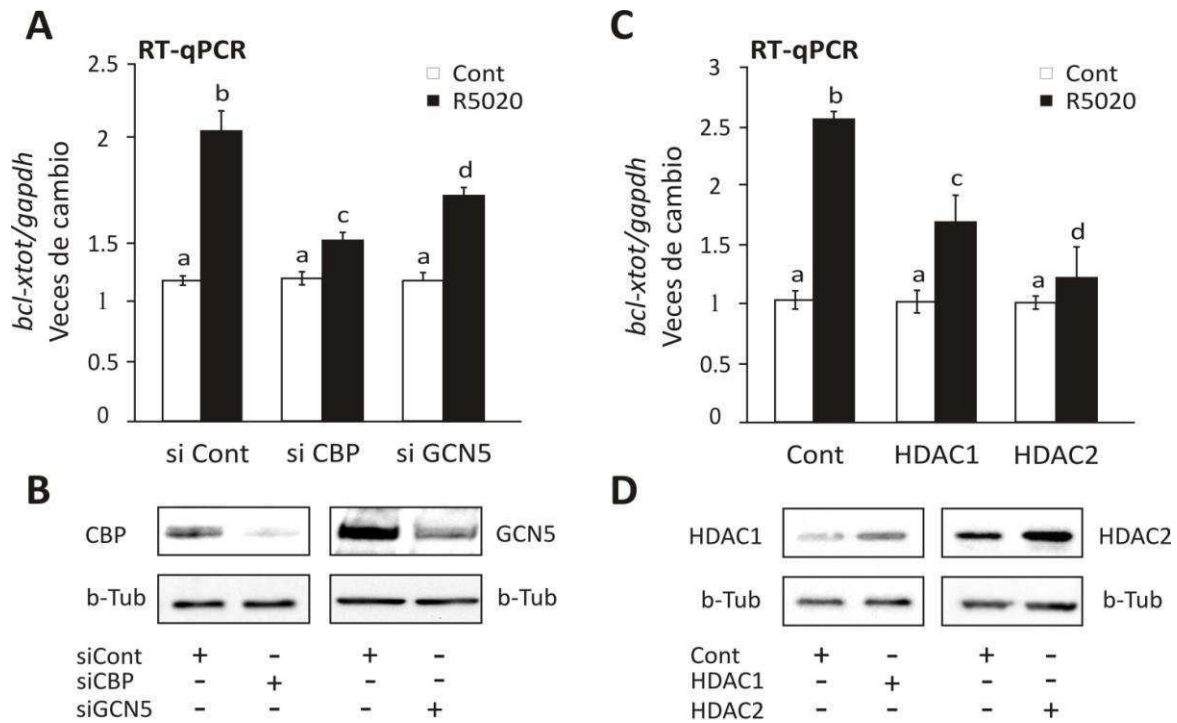


**Figura 21: Grado de acetilación de H4:** Resultado correspondiente a un ChIP realizado contra la pan-acetilación de la histona H4 en células tratadas por 60 minutos con R5020, normalizadas contra el control sin tratamiento. Se muestra un experimento representativo.

### 3.2. Participación de HATs

La acetilación de las histonas que se produce como consecuencia de la unión de los SRs a las regiones promotoras de sus genes blanco es catalizada por HATs como son, por ejemplo, CBP, GCN5 y PCAF. Por lo tanto, decidimos analizar si algunas de esas HATs estarían involucradas en el efecto del PR sobre la transcripción en *bcl-x*. Para abordar esta hipótesis, en primer lugar, realizamos *knock downs* mediante la utilización de siARNs específicos de las HATs CBP y GCN5 y evaluamos su efecto sobre la inducción de la expresión de *bcl-x* por RT-qPCR, luego de 6 horas de tratamiento con R5020 (Figura 22A). Los resultados nos indican que tanto el *knock down* de CBP como el de GCN5 disminuyen significativamente el efecto del R5020 sobre la expresión de *bcl-x*. En este mismo sentido, se encontró que la sobre-expresión de las HDACs: HDAC1 y HDAC2 también perjudica, en forma significativa, la inducción de la expresión de este gen, luego del tratamiento hormonal (Figura 22B).

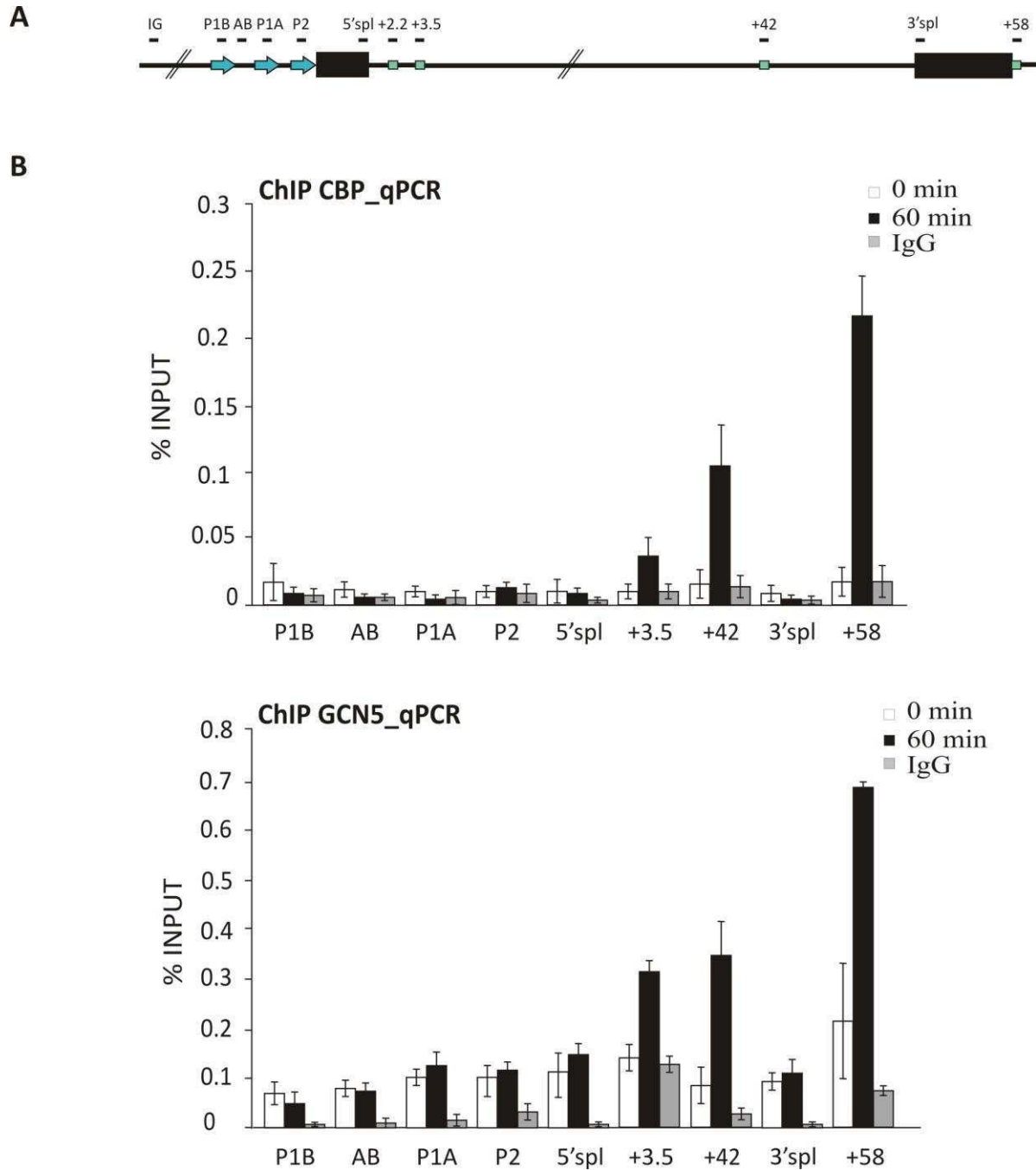
Estos resultados en su conjunto, sugieren que la regulación de la acetilación por HATs y HDACs participaría en el efecto inductor del PR sobre *bcl-x* siendo CBP y GCN5 necesarias para este efecto. Sin embargo, no podemos descartar que otras HATs esten involucradas en la activación de *bcl-x* en esta línea celular.



**Figura 22: Efecto de HATs y HDACs sobre la inducción transcripcional de *bcl-x* por el R5020.** **A.** Efecto de los siARNs específicos de GCN5 y CBP sobre la inducción de la expresión del gen *bcl-x* luego de 6 horas de tratamiento hormonal medido por RT-qPCR. Se utilizó como control un siARN inespecífico (siCont). El gráfico muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b, c o d) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ). **B.** Resultado de los Western Blots que muestran la disminución de GCN5 y CBP causada por el tratamiento con los siARNs específicos respecto al control. **C.** Efecto de la sobreexpresión de HDAC1 y HDAC2 sobre la inducción de la expresión del gen *bcl-x* luego de 6 horas de tratamiento hormonal medido por RT-qPCR. Se utilizó como control el plásmido vacío (Cont). El gráfico muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b, c o d) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ). **D.** Resultado de los Western Blots que muestran el aumento de HDAC1 y HDAC2 respecto al caso control.

### 3.3. Reclutamiento de HATs

El efecto inhibitorio del *knock down* de CBP y GCN5 sobre la inducción del gen *bcl-x*, que ocurre luego del tratamiento con R5020, podría deberse a un efecto indirecto de la disminución de la abundancia de estas proteínas en las células. Por lo tanto, teniendo en cuenta esta posibilidad y la hipótesis principal del trabajo, en la que proponemos que el PR podría reclutar maquinaria modificadora de la cromatina a sus sitios internos de unión, continuamos analizando si las HATs CBP y GCN5 podrían ser reclutadas a *bcl-x*, luego de la adición del R5020. Con este objetivo, realizamos ChIPs con anticuerpos específicos contra estas HATs seguidos de PCRs cuantitativas en distintas regiones del gen (ver esquema en la Figura 23A). Los resultados muestran que luego de 60 minutos de tratamiento hormonal, tanto CBP como GCN5 son reclutadas al gen *bcl-x* únicamente a los HREs intragénicos de unión del PR (Figura 23B). Además, se encontró que GCN5 se encuentra unida basalmente a lo largo de este gen, no siendo el caso de CBP. Es importante notar que ambas HATs se reclutan a los sitios internos analizados con un patrón de unión similar al encontrado previamente para el PR (Figura 18C).



**Figura 23: CBP y GCN5 son reclutadas al gen *bcl-x* a los sitios de unión del PR.** A. Esquema del gen *bcl-x* donde se marcan las regiones amplificadas por qPCR. B. Resultado de los ChIPs realizados con anticuerpos específicos contra las HATs CBP (Panel superior) y GCN5 (Panel inferior). Los gráficos muestran la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes.

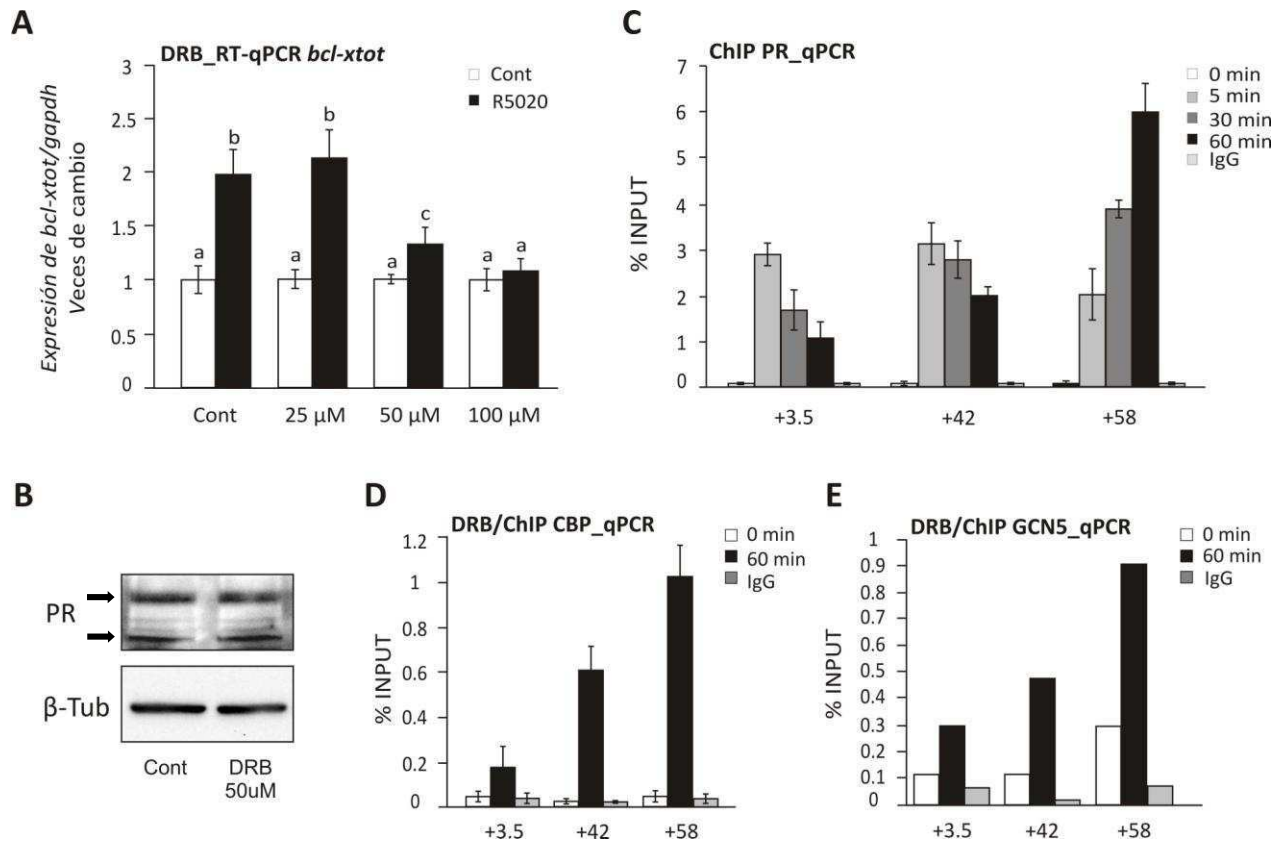
Dado que la Pol II interacciona físicamente con las HATs [35] nos preguntamos si el reclutamiento de CBP y GCN5 a los HREs de *bcl-x* estaría asociado al reclutamiento del PR o bien si podría ser consecuencia de una mayor abundancia de la Pol II en esas regiones asociada al aumento transcripcional de este gen, post-tratamiento hormonal. Para contestar esta pregunta se planeó la realización de los ChIPs de CBP y GCN5 en células pre-tratadas con un inhibidor de la elongación. El inhibidor utilizado fue el 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) que actúa sobre la quinasa CDK9 del factor positivo de la elongación P-TEFb, desfavoreciendo la fosforilación de la Ser 2 del dominio CTD de la Pol II e inhibiendo, así, la elongación transcripcional [145]. Sin embargo, dado que el requerimiento de P-TEFb para la elongación de la Pol II es específico de cada gen [144], en primer lugar, se evaluó si la inducción de la expresión de *bcl-x* por el tratamiento con R5020 es dependiente de este factor. Para ello se pre-trataron células T47D con el DRB a concentraciones crecientes (25, 50 y 100  $\mu$ M), luego se trataron con R5020 o vehículo por 6 horas, en presencia del inhibidor, y se realizaron RT-qPCR con *primers* específicos para analizar la expresión total de este gen. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con el DRB inhibe significativamente el efecto del R5020 sobre la expresión de *bcl-x* en forma dosis-dependiente (Figura 24A). Para continuar los experimentos se decidió utilizar el DRB a una concentración de 50  $\mu$ M, correspondiente a la mínima concentración a la cual se observó el efecto inhibitorio de la inducción de este gen.

Como control del tratamiento con DRB, analizamos por Western Blot los niveles totales del PR en las células pre-tratadas con este inhibidor y comprobamos que no se ven afectados por la presencia del inhibidor (Figura 24B). Además, realizamos el análisis de las cinéticas de reclutamiento del PR a los HREs bajo estas mismas condiciones. Como puede observarse en la Figura 24C, el PR es reclutado en presencia del inhibidor de la elongación con la misma cinética de reclutamiento a cada uno de sus sitios de unión que en el caso

control, con un máximo de reclutamiento a los 5 minutos para los sitios +3.5 y +42 y a los 60 minutos en el sitio +58 (Comparar la Figura 24B con la Figura 19C).

Finalmente, del análisis del ChIP de CBP y GCN5 en presencia de DRB, se encontró que ambas HATs se unen con el mismo patrón de unión a los sitios +3.5, +42 y +58, independientemente del proceso de elongación, luego de 60 minutos de tratamiento hormonal (Comparar Figura 24C y D con la Figura 23B). Estos resultados sugieren que tanto CBP como GCN5 estarían siendo reclutadas al gen por el propio Receptor de Progesterona y no como consecuencia de un aumento en la abundancia de la maquinaria de elongación en estas regiones.

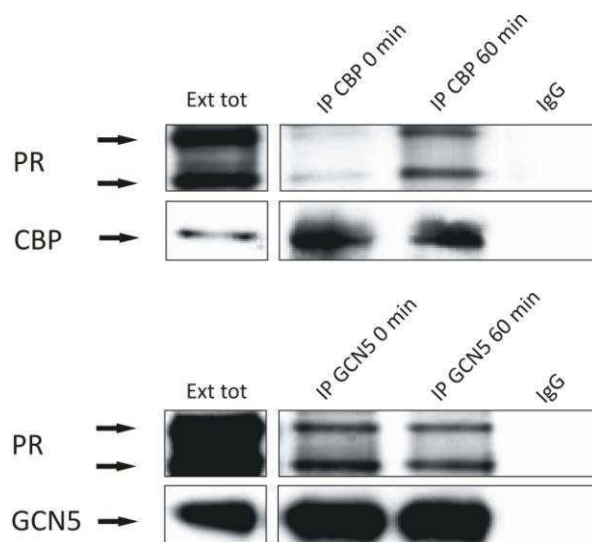




**Figura 24: CBP y GCN5 son reclutadas a los sitios internos de unión del PR en *bcl-x* independientemente de la elongación transcripcional.** **A.** Resultados obtenidos de la medición de los niveles totales de expresión del gen *bcl-x* en células pretratadas por 90 minutos con el inhibidor de la elongación DRB (25, 50 y 100  $\mu$ M) y luego con vehículo o R5020, en presencia del inhibidor. Los gráficos muestran la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b o c) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ). **B.** Western Blot revelado contra el PR total en células tratadas con DRB (50  $\mu$ M). **C.** Análisis de las cinéticas de reclutamiento del PR en los HREs +3.5, +42 y +58 en presencia de DRB (50  $\mu$ M). Los gráficos muestran la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. **D. E.** Resultados de los ChIPs contra CBP y GCN5 en células T47D pre-tratadas con DRB (50  $\mu$ M) y con R5020 por 60 minutos, en presencia del inhibidor. En **D.** se muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes y en **E.** se muestra un experimento representativo.

### 3.4. Interacción PR-HATs

Para sumar evidencias acerca del reclutamiento de CBP y GCN5 por el PR a los sitios de unión del PR en *bcl-x*, decidimos analizar la existencia de interacción física entre estas HATs y el PR. Para ésto, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación contra CBP y GCN5 en células tratadas con R5020 o con vehículo por 60 minutos, seguidas de Western Blots revelados con un anticuerpo específico del PR total. En la Figura 25A se observa que mientras CBP co-precipita con el PR, mayoritariamente, en células tratadas con R5020 mientras que GCN5 lo hace de manera independiente de la presencia del progestágeno (Figura 25B). Estos resultados sugieren que el PR es capaz de formar un complejo con estas dos acetil transferasas.

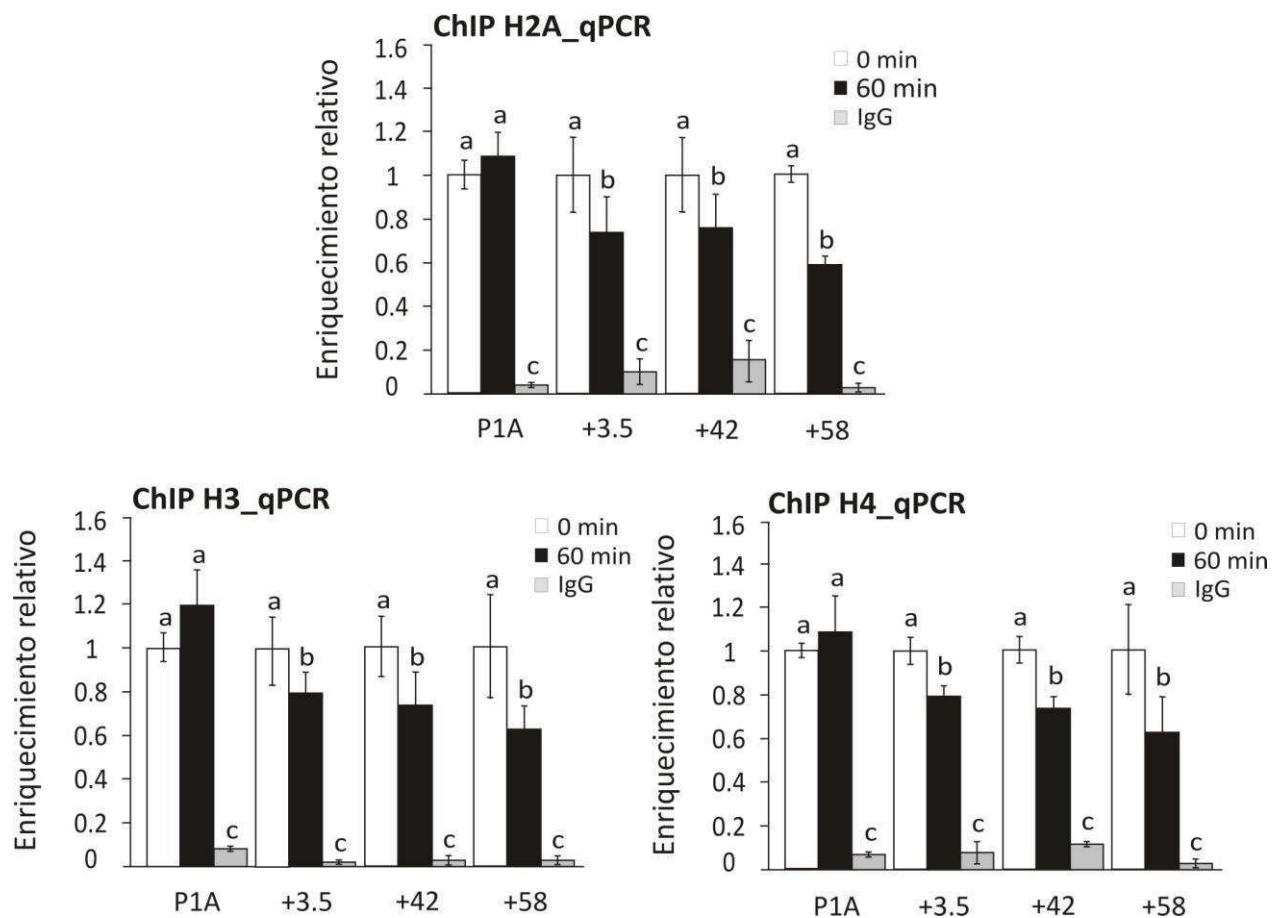


**Figura 25: Análisis de co-inmunoprecipitación de CBP y GCN5 con el PR.** Se muestra el resultado de un ensayo de inmunoprecipitación de CBP (A) y otro de GCN5 (B) en células T47D tratadas con vehículo o con R5020 y posterior Western Blots revelado contra el PR. Como control de carga se analizó la abundancia de CBP y GCN5, respectivamente. Se muestra el control de la IP realizada con un anticuerpo inespecífico (IgG) y un extraxto proteico total (Ext tot) de estas células. Los INPUTs correspondientes a cada uno de los tratamientos presentaban niveles comparables de las proteínas analizadas.

### 3.5. Densidad de nucleosomas

La maquinaria modificadora de la cromatina reclutada por los SRs a las regiones promotoras de sus genes blanco favorece el desplazamiento de los nucleosomas en estas regiones. Teniendo en cuenta que los nucleosomas se presentan como una barrera para la elongación transcripcional desfavoreciendo el pasaje de la Pol II a lo largo de los genes y que ciertas HATs fueron encontradas favoreciendo la elongación transcripcional, nos preguntamos si la unión del PR al ADN podría favorecer la apertura o relajación de la estructura de la cromatina concomitantemente con el reclutamiento de CBP y GCN5. Para ello, se realizaron ChIPs contra las histonas H2A, H3 y H4 a partir de células tratadas durante 0 y 60 minutos con R5020. En la Figura 26 podemos observar que luego de la adición de la hormona se produce una disminución parcial (30-40%) en la presencia de los tres tipos de histonas analizadas en los sitios +3.5, +42 y +58, mientras que no se detectan cambios en la región P1A de este gen.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con el progestágeno provocaría un desplazamiento parcial de los nucleosomas enteros en las regiones internas de *bcl-x*, teniendo en cuenta que el desplazamiento de las histonas H3 y H4 es similar al observado para la histona H2A.



**Figura 26: Abundancia de las histonas en los sitios de unión del PR luego del tratamiento con R5020.** Análisis de la abundancia de las histonas H2A, H3 y H4 en los sitios de unión del PR +3.5, +42, +58 y en el promotor 1A medidos por ChIP-qPCR a partir de células tratadas con R5020. Los gráficos muestran la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b o c) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ).

## 4. Reclutamiento de factores de elongación

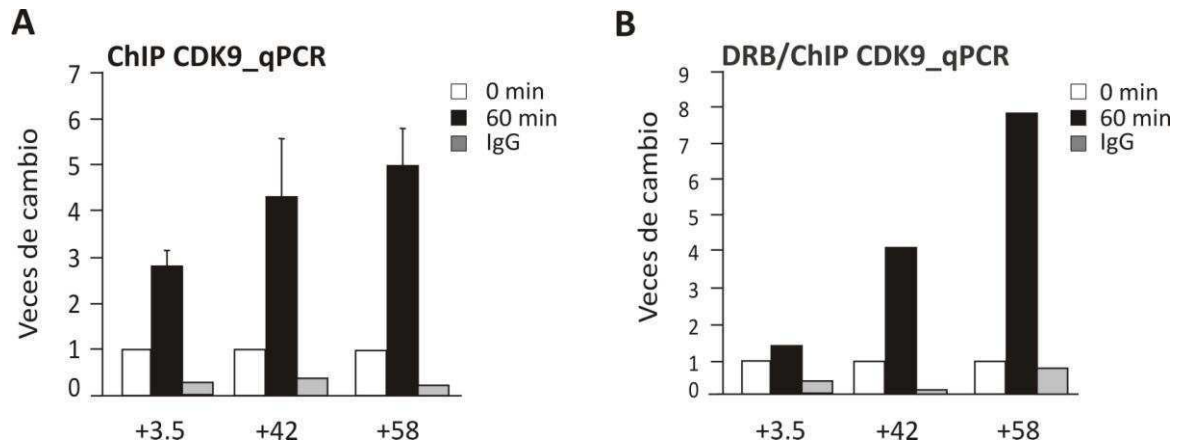
---

### 4.1. Reclutamiento de P-TEFb

Como se mencionó en la introducción, en una publicación reciente, Keninis y colaboradores demostraron que el receptor de estrógenos es reclutado a los promotores de sus genes blanco en donde, no sólo favorece el ensamblado del PIC, como explica el modelo clásico de acción de los SRs, sino que también es capaz de favorecer la elongación temprana mediante el reclutamiento del factor de elongación P-TEFb y el consecuente desplazamiento de los complejos negativos de la elongación NELF y DSIF [136, 146]. Sin embargo, nada se sabe sobre el reclutamiento de factores de elongación mediados por PR y, por lo tanto, nos preguntamos si el PR podría ser capaz de reclutar a P-TEFb a sus sitios de unión intragénicos en *bcl-x*. El primer análisis que realizamos fue un CHIP contra la subunidad quinasa CDK9 de este factor y cuantificamos su abundancia en los sitios +3.5, +42 y +58, antes y después de la adición de la hormona. En la Figura 27A puede observarse que, luego de 60 minutos de tratamiento con R5020, el reclutamiento de CDK9 aumenta en los tres sitios de unión del PR. En este caso, al igual que se observa en los ChIPs de CBP y GCN5, CDK9 se une a estos sitios con un patrón similar de abundancias relativas que en el caso del PR, con mayores niveles de reclutamiento cuanto más cercano se encuentre el sitio a la región 3' del gen.

Se sabe que el factor P-TEFb viaja lo largo de los genes generalmente unido a la Pol II [147]. Por lo tanto, decidimos evaluar si el reclutamiento de este factor sería consecuencia de la unión del PR a estos sitios o si su reclutamiento es causado, indirectamente, por un aumento en la abundancia de la Pol II en estas regiones, luego de la adición de la hormona. Para ello, realizamos ChIPs contra CDK9 en células pre-incubadas con el inhibidor de la elongación DRB (50  $\mu$ M) y determinamos el grado de reclutamiento de este factor en las regiones correspondientes a los sitios +3.5, +42 y +58. Los resultados muestran que CDK9 se

une a estos tres HREs en forma independiente de la elongación de la Pol II (Figura 27B). Por lo tanto, esta quinasa, componente del factor P-TEFb podría estar siendo reclutada a *bcl-x* por el PR y no por la Pol II elongadora.

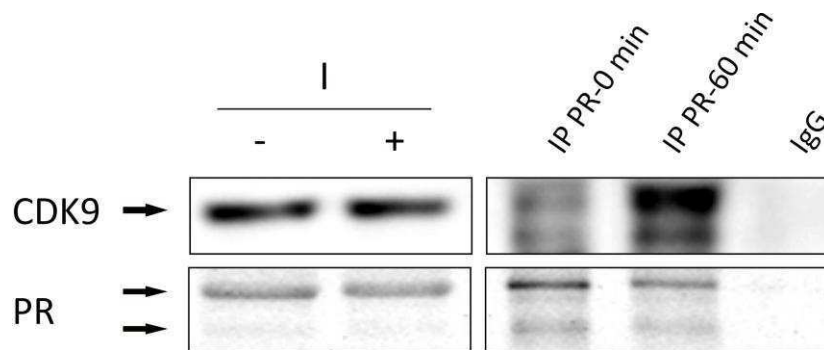


**Figura 27: CDK9 es reclutada a los sitios de unión del PR en *bcl-x* independientemente de la Pol II elongadora.**

**A.** Reclutamiento de CDK9 a los sitios +3.5, +42 y +58 de *bcl-x* analizado por ChIP de células T47D tratadas a 0 y 60 minutos con R5020. El gráfico muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. **B.** Reclutamiento de CDK9 a los sitios +3.5, +42 y +58 de *bcl-x* analizado por ChIP de células T47D pre-tratadas con el inhibidor de la elongación DRB (50  $\mu$ M) y posteriormente tratadas a 0 y 60 minutos con R5020, en presencia del inhibidor. Se muestra un experimento representativo.

## 4.2. Interacción P-TEFb-PR

Finalmente, para sumar evidencias de que el reclutamiento de P-TEFb sería mediado por el PR, analizamos la posible interacción física entre estos dos factores en la línea celular utilizada. Para esto realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación del PR, seguidos de Western Blot contra la subunidad CDK9 de este factor de la elongación en células tratadas con R5020 por 0 y 60 minutos. Los resultados de la Figura 28 muestran que, en esta línea celular, el PR se encuentra basalmente unido a la quinasa CDK9 y que esta interacción se ve incrementada a los 60 minutos de tratamiento con R5020.



**Figura 28: CDK9 interactúa con el PR en células T47D.** Resultado de la co-inmunoprecipitación del PR y Western Blot de CDK9 en células tratadas por 0 y 60 minutos con R5020. Como control de carga se analizó la abundancia del PR total. Se muestran los Inputs (I) de cada tratamiento y el control de la IP realizada con un anticuerpo inespecífico (IgG).

# 5. Efecto del PR sobre la elongación transcripcional

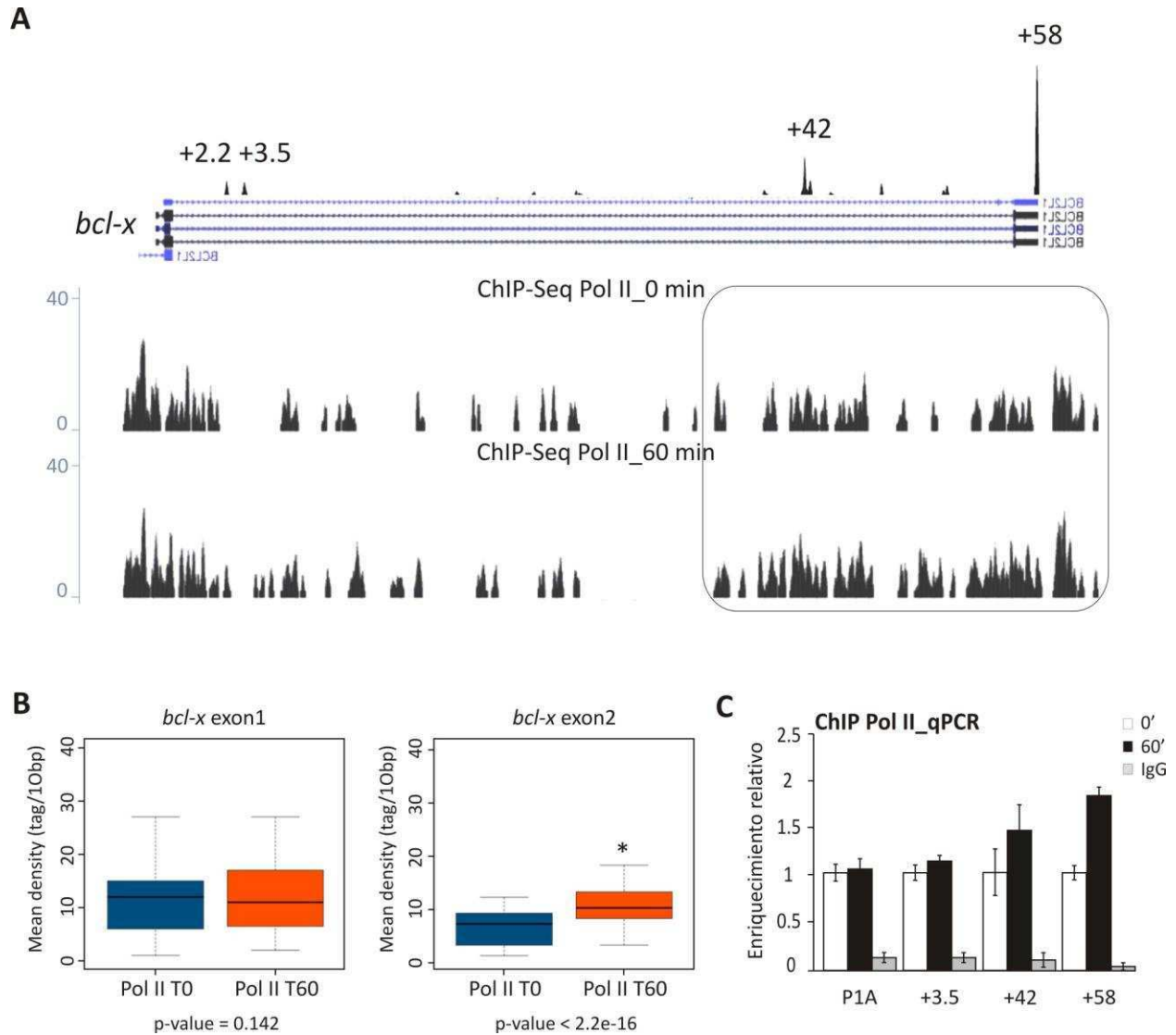
---

## 5.1. Distribución de la ARN Pol II

Si la unión del PR a sus sitios intragénicos en *bcl-x* favoreciera la elongación transcripcional, podríamos esperar un cambio en la distribución y abundancia de la Pol II a lo largo del gen. Por lo tanto, con el objetivo de conocer la distribución de la Pol II en *bcl-x* antes y después del tratamiento de las células con R5020, como primer medida, se analizó el perfil de esta enzima obtenido mediante ChIP-Seq realizado con un anticuerpo específico que reconoce su forma total (Ballaré, C. *et al.*, manuscrito en revisión). En la Figura 29A puede observarse que el patrón de distribución de la Pol II en células tratadas con R5020 por 0 y 60 minutos se produce un evidente aumento en la abundancia y cobertura de esta enzima, principalmente en la mitad 3' del mismo. En este sentido, mediante el análisis bioinformático de estos datos detectamos que la abundancia de la Pol II aumenta significativamente en la región 3' del gen (exón 2) pero no en la región 5' del mismo (exón 1), luego de 60 minutos de tratamiento hormonal (Figura 29B).

Posteriormente corroboramos estos datos de ChIP-Seq mediante ChIP seguido de qPCR con el mismo anticuerpo específico que reconoce a la Pol II total. Se trataron las células con R5020 por 60 minutos y se analizó la abundancia de la Pol II en tres sitios de unión del PR, ubicados en distintas regiones del gen. A partir de estos resultados, se observa que, luego de 60 minutos de tratamiento con R5020, se produce un aumento en la abundancia de la Pol II, principalmente, en los sitios +42 y +58, ubicados más cercanos al 3' del gen pero no en la región promotora ni en el sitio +3.5, ubicado hacia el extremo 5' del mismo (Figura 29C).



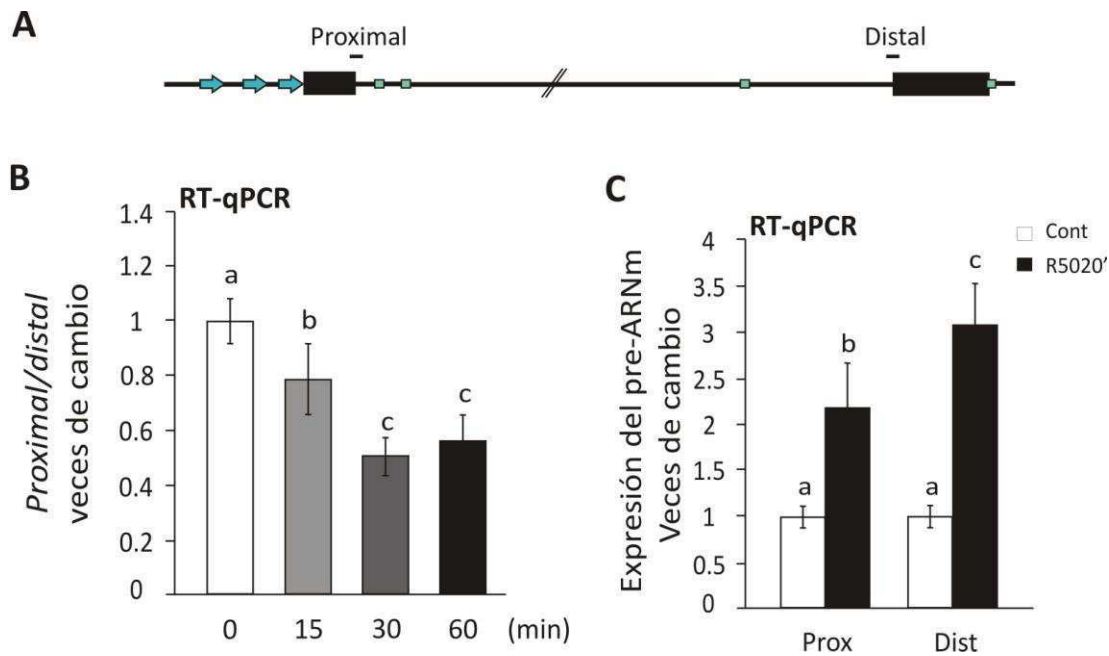


**Figura 29: La distribución de la Pol II en *bcl-x* se ve afectada por el tratamiento con R5020. A.** Distribución de la ARN Pol II a lo largo de todo el gen, antes y después de 60 minutos de tratamiento con R5020 detectada por ChIP-Seq (Ballaré *et al.*, manuscrito en revisión). Se recuadra la región que presenta el mayor cambio en la abundancia de esta enzima, luego del tratamiento hormonal. **B.** Análisis bioinformático de la abundancia de la Pol II en las regiones correspondientes al exón 1 y exón 2, antes y después el tratamiento con R5020. El asterisco corresponde a una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) (Análisis realizado por Giancarlo Castellano, CRG, Barcelona). **C.** Abundancia de la ARN Pol II antes y después de 60 minutos de tratamiento con R5020 analizada por ChIP, seguida de qPCR en la región promotora (P1A) y en los sitios +3.5, +42 y +58. El gráfico

## 5.2. Transcripción proximal y distal

La determinación de los cambios en la tasa de elongación de la Pol II endógena, producida por un determinado estímulo es una tarea técnicamente difícil. Una forma indirecta de medir la actividad de la Pol II es comparando la relación de abundancias de los transcriptos proximales y distales del pre-ARNm [148]. Por lo tanto, decidimos analizar si el tratamiento con R5020 tiene un efecto sobre la relación de la transcripción en una región proximal a los promotores y en otra distal en *bcl-x*, para lo que se diseñaron dos pares de *primers* específicos como se muestra en el esquema de la Figura 30A. Las células se trataron con R5020 por 0, 15, 30 y 60 minutos, se extrajo el ARN total y se analizó la transcripción del pre-ARNm por RT-PCR cuantitativa, graficándose como la relación entre ambos amplicones (Proximal/Distal). A partir de los resultados se observa que el tratamiento con el R5020 produce una disminución de ese cociente, sugiriendo que el tratamiento hormonal podría estar afectando la elongación de la Pol II (Figura 30B). Del análisis de ambos amplicones por separado, normalizados contra la expresión del gen *gapdh* podemos inferir que tanto la transcripción proximal como la distal aumentan luego del tratamiento con R5020, pero que la transcripción distal aumenta significativamente más que lo que lo hace la transcripción proximal (Figura 30C).

Estos resultados, junto con los cambios detectados en la distribución de la Pol II, luego del tratamiento con R5020, sugieren que el agregado de la hormona favorece la elongación de la Pol II a lo largo del gen *bcl-x*.



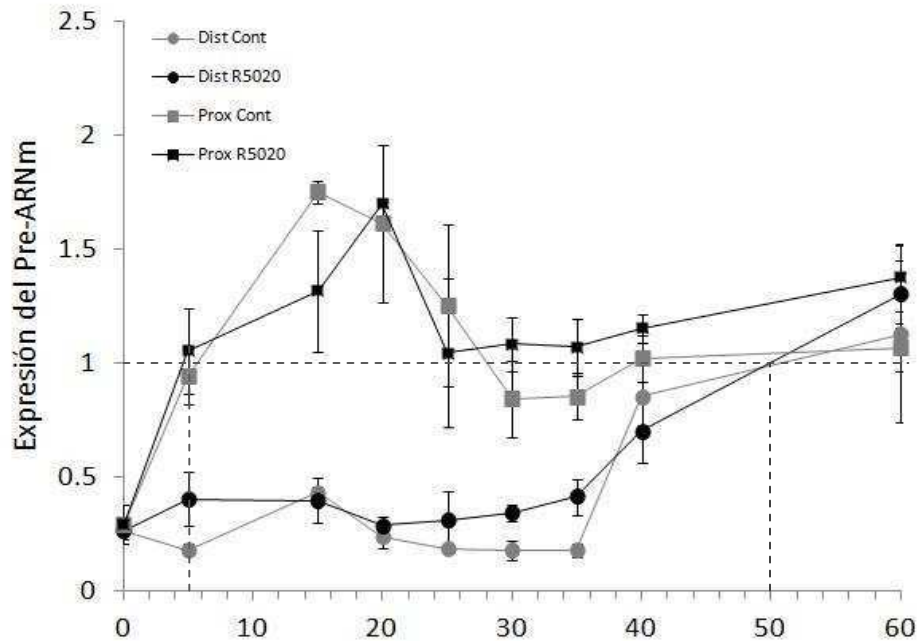
**Figura 30: El tratamiento con R5020 afecta la relación entre la transcripción proximal y distal.** **A.** Esquema del gen *bcl-x* en donde se muestran las regiones amplificadas por qPCR (Proximal y Distal) **B.** Se grafica la relación de abundancias de la transcripción proximal y distal (Proximal /Distal) de células tratadas con R5020 por 0, 15, 30 y 60 minutos, relativas el tiempo cero. El gráfico muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b, c o d) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ). **C.** Se muestran los resultados de ambas regiones analizadas por separado, normalizadas contra la expresión del gen *gapdh*. El gráfico muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b o c) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ).

### 5.3. Análisis de la velocidad de la Pol II

Hasta el momento nuestros resultados indican que el tratamiento con R5020 de las células T47D y la consecuente unión del PR a los HREs intragénicos de *bcl-x* podría estar favoreciendo la elongación transcripcional de la Pol II. Sin embargo, con estos resultados no podemos discernir si este efecto es producto de un cambio en la actividad catalítica de esta enzima (tasa de elongación) o en su procesividad, siendo ambos parámetros susceptibles a ser regulados independientemente el uno del otro [41].

Recientemente se ha publicado una estrategia experimental que permite analizar la tasa de elongación de la Polimerasa II en genes endógenos [27]. La técnica consiste en el bloqueo de la elongación con el inhibidor de la elongación DRB por 3 horas, y la posterior recuperación de la elongación en un medio libre de este inhibidor. Luego se extrae el ARN total a distintos tiempos y se analizan los niveles de transcripción en regiones proximales y distales correspondientes al pre-ARNm, separadas entre sí por una determinada distancia en Kb. De esta manera, conociendo la distancia entre los amplicones y el tiempo de recuperación de la transcripción de cada región, desde el lavado del DRB, puede calcularse la tasa de elongación.

Con el objetivo de analizar este parámetro de la elongación transcripcional, realizamos un experimento en células T47D a los 0, 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 60 minutos pos-retiro del DRB y agregado del R5020 o vehículo. El nivel de los pre-ARNs mensajeros se analizó por RT-qPCR y, a partir de estos datos, se estimó la velocidad de elongación expresada en  $\Delta\text{Kb}/\Delta t$ , siendo  $\Delta\text{Kb}$  la distancia en Kb entre los dos amplicones analizados y  $\Delta t$  el tiempo transcurrido para que cada uno de ellos recupere su expresión basal. Los resultados se grafican como los valores de cada muestra relativos a los valores detectados en las células control, sin pre-tratamiento con DRB (a los cuales se les asignó un valor de 1). En la Figura 31 se observa que, independientemente de la presencia del R5020, el transcripto proximal comienza a recuperar su expresión a partir de los 5 minutos del reemplazo del medio con DRB por medio fresco, mientras que el distal lo hace a partir de, aproximadamente, 50 minutos. Dado que la distancia entre ambos amplicones es de 55,3 Kb, la velocidad de la Pol II calculada es de 1,22 Kb por minuto, en forma independiente del tratamiento hormonal. Dado que en genes endógenos se estimó que la velocidad de la Pol II oscila entre 1.1 and 6 kb/min [27-30], el valor determinado mediante esta técnica en el gen *bcl-x* se encuentra dentro del rango de valores esperados.



**Figura 31: Análisis de la velocidad de la elongación transcripcional.** Se grafican los niveles de transcripción proximal (Prox) y distal (Dist) de células pre-tratadas con el inhibidor de la elongación DRB 100  $\mu$ M, lavadas con PBS y posteriormente tratadas por 0, 5, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 60 con R5020 (Prox y Dist R5020) o vehiculo (Prox y Dist Cont). El valor de la expresión de los pre-ARNm para cada amplicón fue calculado sustrayendo los valores de los controles sin RT y normalizado contra la expresión basal, previa al tratamiento con DRB. Los datos En el gráfico se representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes para cada tiempo.

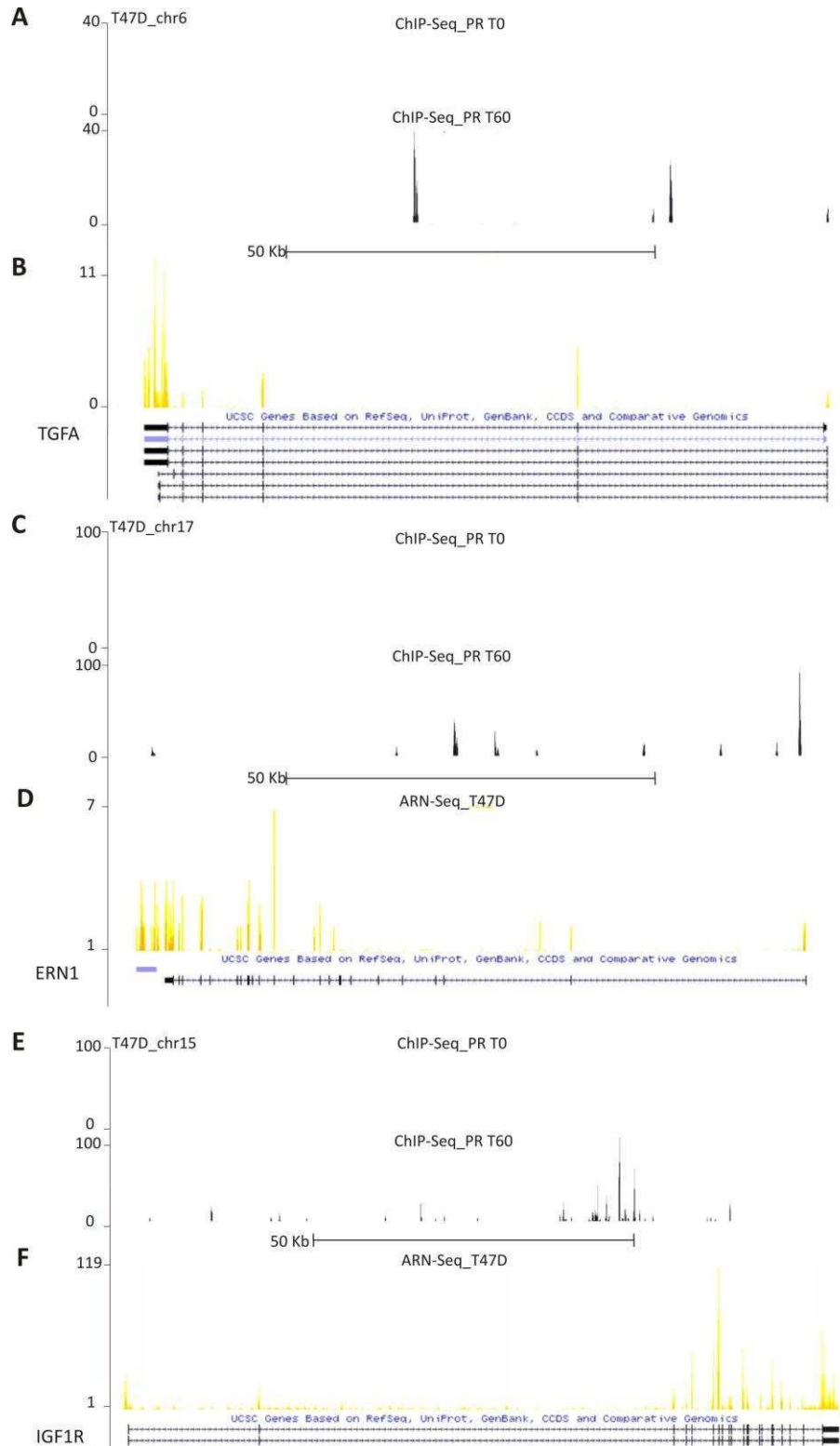
## 6. Transcripción Proximal y Distal de otros genes

---

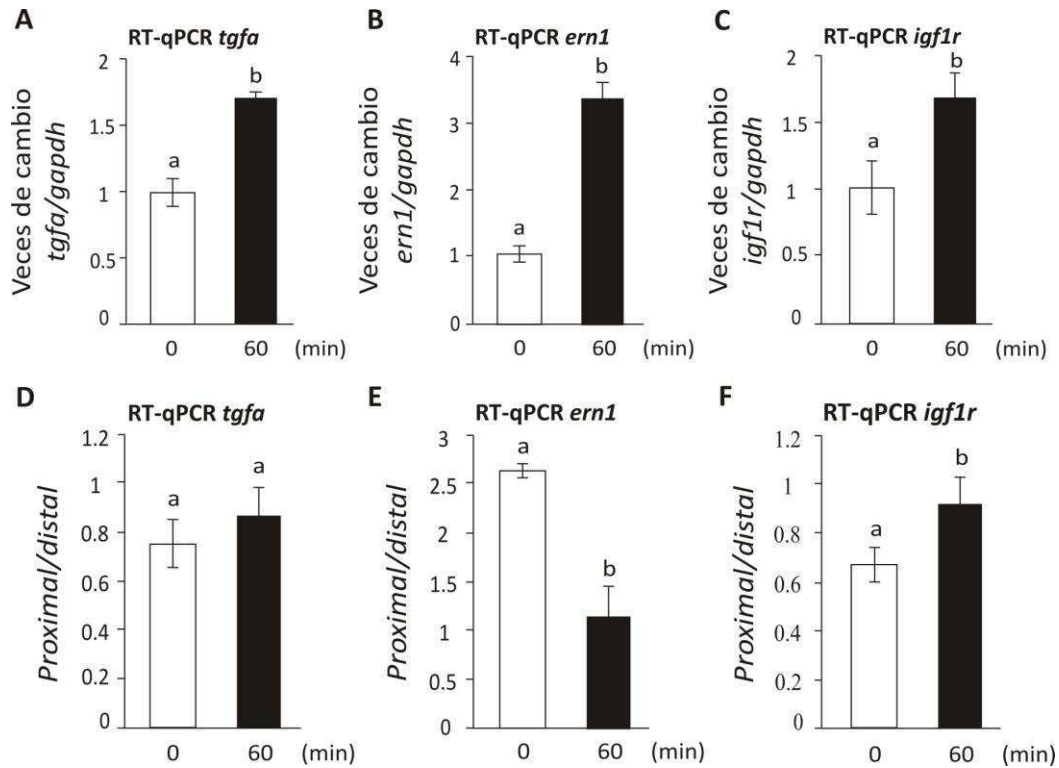
En este trabajo encontramos que el PR activado se une a los HREs intragénicos presentes en el gen *bcl-x*, donde es capaz de reclutar a las HATs CBP y GCN5, con las cuales forma un complejo en esta línea celular, y de favorecer la acetilación de las histonas y el

desplazamiento de los nucleosomas. Además, encontramos que el PR recluta a sus sitios internos de unión al factor positivo de la elongación P-TEFb, con el cual también interaccionaría físicamente en esta línea celular. En estas condiciones, el PR induce la transcripción de *bcl-x* generando un cambio en la abundancia relativa entre sus isoformas de *splicing* alternativo, mediante un mecanismo que involucra, al menos en parte, la modulación de la elongación transcripcional.

Finalmente nos preguntamos si este efecto del PR sobre la elongación de la Pol II podría ser un mecanismo de acción general, o bien, dependiente de cada gen. Para contestar a esta pregunta seleccionamos tres genes blanco de acción del PR: *igflr* (*insulin-like growth factor 1 receptor*), *tgfa* (*transforming growth factor alpha*) y *ern1* (*endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1*). Todos ellos son genes de más de 50Kb de longitud, que poseen únicamente sitios intragénicos de unión al PR (Figura 32A, C, E), presentan actividad basal en células T47D (Figura 32B, D, F) y se inducen por el tratamiento con R5020 (Figura 33A, B, C), de la misma forma que *bcl-x*. Para los tres genes diseñamos dos pares de primers, uno para la región proximal y otro para la región distal y analizamos los niveles de transcripción en cada región, antes y después del tratamiento con R5020, mediante RT-qPCR y graficamos los datos como la relación Proximal/Distal. Para nuestra sorpresa, cada uno de los genes se comportó de una manera distinta ante el tratamiento hormonal (Figura 33D, E, F). La relación entre la transcripción proximal y distal del gen *igflr* aumenta significativamente, luego de 60 minutos de tratamiento con R5020, sugiriendo un efecto del PR unido a sus sitios intragénicos, principalmente, sobre la iniciación de la transcripción. Por su parte, esta relación se mantiene constante para el gen *tgfa*, a pesar del aumento transcripcional causado por el tratamiento, mientras que *ern1* se comporta como el gen *bcl-x*, produciéndose la disminución de la relación entre la transcripción proximal y distal.



**Figura 32: Sitios de unión del PR y niveles basales de expresión de *tgfα*, *ern1* y *igflr*.** A, C, E. Sitios de unión del PR detectados por ChIP-Seq a partir de células tratadas a 0 y 60 minutos con R5020 (Ballaré *et al.*, manuscrito en preparación). B, D, F. Actividad génica basal detectada por RNA-Seq en células T47D sin tratamiento [11]. 126



**Figura 33: El efecto del PR reclutado a sus sitios intragénicos de unión presenta diferentes efectos sobre la transcripción génica. A, B, C.** Efecto del R5020 sobre la transcripción de los genes *igf1r*, *tgfa* y *ern1*. El gráfico muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a o b) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ). **D, E, F.** Se grafica la relación de abundancias de la transcripción proximal y distal (Proximal /Distal) de células tratadas con R5020 por 0 y 60 minutos, relativas el tiempo cero de los genes *igf1r*, *tgfa* y *ern1*. El gráfico muestra la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a o b) son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0.05$ ).



# Discusión

---

Los SRs son factores de transcripción que median las funciones biológicas de las hormonas esteroideas produciendo cambios en los patrones de la expresión génica. La mayoría de los estudios realizados para comprender el mecanismo de acción de estos receptores se focalizaron en el efecto de su unión específica a los HREs ubicados en las regiones promotoras y *enhancers* de sus genes blanco, en donde reclutan complejos modificadores de la cromatina, favoreciendo la formación del PIC y la iniciación de la transcripción. Recientemente se describió que el ER, unido a sus sitios de unión localizados en promotores, también es capaz de favorecer la elongación temprana mediante el reclutamiento del factor positivo de la elongación P-TEFb y el desplazamiento de factores inhibitorios de este proceso [136]. Sin embargo, este modelo de acción de los SRs, actuando sobre las regiones proximales a los promotores, no sería el más frecuente ya que cada vez son más las evidencias que demuestran la gran proporción de sitios de unión de los SRs que se encuentran ubicados en las regiones intragénicas de sus genes blanco [1, 128-131]. Estas evidencias, abren un nuevo e interesante campo de estudio en el que el principal objetivo es determinar la función de los sitios de unión intragénicos de los SRs y los mecanismos de acción involucrados en sus efectos sobre la expresión genica.

En este trabajo de tesis encontramos que el Receptor de Progesterona, unido a sus sitios intragénicos en el gen *bcl-x* endógeno, induce su transcripción favoreciendo, al menos en parte, el proceso de elongación transcripcional. Este efecto estaría mediado por el reclutamiento local de factores modificadores de la cromatina y del factor positivo de la elongación P-TEFb. Discutiremos estos resultados en la siguiente sección.

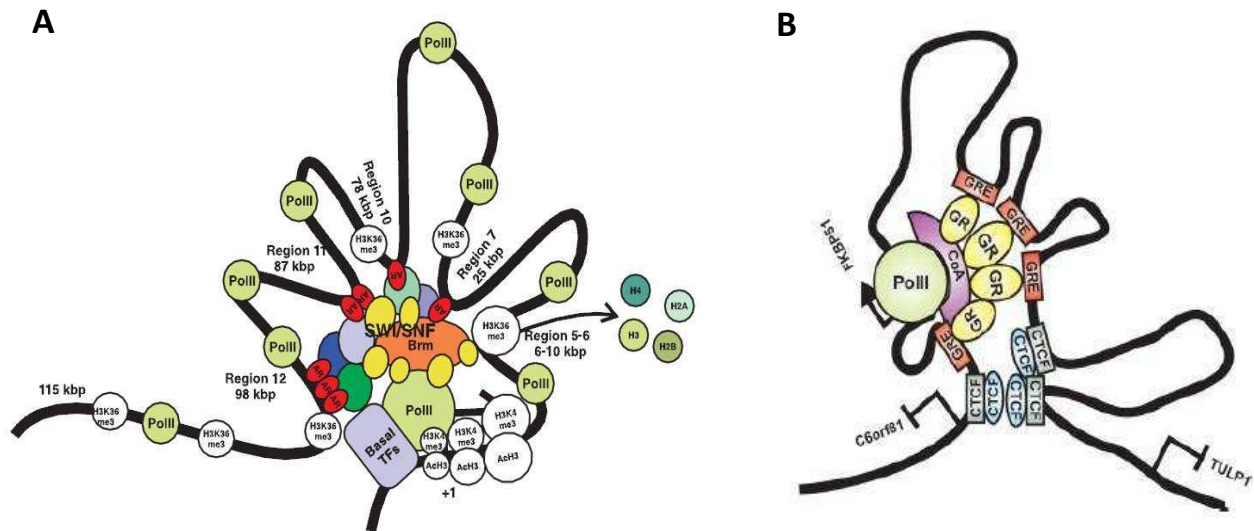
## 1. Distribución de los HREs y *loopings* transcripcionales

A partir del ChIP-Seq realizado contra el Receptor de Estrógenos en las células MCF7 tratadas con 17 $\beta$ -Estradiol 10nM, Welboren y colaboradores demostraron que el 41% de los sitios de unión al ADN para este receptor están posicionados en intrones, el 5% en exones y sólo el 7% en regiones promotoras y *enhancers* [1]. Por su parte, el mismo análisis realizado con el Receptor de Progesterona en células T47D tratadas con el progestágeno sintético R5020 por 60 minutos mostró que el 31% de los sitios de unión al ADN del este receptor se encuentran en intrones, el 4% en exones y sólo el 3% en regiones promotoras y *enhancers* (Ballare *et al.*, manuscrito en revisión). Resultados similares también se describieron para otros receptores nucleares [1, 128-131]; sin embargo, hasta el momento, no se ha encontrado ninguna correlación entre la ubicación de los elementos de respuesta a hormonas y sus funciones sobre el control de la transcripción génica.

En la actualidad, se postula que el mecanismo de acción de los FTs unidos a las regiones distantes de los promotores sobre la transcripción de sus genes blanco involucra un efecto a “larga distancia”. Este efecto está asociado a la formación de bucles o *loopings* transcripcionales [134] que se producen por la interacción de regiones de la cromatina alejadas entre sí, como consecuencia de la flexibilidad de las fibras de cromatina. Durante los últimos años, se desarrollaron nuevas técnicas para estudiar estos *loopings*, como la captura de la conformación de los cromosomas (3C) y sus técnicas derivadas, que se basan en la asunción de que las regiones genómicas distales se encuentran interconectadas entre sí a través complejos proteicos que son químicamente “*crosslinkeables*” [149]. Mediante la utilización de estas técnicas, se encontró que los *loopings* transcripcionales están involucrados tanto en la represión [150] como en la activación génica [151] en respuesta a un determinado estímulo.

La asociación entre los *loopings* transcripcionales y la acción de los SRs fue analizada por el grupo de Palvimo en dos trabajos recientes en los que estudiaron el mecanismo

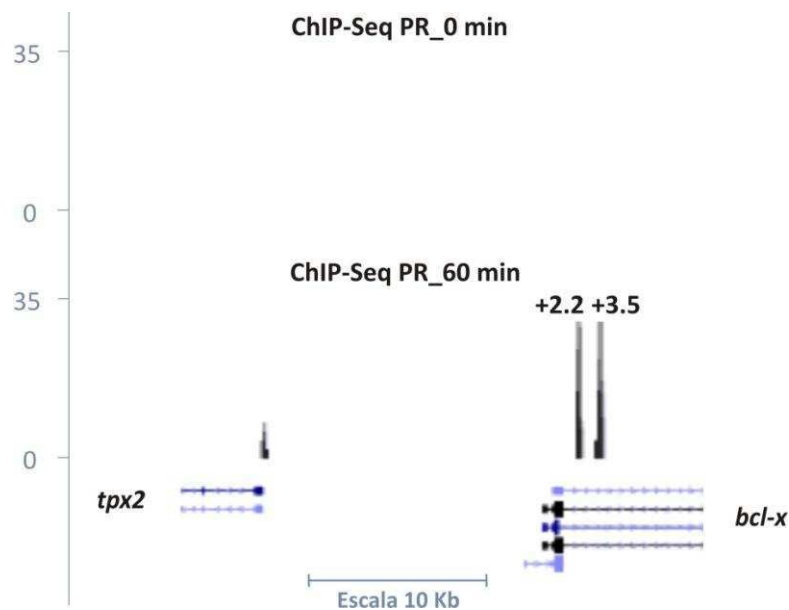
mediante el cual los andrógenos y los glucocorticoides inducen la transcripción del gen *fkbp5*, en células humanas VCaP y LNCaP, derivadas de cáncer de próstata y de epitelio de pulmón A549, respectivamente [2, 3]. En estos trabajos los autores demostraron que existe una interacción entre la maquinaria general de la transcripción y el AR o el GR, que se unen a sitios distantes de la región promotora de este gen, luego del tratamiento hormonal. También propusieron un modelo espacial de formación de *loopings* transcripcionales en el que estos receptores estarían interactuando con el complejo transcripcional mediante co-activadores (Figura 34).



**Figura 34.: Modelo espacial de la formación de *loopings* transcripcionales mediados por el AR y el GR.**

**A.** Una vez activado por ligando, el AR es reclutado a cuatro sitios de unión distales de la región promotora del gen *fkbp51*, produciendo bucles transcripcionales mediados por co-reguladores, como SWI/SNF. **B.** Luego del tratamiento de las células con Dexametasona, el GR es reclutado a tres sitios de unión distales de la región promotora del gen *fkbp51* y a uno en la región *enhancer*. Como consecuencia, se producen bucles transcripcionales mediados por co-reguladores y por la proteína de *boundaries* CTCF [2, 3].

Dado que cada vez son más las evidencias que demuestran la relevancia del efecto a “larga distancia” de los SRs sobre la región promotora de sus genes blanco, se propone que el foco de los estudios sobre la acción de estos receptores sobre la transcripción génica estaría cambiando de un paradigma basado en una visión “lineal” al de una arquitectura tri-dimensional [2]. Sin embargo, y a pesar de que no podemos descartar la posibilidad de la formación de ciertos *loopings* transcripcionales generados por el PR durante la inducción de la expresión de *bcl-x* post-tratamiento con el R5020, creemos que este no sería el mecanismo principal de acción. En primer lugar, la técnica de ChIP, mediante la cual analizamos el reclutamiento del PR, es una técnica que detecta tanto la unión directa como indirecta de una proteína al ADN. La ausencia de este receptor unido en las regiones promotoras y *enhancers* de *bcl-x*, detectada por ChIP y ChIP-Seq (Ballaré, C. *et al.*, manuscrito en revisión), sugiere que el PR unido a sus sitios intragénicos no estaría en contacto con esas regiones vía *loopings*. Si este fuera el caso debería observarse, al menos, un pequeño enriquecimiento del receptor en alguna región cercana al TSS. Más aún, a partir de los datos obtenidos del ChIP-Seq contra el PR (Ballaré, C. *et al.*, manuscrito en revisión) encontramos que los sitios de unión del PR río arriba de *bcl-x*, más cercanos al gen, se encuentran ubicados en la región promotora del gen TPX2, a más de 10 kb (región *enhancer*) del promotor de *bcl-x* (Figura 35).



**Figura 35: Sitios de unión del PR río arriba del promotor de *bcl-x*.** Se muestran los resultados del ChIP-Seq correspondientes a los sitios de unión del PR +2.2 y +3.5 en el gen *bcl-x* y en la región promotora del gen *tpx2*, en células T47D tratadas por 0 y 60 minutos con R5020. (Ballare *et al.*, manuscrito en revisión)

Otra de las evidencias que el grupo de Jorma J. Palvimo encontró sugestiva de la formación de *loopings* entre los *enhancers* distales del GR y la región promotora de *fkbp5* fue el enriquecimiento de la Pol II total, principalmente, en la regiones 5' y 3' de este gen [2]. Nuestros resultados del análisis de la abundancia de la Pol II total a lo largo de *bcl-x*, en cambio, no mostraron el mismo patrón de enriquecimiento. En este caso, el aumento de la Pol II resultó ser significativo en la region 3' del gen (exón 1), mientras que no se detectaron cambios significativos en la region 5' del mismo (exón 2). Estos datos aportan un indicio más

en contra un efecto de “larga distancia” del PR sobre la región promotora de *bcl-x* y a favor de un efecto más local de este receptor sobre la transcripción de este gen.

A pesar de que no descartamos la posibilidad de que se produzcan *loopings* transcripcionales mediados por el PR en el gen *bcl-x* luego de la adición del R5020, proponemos que el efecto de este receptor unido a los sitios internos de unión presentes en este gen involucraría, al menos en parte, un mecanismo similar al que presentan los SRs en las regiones promotoras de sus genes blanco. Este mecanismo estaría asociado a la unión del PR activado por la fosforilación en su Ser 294 y al reclutamiento local de co-factores que modifican la estructura de la cromatina pero, en este caso, afectando la elongación de la Pol II en las regiones internas de *bcl-x*, más que el reclutamiento de esta enzima a las regiones promotoras.

## 2. Las pausas transcripcionales y el remodelado de la cromatina

A lo largo de los genes, y más aún en genes largos como es el caso de *bcl-x* (57 Kb), la presencia de nucleosomas en toda la región codificante afecta la elongación de la Pol II. Los nucleosomas desestabilizan la unión de esta enzima con el templado de ADN disminuyendo, así, su eficiencia de elongación y favoreciendo las pausas y arrestos transcripcionales [155, 156]. Por lo tanto, el reclutamiento de co-factores que modifican relajan la estructura de la cromatina como CBP y GCN5 a los sitios intragénicos de unión de *bcl-x* mediado por el PR generaría un molde cromatínico más accesible para el pasaje de la Pol II.

Dado que la acetilación de las histonas no sólo afecta el contacto entre el ADN y las histonas, sino que también actúa como una plataforma de reclutamiento de maquinaria remodeladora de la cromatina dependiente de ATP, el efecto del PR sobre la abundancia de los nucleosomas en estas regiones podría también estar asociado al reclutamiento de este tipo de complejos (Figura 36). En este sentido, el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF posee uno o más bromodominios capaces de unirse a las histonas acetiladas [157] y se sabe

que algunos SRs, como es el caso del PR, requieren de su actividad para ser capaces de inducir la transcripción de sus genes blanco [158-161]. Este complejo tiene la capacidad de remodelar los nucleosomas tanto por el deslizamiento de los dímeros de H2A/H2B como por el desplazamiento o disociación del ADN de los nucleosomas enteros, características que podrían sugerirlo como un posible candidato involucrado en el efecto del PR sobre la transcripción de *bcl-x*. En este sentido, resultados asociados a este trabajo de tesis (Vicent *et al.*, datos no publicados) indicaron que la subunidad ATPasa BRG1 de este complejo remodelador se recluta en los sitios intragénicos de este gen, luego de 60 minutos de tratamiento con el R5020. Por lo tanto, proponemos que esta familia de remodeladores de la cromatina dependientes de ATP podría ser, al menos, uno de los mecanismos responsables de la disminución en los niveles de histonas observado en los sitios de unión internos de unión del PR en *bcl-x*, luego de la adición de la hormona. En forma similar, Paakinaho y colaboradores encontraron que BRG1 y Bhrma, que es la otra subunidad ATPasa del complejo SWI/SNF, son reclutadas en los sitios de unión del GR ubicados en forma distal de las regiones promotoras del gen *fkbp51* humano, luego del tratamiento con Dexametasona. Al igual que ocurre en *bcl-x*, en este caso, el reclutamiento de este complejo remodelador de la cromatina correlaciona con el desplazamiento de la histona H3 en esos sitios de unión del GR [2].

Otros modificadores de la cromatina como son las chaperonas Asf1 y FACT fueron encontrados favoreciendo la elongación mediante el desensamblado de los nucleosomas a lo largo de los genes [32, 61, 86, 162], por lo que también podrían estar involucradas en el efecto del PR sobre la transcripción del gen *bcl-x*. Sin embargo, resultados relacionados con este trabajo de tesis (Vicent *et al.*, datos no publicados), mostraron que la chaperona FACT no se recluta a los HREs internos de *bcl-x*. Estas evidencias, sumadas a que el mecanismo por el cual FACT favorece la elongación de la Pol II involucra el desensamblado y posterior reensamblado de los dímeros H2A-H2B y que, en los sitios de unión del PR en *bcl-x*



observamos el desplazamiento parcial de los nucleosomas enteros, creemos que esta chaperona no estaría involucrada en la inducción transcripcional de este gen luego del tratamiento con R5020. En este sentido, se encontró que FACT no es igualmente requerido para la transcripción de todos los genes y que esta diferencia está relacionada con la estructura de la cromatina en las regiones transcribibles [163].

Por lo tanto, creemos que una diversidad de factores como son otras chaperonas de histonas, otros complejos remodeladores de la cromatina dependiente de ATP, así como también otras HATs, como PCAF, que fue encontrada favoreciendo la elongación de la Pol II, puedan también participar de efecto del PR sobre la transcripción de *bcl-x*.

### 3. Acetilación de SRs

El estudio del papel que juegan la acetilación y des-acetilación de proteínas en la regulación de la expresión génica está focalizado, principalmente, en su efecto sobre la estructura de la cromatina y su correlación con los niveles de expresión génica [164]. Sin embargo, se sabe que las histonas no son los únicos blancos moleculares de la acción de las HATs/HDACs, sino que éstas presentan un amplio rango de sustratos entre los que se incluyen distintos factores de transcripción [165]. Por ejemplo, se demostró que los SRs son modificados post-traduccionalmente por las HATs, lo cual afecta sus funciones como factores de transcripción. Por ejemplo, el ER es acetilado por la HAT p300 disminuyendo su actividad transcripcional, mientras que la acetilación del PR, el AR y el GR favorece su actividad inducida por ligando [166]. Por lo tanto, además de afectar la acetilación de las histonas, las HATs CBP y GCN5, podrían estar también modulando la actividad del PR en esta línea celular.

Experimentos asociados a este trabajo de tesis mostraron que el PR se acetila en las células T47D luego de 30 y 60 minutos de tratamiento con R5020. Por lo tanto, dado que la interacción del PR y CBP es dependiente de ligando, mientras que su interacción con GCN5

no lo es, creemos que CBP podría ser, al menos, una de las HATs responsables de esta acetilación dependiente de ligando del receptor de progesterona. En este sentido, se están realizando más estudios para poder confirmar esta hipótesis.

#### 4. Modulación de la elongación transcripcional de la Pol II

Se sabe que la abundancia de los nucleosomas suele ser inversamente proporcional a la densidad de Pol II en las regiones génicas [35]. En este mismo sentido, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, luego del tratamiento con R5020 y de la unión del PR a los sitios internos en *bcl-x*, el desplazamiento de nucleosomas correlaciona con una mayor abundancia de la Pol II, principalmente en los sitios +42 y +58 y en el exón 2, ubicados en la región 3' del gen. Sin embargo, a partir de nuestros resultados no podemos descartar la posibilidad de que la disminución parcial de nucleosomas detectada en los HREs de *bcl-x* sea una consecuencia del mayor pasaje de la Pol II por estas regiones, causada por un mecanismo diferente de acción del PR sobre este proceso transcripcional. Para evaluar esta posibilidad, estamos realizando experimentos de CHIP con anticuerpos específicos que reconocen los distintos tipos de histonas en células T47D tratadas con vehículo o R5020, en presencia del inhibidor de la elongación DRB. Si el PR y la maquinaria modificadora de la cromatina que este receptor recluta a los HREs intragénicos de *bcl-x* son capaces, por sí mismos, de reorganizar los nucleosomas, la inhibición de la elongación de la Pol II por el tratamiento con este inhibidor no debería afectar el desplazamiento parcial de los nucleosomas detectado luego del tratamiento hormonal. En este sentido, creemos que tanto el PR como la Pol II elongadora estarían afectando la abundancia de los nucleosomas en las regiones internas de *bcl-x*. El PR podría generar la apertura de la estructura de la cromatina mediante el reclutamiento local de modificadores de la cromatina y, así, favorecer el pasaje de la Pol II la cual, a su vez, también favorece el desplazamiento de los nucleosomas; generándose un efecto

de retroalimentación positiva sobre la elongación transcripcional entre la acción del PR y de la Pol II.

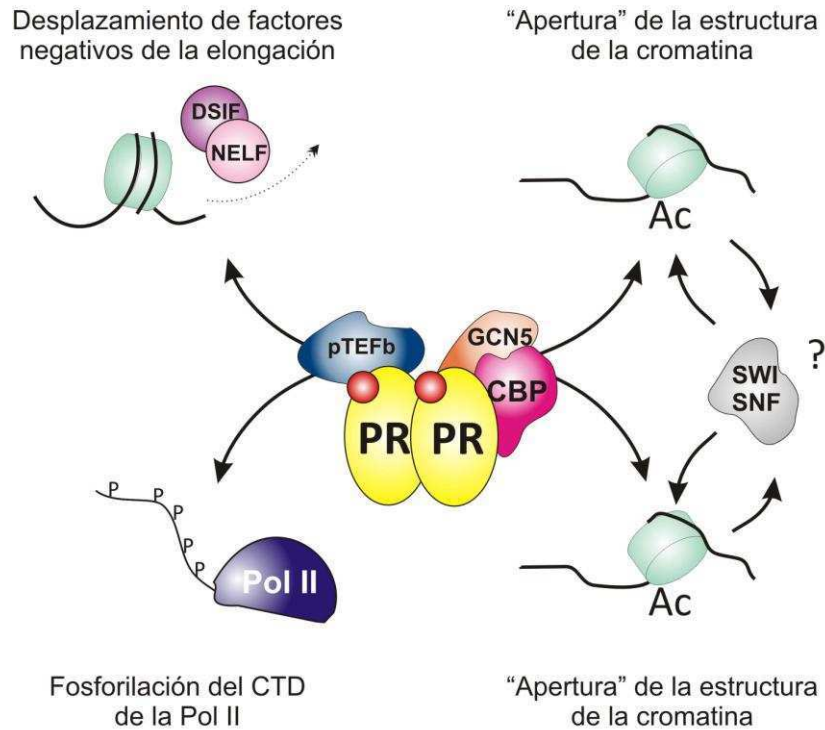
El efecto de los SRs sobre la elongación transcripcional fue previamente estudiado, por Welboren y colaboradores. Ellos observaron que existen genes blanco del ER que presentan una acumulación de Pol II precargada y pausada río abajo de la región promotora, con una ocupación mínima dentro del cuerpo del gen, fenómeno que se denominó enriquecimiento de la Pol II pausada proximalmente al promotor (PPEP). En su trabajo, estos autores encontraron que el ER, unido a sus elementos de respuesta específicos presentes en las regiones promotoras de estos genes, es capaz de reclutar al factor positivo de la elongación P-TEFb. Este factor favorece la elongación mediante la fosforilación y el consecuente desplazamiento del complejo negativo de la elongación NELF/DSIF y la fosforilación de la Pol II en las Ser 2 de su CTD, induciendo el cambio de su estado de “pausado” al de elongación productiva [1]. De esta manera, el ER favorece la elongación temprana y la consecuente activación de la expresión génica sin necesidad del reconocimiento previo de la región promotora por la Pol II, la formación del PIC y la iniciación de la transcripción. Estos descubrimientos generaron un cambio en la perspectiva del estudio de los mecanismos de acción de los SRs sobre la activación de la expresión génica, pasando de la visión clásica que describe que el mecanismo principal acción de estos receptores implica la regulación de la iniciación de la transcripción a una visión en la que se propone un efecto directo sobre la iniciación de la elongación productiva. De esta manera, el control de la elongación jugaría un papel tan o más relevante que la modulación de la iniciación transcripcional, sobre todo en genes que responden rápidamente a ciertas señales celulares [167-169].

En el caso del PPEP, el reclutamiento del factor P-TEFb y el consecuente efecto sobre la elongación temprana, ocurre mediante la unión del ER a las regiones promotoras de sus genes blanco que se encuentran basalmente silenciados o que presentan una actividad basal muy baja. En este trabajo, en cambio, encontramos que P-TEFb es también reclutado al ADN

por el PR pero, en este caso, a regiones internas del gen *bcl-x* que se encuentra transcripcionalmente muy activo en esta línea celular. En este sentido, a pesar de que la función de los factores negativos de la elongación NELF/DSIF está muy bien caracterizada a nivel de la transcripción temprana, también se demostró que su presencia en las regiones internas de los genes lleva a una disminución de la tasa de elongación y al pausado de la Pol II en distintos puntos a lo largo de los mismos [170]. Estas pausas transcripcionales son revertidas por el factor P-TEFb que favorece la liberación de la Pol II pausada o arrestada y la reanudación de la elongación. Más aún, en un trabajo muy reciente realizado en células tumorales mamarias MCF7, se demostró que P-TEFb es reclutado por el ER a una región de pausado de la Pol II en el gen *myb*, localizada a 1,7 Kb de sitio de inicio de la transcripción. Allí, P-TEFb favorece la fosforilación de la Ser 2 de la Pol II (alrededor de 5 a 6 veces), produciendo la reanudación de la elongación transcripcional luego del tratamiento con estrógenos [171].

Por lo tanto, el reclutamiento de P-TEFb a *bcl-x* mediado por el PR podría tener un efecto sobre la elongación transcripcional de dos formas: tanto desfavoreciendo las pausas transcripcionales a lo largo del gen, por el desplazamiento de factores negativos de la elongación como NELF/DSIF como manteniendo el estado de fosforilación de la Pol II durante la elongación productiva (Figura 36). A su vez, estos efectos podrían estar actuando en paralelo con la apertura del contexto cromatínico asociada al reclutamiento de maquinaria modificadora de la cromatina mediado por el PR.

### DESAFVORECE PAUSAS TRANSCRIPCIONALES



### FAVORECE LA ELONGACIÓN TRANSCRIPCIONAL PRODUCTIVA

**Figura 36: Posible efecto del PR sobre la elongación transcripcional.** El PR puede desfavorecer el pausado de la Pol II a lo largo de los genes mediante el reclutamiento de P-TEFb, que favorece el desplazamiento de complejos de pausado como NELF y DSIF, y mediante el desplazamiento parcial de nucleosomas que acompaña el reclutamiento de las HATs CBP y GCN5. Este desplazamiento de nucleosomas también puede afectar la elongación productiva, así como también puede hacerlo el factor P-TEFb mediante la fosforilación de las Ser 2 del CTD.

La distribución de la Pol II a lo largo del gen *bcl-x* (detectada por ChIP-Seq) muestra que, en ausencia de estímulo, su abundancia es mayor en el exón 1 (en donde la densidad media de la Pol II es de 10 tag/10bp) que en el exón 2 (en donde la densidad media de la Pol II es de aproximadamente 7,5 tag/10bp) mientras que, luego del tratamiento hormonal,

ambos exones presentan una densidad media de aproximadamente 10 tag/10bp. De la misma manera, Kininis y colaboradores encontraron que los niveles basales de ocupancia de la Pol II en diversos genes que presentan PPEP, y que se inducen en respuesta al tratamiento con estrógenos, es significativamente menor 1Kb río abajo del inicio de la transcripción (TSS) que en el propio TSS. En cambio, luego del tratamiento hormonal, la ocupancia de esta enzima se incrementa en estas regiones a niveles similares a los detectados en los TSS. Estos resultados, podrían sugerir que el mecanismo de acción del PR sobre la elongación de *bcl-x* podría involucrar un efecto a “larga distancia” sobre la elongación temprana, favoreciendo la transición entre el estado de “pausado” de la Pol II y la elongación productiva. Sin embargo, nuestros resultados del análisis de la transcripción proximal y distal de *bcl-x*, nos indican que, al menos en parte, este no sería el mecanismo involucrado. En este caso, el amplicón proximal analizado se encuentra ubicado a casi 700 pb río abajo de la región de pausado de la Pol II proximal al promotor y, por lo tanto, si el efecto del PR sobre la elongación fuera únicamente favoreciendo la elongación temprana, no habríamos detectado cambios en la relación de los niveles de transcripción proximal y distal de este gen antes y después del tratamiento con R5020.

Al igual que lo descrito por Kininis y colaboradores, nuestros resultados indican que el control de la expresión de *bcl-x* mediado por el PR involucraría, mayoritariamente, la regulación de la actividad de la Pol II más que el reclutamiento de la misma a las regiones promotoras. La diferencia sería que, en este caso, el efecto del PR sería sobre la elongación transcripcional productiva a lo largo de *bcl-x* más que sobre la iniciación de la elongación a partir de la activación de la Pol II pausada en la región proximal al promotor.

Los SRs tanto como la Pol II elongadora se encontraron asociados a los complejos modificadores de la cromatina [83, 124, 125, 173-175] y al factor de la elongación P-TEFb [135, 170-171, 175], siendo capaces de reclutarlos a las regiones génicas de sus genes blanco. Por lo tanto, creemos que el reclutamiento detectado de CBP, GCN5 y P-TEFb a los sitios de

unión del PR en *bcl-x* en forma independiente de la elongación de la Pol II, aporta la evidencia necesaria para proponer que el reclutamiento de estos factores al ADN sería, al menos, parte del mecanismo por el cual el PR favorece la elongación de la Pol II.

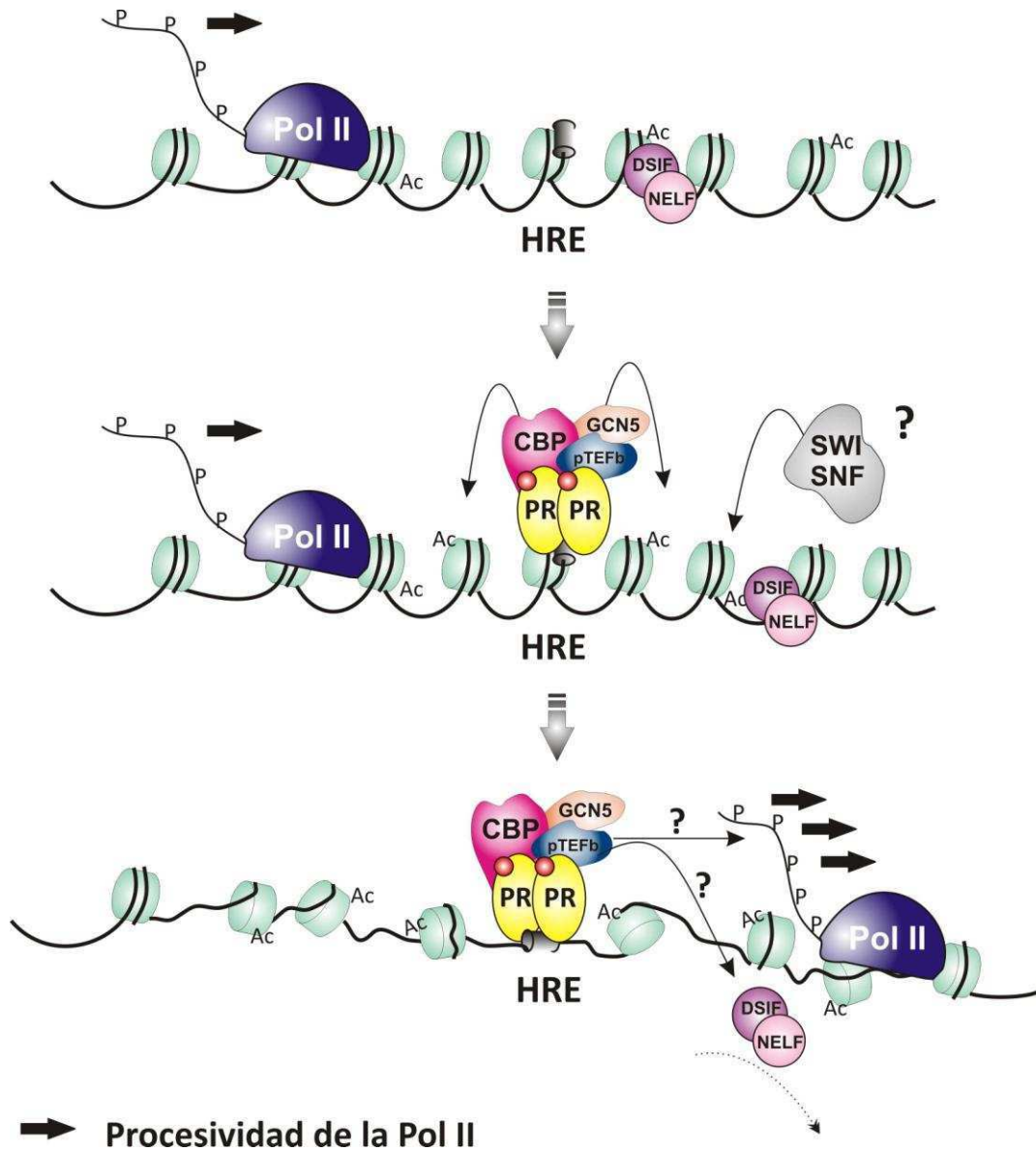
Más allá de la caracterizada interacción de los complejos modificadores de la cromatina y los SRs, hasta el momento, la interacción de estos receptores con el factor de la elongación P-TEFb, en forma endógena, fue descrita para el AR [135] y el ER [171, 176]. En el caso del ER, mientras que Wittmann y colaboradores demostraron que esta interacción es dependiente de ligando, Mirta y colaboradores encontraron que no lo es [171, 176]. Nuestros resultados de las co-inmunoprecipitaciones muestran que el PR también es capaz de interaccionar con P-TEFb, en células T47D, y que, al igual que encontraron Wittmann *et al* para el ER, el PR se encuentra unido basalmente a este factor regulador de la elongación pero esta unión se ve favorecida por la presencia de ligando. Por lo tanto, la interacción física entre el PR y P-TEFb, detectada en esta línea celular, suma una evidencia más a favor de que este factor positivo de la elongación estaría involucrado en los mecanismos de acción de los SRs sobre la transcripción de sus genes blanco.

La regulación de la Pol II se da mediante la modulación la tasa de elongación y/o de la procesividad de esta enzima, no obstante, en nuestras condiciones experimentales, no detectamos cambios en la velocidad de la Pol II en presencia del R5020. Por lo tanto, creemos que los cambios en la elongación de *bcl-x*, luego de la unión del PR a sus HREs internos, estaría afectando la procesividad de esta enzima, más que su tasa de elongación. En este sentido, Mason y Kevin Struhl demostraron que a pesar de que la tasa de elongación y la procesividad de la Pol II son parámetros asociados *in vivo*, también son afectados en forma independiente el uno del otro. Además, estos autores no encontraron ningún factor involucrado en la modulación de la velocidad de esta enzima y propusieron que este parámetro sería determinado intrínsecamente por la actividad enzimática de la Pol II [41]. Sin embargo, para poder concluir que la tasa de elongación transcripcional no se encuentra

afectada por el tratamiento hormonal creemos que es necesario realizar nuevos experimentos de aproximación de este parámetro, con una mayor resolución temporal.

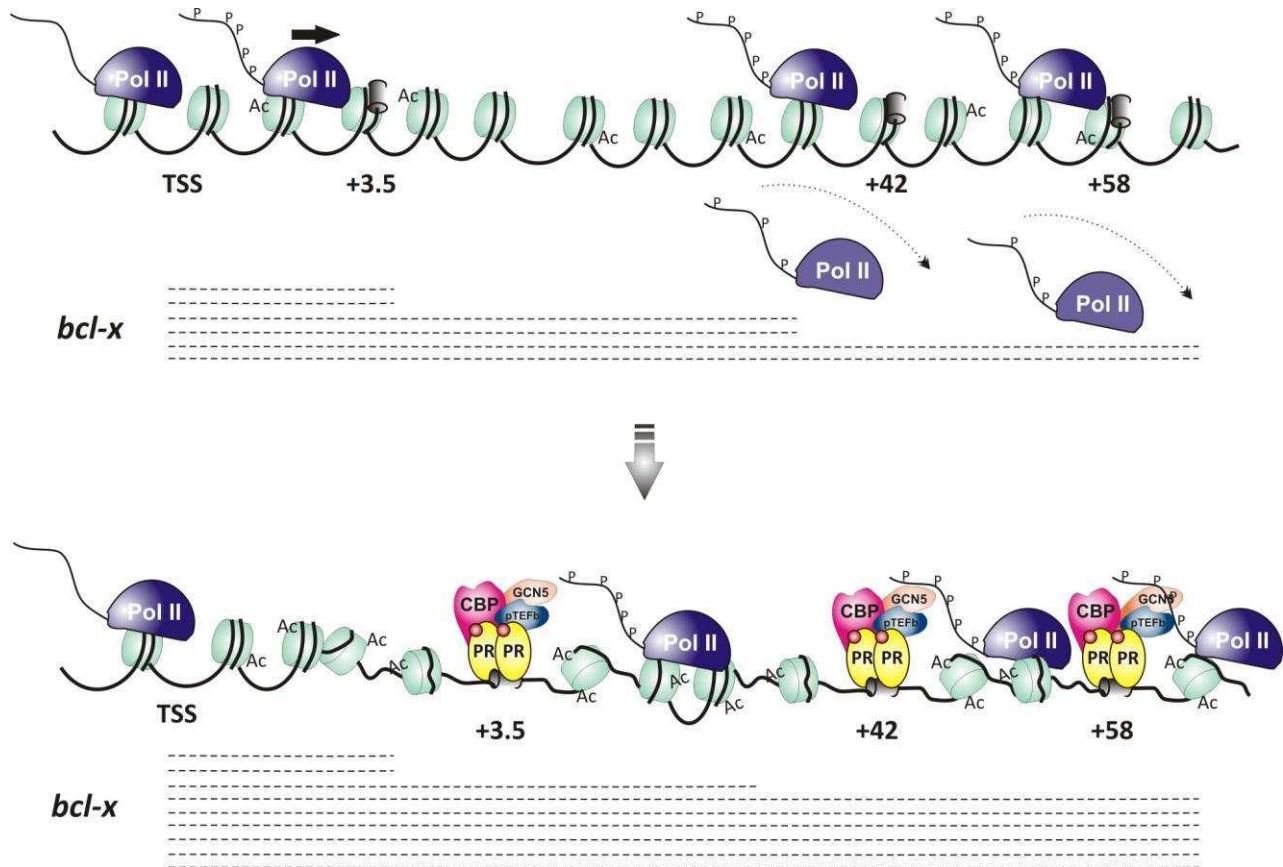
En resumen, a partir de los resultados presentados en esta tesis y los antecedentes del tema, proponemos que, luego de la adición del R5020 a las células T47D, el PR se une a los elementos de respuesta a hormona ubicados en regiones intragénicas del gen *bcl-x*. Este receptor reclutaría a las HATs CBP y GCN5 a estos sitios, las cuales catalizan la acetilación de las histonas y la consecuente desestabilización de la unión entre éstas y el ADN. Además, el desplazamiento parcial de los nucleosomas podría también estar asociado al reclutamiento del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, favoreciendo en conjunto, la relajación de la cromatina. A su vez, el PR recluta el factor positivo de la elongación P-TEFb a estos sitios, el cual es el principal responsable de la fosforilación de las serinas 2 del dominio CTD de la Pol II, así como también, induce el desplazamiento de factores negativos de este proceso (Ver modelo en la Figura 37).





**Figura 37: Modelo de los efectos del PR unido a un HRE intragénico.** El PR unido a un HREs intragénico recluta a las HATs CBP y GCN5 que podrían estar involucradas en la acetilación de las histonas y el consecuente remodelado de los nucleosomas en el cual, también podría participar el complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP SWI/SNF. A su vez, el PR recluta al factor positivo de la elongación P-TEFb que podría estar desfavoreciendo las pausas transcripcionales y/o manteniendo los niveles de fosforilación de la Pol II.

El efecto conjunto del PR unido a los distintos HREs de *bcl-x* podría explicar el aumento de la abundancia de la Pol II hacia la región 3' del gen y los cambios en la procesividad de esta enzima, luego del tratamiento con R5020 (Ver modelo en la Figura 38).



**Figura 38: Modelo del efecto del PR sobre la elongación transcripcional de *bcl-x*.** El gen *bcl-x* se encuentra basalmente activo. En esta condición, algunas ARN Polimerasas II transcriben el gen completo mientras que otras se desprenden del templado de ADN una vez iniciada la elongación productiva. Luego del tratamiento con R5020, el PR se une a los distintos HREs intragénicos, recluta a las HATs CBP y GCN5 y al factor de elongación P-TEFb y favorece la procesividad de la Pol II. De esta forma, un mayor número de Pol II que inician la transcripción de este gen, lo hacen en forma completa, disminuyendo el número de Pol II que se desprenden del molde de cromatina antes de llegar a la región de corte y poli A.

En este sentido, el PR unido a los demás sitios menores de unión presentes a lo largo del intrón de *bcl-x*, que no fueron analizados en este trabajo, podría estar actuando de la misma manera, generalizando este efecto a gran parte de la región interna de este gen. Estos HREs actuarían como posibles almacenes de servicio ubicados a lo largo de la extensa carretera que recorre la Pol II (Pecci *dixit*).

## 5. Regulación de la elongación en otros genes

La modulación de la elongación mediada por el PR podría ser un mecanismo común de regulación de la transcripción de todos los genes blanco de este receptor que posean sitios de unión en sus regiones intragénicas, que presenten una cierta actividad basal y que se induzcan mediante el tratamiento con R5020. Sin embargo, en este trabajo mostramos que existen respuestas transcripcionales diferentes asociadas a la inducción de la expresión génica por la acción del R5020, en células T47D, sobre algunos genes con estas características. En efecto, el tratamiento hormonal no produce cambios en la relación de la transcripción proximal y distal en el gen *tgfa* mientras que sí lo hace en los genes *igflr*, a favor de la transcripción proximal y en el gen *ern1*, a favor de la distal, como es el caso del efecto sobre el gen *bcl-x*. Estos datos nos indican que la acción del PR unido a sus sitios intragénicos puede también afectar las etapas tempranas de la transcripción, lo cual podría depender de otros factores como el contexto cromatínico pre-existente, la presencia basal de complejos y factores reguladores de la transcripción en cada uno de estos genes o la presencia de *loopings* transcripcionales asociados a la unión del PR a sus sitios intragénicos. Las diferencias encontradas también podrían deberse a la “calidad” del PR reclutado a sus sitios de unión, o sea, si este PR está activado o no y si presenta otras modificaciones post-traduccionales que favorezcan o perjudiquen su actividad y su capacidad de reclutar maquinaria modificadora de la cromatina y/o de factores de elongación, como por ejemplo, P-TEFb. Por lo tanto, es necesario un estudio exhaustivo de una diversidad de genes blanco de acción del PR para

poder profundizar nuestro conocimiento acerca de los distintos mecanismos de acción y las causas de las diferencias encontradas en los cambios de la transcripción proximal y distal de estos genes.

Además, dado que los SRs también tienen la capacidad de reclutar maquinaria modificadora que “cierra” la estructura de la cromatina a sus sitios de unión al ADN, podría resultar muy interesante estudiar si este efecto del PR sobre la elongación podría estar involucrado también en la modulación negativa de la transcripción génica. El reclutamiento local de esta maquinaria mediado al PR podría suponer un nuevo mecanismo por el cual la compactación parcial de la cromatina en las regiones intragénicas modulara la procesividad de la Pol II y así la transcripción completa de los pre-ARNm, disminuyendo su expresión, sin necesidad del silenciamiento completo del gen.

Los demás factores de transcripción actúan generalmente sobre las regiones promotoras y *enhancer* de sus genes blanco, en forma similar al mecanismo clásico de acción de los SRs [177]. Hace algunos años también se demostró que una diversidad de FTs, como por ejemplo NFκB, tienen la capacidad de reclutar al factor P-TEFb a sus sitios de unión en sus genes blanco [Revisado en 21]. Finalmente, el análisis genómico de los sitios de unión de algunos de estos FTs mostró, al igual que para los SRs y demás NRs, que una gran parte o la mayoría de sus sitios de unión al ADN se encuentran en regiones intragénicas [178-180]. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta tesis podrían abrir un nuevo campo de estudio en el análisis del efecto de otros factores de transcripción unidos a regiones intragénicas sobre la elongación de la Pol II.

## 6. Posibles efectos asociados a la regulación de la elongación transcripcional

Durante los últimos años, los estudios realizados a nivel genómico generaron un nuevo campo de estudio sobre el efecto de los SRs sobre la regulación transcripcional. El

primer gran descubrimiento fue que la mayor parte de los sitios de unión de estos receptores al ADN se encuentran en regiones intragénicas y no en las regiones promotoras y *enhancer* de sus genes blanco, como se creía anteriormente. El segundo gran aporte vino del descubrimiento de que los SRs son capaces de afectar la elongación transcripcional temprana como mecanismo rápido de acción ante un determinado estímulo hormonal. Los resultados presentados en este trabajo de tesis provienen del análisis conjunto de estos dos descubrimientos y podrían abrir aún más el campo de investigación sobre el efecto de los SRs sobre la transcripción génica. Algunas de las preguntas que surgen de este trabajo son: ¿Cuál es la función del reclutamiento local del factor de la elongación P-TEFb a los sitios intragénicos de unión de los SRs? ¿Qué otra maquinaria transcripcional estará siendo reclutada a estos sitios? ¿Podrán los SRs unidos a estas regiones internas de sus genes blanco reclutar también maquinaria involucrada en el procesamiento de los pre-ARNm? ¿O bien afectar indirectamente dicho procesamiento?

En este sentido, se sabe que la modulación de la elongación de la Pol II regula el *splicing* alternativo de una diversidad de genes (de la Mata et al., 2003). Por ejemplo, el tratamiento de las células con agentes que promueven la hiper-acetilación de las histonas o con siARNs interferentes (siARNs), dirigidos contra regiones intrónicas del gen *fibronectina* humano, afectan el estado de la cromatina en regiones intragénicas y, como consecuencia, el *splicing* alternativo de este gen [88, 89]. Así también, se encontró que el posicionamiento de los nucleosomas en cercanías a los sitios de *splicing* alternativo actúa como un modulador del reconocimiento de estos sitios durante el procesamiento co-transcripcional del pre-ARNm [181]. Por lo tanto, creemos que el efecto del PR sobre el estado de la cromatina en las regiones internas de sus genes blanco podría también modular la selección de los sitios de *splicing* alternativo de algunos genes.

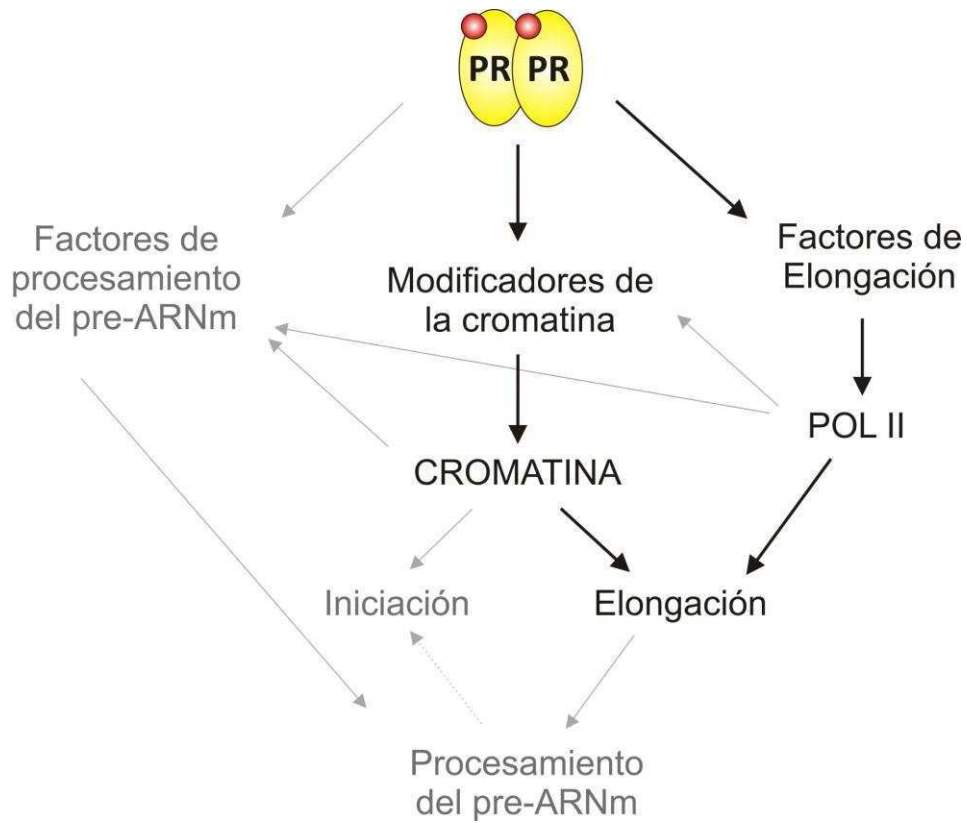
En el caso particular de *bcl-x*, el efecto del PR sobre la elongación de la Pol II, luego del tratamiento con R5020 en las células T47D, se ve acompañado por un cambio en la

relación de la expresión de ambas isoformas de este gen, a favor de la anti-apoptótica (*bcl-xL*). Este cambio en la expresión relativa de las isoformas sugiere un efecto del PR sobre la selección del sitio 5' alternativo de *splicing* que podría ser consecuencia de la mayor o más eficiente elongación de la Pol II, como consecuencia del tratamiento hormonal. En este mismo sentido, recientemente se demostró que el tratamiento de las células con UV reduce la eficiencia de la elongación de la Pol II y, como consecuencia, incrementa la proporción del ARN mensajero de la isoforma pro-apoptótica de bcl-x (*bcl-xC*) [182]. Por lo tanto, la eficiencia de elongación de la Pol II podría estar directamente asociada a la selección del sitio de *splicing* de este gen.

Sin embargo, además de afectar el procesamiento del pre-ARNm mediante cambios en el contexto cromatínico y en la elongación transcripcional, el PR podría estar reclutando maquinaria específica involucrada en dicho procesamiento. En este sentido, se demostró que el tratamiento con hormonas esteroideas puede afectar el *splicing* alternativo y la poliadenilación de los pre-ARNm de varios genes blanco de su acción mediante el reclutamiento de maquinaria involucrada en dichos procesos [183]. Hace algunos años se encontró que las proteínas CAPER, que funcionan como co-activadores de la transcripción de los SRs [184] también actúan como factores de *splicing* asociados a estos receptores [185]. El reclutamiento de esta maquinaria específica a las regiones intragénicas de los genes blanco de los SRs, podría adicionar un nivel de control de la expresión génica que actúe en conjunto a la modulación de la elongación y sus posibles efectos sobre el procesamiento del pre-ARNm.

Más aún, dado que todos los pasos de la transcripción se encuentran acoplados, los efectos de los SRs reclutados a sus sitios internos de unión podrían también afectar el proceso de *capping* y poliadenilación y como consecuencia, también tener un efecto sobre la reiniciación de la transcripción [95]. En este mismo sentido, el reclutamiento del factor P-TEFb podría regular y favorecer la afinidad de los factores de *capping*, *splicing* y

poliadenilación por la Pol II al aumentar o mantener la fosforilación de las Ser 2 de su CTD, regulando, así, el procesamiento del pre-ARNm [21].



**Figura 39: Modelo del acoplamiento entre el PR, los factores de elongación, procesamiento del pre-ARN mensajero y los demás pasos transcripcionales.** Esquema del acoplamiento existente entre los distintos factores y procesos transcripcionales. En negro se resaltan los efectos del PR estudiados en este trabajo de tesis.

En este trabajo de tesis proponemos que la modulación de la elongación transcripcional como consecuencia del reclutamiento local de co-factores a las regiones internas del gen *bcl-x* supondría un nuevo mecanismo de regulación de la expresión génica mediada por el PR. Estos resultados aportan una nueva evidencia a favor del efecto de los SRs sobre la elongación de la Pol II y abren nuevas preguntas asociadas a este reciente campo de investigación. Por lo tanto, son necesarios realizar una diversidad de experimentos adicionales, en distintos modelos de estudio, para seguir profundizando nuestro conocimiento sobre este nuevo mecanismo de acción.



# Resumen de resultados y conclusiones

---

- La inducción de la transcripción del gen *bcl-x* en células T47D por progestágenos (R5020) es a nivel transcripcional e independiente de la síntesis proteica.
- Esta inducción transcripcional es mediada por la unión del Receptor de Progesterona activado, mediante la fosforilación vía ERK de su Serina 294, a elementos de respuesta a hormona específicos que se encuentran localizados únicamente en regiones internas del gen *bcl-x*.
- El PR es capaz de reclutar maquinaria modificadora de la cromatina, como CBP y GCN5, y al factor positivo de la elongación P-TEFb, con los cuales interacciona en la línea celular T47D, a los HREs de *bcl-x* en forma independiente de la elongación de la Pol II.
- La unión del PR a estos sitios produce un aumento localizado en la acetilación de histonas y el desplazamiento parcial de nucleosomas.
- Estos efectos a nivel cromatínico están acompañados por un aumento en la abundancia de la Pol II hacia la región 3' del gen y por el cambio de la abundancia de la transcripción proximal y distal.

En su conjunto los resultados presentados en este trabajo sugieren que el PR es capaz de modular el proceso de elongación transcripcional, en forma endógena, mediante su unión directa a los HREs intragénicos ubicados en el gen *bcl-x* humano, luego del tratamiento con R5020. Este efecto sería debido a dos mecanismos complementarios que incluyen: i) la relajación del contexto cromatínico en la región interna del gen, mediada por el reclutamiento local de maquinaria modificadora de la cromatina y ii) el reclutamiento del factor positivo de la elongación P-TEFb a estas regiones. Por lo tanto, la modulación de la elongación de la Pol II a lo largo de los genes podría suponer un nuevo mecanismo de regulación de la expresión génica mediada por el PR.

# Bibliografía

---

1. Welboren, W.J., et al., *ChIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands*. EMBO J, 2009. **28**(10): p. 1418-28.
2. Makkonen, H., et al., *Long-range activation of FKBP51 transcription by the androgen receptor via distal intronic enhancers*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(12): p. 4135-48.
3. Paakinaho, V., et al., *Glucocorticoid receptor activates poised FKBP51 locus through long-distance interactions*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(3): p. 511-25.
4. Eilertsen, K.J., et al., *Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer*. Anim Reprod Sci, 2007. **98**(1-2): p. 129-46.
5. McClung, C.A. and E.J. Nestler, *Neuroplasticity mediated by altered gene expression*. Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(1): p. 3-17.
6. de la Serna, I.L., Y. Ohkawa, and A.N. Imbalzano, *Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodellers*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(6): p. 461-73.
7. Orphanides, G. and D. Reinberg, *A unified theory of gene expression*. Cell, 2002. **108**(4): p. 439-51.
8. Cairns, B.R., *Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(11): p. 989-96.
9. Saunders, A., L.J. Core, and J.T. Lis, *Breaking barriers to transcription elongation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 557-67.
10. Vicent, G.P., et al., *Minireview: role of kinases and chromatin remodeling in progesterone signaling to chromatin*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(11): p. 2088-98.
11. Wang, E.T., et al., *Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes*. Nature, 2008. **456**(7221): p. 470-6.
12. Cole, M.D. and V.H. Cowling, *Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(10): p. 810-5.
13. de la Mata, M., et al., *RNA Polymerase II Elongation at the Crossroads of Transcription and Alternative Splicing*. Genet Res Int, 2011. **2011**: p. 309865.
14. Komili, S. and P.A. Silver, *Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(1): p. 38-48.
15. Palancade, B. and O. Bensaude, *Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation*. Eur J Biochem, 2003. **270**(19): p. 3859-70.
16. Cai, H. and D.S. Luse, *Transcription initiation by RNA polymerase II in vitro. Properties of preinitiation, initiation, and elongation complexes*. J Biol Chem, 1987. **262**(1): p. 298-304.
17. Dvir, A., *Promoter escape by RNA polymerase II*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1577**(2): p. 208-223.

18. Taatjes, D.J., M.T. Marr, and R. Tjian, *Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 403-10.
19. Akoulitchev, S., et al., *Requirement for TFIIF kinase activity in transcription by RNA polymerase II*. Nature, 1995. **377**(6549): p. 557-60.
20. Rasmussen, E.B. and J.T. Lis, *In vivo transcriptional pausing and cap formation on three Drosophila heat shock genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 7923-7.
21. Peterlin, B.M. and D.H. Price, *Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb*. Mol Cell, 2006. **23**(3): p. 297-305.
22. Wada, T., et al., *DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs*. Genes Dev, 1998. **12**(3): p. 343-56.
23. Yamaguchi, Y., et al., *NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation*. Cell, 1999. **97**(1): p. 41-51.
24. Sims, R.J., 3rd, R. Belotserkovskaya, and D. Reinberg, *Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it*. Genes Dev, 2004. **18**(20): p. 2437-68.
25. Peng, J., et al., *Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb*. Genes Dev, 1998. **12**(5): p. 755-62.
26. Mancebo, H.S., et al., *P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro*. Genes Dev, 1997. **11**(20): p. 2633-44.
27. Singh, J. and R.A. Padgett, *Rates of in situ transcription and splicing in large human genes*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(11): p. 1128-33.
28. Tennyson, C.N., H.J. Klamut, and R.G. Worton, *The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced*. Nat Genet, 1995. **9**(2): p. 184-90.
29. Femino, A.M., et al., *Visualization of single molecules of mRNA in situ*. Methods Enzymol, 2003. **361**: p. 245-304.
30. Darzacq, X., et al., *In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(9): p. 796-806.
31. Maiuri, P., et al., *Fast transcription rates of RNA polymerase II in human cells*. EMBO Rep, 2011. **12**(12): p. 1280-5.
32. Schwabish, M.A. and K. Struhl, *The Swi/Snf complex is important for histone eviction during transcriptional activation and RNA polymerase II elongation in vivo*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(20): p. 6987-95.
33. Price, D.H., *P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(8): p. 2629-34.
34. Renner, D.B., et al., *A highly purified RNA polymerase II elongation control system*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42601-9.

35. Selth, L.A., S. Sigurdsson, and J.Q. Svejstrup, *Transcript Elongation by RNA Polymerase II*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 271-93.
36. Bengal, E., et al., *Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1195-206.
37. Rondon, A.G., et al., *Molecular evidence that the eukaryotic THO/TREX complex is required for efficient transcription elongation*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 39037-43.
38. Rondon, A.G., et al., *Molecular evidence for a positive role of Spt4 in transcription elongation*. EMBO J, 2003. **22**(3): p. 612-20.
39. Morillon, A., et al., *Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II*. Cell, 2003. **115**(4): p. 425-35.
40. Shilatifard, A., et al., *An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene*. Science, 1996. **271**(5257): p. 1873-6.
41. Mason, P.B. and K. Struhl, *Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo*. Mol Cell, 2005. **17**(6): p. 831-40.
42. Roberts, J.W., et al., *Antitermination by bacteriophage lambda Q protein*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1998. **63**: p. 319-25.
43. Jurica, M.S. and M.J. Moore, *Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins*. Mol Cell, 2003. **12**(1): p. 5-14.
44. Hansen, J.C., et al., *Homogeneous reconstituted oligonucleosomes, evidence for salt-dependent folding in the absence of histone H1*. Biochemistry, 1989. **28**(23): p. 9129-36.
45. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
46. Turner, B.M., *Histone acetylation and an epigenetic code*. Bioessays, 2000. **22**(9): p. 836-45.
47. Richards, E.J. and S.C. Elgin, *Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects*. Cell, 2002. **108**(4): p. 489-500.
48. Agalioti, T., G. Chen, and D. Thanos, *Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene*. Cell, 2002. **111**(3): p. 381-92.
49. Hassan, A.H., et al., *Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes*. Cell, 2002. **111**(3): p. 369-79.
50. Kasten, M., et al., *Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14*. EMBO J, 2004. **23**(6): p. 1348-59.
51. Krebs, J.E., et al., *Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene*. Genes Dev, 1999. **13**(11): p. 1412-21.
52. Dhalluin, C., et al., *Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain*. Nature, 1999. **399**(6735): p. 491-6.
53. Shahbazian, M.D. and M. Grunstein, *Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 75-100.

54. Clayton, A.L., C.A. Hazzalin, and L.C. Mahadevan, *Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective*. Mol Cell, 2006. **23**(3): p. 289-96.
55. Rice, J.C., et al., *Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1591-8.
56. Clapier, C.R. and B.R. Cairns, *The biology of chromatin remodeling complexes*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 273-304.
57. Ahmad, K. and S. Henikoff, *Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99 Suppl 4**: p. 16477-84.
58. Zhang, H., D.N. Roberts, and B.R. Cairns, *Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss*. Cell, 2005. **123**(2): p. 219-31.
59. Winston, F. and C.D. Allis, *The bromodomain: a chromatin-targeting module?* Nat Struct Biol, 1999. **6**(7): p. 601-4.
60. Park, Y.J. and K. Luger, *Structure and function of nucleosome assembly proteins*. Biochem Cell Biol, 2006. **84**(4): p. 549-58.
61. Reinberg, D. and R.J. Sims, 3rd, *de FACTo nucleosome dynamics*. J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23297-301.
62. Lorch, Y., B. Maier-Davis, and R.D. Kornberg, *Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3090-3.
63. Swaminathan, V., et al., *Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7534-45.
64. Ito, T., et al., *p300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone*. Genes Dev, 2000. **14**(15): p. 1899-907.
65. Soller, M., *Pre-messenger RNA processing and its regulation: a genomic perspective*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(7-8): p. 796-819.
66. Maniatis, T. and R. Reed, *An extensive network of coupling among gene expression machines*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 499-506.
67. Proudfoot, N., *Connecting transcription to messenger RNA processing*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(6): p. 290-3.
68. Proudfoot, N.J., A. Furger, and M.J. Dye, *Integrating mRNA processing with transcription*. Cell, 2002. **108**(4): p. 501-12.
69. Hirose, Y. and J.L. Manley, *RNA polymerase II and the integration of nuclear events*. Genes Dev, 2000. **14**(12): p. 1415-29.
70. Misteli, T. and D.L. Spector, *RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo*. Mol Cell, 1999. **3**(6): p. 697-705.
71. Gornemann, J., et al., *Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex*. Mol Cell, 2005. **19**(1): p. 53-63.

72. Kotovic, K.M., et al., *Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(16): p. 5768-79.
73. Listerman, I., A.K. Sapra, and K.M. Neugebauer, *Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(9): p. 815-22.
74. Luco, R.F., et al., *Regulation of alternative splicing by histone modifications*. Science, 2010. **327**(5968): p. 996-1000.
75. Spies, N., et al., *Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons*. Mol Cell, 2009. **36**(2): p. 245-54.
76. Formosa, T., et al., *Defects in SPT16 or POB3 (yFACT) in Saccharomyces cerevisiae cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure*. Genetics, 2002. **162**(4): p. 1557-71.
77. Nourani, A., F. Robert, and F. Winston, *Evidence that Spt2/Sin1, an HMG-like factor, plays roles in transcription elongation, chromatin structure, and genome stability in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(4): p. 1496-509.
78. Simic, R., et al., *Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes*. EMBO J, 2003. **22**(8): p. 1846-56.
79. Corey, L.L., et al., *Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation*. Genes Dev, 2003. **17**(11): p. 1392-401.
80. Protacio, R.U., et al., *Effects of histone tail domains on the rate of transcriptional elongation through a nucleosome*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(23): p. 8866-78.
81. Govind, C.K., et al., *Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions*. Mol Cell, 2007. **25**(1): p. 31-42.
82. Ginsburg, D.S., C.K. Govind, and A.G. Hinnebusch, *NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gcn5*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(24): p. 6473-87.
83. Cho, H., et al., *A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5355-63.
84. Carey, M., B. Li, and J.L. Workman, *RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation*. Mol Cell, 2006. **24**(3): p. 481-7.
85. Subtil-Rodriguez, A. and J.C. Reyes, *BRG1 helps RNA polymerase II to overcome a nucleosomal barrier during elongation, in vivo*. EMBO Rep, 2010. **11**(10): p. 751-7.
86. Schwabish, M.A. and K. Struhl, *Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell, 2006. **22**(3): p. 415-22.
87. Kornblihtt, A.R., *Coupling transcription and alternative splicing*. Adv Exp Med Biol, 2007. **623**: p. 175-89.



88. Schor, I.E., M. Allo, and A.R. Kornblihtt, *Intragenic chromatin modifications: A new layer in alternative splicing regulation*. Epigenetics, 2010. **5**(3).
89. Allo, M., et al., *Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(7): p. 717-24.
90. Andersson, R., et al., *Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications*. Genome Res, 2009. **19**(10): p. 1732-41.
91. Kolasinska-Zwierz, P., et al., *Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3*. Nat Genet, 2009. **41**(3): p. 376-81.
92. Schwartz, S., E. Meshorer, and G. Ast, *Chromatin organization marks exon-intron structure*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(9): p. 990-5.
93. Damgaard, C.K., et al., *A 5' splice site enhances the recruitment of basal transcription initiation factors in vivo*. Mol Cell, 2008. **29**(2): p. 271-8.
94. Fong, Y.W. and Q. Zhou, *Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation*. Nature, 2001. **414**(6866): p. 929-33.
95. Wang, Y., J.A. Fairley, and S.G. Roberts, *Phosphorylation of TFIIB links transcription initiation and termination*. Curr Biol, 2010. **20**(6): p. 548-53.
96. Smith, C.L. and B.W. O'Malley, *Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators*. Endocr Rev, 2004. **25**(1): p. 45-71.
97. Lonard, D.M. and B.W. O'Malley, *Expanding functional diversity of the coactivators*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(3): p. 126-32.
98. Jenkins, B.D., C.B. Pullen, and B.D. Darimont, *Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms*. Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(3): p. 122-6.
99. Moore, J.T., J.L. Collins, and K.H. Pearce, *The nuclear receptor superfamily and drug discovery*. ChemMedChem, 2006. **1**(5): p. 504-23.
100. Defranco, D.B., et al., *Nucleocytoplasmic shuttling of steroid receptors*. Vitam Horm, 1995. **51**: p. 315-38.
101. Puca, G.A., et al., *Interaction between estrogen receptor and subcellular structures of target cells: nuclear localization of unoccupied receptor and its modification induced by estradiol*. Ann N Y Acad Sci, 1986. **464**: p. 168-89.
102. Press, M.F. and G.L. Greene, *Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progesterin receptor*. Endocrinology, 1988. **122**(3): p. 1165-75.
103. Picard, D. and K.R. Yamamoto, *Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor*. EMBO J, 1987. **6**(11): p. 3333-40.
104. Jenster, G., J. Trapman, and A.O. Brinkmann, *Nuclear import of the human androgen receptor*. Biochem J, 1993. **293** ( Pt 3): p. 761-8.
105. Wehling, M., *Specific, nongenomic actions of steroid hormones*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 365-93.

106. Croxtall, J.D., Q. Choudhury, and R.J. Flower, *Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(2): p. 289-98.
107. Falkenstein, E., A.W. Norman, and M. Wehling, *Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s)*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(5): p. 2072-5.
108. Hafezi-Moghadam, A., et al., *Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase*. Nat Med, 2002. **8**(5): p. 473-9.
109. Castoria, G., et al., *PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells*. EMBO J, 2001. **20**(21): p. 6050-9.
110. Migliaccio, A., et al., *Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells*. EMBO J, 1996. **15**(6): p. 1292-300.
111. Ballare, C., et al., *Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 1994-2008.
112. Boonyaratanakornkit, V., et al., *Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases*. Mol Cell, 2001. **8**(2): p. 269-80.
113. Boonyaratanakornkit, V., et al., *The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(2): p. 359-75.
114. Rogatsky, I., J.M. Trowbridge, and M.J. Garabedian, *Potential of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22296-302.
115. Faivre, E., et al., *Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators*. Steroids, 2005. **70**(5-7): p. 418-26.
116. Srinivas, H., et al., *Akt phosphorylates and suppresses the transactivation of retinoic acid receptor alpha*. Biochem J, 2006. **395**(3): p. 653-62.
117. Pierson-Mullany, L.K. and C.A. Lange, *Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(24): p. 10542-57.
118. Moore, N.L., R. Narayanan, and N.L. Weigel, *Cyclin dependent kinase 2 and the regulation of human progesterone receptor activity*. Steroids, 2007. **72**(2): p. 202-9.
119. Zhang, Y., et al., *Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(8): p. 1029-40.

120. Vicent, G.P., et al., *Induction of progesterone target genes requires activation of Erk and Msk kinases and phosphorylation of histone H3*. Mol Cell, 2006. **24**(3): p. 367-81.
121. Necela, B.M. and J.A. Cidlowski, *Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells*. Proc Am Thorac Soc, 2004. **1**(3): p. 239-46.
122. McKenna, N.J. and B.W. O'Malley, *SnapShot: NR coregulators*. Cell, 2010. **143**(1): p. 172-172 e1.
123. Carroll, J.S., et al., *Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1*. Cell, 2005. **122**(1): p. 33-43.
124. Deroo, B.J. and T.K. Archer, *Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3039-46.
125. Fryer, C.J. and T.K. Archer, *Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex*. Nature, 1998. **393**(6680): p. 88-91.
126. Chen, L., et al., *Genomic analysis of glucocorticoid-regulated promoters in murine T-lymphoma cells*. Recent Prog Horm Res, 2003. **58**: p. 155-74.
127. Horie-Inoue, K., et al., *Identification of novel steroid target genes through the combination of bioinformatics and functional analysis of hormone response elements*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(1): p. 99-106.
128. Nielsen, R., et al., *Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis*. Genes Dev, 2008. **22**(21): p. 2953-67.
129. Hamza, M.S., et al., *De-novo identification of PPARgamma/RXR binding sites and direct targets during adipogenesis*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4907.
130. So, A.Y., et al., *Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor*. PLoS Genet, 2007. **3**(6): p. e94.
131. Carroll, J.S., et al., *Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites*. Nat Genet, 2006. **38**(11): p. 1289-97.
132. Wang, Q., et al., *A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth*. Mol Cell, 2007. **27**(3): p. 380-92.
133. De Bosscher, K. and G. Haegeman, *Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(3): p. 281-91.
134. Bulger, M. and M. Groudine, *Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation*. Genes Dev, 1999. **13**(19): p. 2465-77.
135. Lee, D.K., H.O. Duan, and C. Chang, *Androgen receptor interacts with the positive elongation factor P-TEFb and enhances the efficiency of transcriptional elongation*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 9978-84.
136. Kininis, M., et al., *Postrecruitment regulation of RNA polymerase II directs rapid signaling responses at the promoters of estrogen target genes*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(5): p. 1123-33.

137. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
138. Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1899-911.
139. Viegas, L.R., et al., *Steroid hormones induce bcl-X gene expression through direct activation of distal promoter P4*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9831-9.
140. Moore, M.R., J.L. Conover, and K.M. Franks, *Progesterone effects on long-term growth, death, and Bcl-xL in breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(3): p. 650-4.
141. Wang, Q., et al., *Equilibrium interactions of corepressors and coactivators with agonist and antagonist complexes of glucocorticoid receptors*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(6): p. 1376-95.
142. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
143. Kassel, O. and P. Herrlich, *Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **275**(1-2): p. 13-29.
144. Gomes, N.P., et al., *Gene-specific requirement for P-TEFb activity and RNA polymerase II phosphorylation within the p53 transcriptional program*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 601-12.
145. Chodosh, L.A., et al., *5,6-Dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription elongation by RNA polymerase II in vitro*. J Biol Chem, 1989. **264**(4): p. 2250-7.
146. Core, L.J. and J.T. Lis, *Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II*. Science, 2008. **319**(5871): p. 1791-2.
147. Boehm, A.K., et al., *Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7628-37.
148. de la Mata, M., et al., *A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo*. Mol Cell, 2003. **12**(2): p. 525-32.
149. Kadauke, S. and G.A. Blobel, *Chromatin loops in gene regulation*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1789**(1): p. 17-25.
150. Kurukuti, S., et al., *CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(28): p. 10684-9.
151. Tolhuis, B., et al., *Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus*. Mol Cell, 2002. **10**(6): p. 1453-65.
152. Dekker, J., et al., *Capturing chromosome conformation*. Science, 2002. **295**(5558): p. 1306-11.
153. Cullen, K.E., M.P. Kladd, and M.A. Seyfred, *Interaction between transcription regulatory regions of prolactin chromatin*. Science, 1993. **261**(5118): p. 203-6.
154. Carter, D., et al., *Long-range chromatin regulatory interactions in vivo*. Nat Genet, 2002. **32**(4): p. 623-6.

155. Kireeva, M.L., et al., *Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II*. Mol Cell, 2005. **18**(1): p. 97-108.
156. Voliotis, M., et al., *Fluctuations, pauses, and backtracking in DNA transcription*. Biophys J, 2008. **94**(2): p. 334-48.
157. Saha, A., J. Wittmeyer, and B.R. Cairns, *Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(6): p. 437-47.
158. Ostlund Farrants, A.K., et al., *Glucocorticoid receptor-glucocorticoid response element binding stimulates nucleosome disruption by the SWI/SNF complex*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(2): p. 895-905.
159. Wallberg, A.E., et al., *Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor tau1 activation domain*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(6): p. 2004-13.
160. Garcia-Pedrero, J.M., et al., *The SWI/SNF chromatin remodeling subunit BAF57 is a critical regulator of estrogen receptor function in breast cancer cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22656-64.
161. Rayasam, G.V., et al., *Ligand-specific dynamics of the progesterone receptor in living cells and during chromatin remodeling in vitro*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(6): p. 2406-18.
162. Formosa, T., *FACT and the reorganized nucleosome*. Mol Biosyst, 2008. **4**(11): p. 1085-93.
163. Jimeno-Gonzalez, S., et al., *A gene-specific requirement for FACT during transcription is related to the chromatin organization of the transcribed region*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(23): p. 8710-21.
164. Pazin, M.J. and J.T. Kadonaga, *SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions?* Cell, 1997. **88**(6): p. 737-40.
165. Glass, C.K. and M.G. Rosenfeld, *The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 121-41.
166. Daniel, A.R., et al., *The progesterone receptor hinge region regulates the kinetics of transcriptional responses through acetylation, phosphorylation, and nuclear retention*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(11): p. 2126-38.
167. Muse, G.W., et al., *RNA polymerase is poised for activation across the genome*. Nat Genet, 2007. **39**(12): p. 1507-11.
168. Zeitlinger, J., et al., *RNA polymerase stalling at developmental control genes in the Drosophila melanogaster embryo*. Nat Genet, 2007. **39**(12): p. 1512-6.
169. Core, L.J., J.J. Waterfall, and J.T. Lis, *Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters*. Science, 2008. **322**(5909): p. 1845-8.
170. Palangat, M., et al., *A negative elongation factor for human RNA polymerase II inhibits the anti-arrest transcript-cleavage factor TFIIS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(42): p. 15036-41.

171. Mitra, P., et al., *Estrogen receptor-alpha recruits P-TEFb to overcome transcriptional pausing in intron 1 of the MYB gene*. Nucleic Acids Res, 2012.
172. Kowalczyk, M.S., et al., *Intragenic enhancers act as alternative promoters*. Mol Cell, 2012. **45**(4): p. 447-58.
173. Wittschieben, B.O., et al., *A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme*. Mol Cell, 1999. **4**(1): p. 123-8.
174. Otero, G., et al., *Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation*. Mol Cell, 1999. **3**(1): p. 109-18.
175. Obrdlik, A., et al., *The histone acetyltransferase PCAF associates with actin and hnRNP U for RNA polymerase II transcription*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(20): p. 6342-57.
176. Wittmann, B.M., et al., *The breast cell growth inhibitor, estrogen down regulated gene 1, modulates a novel functional interaction between estrogen receptor alpha and transcriptional elongation factor cyclin T1*. Oncogene, 2005. **24**(36): p. 5576-88.
177. Kadonaga, J.T., *Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines*. Cell, 1998. **92**(3): p. 307-13.
178. Rao, N.A., et al., *Coactivation of GR and NFkB alters the repertoire of their binding sites and target genes*. Genome Res, 2011. **21**(9): p. 1404-16.
179. Motallebipour, M., et al., *Differential binding and co-binding pattern of FOXA1 and FOXA3 and their relation to H3K4me3 in HepG2 cells revealed by ChIP-seq*. Genome Biol, 2009. **10**(11): p. R129.
180. Tallack, M.R., et al., *A global role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells*. Genome Res, 2010. **20**(8): p. 1052-63.
181. Tilgner, H., et al., *Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(9): p. 996-1001.
182. Munoz, M.J., et al., *DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation*. Cell, 2009. **137**(4): p. 708-20.
183. Auboeuf, D., et al., *Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators*. Science, 2002. **298**(5592): p. 416-9.
184. Jung, D.J., et al., *Molecular cloning and characterization of CAPER, a novel coactivator of activating protein-1 and estrogen receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1229-34.
185. Dowhan, D.H., et al., *Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta*. Mol Cell, 2005. **17**(3): p. 429-39.