



Universidad de Buenos Aires



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

EXPRESIÓN DEL GEN bcl-X DE RATÓN DEPENDIENTE DE HORMONAS
ESTEROIDEAS DURANTE EL PROCESO DE APOPTOSIS

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

LUCIANA ROCHA VIEGAS

Directores: DRA. ADALI PECCI

DR. MIGUEL BEATO

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) Philipps Universität, Marburg, Alemania y Centre de Regulació Genòmica (CRG), Barcelona, España.

Buenos Aires, 2005



Universidad de Buenos Aires



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

HORMONE-DEPENDENT MOUSE ***bcl-X*** GENE EXPRESSION

DURING APOPTOSIS

Doctoral Dissertation

LUCIANA ROCHA VIEGAS

Advisors: DRA. ADALI PECCI

DR. MIGUEL BEATO

Laboratory: Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) Philipps Universität, Marburg, Alemania y Centre de Regulació Genòmica (CRG), Barcelona, España.

Buenos Aires, 2005

RESUMEN

bcl-X es uno de los miembros de la familia de genes *bcl-2* involucrados en el proceso de apoptosis. Codifica para al menos 6 isoformas proteicas con funciones opuestas sobre la muerte celular. Los glucocorticoides y los progestágenos controlan la expresión de *bcl-X* y afectan la relación *bcl-X_L* (anti-apoptótico)/*bcl-X_C* (pro-apoptótico) en diferentes tejidos. El gen *bcl-X* de ratón contiene al menos 5 promotores, que exhiben un patrón de activación específico de tejido. En este trabajo se estudió el efecto de glucocorticoides y progestágenos sobre la regulación de la actividad de los distintos promotores del gen. En el promotor 4 (P4) se describieron dos elementos de respuesta a hormona (HREs), que unen el receptor de glucocorticoides o de progesterona *in vitro*. Los niveles de transcritos provenientes de P4 y los de *bcl-X_L* aumentaron luego del tratamiento hormonal en células epiteliales mamarias de ratón, donde ambas hormonas previenen la apoptosis. Con el fin de evaluar si un mecanismo similar está involucrado en la regulación hormonal de tejidos donde los glucocorticoides inducen apoptosis, se llevaron a cabo análisis *in vivo* en timocitos de ratones tratados con dexametasona y en células linfoides en cultivo. Los glucocorticoides inhibieron la transcripción a partir de P4 y disminuyeron la relación *bcl-X_L*/*bcl-X_C* favoreciendo la apoptosis a través del reclutamiento del factor STAT5B. En resumen, *bcl-X* es uno de los genes blanco de esteroides, cuya expresión diferencial en distintos tipos celulares mediaría los efectos tanto anti- como pro-apoptóticos de las hormonas esteroideas. Los resultados observados en esta tesis contribuyen a la comprensión de la bases moleculares de la apoptosis dependiente de hormonas.

ABSTRACT

bcl-X is one of the members of *bcl-2* family genes that is involved in apoptosis. It codifies for at least six different isoforms, some of them with opposite effects on programmed cell death. Glucocorticoids and progestins control *bcl-X* expression and influence the ratio between *bcl-X_L* (antiapoptotic) and *bcl-X_S* (proapoptotic) isoforms in different tissues. The mouse *bcl-X* gene contains at least five different promoters, which exhibit a tissue-specific pattern of promoter usage. Here we explore the potential of the various *bcl-X* gene promoters to be regulated by glucocorticoids or progestins. We found that promoter 4 (P4) contains two hormone response elements (HREs), which bind glucocorticoid (GR)- or progesterone (PR) -receptor *in vitro*. Analysis of the endogenous gene expression showed that transcription from P4 and *bcl-X_L* mRNA are increased upon steroid treatment in mouse epithelial mammary cells, where both hormones prevent apoptosis. In order to test whether a similar mechanism is involved in the hormonal regulation of tissues where glucocorticoids induce apoptosis, we performed *in vivo* analysis of *bcl-X* expression on thymocytes of mice treated with dexamethasone and on lymphoid cells in culture. We showed that glucocorticoids inhibit transcription from the P4 promoter and decrease the ratio *bcl-X_L*/*bcl-X_S* favoring apoptosis through the GR-mediated recruitment of STAT5B factor. In summary, *bcl-X* is at least one steroid-target gene, whose differential expression in different cell types is involved on both antiapoptotic and proapoptotic effects of steroid hormones. The results observed in this thesis may contribute to the understanding of the molecular basis of hormone-dependent apoptosis.

AGRADECIMIENTOS

- a Adali, por seguir dándome ese empuje, esa confianza y ese entusiasmo enormes como el primer día. Por no dejar de divertirme aún a la distancia y hacer que nos una más que una relación jefa-becaria. Siempre estuve y sigo estando orgullosa de vos.
- a Miguel, por aceptarme en tu laboratorio marburgúes primero y barcelonés después. Por confiar en mí, transmitirme tu experiencia y discutir los resultados con tantas ganas.
- a Guille, por hacerme ver los efectos genómicos cuando sólo buscábamos quinasas y enseñarme a demostrarlos en la mesada. Por darle comienzo a este trabajo y estar siempre al pie del cañon cuando te necesité. Por tantos mililitros que me diste y cómo me hiciste reír día a día ¡Fue un placer laburar con vos!
- a Cecita, por su incansable ayuda para evacuar todas mis dudas, enseñarme los trucos del clonado y estar siempre dispuesta a escucharme. Y por adoptarme en Barcelona!
- a Guille, Silvinita, Ignacio, Pauli y Cecita, por hacerme sentir como en casa a miles de km de Bs. As y compartir conmigo tan lindos momentos.
- al CONICET, que confió en mí al darme esta beca mixta y lo siguió haciendo cuando el país se vino abajo al comenzar todo esto.
- A la DAAD por la beca que me permitió estar de local en mi primera vez en Alemania, que no es poco.
- al Regya y al p83/85 por hacer más llevaderas las largas horas de laboratorio y tener ganas de volver al día siguiente.

- a los Hills y demás amigos que, desparramados por el mundo, nunca dejaron de estar al lado mío.
- a mis viejos, abuelos y a Fede, por acompañarme todo el tiempo, dándome el apoyo que siempre necesité aca y allá.
- a todos aquéllos que siguieron ésto de cerca y que no terminaría nunca de nombrar.
- Y finalmente a Ale, a quién le dedico esta tesis, por compartir mi vida, por aguantar tantas despedidas y separaciones, y sobre todo porque escribir la tesis sintiendo estas pataditas fue hermoso.

PUBLICACIONES

- "Steroid hormones induce *bcl-X* gene expression through direct activation of distal promoter P4", L.Rocha Viegas, GP. Vicent, J.L. Barañao, M. Beato and A. Pecci. J Biol Chem. 2004 Mar 12;279(11):9831-9. Epub 2003 Dec 16
- "Glucocorticoids repress *bcl-X_L* expression in mouse thymocytes through the recruitment of STAT5B to the P4 promoter region". L. Rocha Viegas, G.P. Vicent, J.L. Barañao M. Beato and A. Pecci. Enviado a Mol Cell Biol.

Este trabajo fue financiado por:

Fundación Antorchas

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

CONICET

Universidad de Buenos Aires

Ministerio de Salud, Beca Ramón Carrillo-Arturo Oñativia

Ministerio de Ciencia y Tecnología Español

Ministerio de Sanidad Español

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	10
INTRODUCCIÓN	11
➤ Caminos de señalización involucrados en la apoptosis.....	13
➤ Proteínas de la familia de Bcl-2.....	16
➤ El gen <i>bcl-X</i> y sus distintos productos proteicos	18
➤ Estructura genómica de <i>bcl-X</i>	20
➤ Regulación de la expresión de <i>bcl-X</i>	23
➤ Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas	25
➤ Esteroides y apoptosis, especificidad tisular	
Inducción de la apoptosis por hormonas esteroideas	32
Prevención de la apoptosis por hormonas esteroideas	36
➤ Regulación de la expresión de <i>bcl-X</i> por esteroides	38
➤ OBJETIVOS	38
MATERIALES Y MÉTODOS	
➤ Esteroides y reactivos	41
➤ Vectores de expresión.	41
➤ Cultivos celulares y transfecciones transitorias.....	43
➤ Tratamiento de los animales.	44
➤ Análisis <i>in silico</i>	45
➤ Ensayos de retardo en gel (EMSA)	46
➤ Ensayos de metilación con dimetil sulfato.....	47
➤ Preparación y análisis del ARN.	47
➤ Experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	51
➤ Western Blots	53
➤ Estadística.....	53
RESULTADOS-CAPÍTULO 1	
➤ La región promotora P4 del gen <i>bcl-X</i> de ratón contiene elementos de respuesta a hormonas esteroideas (HREs).	55
➤ Análisis de la funcionalidad de los HREs.	61
➤ Los HREs son necesarios para conferirle a P4 respuesta a esteroides.....	67
RESULTADOS-CAPÍTULO 2	
➤ La dexametasona aumenta los niveles de los transcritos de <i>bcl-X</i> en células de epitelio mamario y los disminuye en timocitos.	69
➤ Los glucocorticoides activan la transcripción de P4 en células de epitelio mamario y la inhiben en timocitos.....	72
➤ Reclutamiento <i>in vivo</i> del GR a la región P4 en respuesta a los glucocorticoides.	77
➤ El STAT5B inhibe la actividad de P4 inducida por glucocorticoides.....	79
➤ Expresión diferencial de factores STAT5 y unión al elemento de respuesta en P4	82
➤ Reclutamiento <i>in vivo</i> del STAT5A y del STAT5B a la región P4 en células de mama y timo.....	85
➤ Mecanismo molecular involucrado en la represión transcripcional de P4 mediada por el STAT5B.	88
➤ Cinética del reclutamiento de factores de transcripción al promotor P4.....	90
➤ Los glucocorticoides activan al promotor P4 en células linfoides cuando se inhibe la activación del STAT5.	92
DISCUSIÓN	97
BIBLIOGRAFÍA	110

 ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- Figura 1. Modelo esquemático de dos de los caminos de señalización más importantes en la apoptosis.....15
- Figura 2. Miembros anti- y pro-apoptóticos de la familia Bcl-217
- Figura 3. Productos de *splicing* del gen *bcl-X* de ratón19
- Figura 4. Estructura genómica completa del gen *bcl-X* de ratón.....21
- Figura 5. Región promotora y codificante del gen *bcl-X* de ratón22
- Figura 6. Estructura de los receptores de hormonas esteroideas26
- Figura 7. Mecanismo de acción de los glucocorticoides30

MATERIALES Y MÉTODOS

- Figura 8. Esquema de los vectores de expresión utilizados en las transfecciones transitorias53

RESULTADOS-CAPÍTULO 1

- Figura 9. Esquema de los vectores de expresión utilizados en las transfecciones transitorias..56
- Figura 10. Control hormonal de la actividad promotora de *bcl-X*..58
- Figura 11. Control hormonal de la actividad promotora de *bcl-X* en células de mama59
- Figura 12. Secuencia nucleotídica de los HREs en la región promotora P4..61
- Figura 13. Unión específica del PR y del GR a los HREs de *bcl-X in vitro*.62
- Figura 14. Competencia de los HREs de *bcl-X* por la unión al PR.....64
- Figura 15. Identificación de los contactos PR-HREs de *bcl-X* con dimetil sulfato.65
- Figura 16. Competencia de los HREs mutados de *bcl-X* por la unión al PR..67
- Figura 17. Respuesta a esteroides de los HREs del promotor P4 de *bcl-X*..68

RESULTADOS-CAPÍTULO 2

- Figura 18. Expresión de las isoformas larga y corta de *bcl-X* en respuesta a los glucocorticoides.70
- Figura 19. Expresión de la isoforma Bcl-X_L en respuesta a los glucocorticoides.....72
- Figura 20. Expresión de los transcritos de *bcl-X* generados a partir de la activación de los diferentes promotores.74
- Figura 21. Inmunoprecipitación *in vivo* de la ARNpol II en la región P4.76
- Figura 22. Inmunoprecipitación *in vivo* del GR en la región P477
- Figura 23. Esquema de la secuencia nucleotídica del elemento de respuesta a STAT5 en la región promotora P4.79
- Figura 24. Efecto de los factores STAT5 sobre la actividad de P4 inducida por glucocorticoides81
- Figura 25. Expresión de los factores STAT5 en extractos totales de distintos tipos celulares.82
- Figura 26. Unión específica del STAT5B a la región promotora P4 de *bcl-X in vitro*. ..84
- Figura 27. Inmunoprecipitación *in vivo* de los factores STAT5 en la región P486
- Figura 28. Inmunoprecipitación *in vivo* de SMRT, HDAC3 y H3 en la región P4.89
- Figura 29. Cinética de reclutamiento de factores de transcripción al promotor P4.91
- Figura 30. Inmunoprecipitación de la cromatina en presencia del inhibidor de JAK94
- Figura 31. Inmunoprecipitación de la cromatina y RT-PCR en presencia del inhibidor de JAK.....96

DISCUSIÓN

- Figura 32. Esquema comparativo de la regulación de la expresión de *bcl-X* específica de tejido en respuesta a glucocorticoides101
- Figura 33. Regulación de la actividad de P4 en células linfoides en respuesta a glucocorticoides108

ABREVIATURAS

Dexa: dexametasona

GR: receptor de glucocorticoides

PR: receptor de progesterona

RU: RU 38486, antagonista glucocorticoide

HRE: *hormone response element*, elemento de respuesta a hormona

Luc: luciferasa

b-gal: b-galactosidasa

EMSA: *electrophoretic mobility shift assay*, ensayo de retardo en gel

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

PB: PARES DE BASES

ARN pol II: ARN polimerasa II

RT-PCR: transcripción reversa seguida de una reacción en cadena de la polimerasa

ChIP: *chromatin immunoprecipitation*, inmunoprecipitación de la cromatina

wt: *wild type*, salvaje

INTRODUCCIÓN

El número de células presentes en un determinado tejido es el resultado de un ajustado balance entre proliferación, arresto y apoptosis celular. El término apoptosis, del griego “cayendo” (como ocurre con las hojas de los árboles, o los pétalos de las flores), fue originalmente introducido por *Kerr y col.* (Kerr et al., 1972) para enfatizar que un tipo de muerte celular estaría programada y constituye un mecanismo esencial y evolutivamente conservado en el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis tisular en sistemas multicelulares. La apoptosis consiste en un programa fisiológico y genéticamente controlado que lleva a una serie de cambios morfológicos y bioquímicos característicos. Los primeros signos evidentes son la condensación de la cromatina, la desintegración del nucléolo y la reducción del tamaño nuclear. Las células apoptóticas presentan pérdida del volumen celular, compactación de las organelas, degradación internucleosomal del ADN en fragmentos de 180-200 pb y finalmente alteración y ruptura de la membrana plasmática, formando cuerpos apoptóticos discretos, que pueden ser fagocitados por macrófagos y por otras células vecinas (Cory, 1995). El proceso apoptótico es rápido y se caracteriza por no provocar una marcada respuesta inflamatoria dado que el contenido celular no se libera al medio extracelular. También se observan efectos a nivel mitocondrial, como un cambio en el potencial de membrana, flujo de Ca^{2+} y liberación de especies reactivas de oxígeno (Abastado, 1996).

El control de la supervivencia celular es de vital importancia durante la embriogénesis, y contribuye a modular el funcionamiento y la integridad de tejidos adultos con elevado recambio celular, tales como las glándulas reproductivas y el

sistema linfóide (Kiess and Gallaher, 1998). En este sentido, diferentes vías de señalización simultáneas de activación e inhibición del crecimiento modularían la susceptibilidad de una célula a la inducción de apoptosis.

La alteración de este programa de muerte celular puede ser crítica en ciertas enfermedades neurodegenerativas, en daños por isquemia, en desórdenes autoinmunes y en distintos tipos de cáncer (Squier and Cohen, 1997). Los “desarreglos” en la apoptosis se consideran un complemento importante para la activación de proto-oncogenes, dado que varias oncoproteínas que participan en la división celular también inducen la muerte de las células (por ejemplo Myc, E1a, Ciclina-D1) (Reed, 2003). En forma similar, defectos en la reparación del ADN y en la segregación cromosómica llevan normalmente al suicidio celular como un mecanismo de defensa para eliminar células genéticamente inestables.

Por lo tanto, una apoptosis aberrante permitiría la supervivencia de células defectuosas, dando oportunidad a la selección de clones progresivamente agresivos. Además se facilitaría la metástasis y se promovería la resistencia al sistema inmune. De hecho, muchas de las células citotóxicas T (CTLs) y células *natural killers* (NK) que atacan tumores dependen de la integridad de la maquinaria apoptótica (Reed, 2003).

Finalmente, defectos en la apoptosis asociados al cáncer juegan un papel importante en la quimio- y radiorresistencia, aumentando el umbral para la muerte celular y requiriendo dosis más altas para la eliminación de los tumores (Reed, 2003).

Caminos de señalización involucrados en la apoptosis

Durante el proceso de apoptosis se activan enzimas proteolíticas denominadas caspasas, que pertenecen a una familia altamente conservada de cisteína-proteasas citoplasmáticas. Estas proteínas se sintetizan como proenzimas inactivas y se activan por clivaje en residuos aspartato específicos (en forma autocatalítica o no), liberándose las subunidades pequeñas y grandes que forman un tetrámero activo (Green, 1998). Muchas proteínas celulares son sustrato de caspasas, como la histona H1, el inhibidor de la nucleasa responsable de la fragmentación del ADN (ICAD), enzimas reparadoras del ADN (PARP, ADN-PK), proteínas reguladoras del ciclo celular (Rb, factor de replicación C) y del citoesqueleto (gelsolina, actina, fodrina), proteínas involucradas en el *splicing* (U1-70 kDa) y proteínas esenciales para el ensamblaje de la membrana nuclear (laminas), entre otras (Schulze-Osthoff et al., 1998; Thornberry and Lazebnik, 1998).

Al presente se han descrito al menos cinco vías de activación de caspasas. En primer lugar, la vía extrínseca de la apoptosis involucra receptores de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), como TNFR1/CD120a, Fas/APO1/CD95, DR3/Apo2/Weasle, DR4/TrailR1, DR5/TrailR2 y DR6. La unión del ligando al receptor localizado en la superficie celular provoca el reclutamiento de distintas proteínas intracelulares (incluyendo procaspasas) a los dominios citosólicos de estos receptores, formando el complejo DISC (por *death-inducing signaling complex*), que a su vez activa caspasas iniciadoras, como la caspasa-8 y en algunos casos la caspasa-10. En sus prodominios N-terminales, estas caspasas tienen dominios denominados efectores de muerte (DEDs) que interaccionan con el correspondiente DED de proteínas adaptadoras como FADD, a través de los cuales

se unen a los complejos de receptores de muerte de la familia del TNF (Figura 1) (Reed, 2003).

En segundo lugar, la vía intrínseca de la apoptosis o vía mitocondrial puede activarse por diversos estímulos, entre los que se encuentran la falta de factores de crecimiento esenciales, el estrés oxidativo, el aumento del flujo de Ca^{2+} , la activación de algunos oncogenes, la presencia de agentes que dañan al ADN, drogas que afectan los microtúbulos y hormonas esteroideas. En este proceso la mitocondria libera al citocromo-c (cit-c) desde el espacio intermembrana al citosol. El cit-c liberado induce el ensamblaje de un complejo multiproteico activador de caspasas llamado apoptosoma (Green and Reed, 1998), cuyo componente central es Apaf1. Apaf1 es una proteína activadora de caspasas que se oligomeriza al interactuar con el cit-c y luego se une a la procaspasa-9 a través del dominio reclutador de caspasas (CARD). El clivaje de la procaspasa-9 en su conformación activa desencadena la subsiguiente activación de las caspasas efectoras (caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7) (Figura 1).

Por otro lado, además del cit-c, se liberan otras proteínas mitocondriales al citosol, como la endonucleasa G, una flavoproteína moduladora de muerte (AIF) y proteínas como SMAC (DIABLO) y OMI (HtrA2) que antagonizan a las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). Muchas de estas proteínas promueven la muerte celular independiente de la activación de caspasas (Kroemer and Reed, 2000).

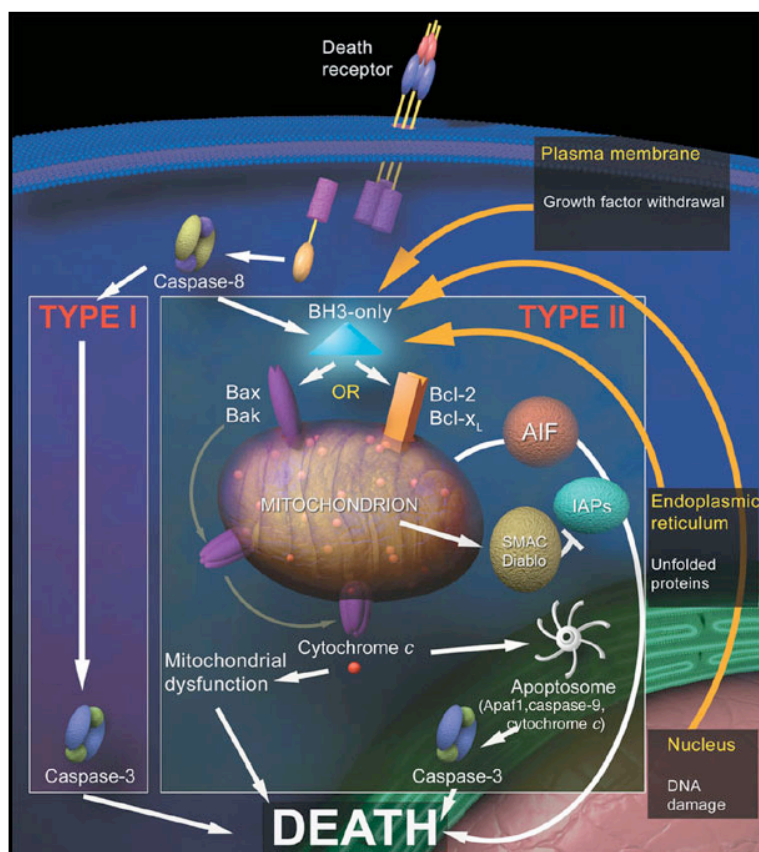


FIGURA 1. **Modelo esquemático de dos de los caminos de señalización más importantes en la apoptosis.** Dos vías principales en la ejecución del proceso apoptótico tienen lugar a partir de señales recibidas por receptores celulares: la vía de las caspasas y la vía mitocondrial. Si la célula sobrevive o muere estaría determinado por un balance de reguladores positivos *versus* negativos que actúan a lo largo de toda la cascada de señalización (Opferman and Korsmeyer, 2003).

Más recientemente se describió una tercera vía de inducción de apoptosis específica para las células CTL y NK, que secretan la proteasa inductora de apoptosis denominada granzima B (GraB) sobre las células blanco (Motyka et al., 2000). La GraB luego de interactuar con receptores de manosa-6-fosfato (IGFR2) entra a las células y posteriormente a los compartimentos celulares a través de canales formados por la proteína perforina. La GraB es una serina proteasa que al igual que las otras caspasas, cliva sustratos en residuos aspartato (Reed, 2003).

Se ha propuesto una cuarta vía de activación de caspasas en respuesta a estrés. Esta vía podría involucrar al retículo endoplásmico y al Golgi, pero no se conocen más detalles (Reed, 2003).

Por último, se ha descrito una vía nuclear durante el proceso de apoptosis que se centra en estructuras macromoleculares subnucleares denominadas dominios oncogénicos PML (PODs) o cuerpos nucleares (NBs) (Salomoni and Pandolfi, 2002). Muchas proteínas que promueven apoptosis se localizan en PODs y están involucradas en la activación de caspasas. Sin embargo, aún se desconoce cómo se relacionan los PODs con la activación de estas proteínas (Reed, 2003).

Proteínas de la familia de Bcl-2

Las proteínas de la familia de Bcl-2, de la cual hasta el momento se han identificado 24 miembros en humanos, desempeñan un papel central en la vía intrínseca de apoptosis (Figura 2). Algunos de los miembros de esta familia tienen funciones anti-apoptóticas y otros pro-apoptóticas. Dependiendo de su abundancia relativa, los miembros con función anti- o pro-apoptótica suprimen o promueven los cambios sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial que son necesarios para la liberación del cit-c y otras proteínas apoptogénicas (Green and Reed, 1998; Gross et al., 1999).

Los miembros de esta familia presentan homología en al menos una de las cuatro regiones conservadas de tipo α -hélice, conocidas como "dominios homólogos a Bcl-2" (BH1, BH2, BH3 y BH4) (Adams and Cory, 1998). Estudios de delección y mutagénesis permitieron demostrar que el dominio BH3 es un dominio de muerte esencial, que debe estar expuesto en los miembros pro-apoptóticos para permitir la

dimerización con otras proteínas de la familia (Wei et al., 2000). Un número considerable de proteínas pro-apoptóticas se localiza en el citosol o interactúa con el citoesqueleto en ausencia de señales apoptóticas (*i.e.* Bax, Bad, Bid, Bak, etc.). Cuando se inicia la apoptosis, ocurren cambios conformacionales que les permiten integrarse en membranas, especialmente en la membrana externa mitocondrial (Gross et al., 1999; Wolter et al., 1997). Los miembros anti-apoptóticos, como Bcl-2 y Bcl-X_L, cuentan con un dominio transmembrana en su extremo carboxilo terminal y se encuentran asociados a membranas mitocondriales, nucleares o del retículo endoplásmico (Gonzalez-Garcia et al., 1994).

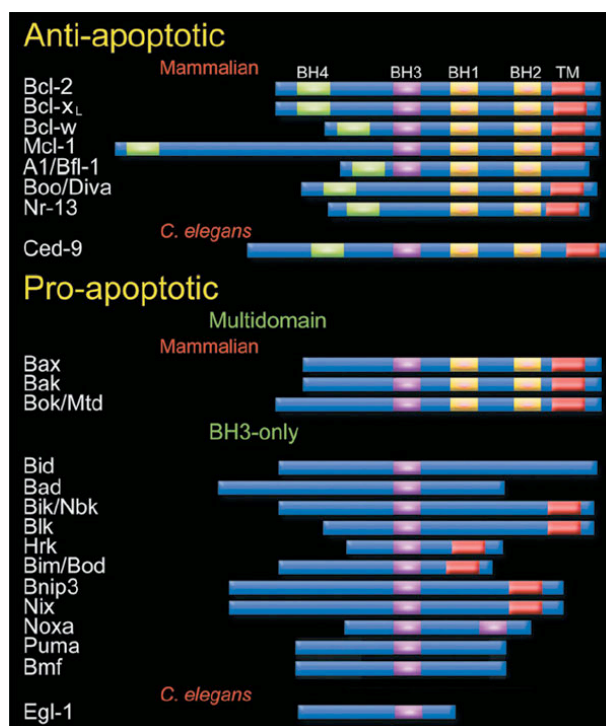


FIGURA 2. **Miembros anti- y pro-apoptóticos de la familia Bcl-2.** BH1-4 son los dominios homólogos a Bcl-2 y TM es el dominio transmembrana (Opferman and Korsmeyer, 2003)

Las distintas proteínas de la familia pueden formar homo o heterodímeros con funciones opuestas sobre la apoptosis. Por ejemplo, mientras los homodímeros de Bax promueven la muerte celular, los heterodímeros Bax/Bcl-2 u homodímeros de Bcl-2 la previenen (Gross et al., 1999). Por otro lado, Bad y Bak que interactúan con Bcl-2 y Bcl-X_L inducen apoptosis al impedir que estas proteínas se unan a Bax (Abastado, 1996).

Tanto Bax como Bcl-2 pueden ser blanco de varios factores y/o señales que controlan la muerte celular; las proporciones relativas de ambas proteínas funcionan como un reóstato que determina la susceptibilidad o resistencia celular a los estímulos apoptóticos (Green and Reed, 1998).

Por otro lado, se ha postulado que la sobreexpresión de miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 o Bcl-X_L podría estar asociada a distintos tipos de cánceres y a la resistencia de las células tumorales a los estímulos apoptóticos (Reed, 2003).

El gen ***bcl-X*** y sus distintos productos proteicos

Bcl-X es uno de los miembros de la familia que desempeña un papel clave en el control de la muerte celular. Se han descrito al menos 6 isoformas generadas por *splicing* alternativo de un único gen (Figura 3) (Boise et al., 1993; Fang et al., 1994; Schmitt et al., 2004; Shiraiwa et al., 1996; Yang et al., 1997). Las distintas isoformas tienen funciones opuestas sobre la muerte celular programada; por ejemplo la isoforma larga de expresión ubícua Bcl-X_L y la isoforma específica de tejido Bcl-X_γ protegen de la apoptosis (Boise et al., 1993; Yang et al., 1997), mientras que la isoforma corta, Bcl-X_C, antagoniza la muerte celular al interactuar con Bcl-X_L y Bcl-2 (Boise et al., 1993; Yang et al., 1997). Debido a que Bcl-X_C

carece de los dominios BH1 y BH2, Bcl-X_C no puede formar homodímeros. Otra isoforma descrita, Bcl-X_{ΔTM}, de localización citosólica por carecer del dominio transmembrana y de expresión ubícuo, también previene el programa de muerte celular (Fang et al., 1994). Una quinta isoforma de expresión específica de tejido, Bcl-X_β, promueve la apoptosis en órganos como el cerebelo, el corazón y el timo (Shiraiwa et al., 1996).

Recientemente, se ha identificado una sexta isoforma de Bcl-X extra corta, Bcl-X_{ES}, que contiene solamente los dominios BH2 y BH4, tiene función anti-apoptótica y se encuentra sobreexpresada en líneas celulares cancerígenas y en tumores humanos (Schmitt et al., 2004).

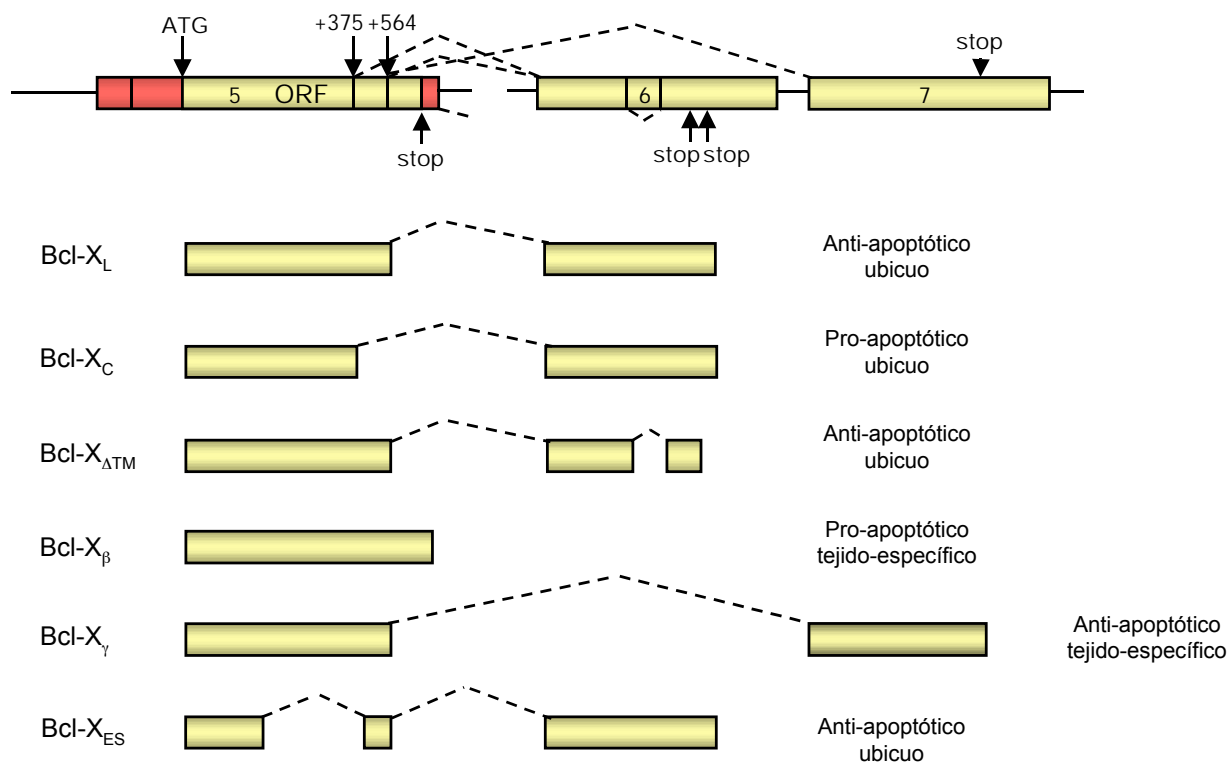


FIGURA 3. **Productos de splicing del gen *bcl-X* de ratón.** El esquema superior muestra la estructura genómica de la región codificante, indicándose los números de cada exón, los sitios de *splicing* y los codones stop. Las distintas isoformas generadas se muestran en la parte inferior.

Bcl-X tiene niveles altos de expresión en diversos tipos celulares humanos y murinos, entre los que se encuentran neuronas sensoriales; timocitos corticales; linfocitos activados y células plasmáticas en nódulos linfáticos; diversos tipos celulares de la médula ósea como los megacariocitos, precursores de glóbulos rojos y algunas células mieloides diferenciadas, espermatozoides y espermátidas, el epitelio germinal del ovario, células epiteliales de mama, próstata, endometrio uterino; células intestinales y células renales (Krajewski et al., 1994).

En muchos casos, los patrones de expresión de Bcl-X_L son significativamente diferentes de los descritos para Bcl-2 a pesar de que ambas proteínas tienen función anti-apoptótica, lo que sugiere que no actúan de manera redundante sino que regulan la muerte celular en distintos estadios de diferenciación a través de un control específico de tejido (Krajewski et al., 1994). En este sentido, se demostró que el ratón *knockout* de *bcl-X* muere alrededor del día 13 del estadio embrionario debido a una muerte neuronal y hematopoyética masiva, contrariamente a lo que ocurre con el ratón *knockout* de *bcl-2*, que es viable (Motoyama et al., 1995).

Estructura genómica de ***bcl-X***

En comparación con los otros miembros de la familia de *bcl-2*, el gen *bcl-X* de ratón presenta la estructura más compleja. Está compuesto por 11 exones, 8 de los cuales comprenden en su totalidad las regiones 5' y 3' no codificantes (5' y 3' UTR, respectivamente) (Figura 4). Las 6 isoformas del gen descritas hasta el momento tienen el mismo extremo amino-terminal, siendo sólo la región codificante del exón 5 común a todas ellas. Bcl-X_L, Bcl-X_C, Bcl-X_δTM y Bcl-X_{ES} comparten además distintas porciones del exón 6.

Por otro lado, sólo Bcl- X_{γ} contiene al exón 7 en el extremo carboxi-terminal de la proteína (Figura 3). Para esta última isoforma, recientemente se identificaron 3 transcritos alternativos que difieren en la longitud de sus segmentos 3' UTR, lo que podría sugerir una nueva regulación del gen en esta región. Un transcripto más largo permitiría introducir nuevas “estructuras de rulo” (*stem loops*) que podrían inferir mayor estabilidad a los mensajeros (Yang et al., 2002).

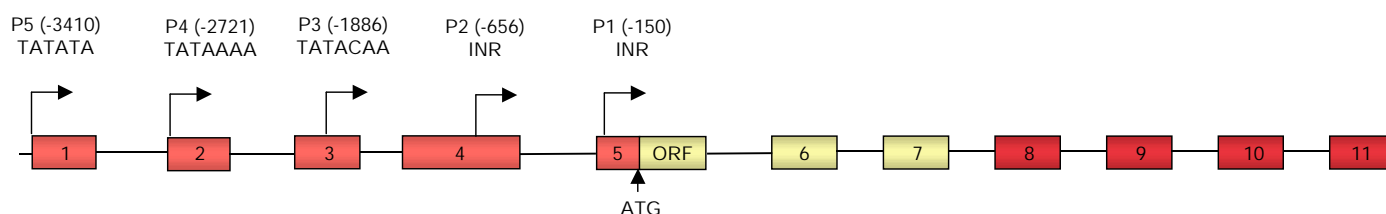


FIGURA 4. **Estructura genómica completa del gen *bcl-X* de ratón.** El esquema muestra la estructura genómica de las regiones 5' y 3' no traducibles en rojo y la región codificante en amarillo. Se indican los 5 promotores con sus respectivos sitios de iniciación de la transcripción.

La región promotora de *bcl-X* contiene al menos 5 promotores (P1-P5) que son activados de manera específica de tejido (Figura 5) (Gascoyne et al., 2003; Pecci et al., 1997; Vicent et al., 2002; Yamamoto et al., 1998). El uso alternativo de promotores puede generar varios ARN mensajeros que difieren por lo menos en sus exones 5' no codificantes. Además, la activación de un determinado promotor podría generar isoformas específicas de *splicing* (Pecci et al., 2001), dependiendo de la secuencia y/o de la estructura que adquieren los diferentes transcritos en sus extremos 5'. Por ejemplo, la activación de P1 conduce mayoritariamente a la expresión de *bcl-X_L*, no habiéndose detectado expresión de *bcl-X_C* o *bcl-X_γ* en hígado, cerebro, bazo o timo. Por otro lado, a partir de los transcritos que incluyen

al exón 4, se generan las isoformas $bcl-X_L$ y $bcl-X_C$ en abundancias comparables. No obstante, a partir de los transcritos que incluyen al exón 3, se expresan $bcl-X_L$ y $bcl-X_C$ sólo en tino, siendo más abundante $bcl-X_C$ que $bcl-X_L$. Además, se observó que $bcl-X_Y$ proviene de transcritos que contienen al exón 3 o al exón 4 en todos los tejidos estudiados (Figura 5).

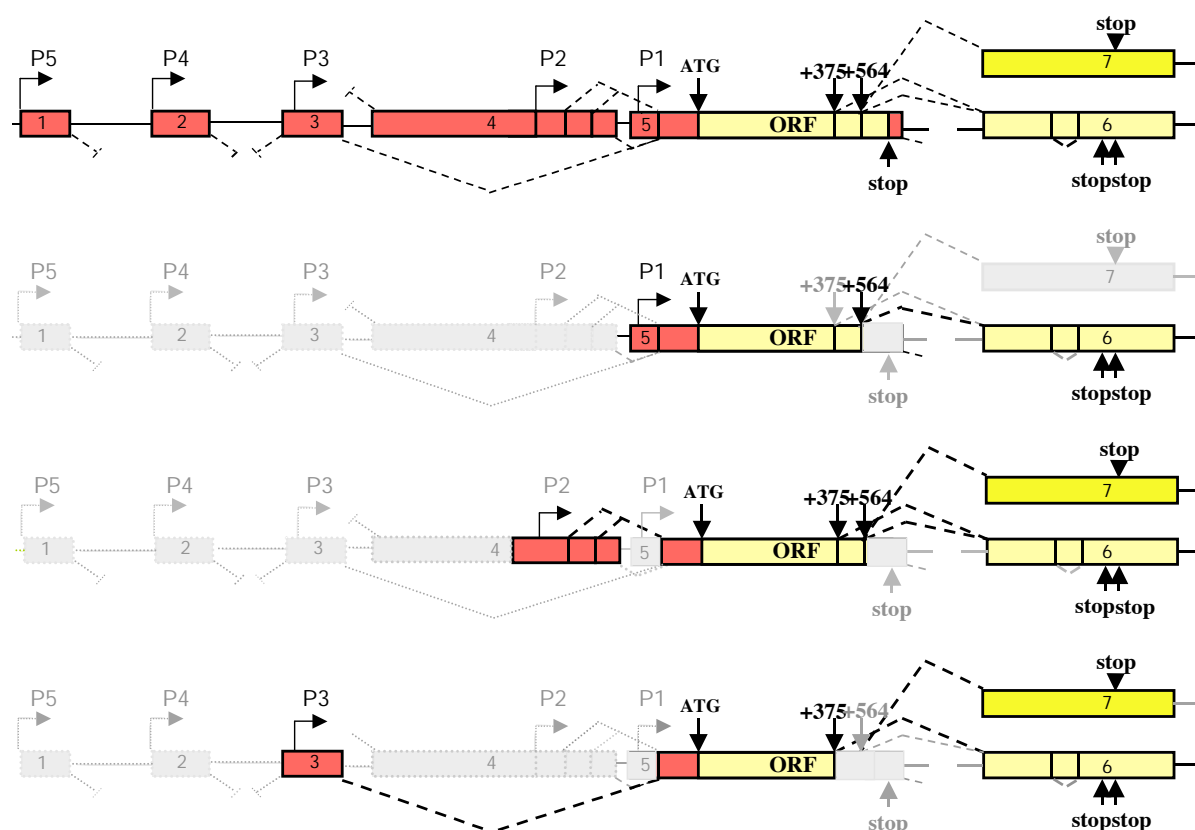


FIGURA 5. **Región promotora y codificante del gen *bcl-X* de ratón.** La región 5' no codificante está indicada en rojo y la codificante en amarillo. Los posibles sitios dadores y aceptores de *splicing*, de acuerdo a la secuencia primaria, se indican en línea de puntos. Las regiones en gris muestran los promotores inactivos y las regiones no transcritas. La activación de un determinado promotor genera isoformas de *splicing* específicas (últimos 3 esquemas de la figura). El exón que corresponde a $bcl-X_Y$ se muestra en otro tono de amarillo y en la parte superior de cada esquema.

Este conjunto de evidencias indica que en algunos tipos celulares los cambios en la abundancia relativa de las isoformas de *bcl-X* son esenciales para lograr un

adecuado control de la apoptosis. De esta forma, parece ser necesaria una regulación precisa no sólo de la transcripción a partir de la activación de los distintos promotores, sino también del *splicing* de los transcritos generados.

La región promotora del gen *bcl-X* humano está compuesta por al menos 3 exones con un alto grado de homología (aproximadamente del 85%) con las regiones correspondientes a P1, P2 y P3 de ratón. Además, se encontraron dos potenciales secuencias TATA box ubicadas río arriba de la región homóloga a P3, como así también sitios de unión para los factores de transcripción Ets y AP-1. De manera similar a lo observado en ratón, se descubrió una regulación específica de tejido sobre la expresión de las distintas isoformas humanas de *bcl-X* (MacCarthy-Morrogh et al., 2000).

Regulación de la expresión del gen ***bcl-X***

El análisis de la secuencia correspondiente a la región 5' del gen *bcl-X* de ratón permitió la identificación de varios motivos consenso de unión de distintos factores de transcripción, cuya relevancia fisiológica aún no se conoce. Se ha demostrado que la expresión de las distintas isoformas de *bcl-X* está controlada por varios estímulos que actúan a través de factores de transcripción del tipo Ets, Sp1, GATA-1, Oct-1, Rel/NF- κ B, AP-1, y STAT (Grillot et al., 1997). Asimismo, las cascadas de señalización de Ras activado, integrina, vitronectina y el factor de crecimiento de hepatocitos también están asociadas a cambios en la regulación de la expresión del gen (Grad et al., 2000).

El factor Ets inhibe la apoptosis de macrófagos inducida por la ausencia de factores de crecimiento mediante un mecanismo dependiente de la expresión de *bcl-X* (Sevilla et al., 1999).

La actividad del factor NF- κ B resultó ser necesaria para evidenciar los efectos anti-apoptóticos de CD40 en células B, debidos a una mayor expresión de Bcl-X_L (Chen et al., 1999). De manera similar, la expresión de factores de transcripción del tipo c-Rel o RelA aumentan específicamente los niveles del ARNm y de la proteína de Bcl-X_L en células de fibrosarcoma. No obstante, el papel que desempeña Rel/NF- κ B en el control de la expresión de *bcl-X* es complejo y depende del tipo celular, del estadio de diferenciación y de la naturaleza del estímulo. Por ejemplo, a diferencia de lo que ocurre en células B o de fibrosarcoma, NF- κ B no tiene ningún efecto sobre los niveles de transcritos de Bcl-X_L en la apoptosis inducida por TNF α en células Jurkat (Grad et al., 2000).

Las proteínas STAT (*signal transducers and activators of transcription*) se activan al ser fosforiladas en tirosina por quinasas *Janus* (JAKs), dimerizan a través de dominios SH2, translocan al núcleo y funcionan como efectores de un gran número de factores de crecimiento y citoquinas. Los STATs activados se encuentran en una amplia variedad de tumores y cánceres humanos, y distintas evidencias sostienen que contribuyen a la oncogénesis por modulación de los niveles de Bcl-X_L y alteración del umbral de agentes quimioterapéuticos (Grad et al., 2000). Una mayor señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) en ciertos carcinomas, o por el receptor de IL-6 en células de mieloma correlaciona con una actividad constitutiva de STAT3 y el aumento de los niveles de la isoforma anti-apoptótica Bcl-X_L (Catlett-Falcone et al., 1999; Grandis et al., 2000). Una situación similar se observa con el factor inhibitorio de leucemia (LIF) que

confiere citoprotección en miocitos cardíacos a través de STAT1 (Fujio et al., 1997). La activación de la vía JAK2-STAT5 mediada por el receptor de IL-2 lleva a una mayor expresión de Bcl-X_L en linfocitos y otros tipos celulares (Lord et al., 2000).

La regulación de la abundancia relativa de isoformas de *bcl-X* por distintos estímulos tiene mucha relevancia en el control de la apoptosis de tejidos que experimentan ciclos de crecimiento y muerte celular, como son aquéllos dependientes de hormonas. Señales externas, como los esteroides, pueden influir sobre los productos de *splicing* resultantes, regulando la elección del promotor a través de sus receptores hormonales activados, como se propuso recientemente para otros genes blanco (Auboeuf et al., 2002). Dependiendo de dicha región promotora y del contexto celular, el mismo factor transcripcional puede reclutar diferentes reguladores que medien efectos distintos sobre la transcripción y el procesamiento del ARN. Dado que la mayoría de los genes humanos dan lugar a isoformas de *splicing* diferentes que pueden cumplir diferentes funciones biológicas, varios mecanismos deberían coexistir para asegurar que la isoforma de ARN mensajero adecuada se genere en las cantidades correctas, de forma específica de tejido y en respuesta a distintas señales biológicas. Un desacoplamiento patológico entre transcripción y procesamiento del ARN podría tener un impacto dramático sobre la homeostasis celular.

Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas

Los esteroides reprimen o activan la transcripción génica a través de su interacción con receptores intracelulares (*steroid hormone receptors*, SHRs), que son factores de transcripción dependientes de ligando (Beato et al., 1995). La

estructura modular de los SHRs, conservada en otros miembros de la familia de receptores nucleares, consiste en un dominio de unión a ADN (DBD), señales de localización nuclear, un dominio de unión de ligando (LBD) y dos dominios de transactivación (AFs). Luego de la unión de la hormona, el complejo hormona-receptor regula la expresión de genes blanco uniéndose a secuencias de ADN específicas presentes en las regiones promotoras y/o *enhancers* de dichos genes, denominadas elementos de respuesta a hormona (HREs). En particular, los receptores de progesterona (PR), glucocorticoides (GR), mineralocorticoides (MR) y andrógenos (AR) se unen exclusivamente como homodímeros (al menos *in vivo*) a la misma secuencia palindrómica consenso TGTYCTnnnACARGA (Scheidereit et al., 1983). La estructura cristalográfica del GR reveló una hélice de reconocimiento del ADN (denominada P box) coordinada por un motivo de unión a zinc que contacta específicamente las bases del surco mayor. Un segundo átomo de zinc organiza una α -hélice orientada a lo largo del eje del ADN y la D box, responsable, en parte, de la homodimerización (Figura 6).

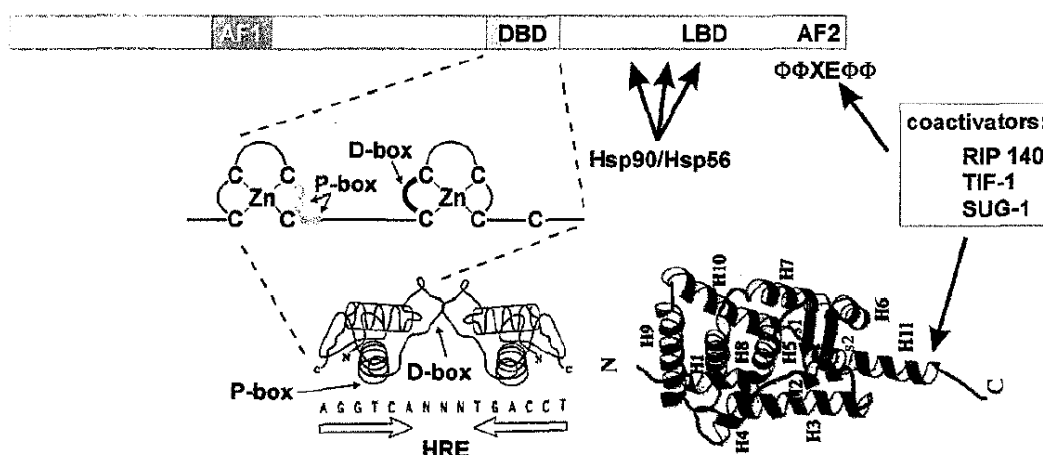


FIGURA 6. **Estructura de los receptores de hormonas esteroideas.** El esquema superior muestra los dominios que componen el GR y los co-activadores que interactúan con la porción carboxi-terminal de la proteína. En el centro, el DBD se ensambla como dímero sobre el HRE y se señalan los motivos P y D-box coordinados por zinc que participan en la unión. La estructura cristalográfica del LBD se detalla a la derecha (Beato et al., 1995).

Dos isoformas del GR, α y β , se caracterizaron en células humanas (Cidlowski et al., 1996). Sin embargo, toda la actividad del receptor se atribuyó a la isoforma α (GR α). Posteriormente se encontró que a partir del gen *GR α* se sintetizan a su vez dos isoformas proteicas, GR A y GR B, generándose ésta última a partir de un segundo sitio de iniciación de la traducción ubicado río abajo del primer codón que da lugar al GR A (Amsterdam et al., 2002). Ambos receptores muestran una localización subcelular similar y translocan al núcleo luego de activarse por la interacción con el ligando. Análisis funcionales de la actividad del GR A y del GR B sobre distintos promotores que responden a glucocorticoides revelaron que la isoforma más corta (GR B) es casi dos veces más efectiva en la transactivación génica que la especie larga (GR A); sin embargo esta diferencia funcional entre ambas isoformas no se observa en la transrepresión (Amsterdam et al., 2002).

En contraste con otros receptores nucleares, en ausencia de la hormona, todos los SHRs están asociados a un gran complejo multiproteico de chaperonas, que incluyen a la Hsp90 y a la inmunofilina Hsp56, que los mantienen en una conformación inactiva pero receptiva para unir el ligando. Durante muchos años se pensó que la función principal de la Hsp90 sobre el receptor de glucocorticoides era la de retenerlo en el citoplasma. Luego de la activación del GR por la hormona se producía la liberación de Hsp90 y la consecuente translocación al núcleo del receptor (Savory et al., 1999; Galigniana et al., 1999). Sin embargo, recientemente se demostró que el GR transloca en asociación con Hsp90 (Pratt et al., 2004a). De hecho, la unión del ligando al receptor desencadena la transformación del LBD del mismo a un estado en el cual interactúa en forma dinámica con el heterocomplejo de chaperonas, asociándose y disociándose de la Hsp90 y de las inmunofilinas. Estas últimas unen el complejo del receptor a las proteínas motoras responsables del

transporte retrógrado (hacia el núcleo) (Pratt et al., 2004b). Es en el núcleo donde el receptor se disocia de las chaperonas, dimeriza e interactúa con la cromatina. Luego de la unión al ADN, el receptor se asocia con componentes de la maquinaria basal de transcripción a través de factores de transcripción específicos de secuencia o co-activadores que actúan como puente entre los SHRs y el complejo de iniciación. Entre los factores intermediarios que interactúan con el dominio AF2 en la región carboxilo terminal del SHR activado se encuentran miembros de la familia p160, como SRC-1, SRC-2 (TIF2/GRIP1) y SRC-3 (pCIP/RAC3/ACTR) (Li et al., 2003).

La activación de los receptores hormonales involucra también su propia fosforilación en residuos de serina o treonina ubicados en el extremo amino-terminal del DBD (Bodwell et al., 1998). Se sugirió que el estado de fosforilación del GR disminuye su vida media y tiene efectos biológicos significativos sobre la expresión del mismo receptor y en la transactivación de algunos genes blanco (Ashwell et al., 2000).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, los SHRs no sólo son capaces de estimular la actividad génica, sino también son represores transcripcionales competentes (Figura 7). Teóricamente, la represión transcripcional puede ocurrir por competencia de un sitio de unión a ADN, por competencia por mediadores comunes al complejo de iniciación de la transcripción, o por secuestro de factores de transcripción en formas inactivas (Beato et al., 1995). El último de estos mecanismos posibles se ejemplifica con la interferencia transcripcional de los receptores nucleares con dos grupos de factores de transcripción de particular importancia fisiológica, AP-1 y NF- κ B. La inhibición de genes dependientes de AP-1 por receptores nucleares es transcripcional y rápida, no requiere síntesis de proteínas, y se observa interacción directa entre ambos factores (Beato et al., 1995).

La relación es mutua dado que una elevada expresión o activación de AP-1 en respuesta a factores de crecimiento o ésteres de forbol inhibe a los promotores con HREs. En esta inhibición mutua, el factor que interfiere no contacta el ADN y el factor reprimido permanece unido al mismo. La propiedad inhibitoria de los SHRs sobre AP-1 es claramente distinta de sus funciones de transactivación. Es dependiente del ligando pero ocurre a menores concentraciones del mismo que la transactivación (Beato et al., 1995). Muchos antiglucocorticoides, antiprogestágenos y antiandrógenos interfieren con la unión al ADN, pero inducen transrepresión, sugiriendo que distintos ligandos pueden dar lugar a conformaciones de SHRs sustancialmente diferentes. Los SHRs pueden existir en conformaciones de transactivación o transrepresión, en la cual el receptor no homodimeriza y los dominios de activación están ocultos. Las interacciones de proteínas y ligandos inducen cambios conformacionales que podrían ser la base para esta actividad dual de los SHRs, y se postuló la influencia del ADN sobre una particular estructura tridimensional. Tanto un efecto sinérgico como inhibitorio podría ocurrir con uno sólo de los factores unidos al ADN (Beato et al., 1995).

De esta manera, las propiedades represoras y activadoras de los SHRs pueden ser discriminadas por mutaciones del receptor. En particular, mutantes que no pueden unirse al ADN, mutantes con AFs defectuosos o mutantes de D box que no dimerizan, reprimen eficientemente promotores dependientes de AP-1, presumiblemente como monómeros (Beato et al., 1995).

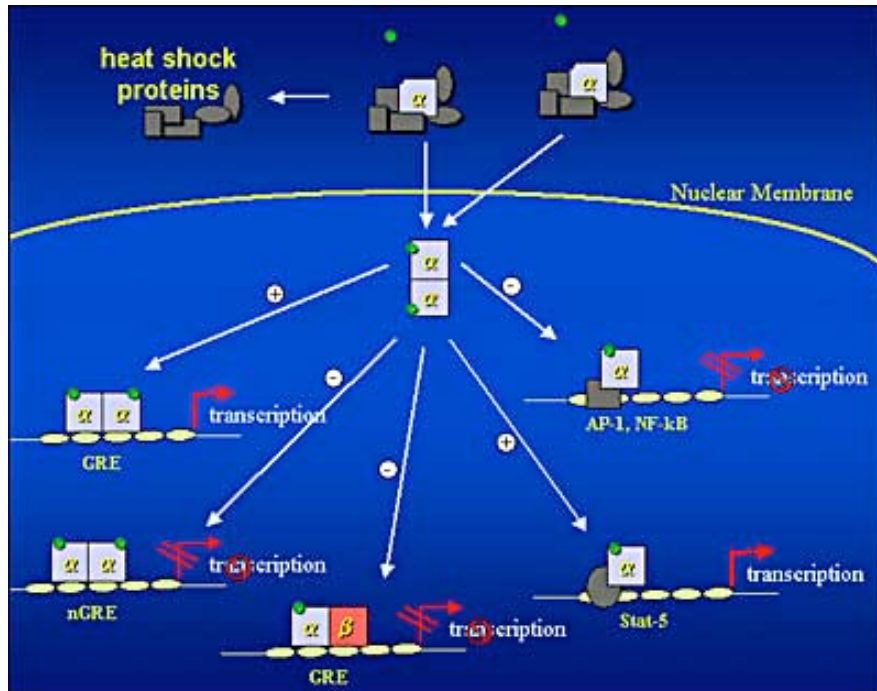


FIGURA 7. **Mecanismo de acción de los glucocorticoides.** El GR α regula positiva o negativamente la transcripción de genes blanco mediante la unión a sus HREs como homodímero o como heterodímero con el GR β . En forma monomérica también interactúa con otros factores de transcripción como AP-1 y NF- κ B inhibiendo la actividad de éstos últimos. Por otro lado cuando el GR α se une al Stat-5, actúa sinérgicamente en la activación de genes dependientes de este factor (<http://www.endotext.org/adrenal/adrenal16/adrenal16.htm>).

En promotores con sitios de unión para NF- κ B, la inhibición por glucocorticoides se explica por una rápida inducción de la síntesis del inhibidor κ B α en respuesta a la hormona, que secuestra al factor de transcripción en el citoplasma (Beato et al., 1995), y también por interacción directa del GR con p65 (Garside et al., 2004)

La organización estructural del ADN mostró tener un papel clave sobre la regulación de la expresión génica dependiente de SHR. En levaduras, la transactivación mediada por el GR requiere componentes remodeladores de la cromatina del complejo SWI/SNF (Beato et al., 1995). Los genes homólogos de SWI2 en humanos son Brm y BRG1. Se demostró que en células carentes de la

expresión de hBrm, la respuesta al GR es débil y sólo puede ser recuperada con la expresión exógena de hBrm o de BRG1, ambos complejos multiproteicos dependientes de ATP (Khavari et al., 1993; Muchardt and Yaniv, 1993). BRG1 se une específicamente a la proteína del retinoblastoma Rb, y ésta aumenta la expresión de genes regulados por el GR sólo en presencia de hBrm. Estos resultados muestran la asociación de los SHRs y la compleja maquinaria celular involucrada en la dinámica de la cromatina y el control del ciclo celular.

El promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) constituye un ejemplo muy bien documentado de control transcripcional por hormonas esteroideas. Los SHRs se unen a varios HREs y facilitan la interacción de otros factores de transcripción, como NF1 y OTF1, con el promotor del MMTV. Sin embargo, la distribución de nucleosomas sobre esta región no es al azar, y diferencias conformacionales o topológicas del ADN pueden modular la accesibilidad de elementos que actúan en *cis* sobre el mismo. La inducción hormonal causaría un rearrreglo nucleosomal que permitiría la unión simultánea de NF1 y OTF1 a sus sitios de unión, y la consecuente activación transcripcional. Dado que estos factores no se pueden unir al mismo tiempo al ADN desnudo del MMTV, una configuración abierta de la cromatina sería un prerequisite esencial para una activación óptima del promotor. Este cambio de la organización nucleosomal inducido por la hormona podría relacionarse con un reclutamiento de SWI/SNF u otro complejo remodelador mediado por el receptor (Beato et al., 1995).

Los receptores de hormonas esteroideas reclutan diferentes complejos co-activadores que promueven distintos patrones de modificación local de la cromatina (Li et al., 2003). Tanto el PR como el GR se reclutan al promotor del MMTV e inducen su transcripción luego del tratamiento hormonal. No obstante, el PR recluta

selectivamente SRC-1 y CBP, causando la acetilación de la histona H4. Mientras que el GR se asocia preferentemente con SRC-2, que recluta subsecuentemente pCAF, provocando la modificación de la histona H3. Estos estudios indican que el reclutamiento diferencial de co-activadores por receptores nucleares determina el ensamblaje de estos complejos sobre promotores blanco con el fin controlar la transcripción a través de patrones específicos de modificación de histonas (Li et al., 2003).

Esteroides y apoptosis, especificidad tisular

Inducción de la apoptosis por hormonas esteroideas

Los glucocorticoides alteran tanto el metabolismo celular como la expresión génica en mamíferos, y tienen efectos citotóxicos en determinados tipos celulares, como los linfocitos (Amsterdam and Sasson, 2002). Los glucocorticoides liberados por la glándula adrenal durante períodos de estrés llevan al catabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos, y a un aumento del azúcar en sangre. Además participan en la modulación del sistema inmune y del sistema nervioso central, como así también son necesarios para el desarrollo y la maduración de muchos órganos, como los pulmones y la misma glándula adrenal.

Las hormonas esteroideas, en particular los glucocorticoides, tienen efectos específicos de tejido sobre la muerte y la supervivencia celular; no obstante, el mecanismo molecular de la apoptosis dependiente de hormonas aún no se conoce completamente.

En la mayoría de las células nucleadas del sistema vascular, como los monocitos, macrófagos, y linfocitos T, los glucocorticoides inducen apoptosis a

través de la vía mitocondrial (Amsterdam and Sasson, 2002), jugando un papel anti-inflamatorio e inmunosupresor central.

El timo cumple un papel central en la diferenciación y selección de células T funcionales. A pesar de que la glándula adrenal es la mayor fuente de glucocorticoides liberados en respuesta a la hormona ACTH secretada por la hipófisis, las células epiteliales del timo también los sintetizan. Esta producción local de glucocorticoides participaría en el desarrollo temprano de timocitos y en el proceso de selección que determina el repertorio de células T maduras específicas de antígeno (Ashwell et al., 2000).

Los timocitos CD4⁺CD8⁺ son extremadamente sensibles a la muerte celular mediada por glucocorticoides, y aún concentraciones fisiológicas logradas durante una respuesta a estrés pueden ser suficientes para causar apoptosis. Las células T periféricas en reposo, no obstante, son comparativamente resistentes a la muerte inducida por glucocorticoides, debido a la expresión de Bcl-2 presente en este tipo celular y ausente en el primero (Ashwell et al., 2000).

Por otro lado, el timo aislado de ratas adrenalectomizadas inyectadas con glucocorticoides muestra una reducción de su peso en un 50 % 48 horas más tarde, y una disminución del 80 % de la población de timocitos principalmente inmaduros y ubicados en la corteza (Compton and Cidlowski, 1986).

La mayoría de los efectos de los glucocorticoides sobre el control de la apoptosis en varios tipos celulares está mediado por el GR α . Aún no queda claro si el GR β , que es capaz de inhibir la actividad del GR α , está involucrado en la modulación de la apoptosis inducida por estos esteroides (Amsterdam and Sasson, 2002).

En ratones GR^{dim/dim}, generados por *knock in* de una variante del GR que presenta una mutación puntual en uno de los dominios de dimerización, los genes dependientes de HREs pierden inducibilidad y provocan desarreglos en muchas funciones fisiológicas del GR (Reichardt et al., 1998). No obstante, estos mutantes son viables, lo cual indica que las actividades del GR dependientes de la unión al ADN no son esenciales para su supervivencia. El receptor actuaría en forma independiente a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción (AP-1, NF-κB, STAT5), como ocurre en general en fenómenos de represión. La interferencia con estos factores ocurriría en la última etapa de la iniciación de la transcripción, luego de la formación del complejo de pre-iniciación. Este efecto represor, tan eficiente en células GR^{dim/dim} como en células salvajes, estaría mediado por monómeros del GR. Análisis mutacionales mostraron que el dominio de unión a ligando y el de unión al ADN participan en este modo de acción.

En particular, si el mecanismo molecular de la apoptosis es una consecuencia de la activación transcripcional dependiente de la unión al ADN, o se debe a una represión de factores de supervivencia mediada por el GR dio lugar a controversias durante los últimos años. Los análisis de los ratones GR^{dim/dim} demostraron que la apoptosis de timocitos y células T maduras requiere de la unión de los dímeros GR-GR a los HREs, mientras que las actividades inmunosupresoras y anti-inflamatorias llevadas a cabo por los glucocorticoides son independientes de la misma (Reichardt et al., 1998).

Recientemente se encontró que los glucocorticoides llevan a cabo algunos de sus efectos a través de un receptor de membrana, distinto del clásico GR intracelular. No obstante, no hay evidencias de que los glucocorticoides afecten la apoptosis a través de una vía no genómica (Amsterdam et al., 2002). Por otro lado,

se demostró que los glucocorticoides pueden alterar el potencial de la membrana plasmática, causando cambios específicos sobre la expresión génica, sugiriendo un mecanismo novel para la inducción de apoptosis por estas hormonas (Mann and Cidlowski, 2001).

Como se mencionó anteriormente, la inducción de apoptosis por glucocorticoides también puede estar mediada por interferencia con otros factores de transcripción, como AP-1. En este sentido, se demostró que líneas celulares de leucemia de tipo T que expresan mutantes del GR defectuosas en la activación génica son altamente sensibles a los glucocorticoides, observándose inhibición de la producción de IL-2, represión de la actividad de AP-1 e inducción de apoptosis (Amsterdam and Sasson, 2002). Otra vía relacionada con la modulación de apoptosis por glucocorticoides es a través del NF- κ B, que es inducido por citoquinas pro-inflamatorias y desempeña un papel central en procesos inmunológicos e inflamatorios, dirigiendo la transcripción de quimioattractantes, citoquinas como el TNF α y la IL-2, receptores de citoquinas y moléculas de adhesión celular. Sin embargo, la dexametasona, un análogo sintético de los glucocorticoides, aumenta la translocación nuclear del NF- κ B en células hepáticas. A pesar de que existe cierta controversia acerca del papel de este factor de transcripción sobre la apoptosis, diversas evidencias sostienen su acción anti-apoptótica cuando la muerte celular es inducida por el TNF α . Además, se demostró que células naturalmente resistentes a la apoptosis se vuelven sensibles cuando son transfectadas con un vector de expresión para I κ B α , que inactiva al NF- κ B.

Los glucocorticoides inhiben la producción de varias citoquinas y también actúan sinérgicamente con otras en diversos tipos celulares (Amsterdam and Sasson, 2002). En este sentido, estas hormonas esteroideas aumentan la expresión

de varios receptores de citoquinas, lo cual podría indicar funciones regulatorias del sistema inmune positivas. Altos niveles del GR β en neutrófilos humanos permiten reducir la tasa espontánea de muerte celular en respuesta a los corticoides (Amsterdam and Sasson, 2002).

Prevención de la apoptosis por hormonas esteroideas

Los glucocorticoides protegen de señales apoptóticas provocadas por diferentes estímulos en células de epitelio mamario (Berg et al., 2002; Schorr and Furth, 2000), endometrio (Pecci et al., 1997), y folículo ovárico (Hillier and Tetsuka, 1998), como también en hepatocitos (Yamamoto et al., 1998) y fibroblastos (Gascoyne et al., 2003).

El crecimiento normal de la glándula mamaria involucra proliferación, diferenciación, muerte celular y remodelación de la membrana basal a través de la estimulación del ciclo ovárico, la preñez y la lactancia. Estos fenómenos están regulados por interacciones complejas de múltiples hormonas, como los estrógenos, la progesterona, los glucocorticoides, la insulina y la prolactina (Kiess and Gallaher, 1998).

La regresión de la glándula mamaria lactante es inducida por una disminución en las concentraciones de prolactina y glucocorticoides, que causan una menor expresión génica de la proteína de la leche, β -caseína, y un aumento de la expresión de genes asociados a la apoptosis como el TGF- β (Kiess and Gallaher, 1998). Niveles elevados de glucocorticoides en la glándula mamaria de ratón contribuyen a mantener la morfología del tejido, inhiben la involución y provocan la acumulación de leche. Estos efectos se acompañan de la activación de la PKA, el

aumento de los mensajeros de *c-fos*, *jun B* y *jun D*, y la unión al ADN del factor AP-1 (Amsterdam et al., 2002). El *crosstalk* entre receptores de hormonas esteroideas y AP-1 es mutuo, inhibiéndose la actividad biológica de ambos factores como así también la involución del epitelio mamario, lo cual indicaría que la apoptosis en la glándula mamaria luego de la lactancia depende de un AP-1 funcional (Feng et al., 1995).

Se han intentado definir los mecanismos moleculares por los cuales el receptor de glucocorticoides controla el desarrollo de la glándula mamaria y la lactancia mediante el uso de ratones genéticamente modificados con un GR defectuoso para unirse al ADN, (Reichardt et al., 2001). Estos ratones conservan la capacidad de regular la transcripción por interacciones proteína-proteína, pero carecen del control de la expresión génica por mecanismos dependientes de la unión al ADN. La ausencia de esta función del GR afectó el desarrollo normal de los ductos de la glándula mamaria en hembras vírgenes, probablemente debido a una reducida proliferación de las células epiteliales. Por el contrario, hembras en lactancia tuvieron glándulas mamarias normalmente diferenciadas y fueron capaces de producir correctamente proteínas de la leche. Estos resultados son coherentes con la demostración de que el GR defectuoso para unirse al ADN conserva la capacidad de interactuar con proteínas STAT5 fosforiladas, lo que sugiere que la regulación de la transcripción por interacciones proteína-proteína constituye la base para la acción de los glucocorticoides en este proceso (Reichardt et al., 2001).

Por otro lado, los glucocorticoides limitan el daño del tejido folicular y median su reparación y/o remodelación luego de la ovulación en el ovario. En células de la granulosa la protección de la apoptosis involucra la promoción de los contactos celulares y la comunicación intercelular, la estabilización del citoesqueleto de actina

y la regulación positiva de la expresión de *bcl-2* (Amsterdam et al., 2002). Finalmente en hepatocitos y fibroblastos, los glucocorticoides inhiben la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y activan al factor de transcripción NF- κ B (Amsterdam et al., 2002).

Regulación de la expresión de ***bcl-X*** por esteroides

bcl-X es uno de los genes más activos en la inducción y prevención de la apoptosis dependiente de hormonas. Su expresión es sensible a los glucocorticoides y a la progesterona, los que además afectan la relación entre *bcl-X_L* (isoforma anti-apoptótica) y *bcl-X_C* (isoforma pro-apoptótica) en distintos tipos celulares (Chang et al., 1997; Gascoyne et al., 2003; Pecci et al., 1997; Schorr and Furth, 2000; Vicent et al., 2002). En timos de ratas adrenalectomizadas, se observó que el efecto apoptótico inducido por los glucocorticoides se correlaciona con una inhibición de la expresión de *bcl-X*, y una disminución en la relación *bcl-X_L/bcl-X_C*, favoreciendo la acumulación relativa de la isoforma pro-apoptótica *bcl-X_C* (Vicent et al., 2002). Por el contrario, en células epiteliales mamarias y endometriales se demostró el efecto anti-apoptótico de los glucocorticoides, la inducción de la expresión del gen *bcl-X* y el incremento en la relación entre *bcl-X_L* y *bcl-X_C* (Pecci et al., 1997; Schorr and Furth, 2000).

En la glándula mamaria de ratones vírgenes, durante la preñez o la lactancia, la relación *bcl-X_L/bcl-X_C* permanece constante, siendo más abundante la isoforma anti-apoptótica. No obstante, durante los dos primeros días de involución, la expresión de la isoforma pro-apoptótica *bcl-X_C* aumenta 6 veces respecto de *bcl-X_L*, lo que ocasiona la pérdida de viabilidad celular (Heermeier et al., 1996). Aún así, los

transcriptos de *bcl-X_C* siguen siendo menos abundantes que los de *bcl-X_L*, lo cual sugiere que sólo pequeños cambios en los niveles de la isoforma pro-apoptótica podrían ser suficientes para inducir apoptosis en las células alveolares.

Estudios previos sugirieron que los glucocorticoides también controlan de manera antagónica la muerte celular, modulando positiva o negativamente la expresión de otros genes, como *bcl-2*, *NF-κB* y *bax* en forma específica de tejido (Amsterdam and Sasson, 2002, Hoijman, 2004). Estos efectos múltiples son el resultado *crosstalk* cuidadosamente controlado entre el GR y una gran variedad de co-activadores o co-represores nucleares, que están selectivamente involucrados en la expresión de genes específicos dependientes de hormonas.

OBJETIVOS

Sobre la base de las consideraciones arriba mencionadas, el objetivo central del presente trabajo es el análisis del control de la expresión del gen *bcl-X* por hormonas esteroideas, examinando comparativamente tejidos en los que la respuesta apoptótica a los esteroides es opuesta.

Los objetivos particulares son:

- Identificar el o los promotores del gen *bcl-X* que responden al tratamiento hormonal
- Identificar los elementos responsables de dicha respuesta
- Estudiar los mecanismos de transducción de señales y los factores de transcripción involucrados
- Identificar, en aquellos tipos celulares donde la respuesta apoptótica a hormonas esteroideas es opuesta, los factores involucrados en esa expresión diferencial
- Analizar si la inducción y la represión del gen es a través de mecanismos diferentes o de un mismo mecanismo que actúa de manera opuesta según el caso

MATERIALES Y MÉTODOS

Esteroides y reactivos. El R5020 (10^{-8} M) se adquirió en Perkin-Elmer. La dexametasona (dexa) (10^{-8} M) y el RU 38486 (RU) (10^{-6} M) de Sigma (St Louis, MO, USA) se usaron para todos los tratamientos hormonales. Las hormonas se disolvieron en etanol absoluto; para los ensayos *in vitro* se prepararon soluciones concentradas 1000X. El medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) y el suero fetal bovino (FCS) se adquirieron en Gibco BRL. El medio RPMI 1640 se adquirió en Sigma (St Louis, MO, USA). El suero libre de esteroides (CS-FCS) se preparó según lo descrito por *Lippman y col.* (Lippman et al., 1976). El inhibidor de JAK AG490 (100 μ M) se adquirió en Calbiochem (Reino Unido).

Vectores de expresión. El vector de expresión pGAW (gentilmente donado por el Dr. Guntram Suske, IMT-Philipps Universität, Marburg, Alemania) es un derivado del plásmido pGL3 básico (Promega). Este vector se usó para subclonar los distintos fragmentos que contienen los promotores de *bcl-X*, río arriba del gen reportero luciferasa.

El vector pP5-P2 (*L.R.V.*, seminario de licenciatura) contiene la secuencia genómica desde el nucleótido -3420 hasta el -537 relativos al inicio de la traducción, incluyendo la región promotora desde P5 a P2.

El vector pP4-completo se generó por digestión del vector pP5-P2 con la enzima *Bam H I*, religado y posterior digestión con la enzima *Xho I* seguida de *Klenow*. Luego, el vector se digirió con la enzima *Ssp I* y se religó.

El vector pP4- Δ HRE se generó por delección de un fragmento de 95 pb entre los nucleótidos -3045 y -2950 del vector pP4-completo, con las enzimas *Xmn I* y *Msc I*, seguido de tratamiento con *Klenow* y religado.

El vector pP4-P3 se generó subclonando el fragmento *Eco R I-Xho I* del vector pP5-P2 en el pGAW.

El vector pP4-mínimo se construyó por digestión del vector pP4-P3 con la enzima *Xho I* seguido de *Klenow*, y posterior digestión con la enzima *Ssp I* y religado.

El vector pP3 (D. Romero, comunicación personal) se generó por amplificación de un fragmento de 497 pb del plásmido pNM1-9 *Sal I* (Pecci et al., 2001) con los oligonucleótidos 5'-CATGGAATTCGGTCATCCTATGCTACATAG-3' y 5'-CGAGCTCGAGCTAGTTCCTTCATCCATCTG-3' como *primers* 5' y 3' respectivamente. El producto de PCR se subclonó en los sitios *Eco R I* y *Xho I* del vector pGAW.

El vector de expresión pP4- Δ STAT5 se construyó por PCR mutando a adeninas los nucleótidos ubicados en las posiciones -240, -239, -238 y -234 relativas al inicio de la transcripción de P4. El plásmido pBKSP4 se generó amplificando del plásmido pNM1-9*Sal I* un fragmento de 143 pb con el oligonucleótido 5': 5'-CCAGGATCTGAGTTCCACTCTTGAACAGAATTAACGC-3' correspondiente a los nucleótidos -2694 a -2658, y el oligonucleótido 3': 5'-AAATGAGCTATAACTCAGTTTTTCAA-3' correspondiente a los nucleótidos -2551 a -2577, como *primers* 5' y 3' respectivamente. El producto de PCR se cortó con *Spe I* y se clonó en los sitios *Spe I* y *EcoR V* del pBluescript KS⁻.

Para una mayor comprensión, un esquema detallado de las distintas regiones promotoras que se describen arriba, se observa en la Figura 8.

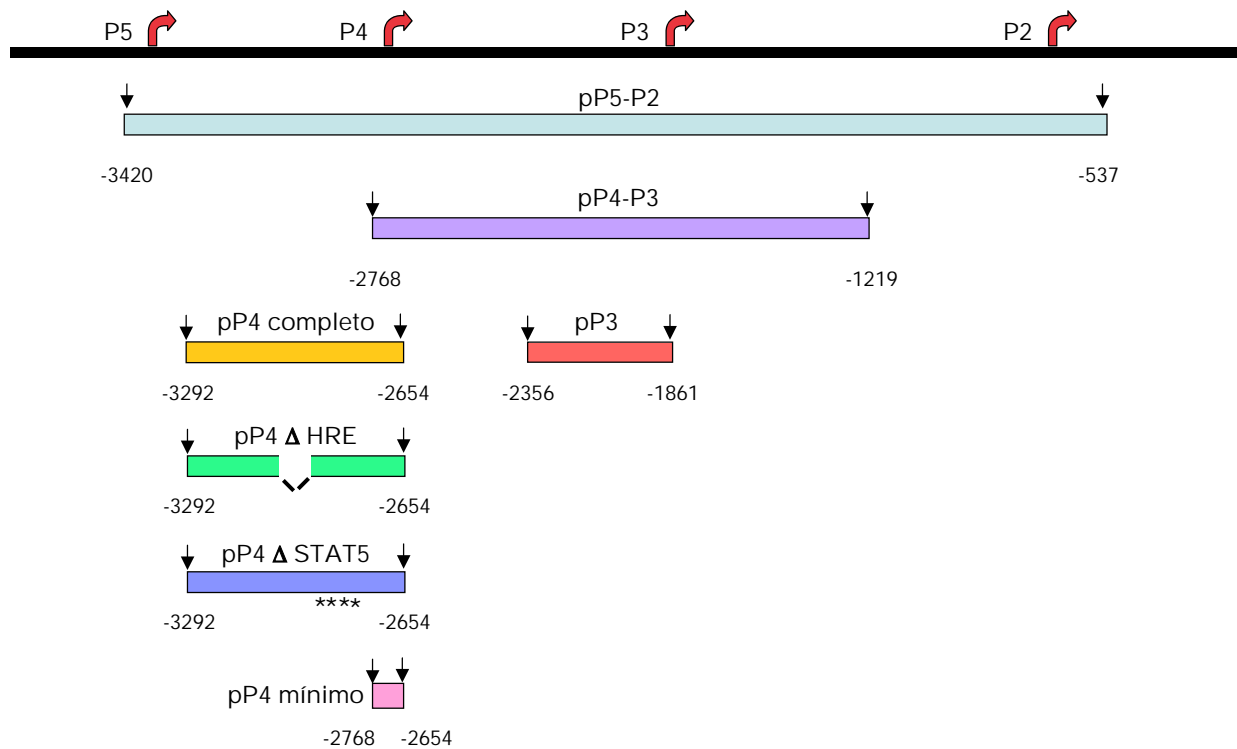


FIGURA 8. **Esquema de los vectores de expresión utilizados en las transfecciones transitorias.** Se muestra la localización de los fragmentos correspondientes a las distintas regiones promotoras de *bcl-X* que se subclonaron río arriba del gen de la luciferasa según lo descrito en el texto.

Cultivos celulares y transfecciones transitorias. Las células Cos-1 se cultivaron en placas de 100 mm (Nunc) con medio DMEM suplementado con 10 % de FCS, penicilina (100 IU/ml), estreptomicina (100 μ g/ml) y glutamina (2 mM) en una estufa a 37°C y 5 % de CO₂. Las líneas celulares de epitelio mamario T47D y HC11 (ésta última gentilmente donada por la Dra. Nancy Hynes, Basilea, Suiza) crecieron en medio RPMI con 10 % FCS y 1 % penicilina/estreptomicina. Cinco μ g/ml de insulina se agregaron a los cultivos de HC11. Las células S49 derivadas de un linfoma T de ratón se crecieron en medio DMEM suplementado con 10 % suero de caballo y 1 % penicilina /estreptomicina.

Para las transfecciones transitorias, las células se plaquearon a una densidad de 5×10^5 células/placa de 60mm y se transfectaron con Lipofectin 2000 (Gibco, Inc.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se transfectaron en células HC11, T47D y Cos-1, 5 pmoles de cada vector de expresión de luciferasa bajo control de distintos promotores de *bcl-X*. Un μg del vector que codifica para la isoforma B del PR humano (Kastner et al., 1990) o del que lo hace para el GR humano (Godowski et al., 1987) y según corresponda, cantidades crecientes de mutantes constitutivamente activos de los vectores STAT5B (pSTAT5B-N642H) y STAT5A (pSTAT5A-N642H) (gentilmente donados por T. Kitamura, Tokio, Japón) (Ariyoshi et al., 2000) se co-transfectaron en células Cos-1. También se agregaron 3 μg del vector pCMV-LacZ como control de transfección. Los plásmidos se diluyeron en 100 μl de medio y se agregaron gota a gota a un volumen equivalente de medio conteniendo 4 μl de Lipofectin 2000 (Gibco, Inc.). Luego de 20 minutos, se agregó gota a gota la mezcla de transfección a las células. Seis horas más tarde, el medio se reemplazó por medio nuevo conteniendo 10 % de CS-FCS y los antibióticos descriptos anteriormente; se incubó toda la noche a 37°C en una estufa con 5 % de CO₂. Las células se trataron con los distintos esteroides durante 36 horas. Finalizada la incubación, las mismas se cosecharon en 200 μl de solución de lisis (Promega Inc. cat # E3971) y se midió la actividad luciferasa en una alícuota de 30 μl con el correspondiente kit, de acuerdo al protocolo del fabricante (Promega Inc. cat # E1501). La actividad β -galactosidasa se midió en una alícuota de 50 μl como se describió previamente (Truss et al., 1995).

Tratamiento de los animales. Para el análisis en timo, se inyectaron ratones macho de la cepa CF1 de 20 g de peso con dexametasona (0.5 mg /100 g de peso corporal en

0.2 ml de vehículo: etanol:propilenglicol:NaCl (0.9 %) (3:3:34)) *i.p.* durante 2 horas. El antagonista glucocorticoide RU (0.5 mg /100 g de peso corporal en 0.2 ml de aceite de maíz) se inyectó *s.c.* 45 minutos antes de la dexta. Se usaron como control ratones inyectados sólo con vehículo. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los timos.

El tejido mamario se obtuvo de ratones hembra BALB/c por remoción de la almohadilla de grasa subcutánea de los pares de mamas #4 y #5 (realizado por la Lic. Ana Quaglino del laboratorio de la Dra. Edith Kordon de la Academia Nacional de Medicina). Se utilizaron hembras amamantando a sus crías, o mamas involucionando tanto por retiro de las crías como por bloqueo local de la salida de leche. Este procedimiento se lleva a cabo colocando pegamento quirúrgico en los pezones correspondientes a las mamas de un solo flanco #4 y #5, que les permite a las crías continuar su amamantamiento con las 8 mamas restantes. De esta manera se produce la involución específica de las mamas bloqueadas en presencia de las hormonas lactogénicas circulantes, tal como se describió previamente (Schere-Levy et al., 2003). El retiro de las crías o el bloqueo local del amamantamiento se llevó a cabo una vez que la lactancia se encontró bien establecida (de 5 a 7 días post-parto) y antes de los 15 días posteriores al nacimiento, cuando las crías pueden comenzar un destete paulatino espontáneo.

Análisis *in silico*. La búsqueda de potenciales elementos de respuesta a esteroides (HREs) y de los sitios de reconocimiento de los factores STAT se llevó a cabo con el programa MatInspector (Quandt et al., 1995).

Ensayos de retardo en gel (EMSA). Los EMSAs se realizaron con los oligonucleótidos sintéticos, HRE-consenso (*cons*-HRE): 5'-TCGGAGTGCCTAGAG AACAACTGTTCTGACTCAAC-3' (Chalepakis et al., 1990), *bcl-X* HRE salvaje (wt): 5'-GAGTTTGAAACAATTCTGGTGTGTCTGTTCCCACATGGGCTCAGCTCTCCAG CACACACCAAATTTTCAGTCAAGGGG-3' y *bcl-X* HRE mutado (mut): 5'-GAGTTTG AACAAATTCTAGTATGTCTATTTCCACATGGGCTCAACTTTCCAACATACACCAA ATTTTCATCAAGGGG-3' como se describió anteriormente (Di Croce et al., 1999). Brevemente, se hibridaron las hebras complementarias en cantidades equimolares (100 nM cada una) en una solución de hibridación (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 30 mM KCl), mediante desnaturalización a 95°C durante 5 minutos y enfriamiento lento a temperatura ambiente. También se realizaron ensayos utilizando como sondas fragmentos de *bclX*-P4 salvaje o mutado, generados por digestión del vector pP4-completo o del pP4- Δ STAT5 respectivamente, con las enzimas *Ase* I y *Bgl* II entre los nucleótidos -3133 y -2829. Los oligonucleótidos doble cadena se marcaron radiactivamente con la T4 polinucleótido quinasa y [³²P]- γ -ATP.

La preparación de los receptores recombinantes PR y GR estuvo a cargo de Bernhard Gross (IMT, Marburg, Alemania); se expresaron en baculovirus y se purificaron como se describió previamente (Di Croce et al., 1999). Los extractos nucleares conteniendo PR o GR se prepararon de células T47D tratadas con R5020, o de células S49 y timocitos obtenidos de animales tratados con dexametasona, durante 30 minutos respectivamente, como se describió anteriormente (Andrews and Faller, 1991). Los ensayos de unión se llevaron a cabo en 30 μ l de solución de reacción conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 mM EDTA, 5 % glicerol, 0.5 mM 2-mercaptoetanol, 90 mM NaCl, 1 μ g de poli dl-dC, 50 ng de sonda marcada, 100 ng

de ADN de timo de ternera y 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de seroalbúmina bovina. Se agregaron a la reacción de unión alícuotas de 1 a 8 μl de extracto nuclear, o de 15 a 120 ng del PR o del GR recombinante, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los ensayos de competencia específica se realizaron agregando el fragmento *bcl-X* HRE radioinerte de 10 a 500 veces en exceso molar. Para la detección de los complejos, la mezcla de reacción se sometió a electroforesis durante 3 horas en un gel 3,5 % acrilamida/20 % glicerol/0.5 % agarosa/0.3X TBE. Los resultados se visualizaron por autorradiografía del gel seco y la cuantificación se realizó con un Phosphorimager (Fuji FLA 3000G) utilizando el programa Image Gauge v 3.1. El anticuerpo monoclonal α -GR (BuGR, Affinity Bioreagents, Golden, Co.) y los policlonales α -STAT5A y α -STAT5B (Santa Cruz, Biotechnology) se incluyeron sin diluir en las mezclas de incubación para los experimentos de *supershift*.

Ensayos de metilación con dimetil sulfato. La metilación se llevó a cabo por agregado de 1 μl de una solución 10 % de dimetil sulfato a 20 μl de la solución de unión (ver arriba) conteniendo 50 ng de ADN marcado en un extremo, 250 ng de dIdC, 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de seroalbúmina bovina y de 15 a 75 ng del PR recombinante. Luego de un minuto a temperatura ambiente, la reacción se detuvo por agregado de 2 μl de 250 mM DTT. Luego de la extracción con fenol-cloroformo y de la precipitación con etanol, las muestras se trataron con 1 M piperidina durante 30 minutos a 90°C, se secaron al vacío y se analizaron en un gel de secuencia 6.5 %.

Preparación y análisis del ARN. Al cabo de 2 horas de tratamiento con dexametasona, en presencia o ausencia de 100 μM AG490 (agregado al medio de cultivo una hora antes), las células se resuspendieron en solución desnaturante (4 M tiocianato de

guanidinio, 25 mM citrato de sodio, pH 7; 0.1 M β -mercaptoetanol y 0.5 % sarcosil) y se extrajo el ARN total según lo descrito por *Chomczynski y Sacchi* (Chomczynski and Sacchi, 1987). Para las reacciones de transcripción reversa se usaron 4 μ g de ARN total. La primera hebra de ADNc se sintetizó con la enzima transcriptasa reversa Superscript (Gibco BRL) y 25 ng/ μ l de oligo-dT (Gibco BRL) como *primer* complementario reverso. Para la amplificación por PCR del exón 5' no traducible de P4, se utilizaron los oligonucleótidos 5': 5'-CCAGGATCTGAGTTCCACTCTTGAACA GAATTAACGC-3' correspondiente a los nucleótidos -2694 a -2658, y 3': 5'-AAATGA GCTATAACTCAGTTTTTCAA-3' correspondiente a los nucleótidos -2551 a -2577 relativos al inicio de la traducción, como *primers* 5' y 3' respectivamente. La reacción dió como producto un fragmento de ADNc de 143 pb. Para la amplificación de los ADNc generados por la activación de P1, se utilizaron los oligonucleótidos *bcl-X P1*: 5'-CCTGAAGCTCTCTCTCTCTTCA-3' correspondiente a los nucleótidos -137 a -114 y *exónStop*: 5'-CCCGTAGAGATCCACAAAAGTGTC-3', que hibrida con la región 5' del exón 6 de *bcl-X_{LC}*, como *primers* 5' y 3' respectivamente. La reacción dió como producto un fragmento de ADNc de 730 pb. La amplificación de los ADNc que contienen al exón 4 se realizó con los oligonucleótidos *bcl-X P2*: 5'-GACTAGTCCAG GTTGTGAGGGGGCAGGTTCCCTAAGCTTCGCAATTCCTCT-3' correspondiente a los nucleótidos -619 a -577 y *exónStop* (descrito arriba). La reacción dió como productos fragmentos de ADNc de 908 pb y 726 pb de longitud, correspondientes a las isoformas *bcl-X_L* y *bcl-X_C* respectivamente. La amplificación de los ADNc que contienen al exón 3 se realizó con los oligonucleótidos *bcl-X P3*: 5'-GGACTAGTCC TAGATTGAAGGAATGTGAACCATAAACGTTCCACGCG-3' correspondiente a los nucleótidos -1858 a -1821 y *exónStop* (descrito arriba). La reacción dió como producto un fragmento de ADNc de 750 pb correspondiente a la isoforma *bcl-X_C*.

Todas las PCRs se normalizaron determinando los niveles de expresión de *gapdh*. Se utilizaron los *primers* 5': 5'-TCATCAACGGGAAGCCCATCACCATCTTC-3' y 3': 5'-GTCTTCTGGTTGGCAGTAATGGCATGGACT-3', que hibridan específicamente con el ADNc de *gapdh*. La reacción dió como producto un fragmento de ADNc de 357 pb de longitud.

A fin de lograr condiciones semicuantitativas, las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo dentro del rango de amplificación lineal. Dos μ l del ADNc obtenido, 1.25 U de la enzima Taq-ADN polimerasa (Gibco BRL) y 20 pmoles de cada uno de los *primers* de amplificación se agregaron a la mezcla de reacción conteniendo 1 X buffer, 2 mM $MgCl_2$ y 200 μ M de cada dNTP, en 50 μ l finales. Las muestras se desnaturalizaron 3 minutos a 96°C, y luego se sometieron a 8, 15, 25 y 30 ciclos de amplificación siguiendo el programa: 96°C, 40 segundos; 65°C (para *gapdh*), 60°C (para el exón de P4), 58°C (para *bcl-X P1*, *bcl-X P2* y *bcl-X P3*), 30 segundos, y 72°C, 1 minuto, finalizando a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa 1.5 %, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV. La imagen negativa se escaneó y la densitometría de las bandas se realizó con el programa Image Quant (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA).

Los ensayos de protección a ARNasa se realizaron como se describió previamente (Zinn et al., 1983). Para la preparación de la sonda de *bcl-X*, el plásmido pGLD3 se digirió con la enzima *Hinf I* y se transcribió con la enzima T3 ARN polimerasa. La longitud de la ribosonda completa de *bcl-X* fue de 294 pb, y los tamaños de los fragmentos protegidos para *bcl-X_L* y *bcl-X_C* fueron de 237 y 155 pb, respectivamente. Para la preparación de la ribosonda P1, el plásmido pNM1-9SaI I (Pecci et al., 2001) se digirió con la enzima *Mae III* y se transcribió con la T3 ARN

polimerasa. La longitud de la ribosonda completa fue de 558 pb y el tamaño del fragmento protegido de 176 pb. Para la preparación de la ribosonda P2, el plásmido pNM1-9*Eag* I (Pecci et al., 2001) se cortó con *EcoR* I y se transcribió con la T7 ARN polimerasa. La longitud de la ribosonda completa fue de 495 pb y el tamaño del fragmento protegido de 124 pb. La ribosonda P4 se preparó cortando el plásmido pBKSP4 con *Spe* I y se transcribió con la T3 ARN polimerasa. La longitud de la ribosonda completa fue de 207 pb y el tamaño del fragmento protegido de 147 pb. Para la preparación de la ribosonda P5, el plásmido pNM1-9*SacI-EcoRI* se digirió con *Sac* I y se transcribió con la T3 ARN polimerasa; la longitud de la ribosonda completa fue de 670 pb y el tamaño del fragmento protegido de 248 pb. El molde de *gapdh* pTRIGAPDH (Ambion, Austin, TX) se digirió con la enzima *Bgl* II y se transcribió con la T3 ARN polimerasa. La longitud de la sonda fue de 359 pb y el tamaño del fragmento protegido fue de 316 pb.

Las ribosondas marcadas con [³²P]- α -CTP (Amersham, Braunschweig) se prepararon según el protocolo del kit utilizado (Promega, Madison, WI). Las sondas se co-precipitaron con las muestras de ARN y se disolvieron en la solución de hibridación (80 % formamida, 40 mM PIPES pH 6.7, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA), se desnaturalizaron a 95°C durante 10 minutos, y se hibridaron a 52°C durante 18 horas. Luego de la digestión con 40 μ g/ml ARNasa A y 2 μ g/ml ARNasa T1, las muestras se trataron con 3.5 mg/ml proteinasa K, se precipitaron, se desnaturalizaron y se sometieron a electroforesis en un gel desnaturalizante con 5 % acrilamida. La cuantificación se realizó con un PhosphorImager (Fuji FLA 3000G) usando el programa Image-Gauge. En todos los casos, la cuantificación se normalizó contra *gapdh*.

Experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Las células HC11 se trataron con dexametasona 10^{-8} M o etanol (control) durante 30 minutos. Además, se extrajeron las mamas de ratones hembra en período de lactancia o a las 48 hs de involución (realizado por la Lic. Ana Quaglino del laboratorio de la Dra. Edith Kordon de la Academia Nacional de Medicina). Por otro lado, ratones macho se inyectaron con 0.5 mg dexametasona /100 g peso corporal durante 30 minutos, se sacrificaron y se extrajeron los testículos. Las células S49 se trataron con dexametasona 10^{-8} M, en presencia o ausencia de 100 μ M AG490 (agregado al medio de cultivo una hora antes) y se incubaron durante intervalos de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. A continuación se realizó el *crosslinking* de las proteínas al ADN con 1 % formaldehído agregado directamente al medio de cultivo o PBS durante 10 minutos a 37°C. Las células se lavaron y se resuspendieron en solución de lisis (1 % SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml pepstatina A) durante 10 minutos en hielo. Los lisados se sonicaron con 3 pulsos de 30 segundos al 20 % de potencia (Sonicador Fisher Scientific Modelo 500) de manera de obtener fragmentos de ADN de 500 pb de longitud promedio. La cromatina obtenida se diluyó al tercio en solución de inmunoprecipitación (0.01% SDS, 1.1 % TX100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 167 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml pepstatina A) y 1 % de esta solución se guardó para determinar la cantidad inicial de ADN a inmunoprecipitar (*input*). Luego se pre-trató la cromatina con bolitas de proteína A agarosa bloqueadas con ADN de esperma de salmón (Upstate Biotechnologies) durante 4 horas a 4°C con rotación. Se centrifugaron las muestras y los sobrenadantes se incubaron toda la noche a 4°C con los correspondientes anticuerpos sin diluir. Los experimentos de ChIP se llevaron a cabo utilizando: α -GR (BuGR, Affinity Bioreagents, Golden, Co.), α -Pol-II (8WG16; Berkeley Antibody

Company), α -STAT5B (G-2 Santa Cruz, Biotechnology), α -STAT5A (L-20 Santa Cruz, Biotechnology), α -SRC1 (Upstate Biotechnologies), α -SMRT (Santa Cruz, Biotechnology), α -BRG-1 (Santa Cruz, Biotechnology) y α -HDAC3 (Abcam). Al día siguiente, se agregaron nuevamente bolitas de proteína A agarosa durante 2 horas a 4°C con rotación y se centrifugaron las muestras un minuto a 8000 rpm. Los pellets obtenidos se lavaron primero con una solución 0.1 % SDS, 1 % Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1 y 150 mM NaCl, luego con una de composición similar pero con 500 mM NaCl y el tercer lavado se realizó con una solución 0.25 M LiCl, 1 % NP-40, 1 % deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA y 10 mM Tris-HCl pH 8.1. Finalmente la cromatina inmunoprecipitada se eluyó con 1 % SDS y 0.1 M NaHCO₃. Se agregó 0.2 M NaCl y se revirtió el *crosslinking* durante toda la noche a 65°C (los *inputs* se trataron de forma similar). Luego las muestras se digirieron con 20 µg/ml proteinasa K, se extrajo el ADN con fenol (saturado en Tris-HCl pH 8)-cloroformo (49:1) y se precipitó con etanol absoluto. Para la amplificación por PCR de la región promotora P4, se utilizaron los oligonucleótidos 5'-GAGTTTGAAACAATTCTGGTGTGTCTG-3' correspondiente a los nucleótidos -3056 a -3030, y 5'-GCCACAGAGTTCATTCTATCCTTTTGG-3' correspondiente a los nucleótidos -2949 a -2965 relativos al inicio de la traducción, como *primers* 5' y 3' respectivamente. El producto de la reacción correspondió a un fragmento de ADN de 130 pb. Para la amplificación de la región promotora proximal P1, se utilizaron los oligonucleótidos 5'-CCTGAAGCTCTCTCTCTCTTCA-3' correspondiente a los nucleótidos -137 a -114, y 5'-CCAGCTCGGTTGCTCTGAGACAT-3' correspondiente al nucleótido 24 y al origen de la traducción, como *primers* 5' y 3' respectivamente. El producto de la reacción correspondió a un fragmento de ADN de 161 pb. Para cada muestra, las PCRs se realizaron con diferentes números de ciclos o con diluciones del ADN *input* para

determinar el rango lineal de amplificación; todos los resultados mostrados caen dentro de dicho rango.

Western Blots. Los extractos proteicos se prepararon a partir de células tratadas con dexametasona 10^{-8} M durante 8 horas y posteriormente lisadas a 4°C durante una hora en 2 volúmenes de solución de lisis (50 mM Tris-Cl pH 8, 150 mM NaCl, 0.02 % azida sódica, 100 mg/ml PMSF, 1 mg/ml aprotinina, 1 % Nonidet P-40). El lisado se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C durante 10 minutos, y se descartó el pellet. La concentración proteica en el sobrenadante se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad). Luego de agregar la solución de corrida y desnaturalizar las muestras durante 5 minutos a 100°C, 100 µg de proteína se corrieron en un gel 15 % SDS-poliacrilamida, y la electroforesis se llevó a cabo a 25 mA durante 2 horas. A continuación las proteínas se transfirieron a una membrana Hybond ECL (Amersham) mediante electrotransferencia. La incubación con los anticuerpos se realizó en solución de bloqueo (1 % leche, 0.5 % Tween) a 4°C. Como anticuerpos primarios se utilizaron el policlonal de conejo α -STAT5A y el policlonal de ratón α -STAT5B descritos anteriormente, y el policlonal de conejo α -Bcl-X_{L/C}. Como anticuerpo secundario, se utilizó uno anti-conejo o ratón conjugado con peroxidasa (Amersham). Las bandas proteicas se detectaron con el kit de ECL (Amersham) y se revelaron por autorradiografía.

Estadística. Los resultados de las transfecciones transitorias están expresados como el promedio de tres experimentos independientes \pm ES. Los datos se analizaron con Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor, y cuando se obtuvo significación se realizaron contrastes *a posteriori* (Tuckey-Kramer) con el fin de

aumentar la rigurosidad del test. Para el análisis de los datos se utilizó el programa GraphPad InStat, versión 3.01 (1998).

RESULTADOS-CAPÍTULO 1

Las hormonas esteroideas inducen la expresión del gen ***bcl-X*** a través de la activación del promotor distal P4

La región promotora P4 del gen bcl-X de ratón contiene elementos de respuesta a hormonas esteroideas (HREs)

Resultados anteriores (L.R.V., seminario de licenciatura) demostraron que un fragmento conteniendo los promotores P3 y P4 del gen *bcl-X* de ratón, subclonado en un vector de expresión río arriba del gen reportero luciferasa, se activaba significativamente con el glucocorticoide sintético dexametasona y el agonista progestágeno R5020 en distintos tipos celulares.

Con el objeto de dilucidar cuál de estos dos promotores era el responsable de la respuesta hormonal, se prepararon nuevas construcciones conteniendo, por un lado, el fragmento P3 y, por otro, el fragmento P4 en el mismo vector reportero luciferasa (Figura 9). Estos vectores de expresión se co-transfectaron en forma transitoria con el pGR (Figura 10 A) o el pPR (Figura 10 B) en células Cos-1.

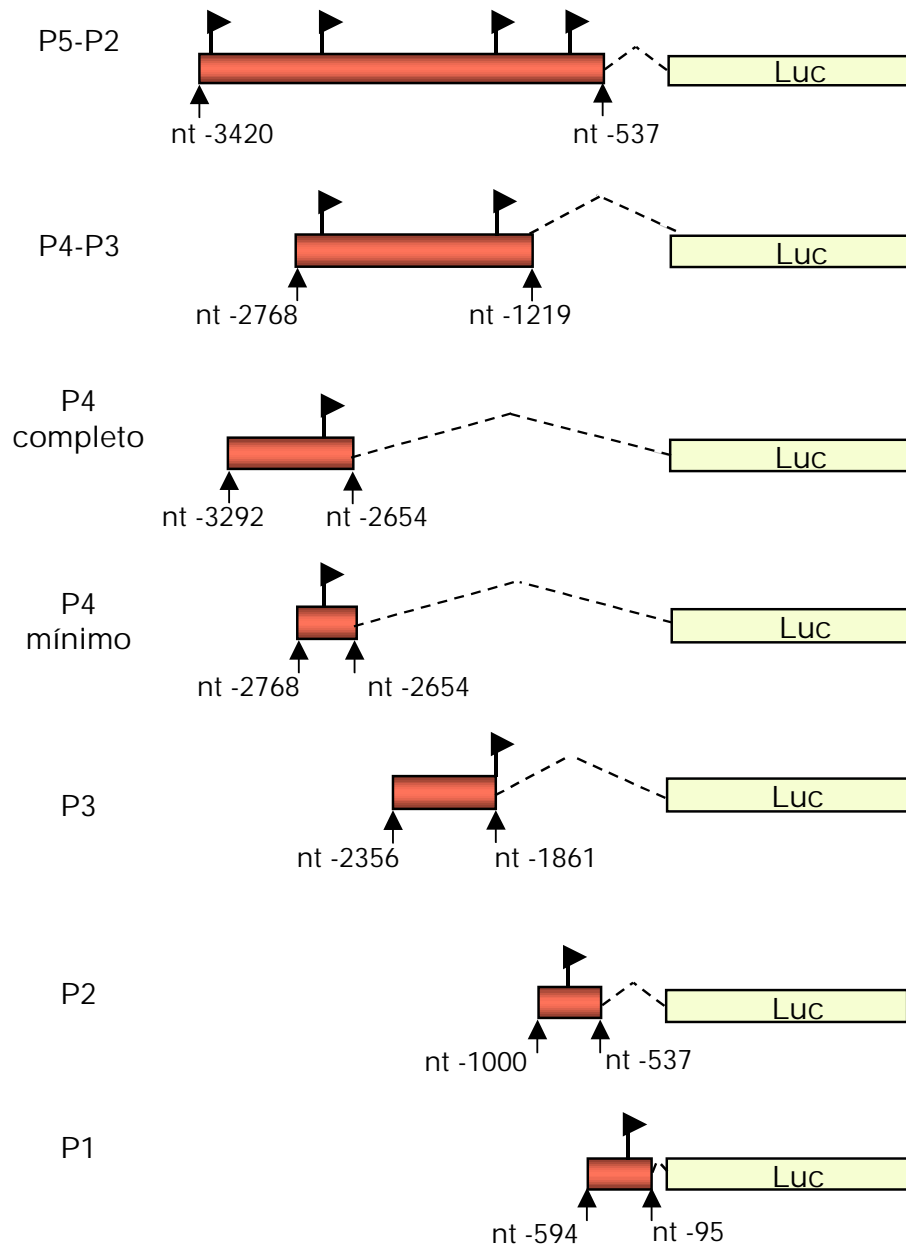
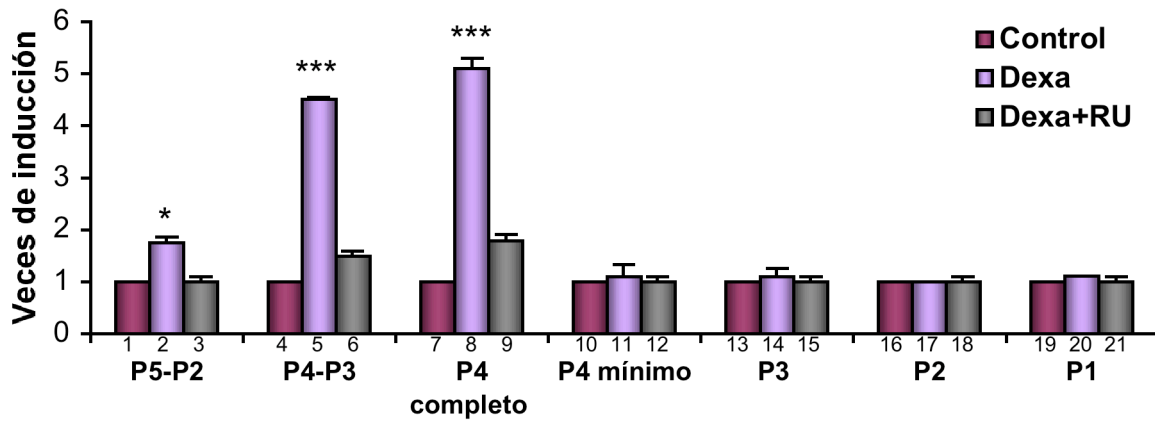


FIGURA 9. **Esquema de los vectores de expresión utilizados en las transfecciones transitorias.** Las distintas regiones promotoras de *bcl-X* se subclonaron río arriba del gen de la luciferasa según lo descrito en materiales y métodos.

Los resultados demostraron que sólo la región que contiene a P4, comprendida entre los nucleótidos -3292 y -2654 relativos al inicio de la traducción (vector pP4-completo), exhibió una fuerte y significativa respuesta a la dexametasona (5.1 veces de inducción vs control) (Figura 10 A, calle 8) y al R5020 (6.3 veces de inducción vs control) (Figura 10 B, calle 8). En todos los casos, la co-incubación de esos agonistas con el antagonista RU revirtió completamente el efecto hormonal (Figura 10 A y B, calle 9).

El vector pP4-mínimo, conteniendo un fragmento desde el nucleótido -2768 hasta el -2654 relativos al inicio de la traducción, no respondió a ninguno de los tratamientos (Figura 10 A y B, calle 11). No obstante, en células transfectadas con el vector pP3, que contiene un fragmento desde el nucleótido -2356 hasta el -1861 relativos al ATG, mientras que el tratamiento con dexametasona no tuvo efecto (Figura 10 A, calle 14), el R5020 aumentó significativamente la expresión de luciferasa alrededor de dos veces (Figura 10 B, calle 14). Con el vector pP3-P4, utilizado con anterioridad a este trabajo (*L.R.V.*, seminario de licenciatura) también se observó una expresión dependiente de hormonas esteroideas (Figura 10 A y B, calle 5).

A



B

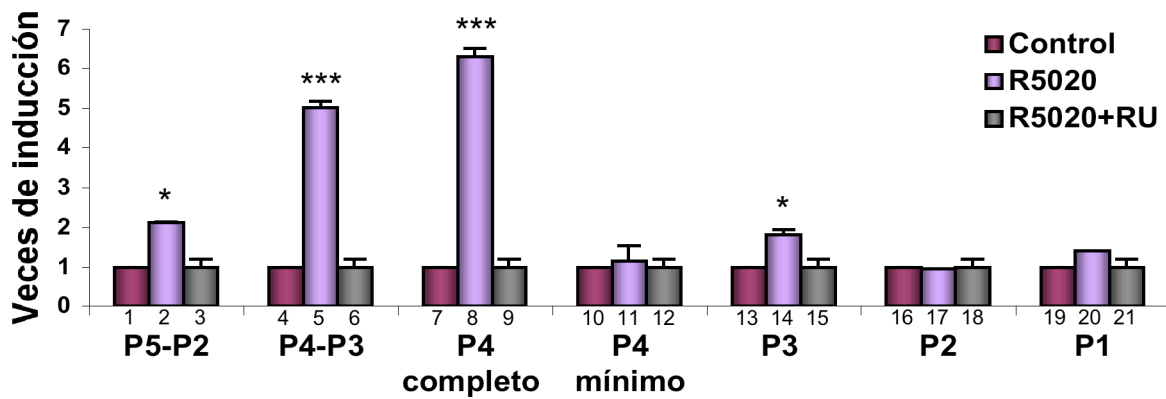


FIGURA 10. **Control hormonal de la actividad promotora de *bcl-X***. Células Cos-1 se co-transfectaron con el vector pGR (A) o pPR (B) y los vectores de expresión que llevan los distintos promotores de *bcl-X*. El vector pCMV-*LacZ* también se agregó como control de transfección. Las células se incubaron durante 36 hs con etanol (Control), R5020, R5020+RU, dexa o dexa+RU, y se determinó la actividad luciferasa. Luego de corregir la eficiencia de transfección con la actividad β -gal, los valores se expresaron como veces de inducción relativas a los controles. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. *** $p < 0.001$ vs control. * $p < 0.05$ vs control.

Cuando se transfectó el vector pP4-completo en la línea celular mamaria humana T47D, que contiene una alta expresión de PR endógeno, y se trató con R5020 se observó un aumento en la expresión de luciferasa (3 veces de inducción vs control) (Figura 11 A, calle 2). PR mediaría la respuesta a R5020 dado que su

efecto se bloqueó con RU (Figura 11 A, calle 3). Cuando se transfectaron las células con el vector pP4-mínimo no se observó inducción (Figura 11 A, calle 5).

Dado que trabajos anteriores demostraron que la dexta induce la expresión de *bcl-X_L* en la línea celular de epitelio mamario de ratón HC11 (Schorr and Furth, 2000), se analizó el efecto de los glucocorticoides sobre la activación de P4 en estas células (Figura 11 B).

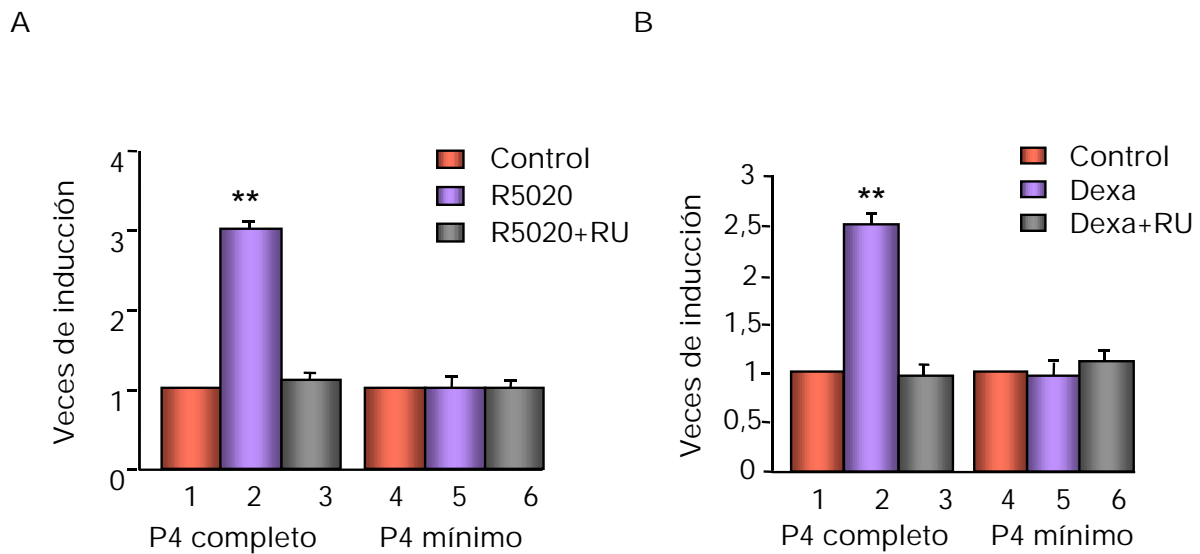


FIGURA 11. **Control hormonal de la actividad promotora de *bcl-X* en células de mama.** Células T47D (A) o HC11 (B) se transfectaron con los vectores de expresión que llevan las distintas regiones promotoras de *bcl-X*. El vector pCMV-*LacZ* también se agregó como control de transfección. Las células se incubaron durante 36 hs con etanol (Control), R5020, R5020+RU, dexta o dexta+RU, y se determinó la actividad luciferasa. Luego de corregir la eficiencia de transfección con la actividad β -gal, los valores se expresaron como veces de inducción relativas a los controles. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. ** $p < 0.01$ vs control.

Luego del tratamiento hormonal, la expresión de luciferasa aumentó en células HC11 transfectadas con el vector pP4-completo (2.5 veces de inducción vs control) (Figura 11 B, calle 2), pero no con el vector pP4-mínimo (Figura 11 B, calle 5).

Todas las construcciones demostraron actividades basales similares entre las líneas celulares estudiadas (datos no mostrados).

Resultados similares se habían obtenido con anterioridad en la línea celular RENTROP, derivada de células epiteliales de endometrio de rata, que responde a las hormonas esteroideas a través de la inducción de la expresión de *bcl-X_L* con la consecuente inhibición de la muerte celular (L.R.V., seminario de licenciatura y Pecci et al., 1997).

En conjunto, estos resultados sugieren que la región comprendida entre los nucleótidos -3292 y -2768 relativos al inicio de la traducción, contiene secuencias responsables de la activación de P4 por hormonas esteroideas.

El análisis *in silico* de la secuencia de dicha región promotora reveló la presencia de varios sitios potenciales de elementos de respuesta a hormonas (HREs) localizados río arriba del P4 mínimo. Dos de estas secuencias, ubicadas entre las posiciones -3040 y -3027 (HRE I = TGGTGTgtcTGTTCC) y entre -3014 y -3001 (HRE II = AGCTCTccAGCACA), están incluidas en la construcción del P4 completo (Figura 12). Ambos sitios están relativamente bien conservados en comparación con la secuencia palindrómica consenso identificada en el gen del virus de tumor mamario de ratón (*MMTV*, TGTyCTnnnACARGA) (Scheidereit et al., 1983). Los sitios HRE I and HRE II son palíndromes imperfectos separados por 3 y 2 pb, respectivamente, y difieren de la región consenso en tres bases (Figura 12).

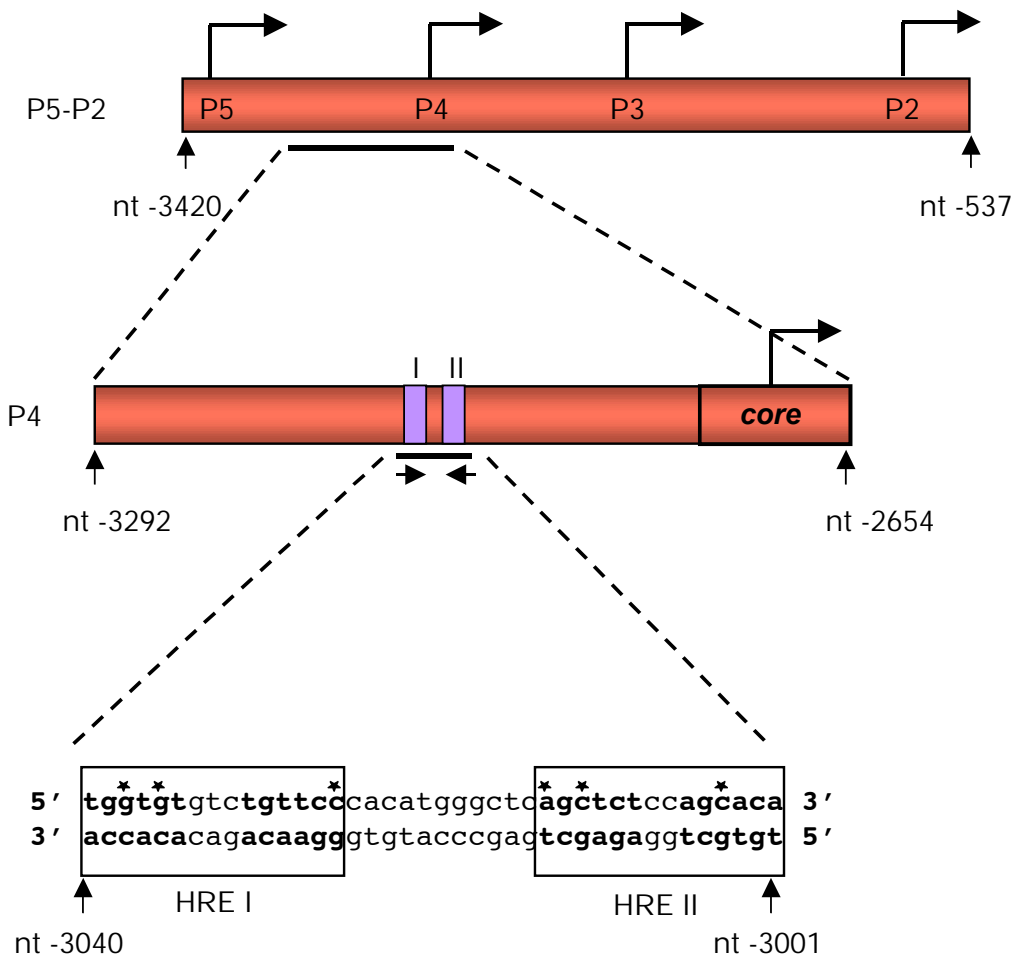


FIGURA 12. **Secuencia nucleotídica de los HREs en la región promotora P4.** El esquema superior muestra la localización del fragmento P4-completo dentro del gran fragmento P5-P2. El esquema inferior muestra en detalle la región promotora P4 con la ubicación de los HRE I y HRE II. Las flechas indican la localización de los oligonucleótidos usados en los experimentos de CHIP. La secuencia nucleotídica de los HREs se detalla dentro de los recuadros en la región comprendida entre las bases -3040 y -3001 relativas al ATG. Los asteriscos indican las bases distintas al HRE-consenso TGTCTnnnACARGA.

Análisis de la funcionalidad de los HREs

A los efectos de analizar si estos posibles HREs unen GR o PR *in vitro*, se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel (EMSA) con cantidades crecientes de

extractos nucleares provenientes de células T47D tratadas con R5020 incubados con un oligonucleótido que contiene dichas secuencias (*bcl-X*-HRE). En estas condiciones, se observó una banda retrasada en el gel (Figura 13 A, calles 2 a 5), que se compitió efectivamente con un exceso molar de 500 veces de un fragmento consenso radioinerte (*cons*-HRE, Figura 13 A, calle 6).

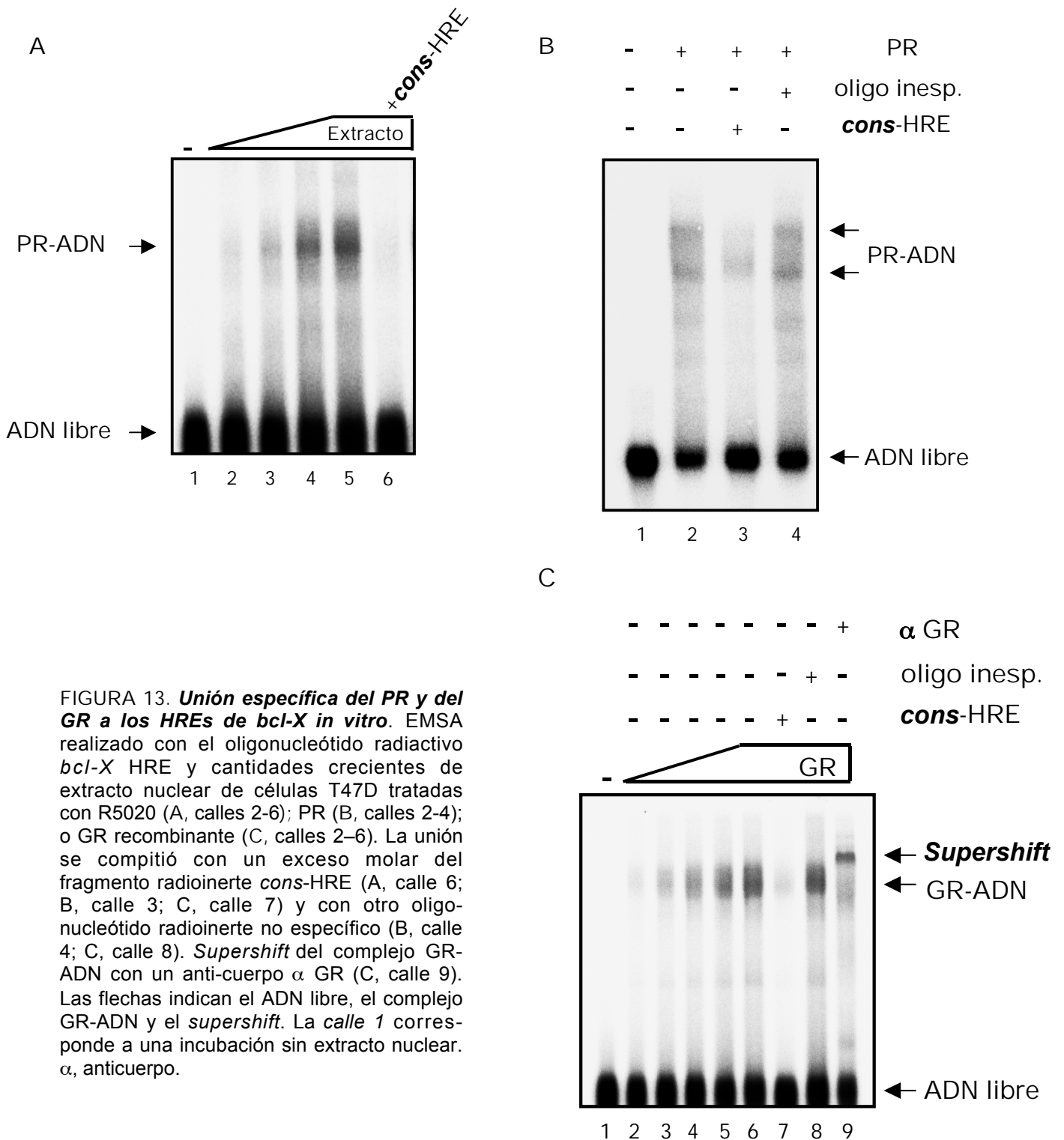


FIGURA 13. **Unión específica del PR y del GR a los HREs de *bcl-X* in vitro.** EMSA realizado con el oligonucleótido radiactivo *bcl-X* HRE y cantidades crecientes de extracto nuclear de células T47D tratadas con R5020 (A, calles 2-6); PR (B, calles 2-4); o GR recombinante (C, calles 2-6). La unión se compitió con un exceso molar del fragmento radioinerte *cons*-HRE (A, calle 6; B, calle 3; C, calle 7) y con otro oligonucleótido radioinerte no específico (B, calle 4; C, calle 8). *Supershift* del complejo GR-ADN con un anti-cuerpo α GR (C, calle 9). Las flechas indican el ADN libre, el complejo GR-ADN y el *supershift*. La *calle 1* corresponde a una incubación sin extracto nuclear. α , anticuerpo.

Resultados similares se obtuvieron con una preparación de PR recombinante (Figura 13 B, calles 2 a 4).

Por otro lado, se analizó por EMSA la interacción del GR con el fragmento *bcl-X*-HRE. Cantidades crecientes del GR recombinante generaron un complejo con un retraso similar al obtenido con el PR (Figura 13 C, calles 2 a 6), cuya formación también se compitió con un exceso molar de 500 veces de oligonucleótido *cons*-HRE radioinerte (Figura 13 C, calle 7). En cambio, un exceso molar de 500 veces de oligonucleótido inespecífico no desplazó la formación del complejo (Figura 13 C, calle 8). La identidad del complejo GR-*bcl-X*-HRE se confirmó mediante un ensayo de *supershift* con un anticuerpo monoclonal α -GR (Figura 13 C, calle 9).

A continuación, dada la naturaleza degenerada de los HREs de *bcl-X*, se analizó su capacidad de los mismos para competir con el oligonucleótido *cons*-HRE por la unión al PR recombinante (Figura 14). Como se muestra en la Figura 14 A, la interacción del PR con el fragmento [³²P]-*cons*-HRE se desplazó con el oligonucleótido *bcl-X*-HRE radioinerte (Figura 14 A, calles 3 a 8). Las curvas de competencia indican que es necesario un exceso molar de aproximadamente 20 veces del oligonucleótido *bcl-X*-HRE para reducir la interacción PR-[³²P]-*cons*-HRE en un 50 %, y sólo de 10 veces del fragmento *cons*-HRE radioinerte (Figura 14 B). Estos resultados sugieren que el PR se une a los HREs de *bcl-X* con aproximadamente la mitad de la afinidad con la que lo hace al HRE consenso.

Para identificar los residuos guanina del P4 que contactan con el PR, se realizaron experimentos de metilación con dimetil sulfato (DMS). Cantidades crecientes de la preparación del PR recombinante se incubaron con el fragmento [³²P]-*bcl-X*-HRE. Los resultados demostraron que los residuos guanina ubicados en ambos sitios HRE I y HRE II se protegieron de la metilación en presencia del PR

(Figura 15, calles 3 a 6). Estas guaninas protegidas corresponden a las previamente reportadas en el HRE1 del *MMTV* (Chalepakis et al., 1990).

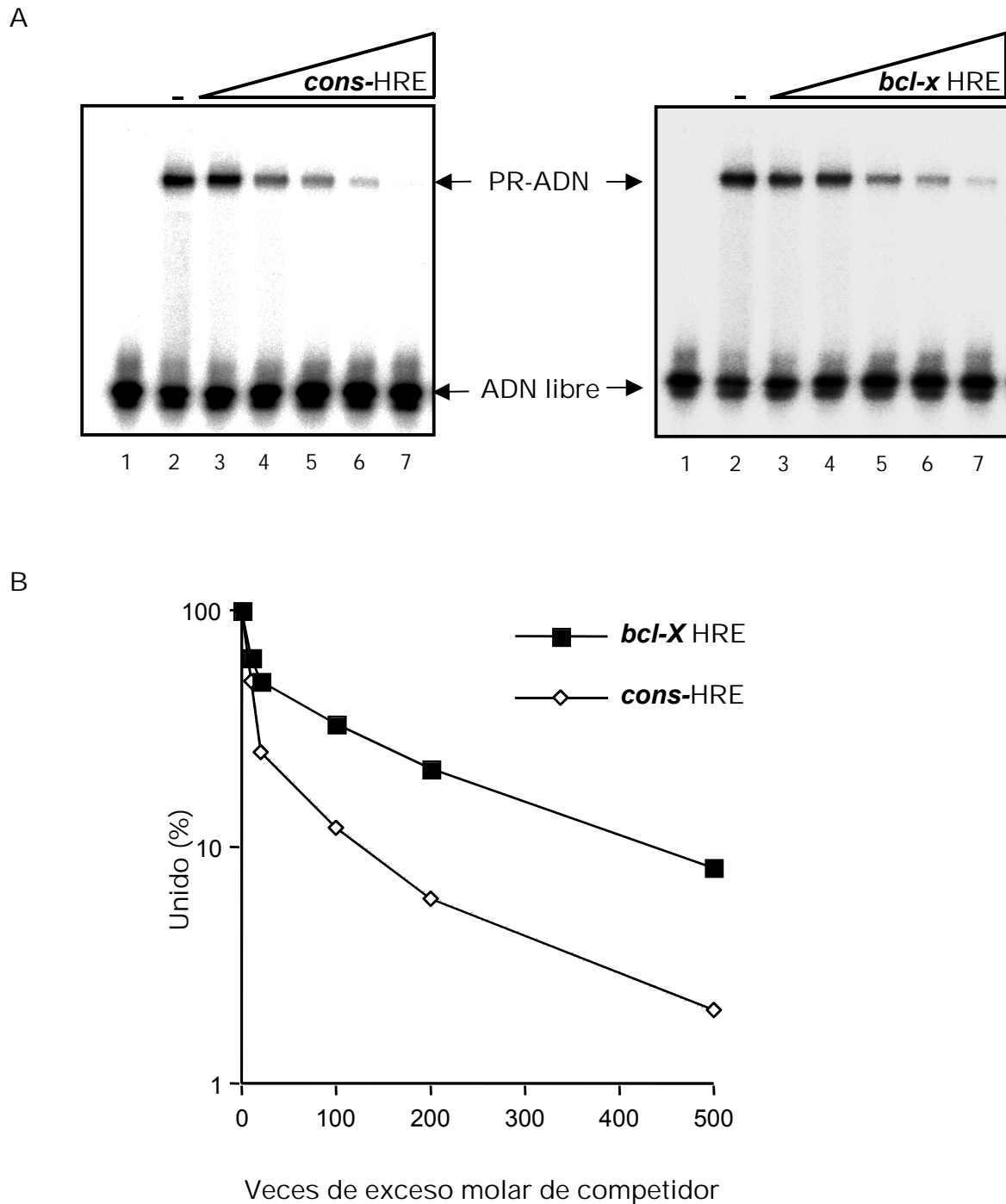


FIGURA 14. **Competencia de los HREs de *bcl-X* por la unión al PR.** (A) La unión al PR con el fragmento radioactivo *cons*-HRE se compitió con cantidades crecientes (0, 10, 20, 100, 200 y 500 veces en exceso molar) del fragmento radioinerte *bcl-X* HRE (panel derecho, calles 2-8) o del mismo fragmento radioinerte *cons*-HRE (panel izquierdo, calles 2-8). Las flechas indican el ADN libre y el complejo PR-ADN. (B) El fragmento radioactivo *cons*-HRE se incubó con cantidades crecientes radioinertes de los fragmentos *cons*-HRE o *bcl-X*-HREs para medir las afinidades relativas al PR. La cantidad de complejo PR-ADN en ausencia de competidor se consideró como 100 %.

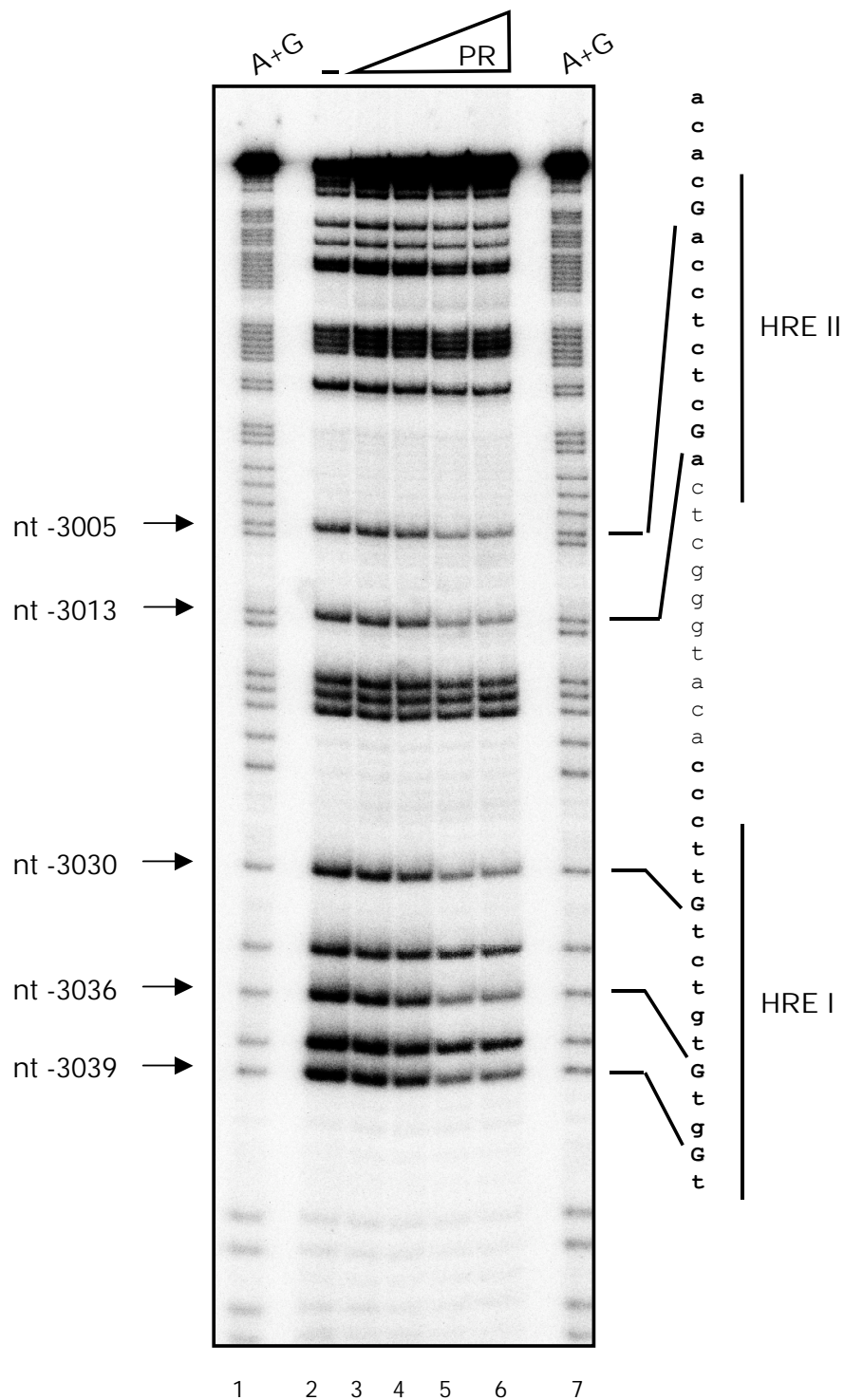
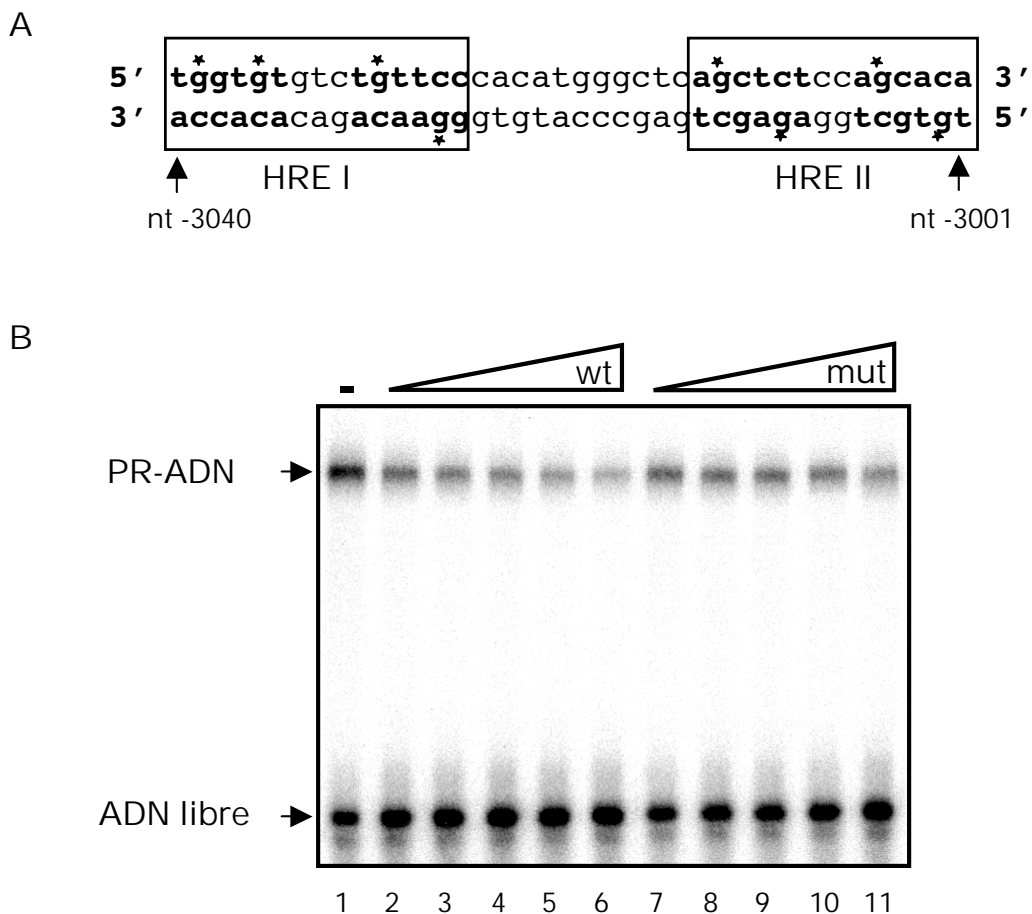


FIGURA 15. **Identificación de los contactos PR-HREs de *bcl-X* con dimetil sulfato.** Cantidades crecientes del PR recombinante incubadas con el fragmento radiactivo *bcl-X*-HRE (calles 3-6) se trataron con dimetil sulfato (DMS) y se identificaron los residuos guanina protegidos que se indican con flechas. Calles 1 y 7: reacción de secuenciación química A+G de la región *bcl-X*-HRE. La secuencia completa se muestra a la derecha y se indica la localización de los HRE I y HRE II.

Con el objeto de estudiar la relevancia de los contactos del receptor identificados, se mutaron todas las guaninas contactadas de los HREs por adeninas (Figura 16 A) y se analizó el efecto de estas mutaciones sobre la capacidad de unir el PR. En ensayos de competencia, un oligonucleótido radioinerte con ambos sitios HRE mutados (*bcl-X*-mut) resultó ser un competidor débil por la unión del PR a un fragmento [³²P]-*cons*-HRE, en comparación con los HREs de *bcl-X* salvajes (Figura 16 B, calles 2 a 11). Un exceso molar de más de 100 veces de la forma mutada se necesitó para reducir la interacción PR-[³²P]-*cons*-HRE en un 50 % (Figura 16 C). Estos experimentos sugieren que el PR se une a los HREs mutados de *bcl-X* con aproximadamente 5 veces menos afinidad que a los HREs de *bcl-X* salvajes.



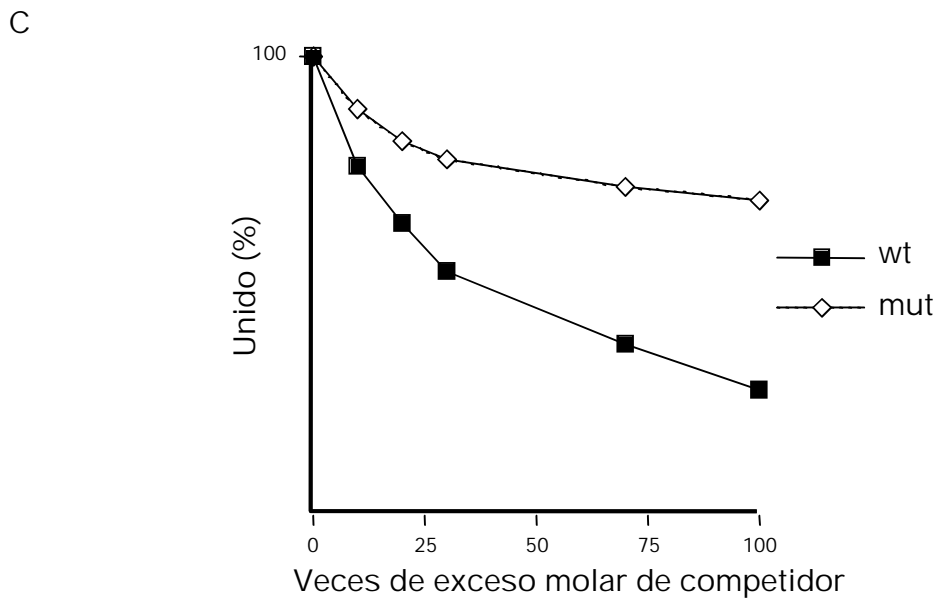


FIGURA 16. **Competencia de los HREs mutados de *bcl-X* por la unión al PR.** (A) Región promotora de *bcl-X* desde el nt -3040 al nt -3001 relativos al ATG. Los asteriscos indican las 4 guaninas que se mutaron en cada HRE. (B) La competencia del fragmento radiactivo *cons*-HRE por la unión al PR se analizó agregando cantidades crecientes (0, 10, 20, 30, 70 y 100 veces en exceso molar) del fragmento radioinerte *bcl-X*-HRE salvaje (wt, calles 1-6) o mutado (mut, calles 7-11). Las flechas indican el ADN libre y el complejo PR-ADN. (C). Representación gráfica de los datos de (B). La cantidad de complejo PR-ADN en ausencia de competidor se consideró como 100 %.

Los HREs de *bcl-X* son necesarios para conferirle a P4 respuesta a esteroides

Con el fin de analizar la relevancia biológica de los sitios HRE I y II, se llevaron a cabo ensayos de transfecciones transitorias con el vector de expresión pP4- Δ HRE, al cual se le delecionaron 95 nucleótidos que incluyen a ambos HREs en la región completa (Figura 17 A). Esta construcción no respondió al R5020 (Figura 17 B, comparar la calle 5 con la calle 2) en células T47D, ni a la dexametasona en células HC11 (Figura 17 C, comparar la calle 5 con la calle 2). Estos resultados sugieren que los sitios HRE I y HRE II podrían ser HREs funcionales que le confieren respuesta hormonal a P4.

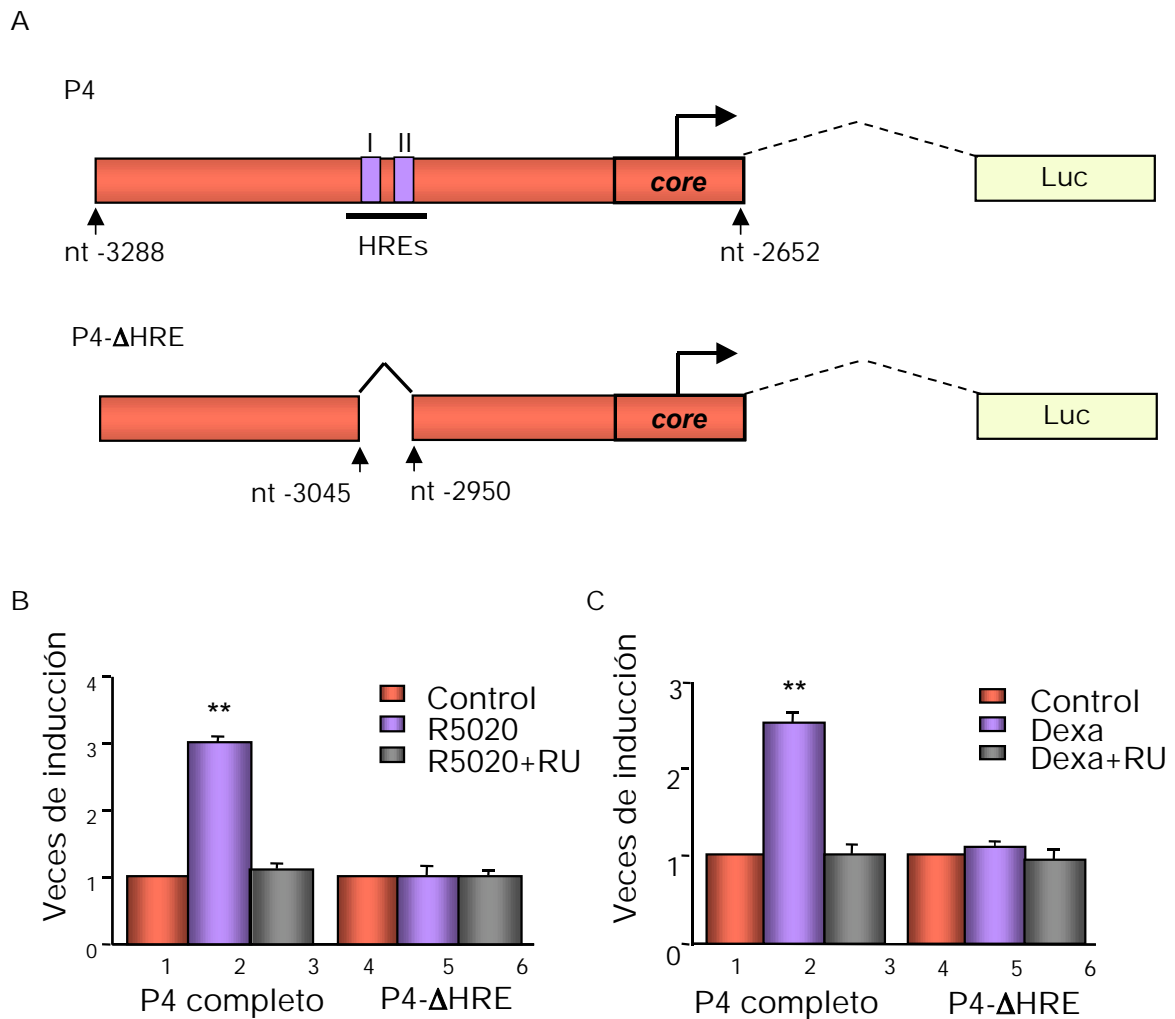


FIGURA 17. **Respuesta a esteroides de los HREs del promotor P4 de bcl-X.** (A) El esquema del vector P4-ΔHRE con ambos HREs eliminados se compara con el del vector salvaje P4 completo. Células T47D (B) o HC11 (C) se transfectaron con los vectores de expresión pP4-completo o pP4-ΔHRE. El vector pCMV-LacZ también se agregó como control de transfección. Las células se incubaron durante 36 hs con los distintos tratamientos y se determinó la actividad luciferasa. Luego de corregir la eficiencia de transfección con la actividad β-gal, los valores se expresaron como veces de inducción relativas a los controles. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. ** $p < 0.01$ vs control.

RESULTADOS-CAPÍTULO 2

El contexto celular modula la expresión de ***bcl-X*** dependiente de glucocorticoides

La dexametasona aumenta los niveles de los transcritos de *bcl-X* en células de epitelio mamario y los disminuye en timocitos

Los glucocorticoides inhiben la apoptosis en células de epitelio mamario, mientras que en células linfoides, en particular en los timocitos CD4⁺CD8⁺, la inducen.

Dado que como se demostró con anterioridad la abundancia relativa de las isoformas anti- y pro-apoptóticas de *bcl-X* cambia durante el proceso apoptótico (Chang et al., 1997; Gascoyne et al., 2003; Pecci et al., 1997; Vicent et al., 2002), se analizó a continuación la influencia del contexto celular sobre la expresión de *bcl-X* en respuesta a glucocorticoides. Para ello, mediante ensayos de protección a ARNasa se determinaron los niveles de expresión de las isoformas *bcl-X_L* y *bcl-X_C* en la línea celular HC11 y en timocitos de animales tratados con dexametasona. En células de epitelio mamario no tratadas, las dos isoformas se expresan en una relación *bcl-X_L*/*bcl-X_C* de 2.52 (Figura 18 A, calle 1 y recuadro al pie). El tratamiento hormonal provocó la acumulación de transcritos de ambas isoformas, y en particular, un aumento relativo en los niveles de mensajero de *bcl-X_L* respecto de *bcl-X_C*, que alcanzó una relación de 5.10 (Figura 18 A, recuadro al pie).

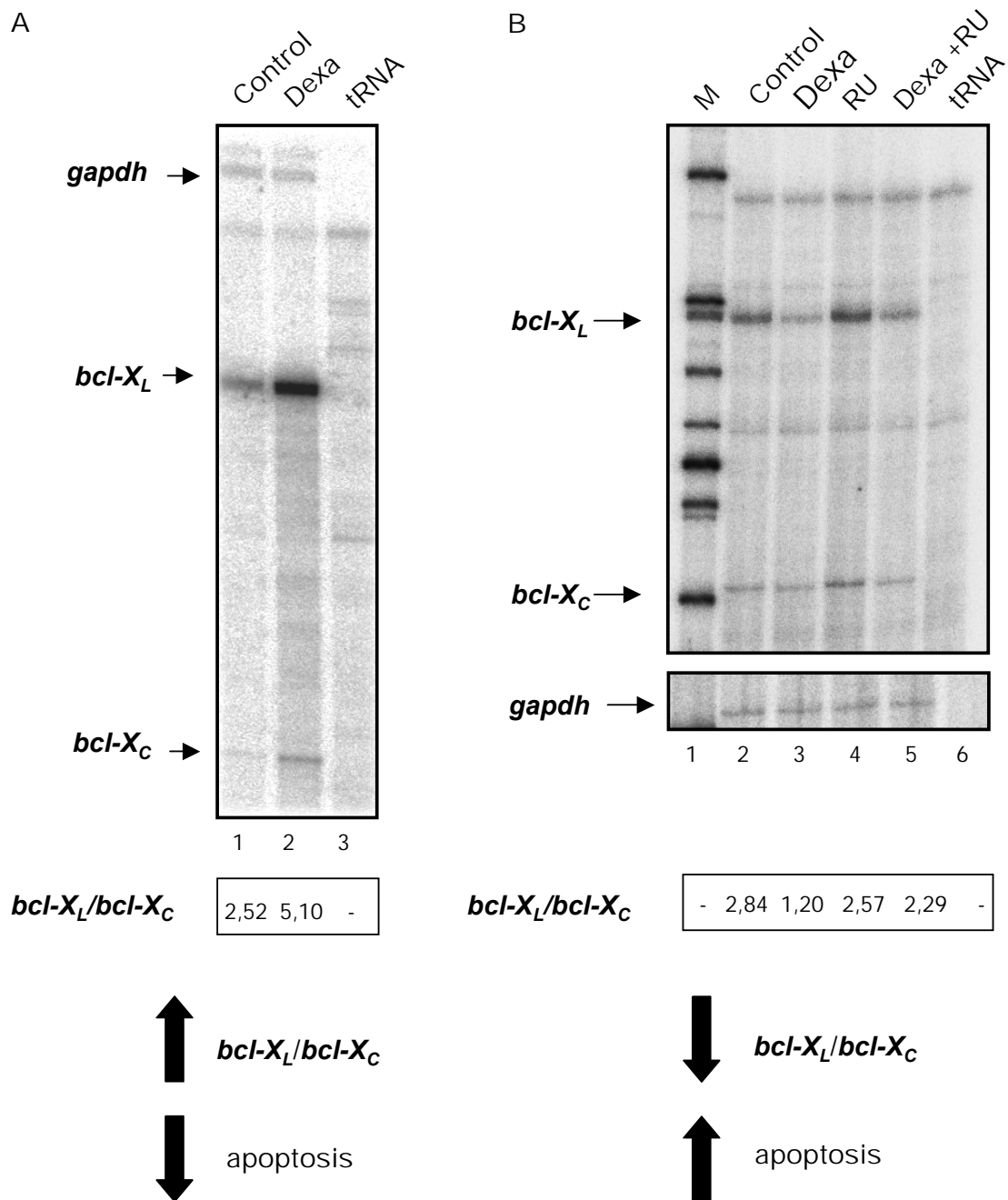


FIGURA 18. **Expresión de las isoformas larga y corta de *bcl-X* en respuesta a los glucocorticoides.** Ensayos de protección a ARNasa de ARN total obtenido de: (A) células de mama HC11 control (calle 1) o tratadas con dexa (calle 2); (B) timocitos de animales control (calles 2), inyectados con dexa (calle 3), con RU sólo (calle 4) o con RU + dexa (calle 5). Las bandas protegidas de ambas isoformas se indican con flechas. Calles 3 (A) y 6 (B), tRNA como control negativo; calle 1 (B) marcador de peso molecular. En ambos ensayos se analizó la expresión de *gapdh* como control. La relación entre *bcl-X_L* y *bcl-X_C* se indica en un recuadro al pie de la figura.

En los timos de animales no tratados, ambas isoformas se expresan y lo hacen en una relación $bcl-X_L/bcl-X_C$ de 2.84 (Figura 18 B, calle 2 y recuadro al pie). Sin embargo, los niveles de $bcl-X_L$ disminuyeron notablemente con el tratamiento hormonal, con menor influencia sobre los transcritos de $bcl-X_C$ (Figura 18 B, calle 3). De esta manera, en timos de ratones tratados con dexametasona la relación $bcl-X_L/bcl-X_C$ disminuyó a un valor de 1.2 (Figura 18 B, recuadro al pie). Este efecto parece estar mediado por el GR, dada su inhibición con la co-inyección del antagonista RU (Figura 18 B, calle 5), que restableció la relación $bcl-X_L/bcl-X_C$ a 2.29. El tratamiento con RU *per se* no tuvo efectos significativos sobre la abundancia relativa de ambas isoformas (Figura 18 B, calle 4 y recuadro al pie). Resultados similares se habían observado previamente en timocitos de ratas tratadas con glucocorticoides (Vicent et al., 2002).

Consistentemente con estos resultados, los niveles de la proteína Bcl- X_L también disminuyeron a las 8 horas de la inyección de dexametasona en este tipo celular, sin embargo no se detectaron niveles cuantificables de Bcl- X_C (Figura 19, panel superior, calle 2 vs calle 1). El pre-tratamiento con RU inhibió el efecto observado de la hormona sobre la isoforma anti-apoptótica de Bcl-X (Figura 19, panel superior, calle 3). Como control de carga se analizó la expresión de tubulina (Figura 19, panel inferior).

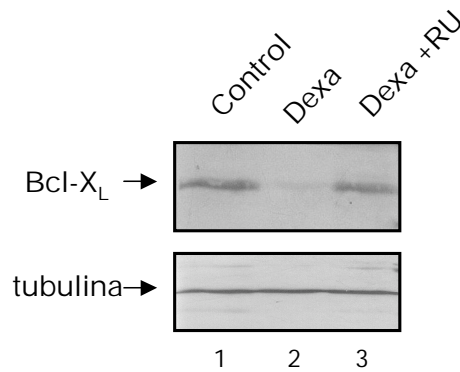


FIGURA 19. **Expresión de la isoforma Bcl-X_L en respuesta a los glucocorticoides.** Western blot de Bcl-X_{L/C} (panel superior) y tubulina (panel inferior) en timocitos de animales control o tratados con dexa.

En conclusión, los glucocorticoides afectan los niveles de los transcritos de *bcl-X_L* en células de epitelio mamario y timocitos en forma opuesta y compatible con sus efectos anti- y pro-apoptóticos respectivamente.

Los glucocorticoides activan la transcripción de P4 en células de epitelio mamario y la inhiben en timocitos

El siguiente objetivo fue determinar cuál de los distintos promotores de *bcl-X* es el responsable del efecto hormonal sobre los niveles de los transcritos en ambos tipos celulares. Para ello, se llevaron a cabo estudios de RT-PCR y ensayos de protección a ARNasa utilizando oligonucleótidos y ribosondas específicas para los diferentes exones 5' no traducibles del gen.

Como se observa en la figura 20, en células HC11 se observó un aumento en los niveles de los transcritos provenientes de P4, apoyando la hipótesis de una activación transcripcional de este promotor por glucocorticoides. No se detectó efecto hormonal cuando se analizaron los productos de RT-PCR obtenidos de los

transcriptos generados a partir de los promotores proximales P1 y P2 (Figura 20 A y B respectivamente, paneles superiores, calles 1 y 2) o de los promotores distales P3 y P5 (Figura 20 C y E respectivamente, paneles superiores, calles 1 y 2). No obstante, se observó un aumento en los niveles de los transcriptos generados a partir de la activación de P4 en muestras obtenidas de células tratadas con dexametasona (Figura 20 D, panel superior, calle 2). La co-incubación con RU486 inhibió este efecto hormonal (Figura 20 D, panel superior, calle 3). No se detectó ningún cambio en los niveles de ARN de *gapdh* luego del tratamiento (Figura 20 A-E, paneles inferiores).

En timocitos de animales tratados con dexametasona no se observó ningún cambio en los niveles de transcriptos generados a partir de los promotores proximales P1 y P2, o del promotor distal P5 (Figura 20 F, G e I respectivamente, paneles superiores, calles 1 y 2). Por el contrario, el tratamiento hormonal disminuyó el nivel de los transcriptos que contienen el exón 2, generados a partir de la activación de P4 (Figura 20 H, panel superior, calle 2). Este efecto se inhibió por la co-inyección del RU486 (Figura 20 H, panel superior, calle 3). No se detectó ningún cambio en los niveles de ARN de *gapdh* luego del tratamiento (Figura 20 F-I, paneles inferiores). Los transcriptos generados a partir de P3 no se analizaron, debido a que este promotor es completamente inactivo en timocitos (Pecci et al., 2001).

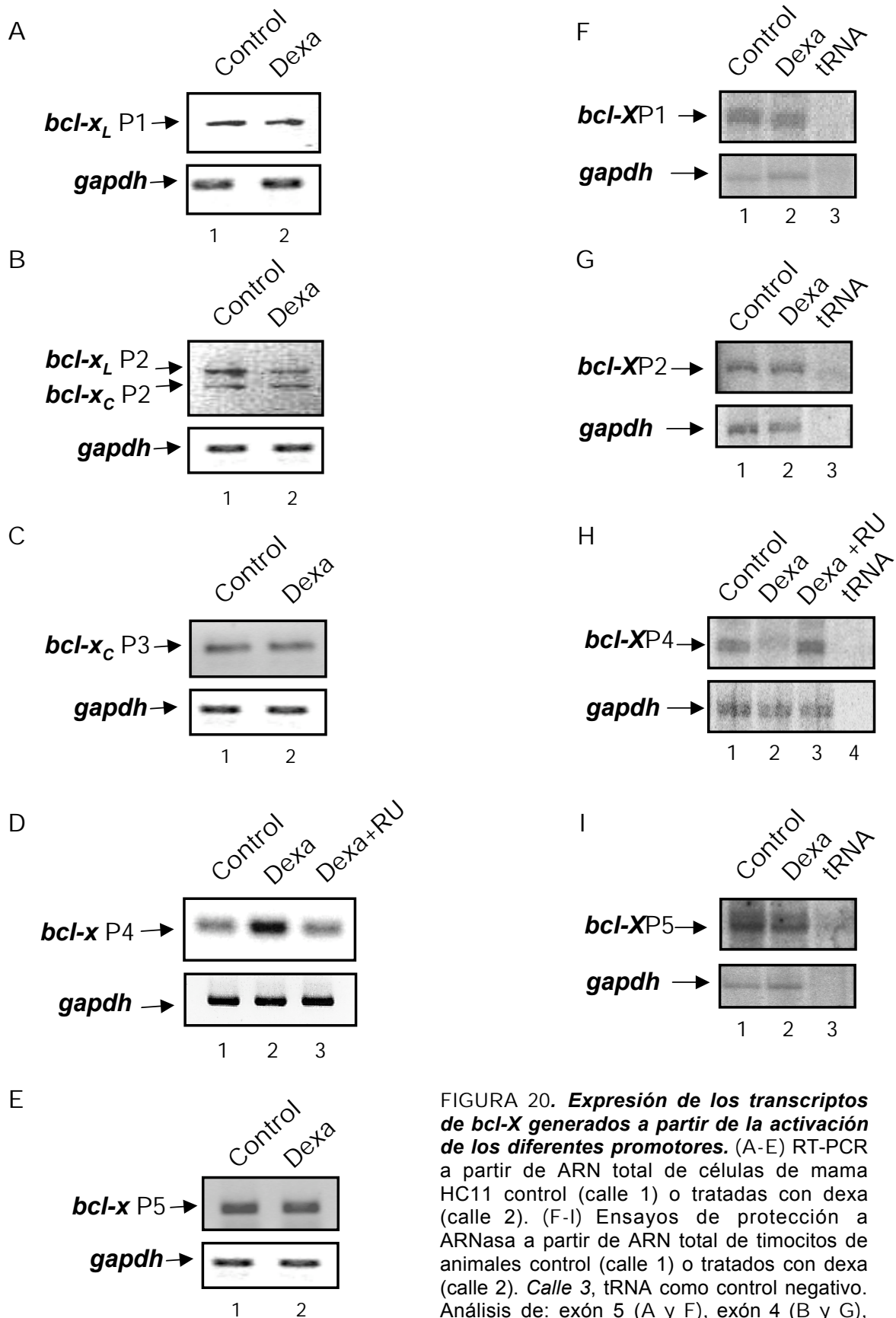


FIGURA 20. **Expresión de los transcritos de *bcl-X* generados a partir de la activación de los diferentes promotores.** (A-E) RT-PCR a partir de ARN total de células de mama HC11 control (calle 1) o tratadas con dexa (calle 2). (F-I) Ensayos de protección a RNasa a partir de ARN total de timocitos de animales control (calle 1) o tratados con dexa (calle 2). Calle 3, tRNA como control negativo. Análisis de: exón 5 (A y F), exón 4 (B y G), exón 3 (C), exón 2 (D y H) y exón 1 (E e I). En todos los ensayos se analizó la expresión de *gapdh* como control.

Como conclusión, los cambios en los niveles de los transcriptos del gen *bcl-X* provocados por el tratamiento con glucocorticoides podrían ser consecuencia del efecto de la hormona sobre la acumulación de mensajeros generados a partir del promotor distal P4 según el tejido analizado. Estos cambios podrían deberse a diferencias en la tasa de transcripción o en la estabilidad de dichos mensajeros. Por lo tanto, se analizó si la región promotora P4 es ocupada por la maquinaria transcripcional luego del tratamiento hormonal. Experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando un anticuerpo monoclonal α -ARN-polimerasa II (ARNpol II) demostraron el reclutamiento específico de la enzima a dicha región luego de incubar las células HC11 con dexametasona (Figura 21 A, panel superior, calle 4). No se observó unión de la ARNpol II a la región promotora proximal de *bcl-X* (que contiene a P1) (Figura 21, panel inferior, calles 3 y 4). En todos los casos, los ChIPs del gen *gapdh* se usaron también como control de la inmunoprecipitación (Figura 21, panel central). Estos resultados sugieren que en células de epitelio mamario en crecimiento el tratamiento con glucocorticoides induciría la transcripción del gen *bcl-X* endógeno, principalmente a través de la activación de P4.

De manera opuesta, en timocitos de ratones no tratados se observó la presencia de la ARNpol II unida a la región P4 (Figura 21 B, panel superior, calle 1), correspondiente a la actividad basal de este promotor. El tratamiento hormonal disminuyó los niveles de la enzima unida a esa región (Figura 21 B, panel superior, calle 2). Este resultado sugiere que los cambios inducidos por los glucocorticoides sobre los niveles de mensajero de *bcl-X* podrían deberse a la represión del promotor P4. El análisis de la región promotora proximal del gen muestra un reclutamiento basal de la ARNpol II que no fue afectado por el tratamiento con dexametasona (Figura 21 B,

panel inferior). No se observó reclutamiento de la enzima en *gapdh*, utilizado como control (Figura 21 B, panel central). Resultados similares arrojaron los ChiPs realizados con la línea celular S49, derivada de un linfoma T de ratón, en la que los glucocorticoides inducen la muerte celular programada (Hyman, 1973) (Figura 21 C). Luego de 30 minutos de tratamiento con dexta, se observó un menor reclutamiento de la ARN pol II en la región P4 (Figura 21 C, panel superior, comparar calles 1 y 2). El tratamiento hormonal no modificó la unión de la enzima a la región promotora proximal del gen (Figura 21 C, panel medio, comparar calles 1 y 2).

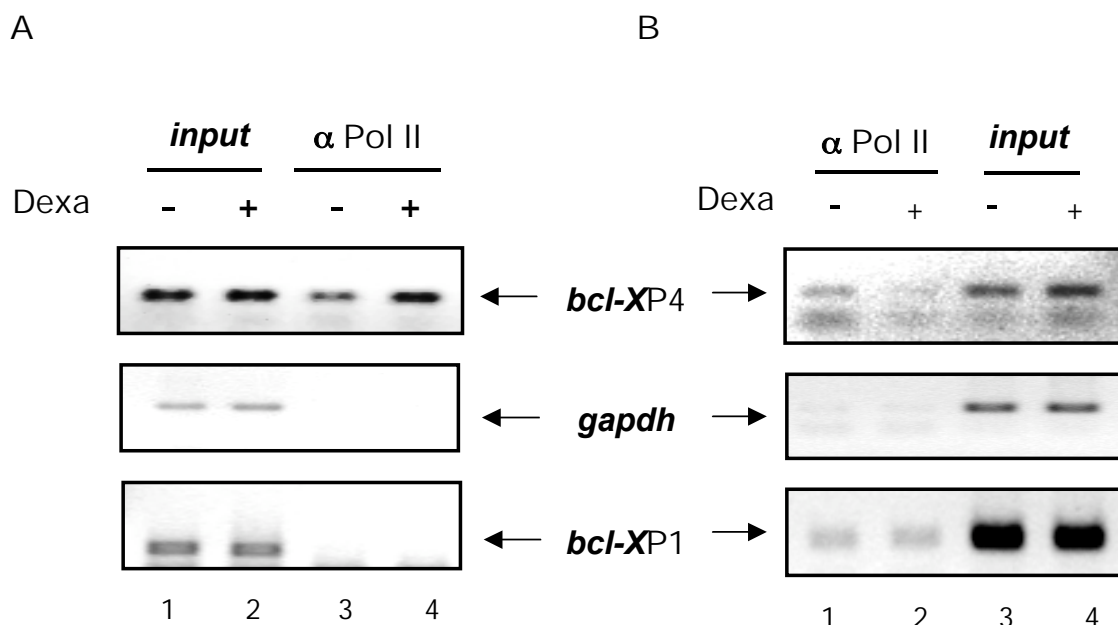
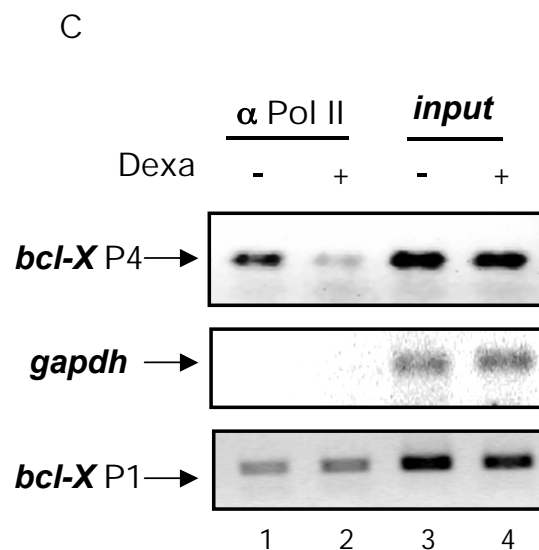


FIGURA 21. **Inmunoprecipitación in vivo de la ARNpol II en la región P4.** (A) Células de mama HC11 control o tratadas con dexta. (B) Timocitos de animales control o tratados con dexta. (C) Células linfoides S49 control o tratadas con dexta. La unión de la ARNpol II a la región promotora P4 (A-C, paneles superiores) y a la región promotora P1 de *bcl-X* (A-C, paneles inferiores) se determinó por CHIP (A: calles 3 y 4; B y C: calles 1 y 2). La cromatina *input* se muestra en A: calles 1 y 2, en B y C: calles 3 y 4. La amplificación del gen *gapdh* se realizó como control (A-C, paneles centrales). α , anticuerpo. -Ac sin anticuerpo.



Reclutamiento *in vivo* del GR a la región P4 en respuesta a los glucocorticoides

Para evaluar si el efecto hormonal sobre la transcripción de P4 involucra la interacción directa del GR con los HREs localizados inmediatamente río arriba de este promotor, se analizó el reclutamiento del GR a dicha región. Luego de 30 minutos de tratamiento de las células HC11 con dexta, el GR se recluta a la región promotora P4 de *bcl-X* que contiene los HREs (Figura 22 A, panel superior, calle 2). Se observó un reclutamiento basal del GR a la región promotora proximal de *bcl-X* que incluye a P1; no obstante el tratamiento hormonal no provocó cambio alguno (Figura 22 A, panel inferior, comparar calles 1 y 2).

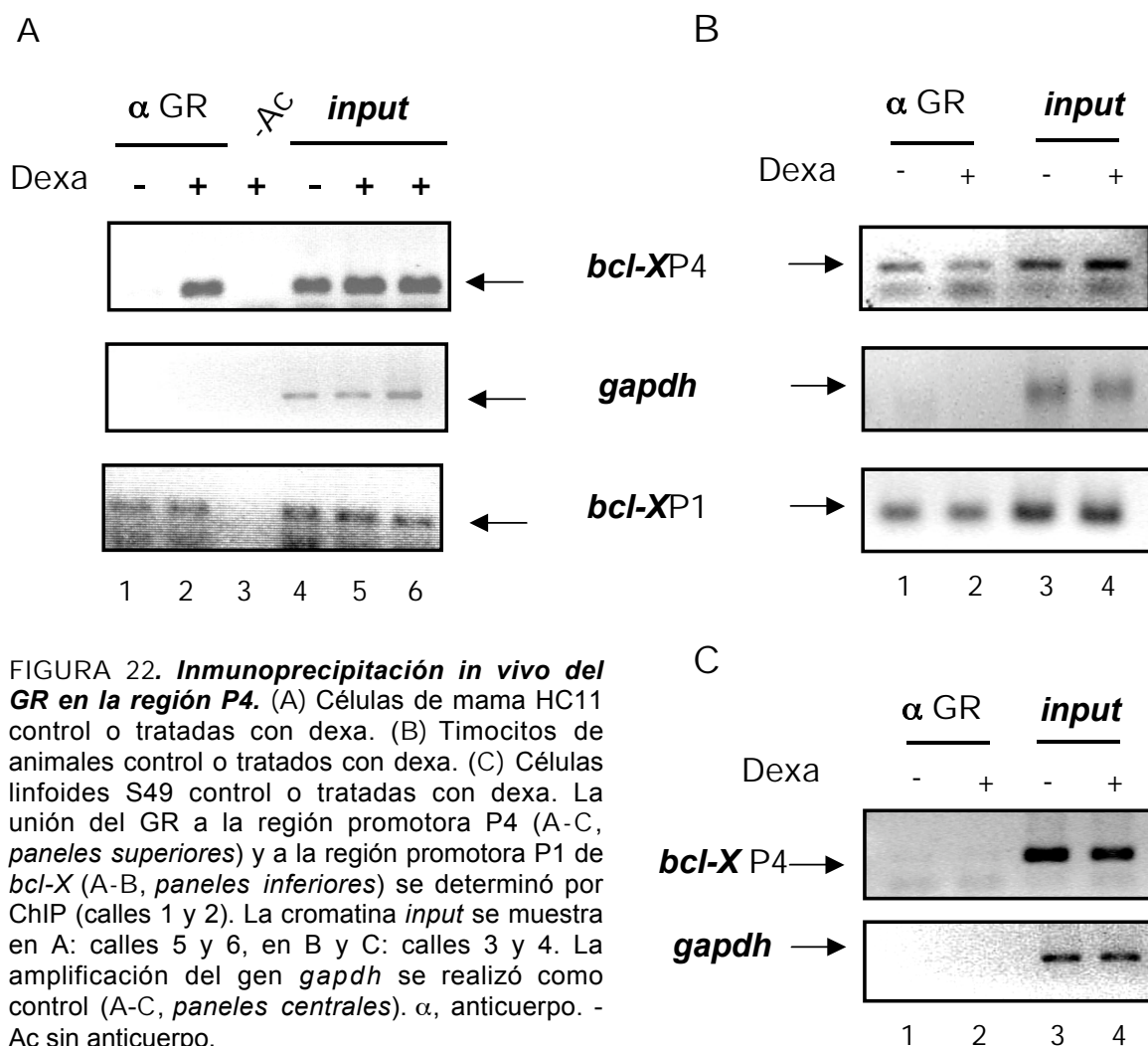


FIGURA 22. **Inmunoprecipitación *in vivo* del GR en la región P4.** (A) Células de mama HC11 control o tratadas con dexta. (B) Timocitos de animales control o tratados con dexta. (C) Células linfoides S49 control o tratadas con dexta. La unión del GR a la región promotora P4 (A-C, *paneles superiores*) y a la región promotora P1 de *bcl-X* (A-B, *paneles inferiores*) se determinó por ChIP (calles 1 y 2). La cromatina *input* se muestra en A: calles 5 y 6, en B y C: calles 3 y 4. La amplificación del gen *gapdh* se realizó como control (A-C, *paneles centrales*). α , anticuerpo. - Ac sin anticuerpo.

Estos resultados indican una correlación entre la unión específica del GR con un aumento en la unión de la ARNpol II a la región promotora P4, lo que sugiere que el receptor de glucocorticoides podría estar mediando en forma directa la activación *in vivo* de este promotor distal en células de epitelio mamario.

Con el objeto de estudiar si en el efecto represor observado en timocitos, el GR también actúa en forma directa, se realizaron ChIPs con cromatina proveniente de timocitos de animales tratados durante 30 minutos con dexametasona. Contrariamente a lo esperado, los resultados no mostraron diferencias en la unión del GR a P4 cuando se compara con cromatina de timocitos de animales controles (Figura 22 B, panel superior, compare calles 1 y 2). Cabe aclarar, que en ambos ChIPs existe un reclutamiento específico del GR en esta región que podría deberse a la presencia de glucocorticoides endógenos tanto en animales controles como en tratados con dexametasona (Figura 22 B, panel superior, compare calles 1 y 2). Tampoco se observaron diferencias en la unión del GR al promotor proximal P1 (Figura 22 B, panel inferior). El gen *gapdh* se utilizó como control (Figura 22 B, panel central).

Se obtuvieron resultados similares con los ChIPs realizados con la línea celular S49 tratada durante 30 minutos con dexametasona (Figura 22 C). En estos ensayos, no se observó reclutamiento específico del GR a P4 en ningún caso (Figura 22 C, panel superior, compare calles 1 y 2), dado que las células S49 habían sido previamente incubadas en medio libre de esteroides (ver detalle en la sección Materiales y Métodos).

El STAT5B inhibe la actividad de P4 inducida por glucocorticoides

El análisis de secuencia de la región promotora P4 reveló la presencia de un posible hemisitio de reconocimiento del factor de transcripción STAT5, 5'-TTCtgtGAA-3' (Figura 23), que se encuentra bien conservado en comparación con la secuencia de unión consenso descrita previamente (TTCnnnGAA) (Ihle, 1996). Este potencial sitio de reconocimiento de STAT5 se localiza 213 pb río arriba de la TATA box correspondiente a P4 y 63 pb río abajo del HRE II descrito anteriormente.

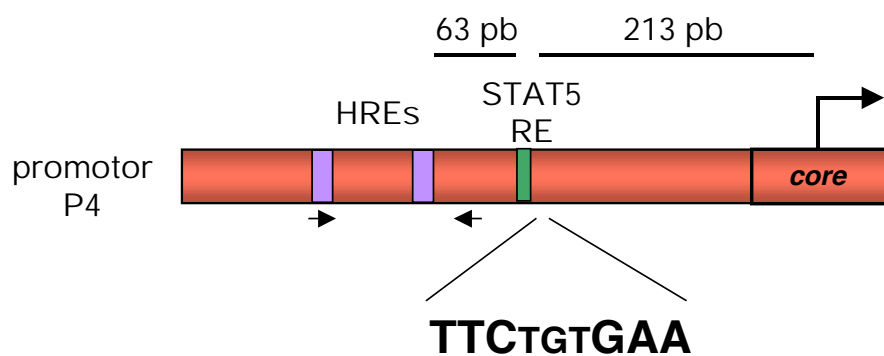


FIGURA 23. ***Esquema de la secuencia nucleotídica del elemento de respuesta a STAT5 en la región promotora P4.*** El diagrama muestra la región promotora P4 completa con la localización de ambos HREs y el sitio de unión de STAT5 (STAT5 RE). Las flechas indican la ubicación de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de ChIP.

Con el fin de analizar la participación del STAT5 sobre la actividad de P4 en respuesta a esteroides, en primer lugar se llevaron a cabo experimentos de transfecciones transitorias con el vector de expresión pP4-completo (que lleva el gen reportero luciferasa bajo control de P4) co-transfectado en células Cos-1 con el vector de expresión que codifica para el GR (pGR) y cantidades crecientes (1, 3 y 5

μg) de los vectores de expresión para las isoformas constitutivamente activas STAT5A (pSTAT5A-N642H) o STAT5B (pSTAT5B-N642H). En estas células, la dexametasona activa este gen reportero transfectado (ver resultados descritos en el capítulo anterior). En la Figura 24 A se muestra que el STAT5B inhibe significativamente y en forma dependiente de la cantidad de vector agregada la actividad de P4 inducida por dexametasona, y que el STAT5A tiene un efecto inhibitorio menor pero significativo (Figura 24 A, panel superior, curvas inferior y superior, respectivamente). La sobreexpresión de las isoformas STAT5A o STAT5B en ausencia del GR no afectó la actividad basal de P4 (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el potencial sitio STAT5 en P4 podría mediar la represión hormonal del promotor a través de su interacción con alguna de las isoformas STAT5.

Con el propósito de analizar la relevancia funcional del sitio STAT5, se realizaron experimentos de co-transfección del vector pGR, de cantidades crecientes del vector pSTAT5B-N642H y del vector de expresión mutante pP4ΔSTAT5, que contiene 4 mutaciones puntuales en el sitio STAT5 que impiden la unión al ADN de este factor (Ihle, 1996). Los resultados que se observan en la Figura 24 B demostraron que el tratamiento hormonal aumentó 3.5 veces la actividad de esta construcción (Figura 24 B, calle 1); sin embargo, cantidades crecientes de pSTAT5B-N642H no afectaron significativamente la respuesta hormonal de P4 (Figura 24 B, calles 2 a 4).

Estos resultados sugieren la participación del elemento de unión de STAT5 en la regulación negativa mediada por el STAT5B de la actividad de P4 inducida por glucocorticoides.

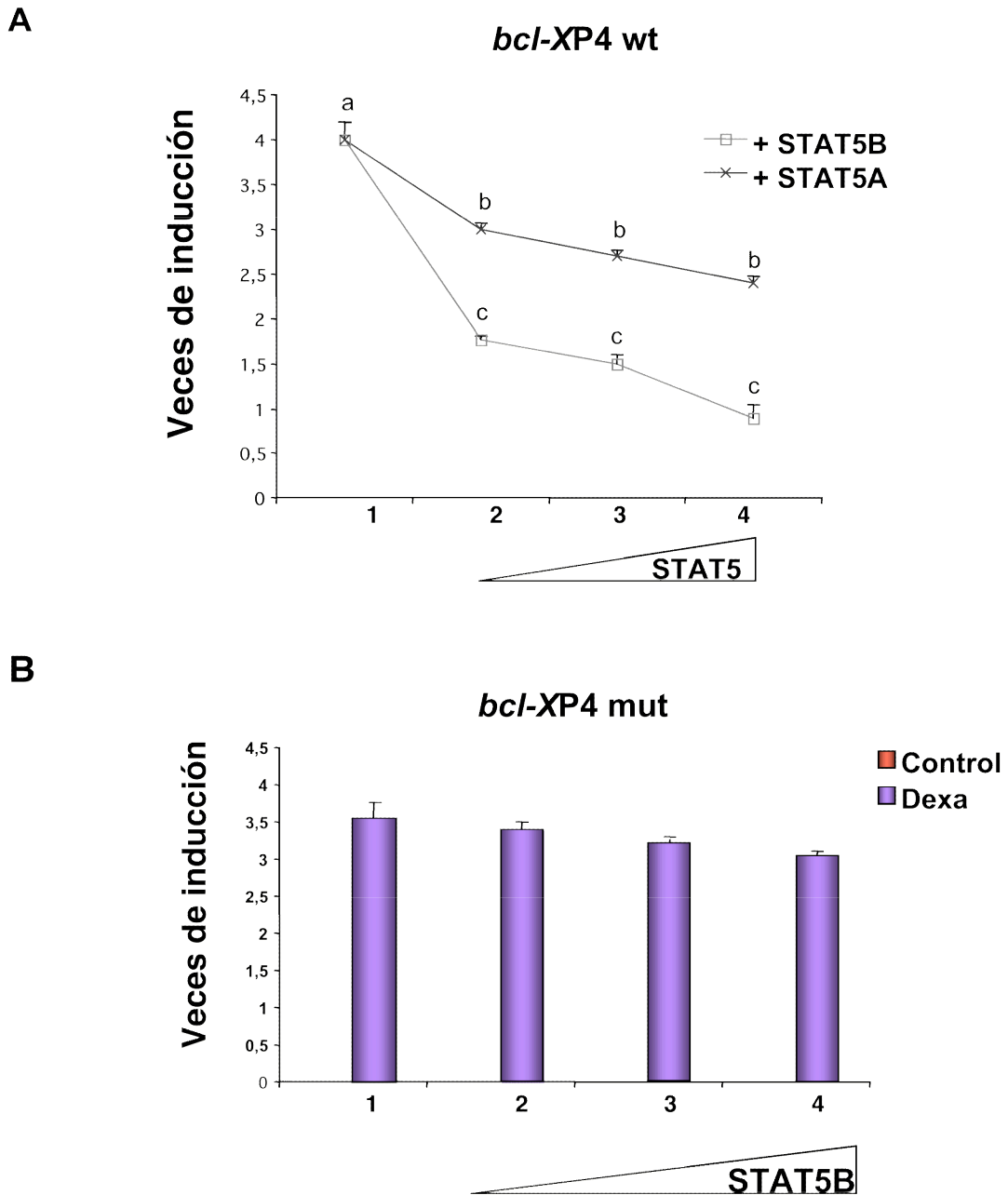


FIGURA 24. **Efecto de los factores STAT5 sobre la actividad de P4 inducida por glucocorticoides.** Células Cos-1 se co-transfectaron con el vector de expresión pP4-completo (A) o pP4- Δ STAT5 (B), el vector pGR y cantidades crecientes de los vectores de expresión para las isoformas activas de STAT5. El pCMV-LacZ se agregó también como control de transfección. Las células se incubaron durante 36 hs con o sin dexa y se determinó la actividad luciferasa. Luego de corregir la eficiencia de transfección con la actividad β -gal, los valores se expresaron como veces de inducción relativas a los controles. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. a, b vs c y a vs b: $p < 0.001$.

Expresión diferencial de los factores STAT5 y unión al elemento de respuesta en P4

A continuación se analizó si las células de epitelio mamario y los timocitos de ratón expresan los factores STAT5. Los ensayos de western blot demostraron la presencia de ambas isoformas STAT5A y STAT5B en células S49 derivadas de un linfoma T de ratón y en timocitos (Figura 25, calles 3 y 5 respectivamente). Además, los niveles de ambos STATs no fueron afectados por el tratamiento con dexametasona (Figura 25, calles 4 y 6). Por otro lado, sólo el STAT5A se detectó en células de mama HC11 en etapa de proliferación (Figura 25, calle 1). La expresión de esta isoforma tampoco se modificó con el agregado de la hormona (Figura 25, calle 2).

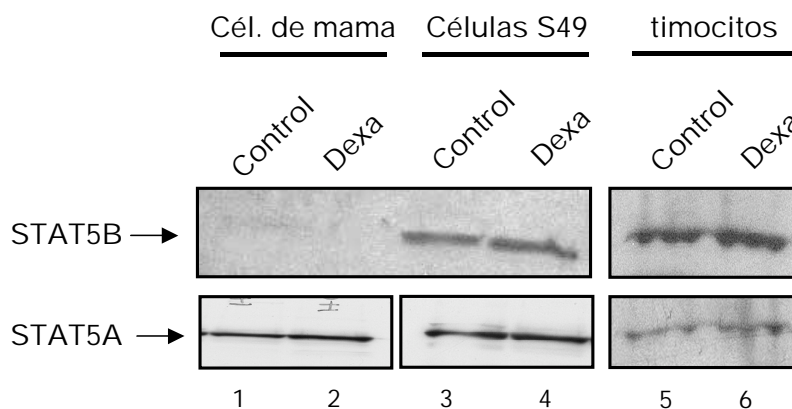


FIGURA 25. **Expresión de los factores STAT5 en extractos totales de distintos tipos celulares.** Western blot de STAT5A (paneles inferiores) y STAT5B (paneles superiores) en células de mama HC11 (izquierda), células linfoides S49 (centro) incubadas con o sin dexametasona y timocitos de animales control o tratados con dexametasona (derecha).

En conclusión, el STAT5B podría participar en la inhibición de la actividad de P4 mediada por glucocorticoides en timocitos, a través de la interacción con un potencial elemento de respuesta presente en este promotor.

Con el objeto de estudiar la viabilidad de esta hipótesis, se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel (EMSA) con extractos nucleares de células S49 tratadas con dexametasona y un fragmento radiactivo de la región promotora P4 que incluye ambos HREs y el sitio STAT5 (*bcl-XP4 wt*). Los resultados que se muestran en la Figura 26 indican la presencia de dos bandas, una débil con mayor velocidad de migración y otra intensa más retrasada (Figura 26, panel izquierdo, calle 2). Ambas bandas sufrieron un retraso significativamente mayor cuando el extracto se incubó con un anticuerpo monoclonal α -GR (Figura 26, panel izquierdo, calle 3), lo que sugiere la presencia del receptor de glucocorticoides en las mismas. Cuando se incubó el extracto con el anticuerpo policlonal α -STAT5B, se observó un retraso menor (Figura 26, panel izquierdo, calle 4). Sin embargo, no se vieron cambios en la movilidad de las bandas cuando se incubó el oligonucleótido con los mismos extractos nucleares pero en presencia del anticuerpo policlonal α -STAT5A (Figura 26, panel izquierdo, calle 5).

Estos resultados sugieren que el GR y el STAT5B podrían unirse en forma simultánea a la misma región promotora P4 *in vitro*.

Para analizar la especificidad de esta unión, se realizaron los mismos ensayos con un fragmento radiactivo que contenía el potencial sitio de reconocimiento de STAT5 mutado (*bcl-XP4 mut*). En la Figura 26, panel derecho, se observa sólo la banda de mayor velocidad de migración correspondiente a este oligonucleótido con el sitio STAT5 mutado incubado con un extracto nuclear de células S49 previamente tratadas con dexametasona (Figura 26, panel derecho, calle 7). La banda observada presentó

un retraso mayor cuando el extracto se incubó con el anticuerpo α -GR (Figura 26, panel derecho, calle 8), pero su movilidad no fue afectada con el agregado del anticuerpo α -STAT5B (Figura 26, panel derecho, calle 9). Por lo tanto, la banda observada con el oligonucleótido *bcl-XP4* mut correspondería al complejo formado por el GR y esta región promotora.

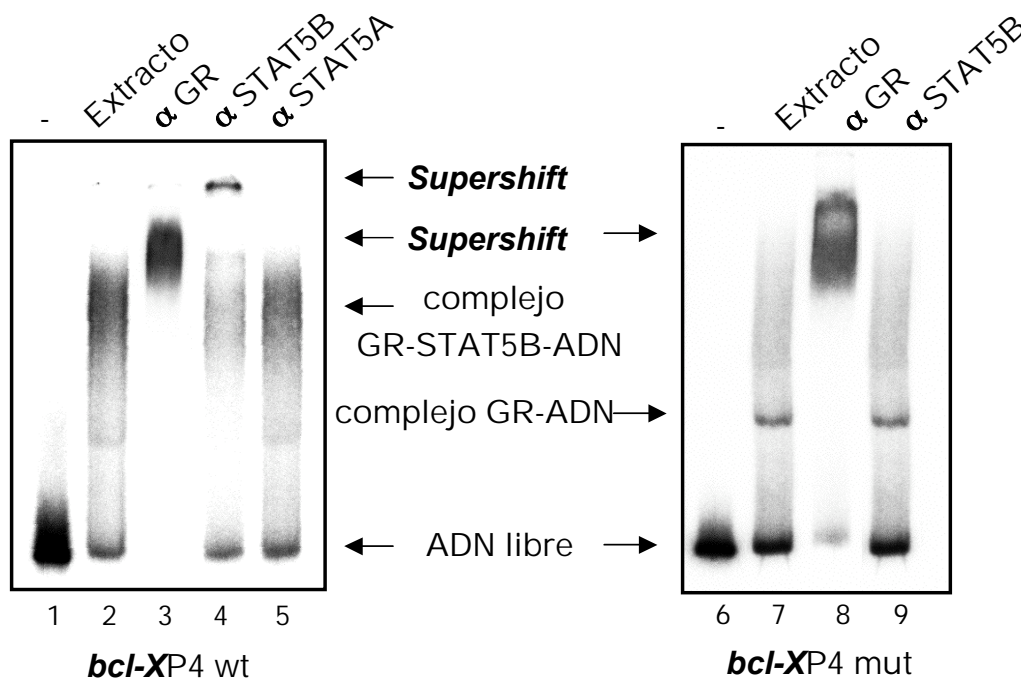


FIGURA 26. **Unión específica del STAT5B a la región promotora P4 de *bcl-X* in vitro.** EMSA realizado con extractos nucleares de células linfoides S49 incubadas con dexametasona y el oligonucleótido radiactivo *bcl-X* P4 wt (*panel izquierdo*, calles 2-5) o *bcl-X* P4 mut (*panel derecho*, calles 7-9). Las flechas indican el ADN libre, el complejo ADN-proteína y el *supershift*. *Supershift* con un anticuerpo monoclonal α GR (calles 3 y 8); policlonal α STAT5 A (calle 5) y policlonal α STAT5B (calles 4 y 9). *Calles 1 y 6* corresponden a incubaciones sin extracto nuclear. α , anticuerpo

En conjunto, estos resultados demuestran que tanto el GR como el STAT5B están presentes en los extractos nucleares provenientes de células S49 tratadas con dexametasona, y son capaces de unirse *in vitro* simultáneamente al promotor P4 en un

fragmento de ADN no cromatinizado. Además, la unión *in vitro* del STAT5B a esta región requiere de la integridad del sitio de unión localizado entre los HREs y la TATA box del promotor P4.

Reclutamiento in vivo del STAT5A y del STAT5B a la región P4 en células de mama y timo

A continuación se estudió la participación *in vivo* de ambos factores STAT5 en la regulación de P4 mediante ensayos de ChIP.

En timocitos de ratones no tratados no se detectaron niveles apreciables del STAT5B unido a P4 (Figura 27 A, calle 1). Sin embargo, luego de 30 minutos de tratamiento con dexametasona, se observó el reclutamiento del STAT5B a esta región promotora (Figura 27 A, calle 2). *gapdh* se utilizó como control de la inmunoprecipitación (Figura 27 A, panel medio). Por otro lado, independientemente del tratamiento hormonal, el STAT5B no se unió a la región promotora proximal P1 (Figura 27 A, panel inferior).

Se obtuvieron resultados similares con los ChIPs realizados con la línea celular S49 luego del tratamiento con dexametasona durante 30 minutos (Figura 27 B).

En ninguno de los tratamientos ensayados se detectó el STAT5A unido a P4 en células linfoides (datos no mostrados).

Por otro lado, en la línea celular HC11 en etapa de proliferación no se observó la unión de ningún factor STAT5 al promotor P4 en presencia o ausencia de dexametasona (datos no mostrados). Este resultado podría deberse a la falta de diferenciación de las células en estas condiciones, que probablemente requieren de prolactina y glucocorticoides para la activación de la vía JAK-STAT y la producción de proteínas de la leche (Merlo et al., 1996).

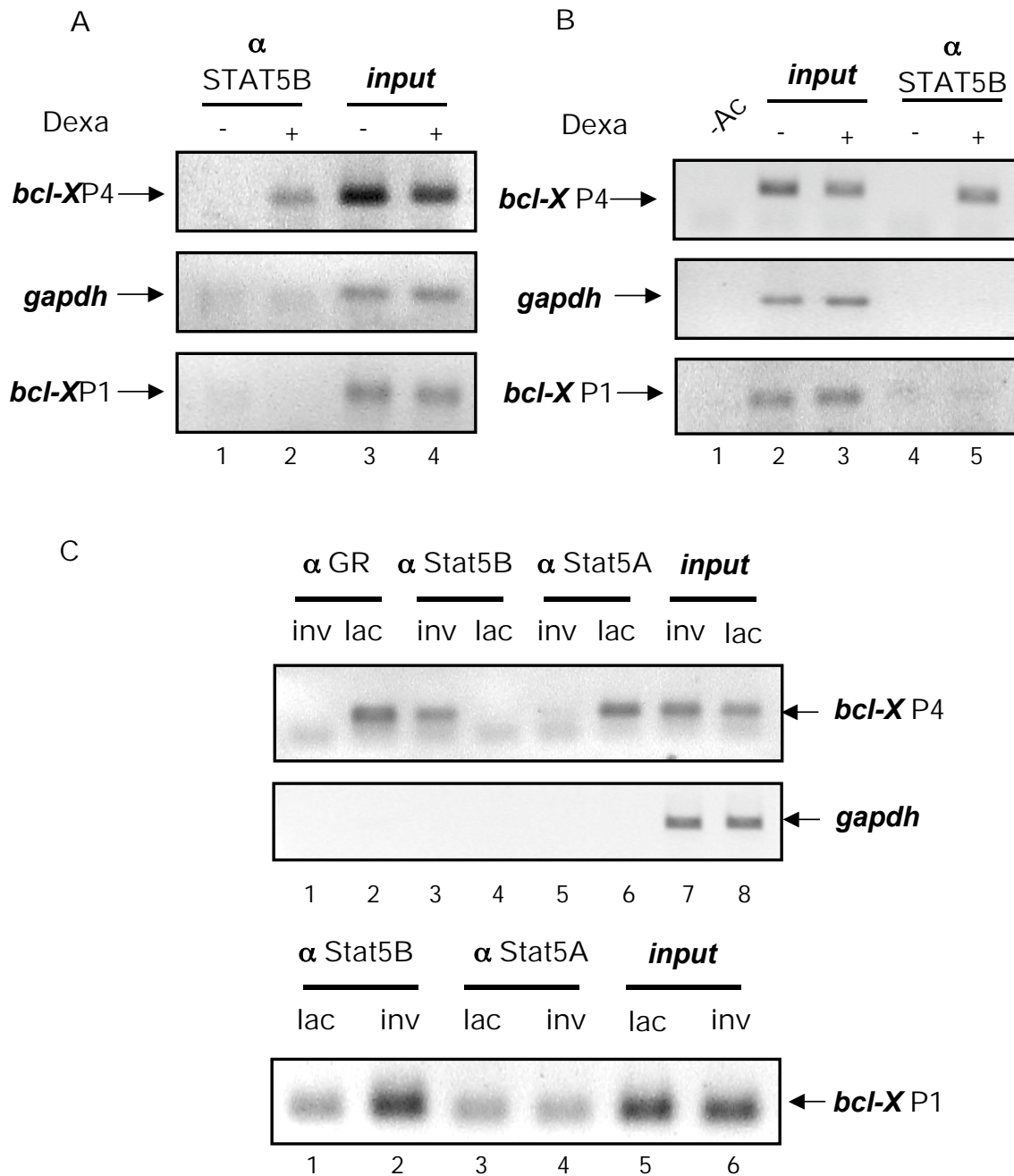


FIGURA 27. **Inmunoprecipitación in vivo de los factores STAT5 en la región P4.** La unión de los factores STAT5 a la región promotora P4 (*paneles superiores*) y a la región promotora P1 (*paneles inferiores*) de *bcl-X* se determinó por ChIP. (A) timocitos de animales control o tratados con dexa, (B) células linfoides S49 incubadas con o sin dexa y (C) células de mama en estadios de lactancia o involución. La amplificación del gen *gapdh* se realizó como control (*paneles centrales*). α , anticuerpo, -Ac, sin anticuerpo.

Teniendo en cuenta esta observación, se realizaron ChIPs con células epiteliales de ratones hembra en estadíos de lactancia o involución, en las que se ha descrito la expresión diferencial de las isoformas larga y corta de *bcl-X* en ambos estadíos del epitelio glandular mamario, siendo la relación $bcl-X_L/bcl-X_C$ seis veces menor cuando se comparan condiciones de involución respecto a estadíos de lactancia (Heermeier et al., 1996).

Como se muestra en la Figura 27 C, en células de epitelio mamario en lactancia se reclutan en la región del promotor P4 el factor STAT5A y el GR (Figura 27 C, panel superior, calles 2 y 6). Sin embargo, no se detectó la presencia del STAT5B en esta región promotora (Figura 27 C, panel superior, calle 4).

Por otro lado, en forma antagónica, en células de mama obtenidas a las 48 horas luego de la interrupción del amamantamiento, ni el GR ni el STAT5A se encontraron unidos a este promotor (Figura 27 C, panel superior, calles 1 y 5), y por el contrario se observó el reclutamiento del STAT5B al mismo (Figura 27 C, panel superior, calle 3).

Para ambos estadíos celulares, no se observaron diferencias en la unión de estos factores al promotor proximal P1, excepto en el caso del STAT5B que en el estadío de involución también mostró un mayor reclutamiento en esta región (Figura 27, panel inferior, calle 2). Este último resultado no resultó sorprendente dada la presencia de un elemento de unión de factores STAT5 en esta región promotora ya demostrada por otros grupos de investigación (Fujio et al., 1997).

En conjunto, estos resultados sugieren que un reclutamiento selectivo del STAT5B a P4 podría estar involucrado en la represión hormonal de la transcripción de *bcl-X* en células involucionando, como las células linfoides luego del tratamiento hormonal o el epitelio mamario luego de interrumpida la lactancia.

Mecanismo molecular involucrado en la represión transcripcional de P4 mediada por el STAT5B

Con el propósito de profundizar el conocimiento del mecanismo de represión observado, se analizó la contribución de complejos co-represores al mismo.

Trabajos de otros autores han identificado al factor nuclear co-represor SMRT (*silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor*) como un potencial complejo de unión a proteínas STAT5 (Nakajima et al., 2001). Cuando se analizó por ChIP la presencia del SMRT en P4, se observó que efectivamente este complejo se reclutó en timocitos de ratones tratados con dexametasona, y no en timocitos de animales control (Figura 28 B, calle 4 vs. calle 3). Independientemente del tratamiento, no se observaron cambios en los niveles mínimos de reclutamiento del complejo SMRT a la región proximal P1 de *bcl-X* (Figura 28 B, panel inferior). *gapdh* se usó como control de la inmunoprecipitación (Figura 28 B, panel central).

Se obtuvieron resultados similares con los ChIPs realizados a partir de células S49 incubadas con dexametasona durante 30 minutos (Figura 28 B, panel superior, calles 2 vs calle 1).

Estos resultados indican que el complejo SMRT podría participar en la represión hormonal mediada por el STAT5B sobre el promotor P4.

Para profundizar esta hipótesis y dado que el complejo SMRT contiene a la enzima desacetilasa HDAC3 necesaria para reprimir el proceso de transcripción (Guenther et al., 2000), se evaluó por ChIP su presencia en la región P4. De acuerdo a lo esperado, 30 minutos luego del tratamiento de las células S49 con dexametasona, la región P4 reclutó HDAC3 (Figura 28 B, panel superior, comparar calles 3 y 4). Este evento coincidió con un menor nivel de acetilación de la histona H3 en

células tratadas respecto de células sin tratamiento hormonal (Figura 28 B, panel superior, compare calles 5 y 6). Tales cambios no se detectaron en la región promotora proximal P1 (Figura 28 B, panel inferior).

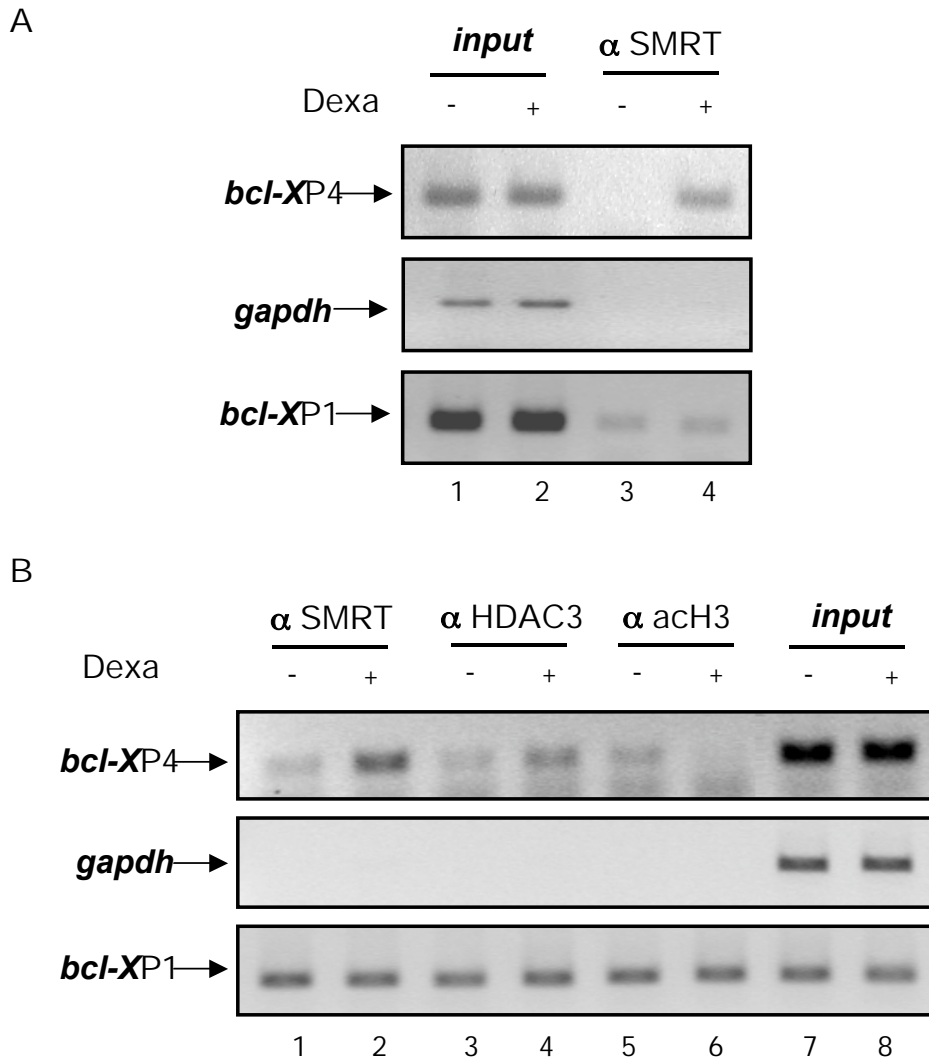


FIGURA 28. **Inmunoprecipitación in vivo de SMRT, HDAC3 y H3 en la región P4.** La unión de SMRT, HDAC3 y H3 acetilada (acH3) a la región promotora P4 (*paneles superiores*) y a la región promotora P1 (*paneles inferiores*) de *bcl-X* se determinó por ChIP. (A) Timocitos de animales control o tratados con dexa y (B) células linfoides S49 incubadas con o sin dexa. La amplificación del gen *gapdh* se realizó como control (*paneles centrales*). α , anticuerpo.

Como conclusión, la actividad desacetilasa de histonas se correlacionó con el reclutamiento del complejo SMRT y podría estar involucrada en la represión transcripcional de P4 en respuesta a glucocorticoides.

Cinética del reclutamiento de factores de transcripción al promotor P4

Teniendo en cuenta los resultados ya mencionados se intentó elucidar el mecanismo por el cual el GR participa en la unión del STAT5B a P4, que llevaría a la subsecuente represión de dicho promotor en células de timo. Para ello, se realizaron ChIPs a tiempos cortos con el fin de analizar la secuencia de eventos que ocurren en la región P4 luego de tratar las células S49 con dexametasona. Como puede observarse en la figura 29, el GR se unió a P4 en forma transitoria, con una ocupación máxima entre los 10 y 15 minutos luego del agregado de dexametasona, no detectándose reclutamiento del mismo a esta región promotora luego de 25 minutos de tratamiento hormonal (Figura 29, panel superior, calles 2 a 7). El STAT5B también se reclutó a P4 con una cinética similar al GR, pero permaneció unido durante al menos 30 minutos (Figura 29, panel superior, calles 2 a 7). Es decir que entre los 5 y 25 minutos ambos factores estarían presentes simultáneamente en el promotor. A la unión del GR a P4 le siguieron el reclutamiento del co-activador SRC-1, el complejo remodelador de la cromatina BRG-1 y un aumento de la unión de la ARN polimerasa II, que mostraron su máxima ocupación en P4 entre los 10 y 15 minutos luego del tratamiento con dexametasona, disociándose luego (al igual que el GR) y volviendo a niveles indetectables de interacción (Figura 29, paneles superiores, calles 2 a 7).

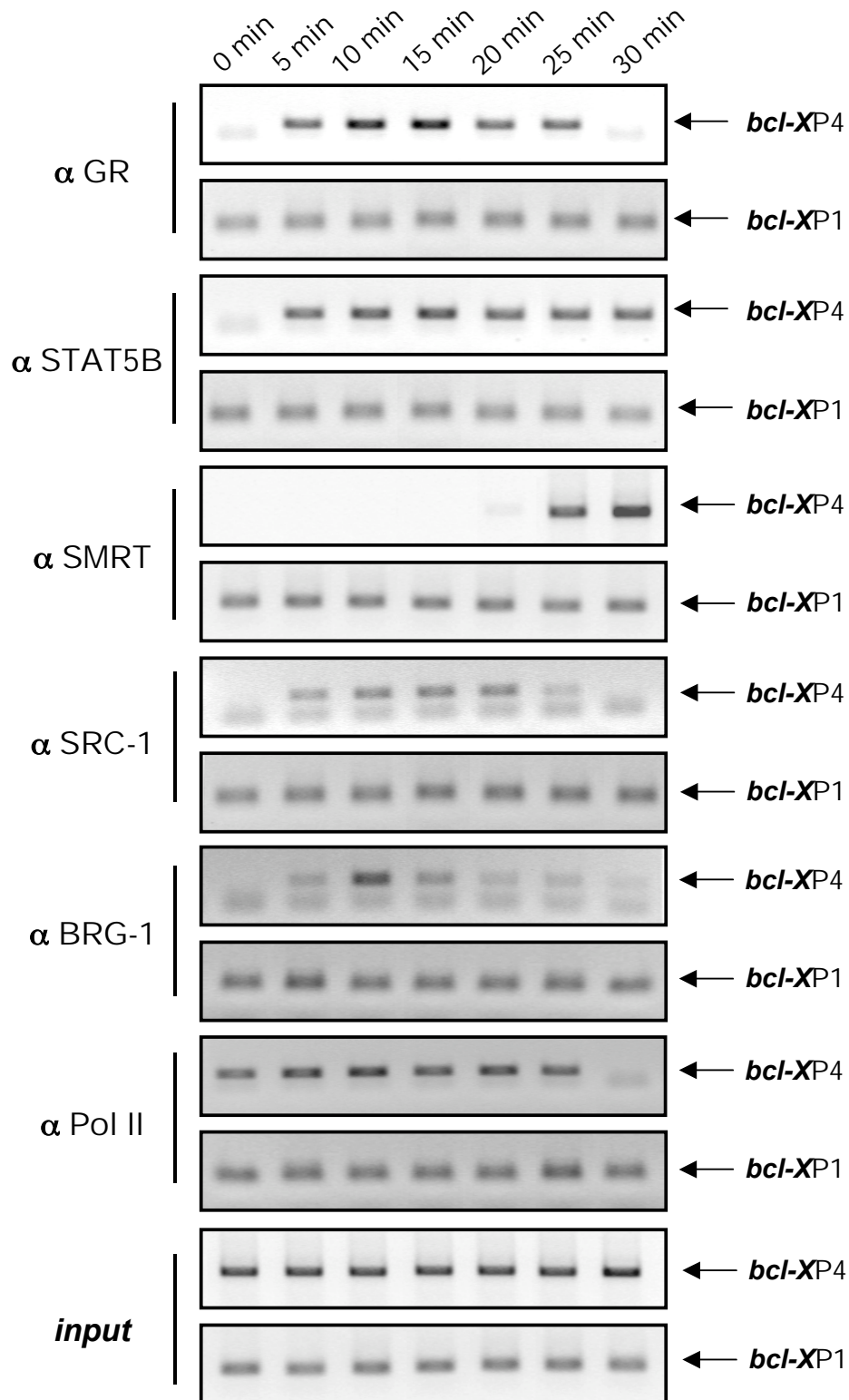


FIGURA 29. **Cinética de reclutamiento de factores de transcripción al promotor P4.** A partir de células linfoides S49 control o tratadas con dexta de 5 a 30 minutos, se determinó por ChIP la unión del GR; STAT5B; SMRT; SRC-1 y BRG-1 a las regiones promotoras P4 (*paneles superiores*) y P1 (*paneles inferiores*) de *bcl-X*. La cromatina *input* se muestra al pie de la figura. α , anticuerpo.

Ninguno de estos cambios se observó en la región promotora proximal que contiene a P1, donde la interacción de los distintos factores con el promotor fue mínima y constante al menos hasta los 30 minutos de tratamiento hormonal (Figura 29, paneles inferiores, calles 2 a 7).

En conjunto, estos resultados sugieren una activación transitoria y selectiva del promotor P4 inmediatamente después del agregado del análogo sintético, seguida de la represión del mismo a partir de los 25 minutos de tratamiento.

La siguiente pregunta estaba dirigida a explicar la causa de la unión transitoria del GR. El reclutamiento del complejo co-represor SMRT a la región P4 se detectó a partir de los 25 minutos del tratamiento con dexametasona, coincidiendo con la disminución en los niveles de reclutamiento del GR, SRC-1, BRG-1 y de la ARN polimerasa II del mismo (Figura 29, panel superior, calles 2 a 7). Estos resultados sugieren una relación causal entre estos eventos. Como el complejo SMRT contiene HDAC3 que desacetila histonas centrales, la compactación de la cromatina podría ser responsable de la disociación de los distintos factores recién mencionados y de la ARN polimerasa II, y como consecuencia de la represión del promotor P4.

Los glucocorticoides activan al promotor P4 en células linfoides cuando se inhibe la activación del STAT5

El reclutamiento del STAT5B a la cromatina luego del agregado de dexametasona sugiere que una quinasa de la familia de las JAKs (*Janus Associated Kinases*) se activó y fosforiló al STAT5B, activándolo e induciendo su translocación al núcleo (Cella et al., 1998). A fin de evaluar si el tratamiento hormonal desencadena estos efectos en el STAT5B, se examinó la influencia de un potente y selectivo inhibidor

de JAK2 y JAK3, AG 490 (Wang et al., 1999), sobre el reclutamiento del STAT5B a P4 en células S49 tratadas con dexametasona (dexa). Como se muestra en la Figura 30, ni el GR ni el STAT5B se unieron a la región P4 cuando las células se incubaron sólo con el inhibidor (Figura 30 A y C, paneles derechos, calle 3). Por otro lado, el pre-tratamiento con AG 490 inhibió el reclutamiento del STAT5B a P4 cuando se co-incubó con dexa (Figura 30 A, panel derecho, calles 3 y 4). En forma similar, el SMRT no se unió al promotor de las células S49 tratadas con dexa y el inhibidor de JAK (Figura 30 B, panel derecho, calles 3 y 4). El tratamiento hormonal en presencia de AG 490 mostró, en cambio, que el GR permaneció unido a P4 aún 30 minutos después del agregado de dexa (Figura 30 C, panel derecho, calles 3 y 4).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el reclutamiento del complejo SMRT podría estar involucrado en la disociación del GR del promotor.

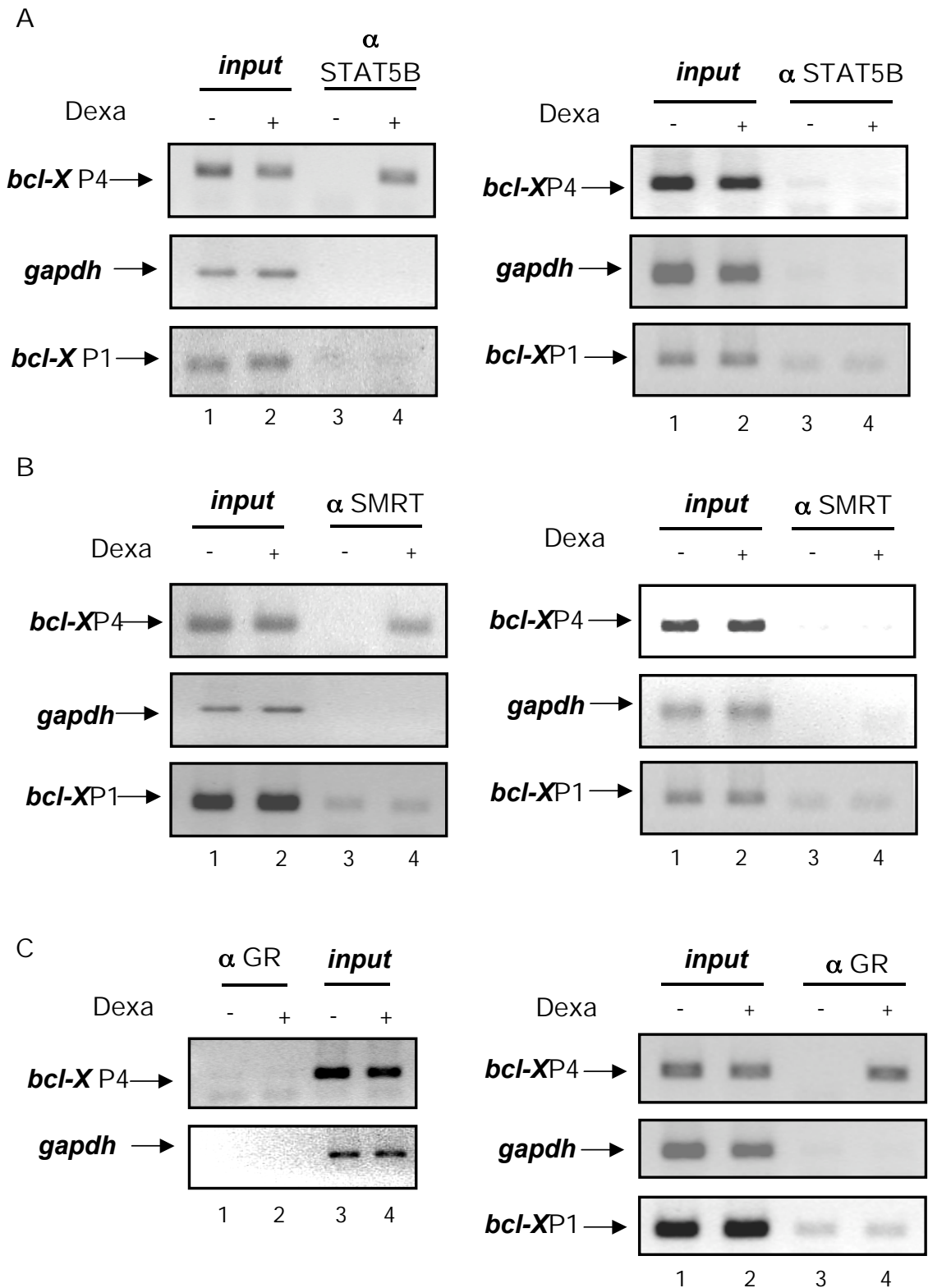
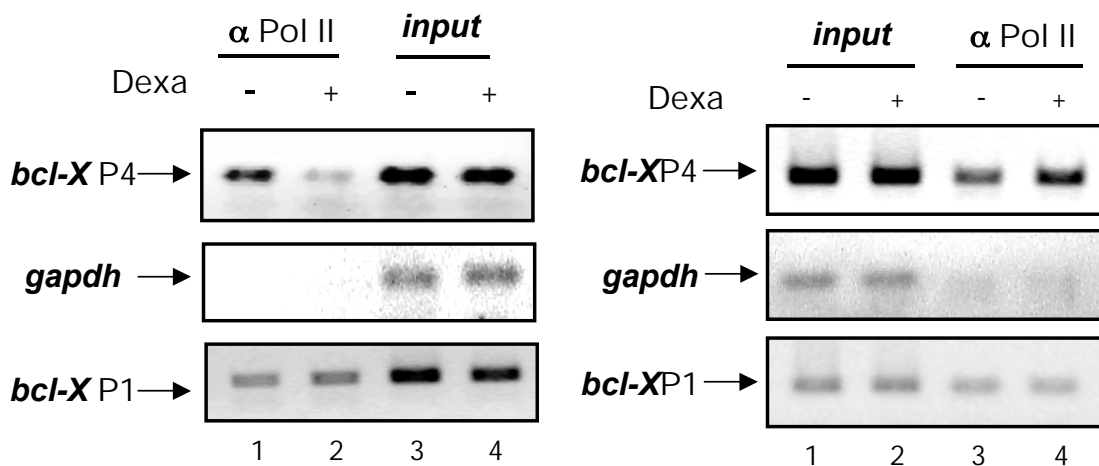


FIGURA 30 **Immunoprecipitación de la cromatina en presencia del inhibidor de JAK.** (A-D) Células linfoides S49 control (calle 3) o tratadas durante 30 min con dexa (calle 4) en presencia del inhibidor de JAK (paneles derechos) o en ausencia del mismo (paneles izquierdos). La unión del STAT5B (A); GR (B) y SMRT (C) a los promotores P4 (paneles superiores) y P1 (paneles inferiores) de *bcl-X* se determinó por ChIP. La cromatina *input* se muestra en las calles 1 y 2 (paneles derechos). La amplificación del gen *gapdh* se realizó como control (paneles centrales). α , anticuerpo.

A continuación, se analizó si la región P4 era transcripcionalmente activa en presencia del inhibidor de JAK. Los ensayos de ChIP con un anticuerpo α -ARNpol II demostraron que la unión de la enzima a P4 provocada por el tratamiento con dexa, se inhibió completamente cuando las células se co-incubaron con el inhibidor de JAK (Figura 31 A, panel derecho, calles 3 y 4). En la región promotora proximal no se observaron cambios en ninguno de los tratamientos (Figura 31 A, panel derecho, calles 3 y 4). La incubación con AG 490 tampoco afectó la unión de la ARNpol II al promotor control de *gapdh* (Figura 31 A, panel derecho).

El análisis por RT-PCR de los niveles de los transcritos provenientes de la activación de P4 en presencia del inhibidor de JAK confirmó la activación transcripcional de este promotor bajo estas condiciones (Figura 31 B, panel superior).

A



B

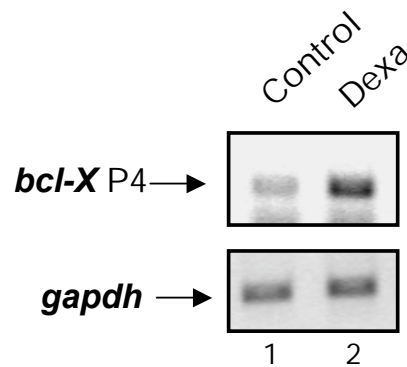


FIGURA 31. **Inmunoprecipitación de la cromatina y RT-PCR en presencia del inhibidor de JAK.** (A) Células linfoides S49 control (calle 3) o tratadas durante 30 min con dexa (calle 4) en presencia del inhibidor de JAK (paneles derechos) o en ausencia del mismo (paneles izquierdos). La unión de *ARNpolII* a los promotores P4 (*paneles superiores*) y P1 (*paneles inferiores*) de *bcl-X* se determinó por CHIP. La cromatina *input* se muestra en las calles 1 y 2 (paneles derechos). La amplificación del gen *gapdh* se realizó como control (paneles centrales). α , anticuerpo. (B) La RT-PCR se llevó a cabo utilizando oligonucleótidos específicos para la amplificación del exón de P4. La amplificación del ADNc de *gapdh* se realizó como control (*panel inferior*).

Como conclusión, en presencia del inhibidor de JAK, la represión de la actividad de P4 por dexa se revirtió y se observó activación del promotor en estas condiciones, concomitantemente con la ausencia de reclutamiento del STAT5B al mismo, y en forma similar a lo observado en células epiteliales mamarias.

DISCUSIÓN

Los glucocorticoides inducen apoptosis en la mayoría de las células nucleadas del sistema vascular (Amsterdam et al., 2002). Sin embargo, existen evidencias sobre efectos anti-apoptóticos de estas hormonas en tejidos glandulares (Schorr and Furth, 2000; Berg et al., 2002; Pecci et al., 1997; Yamamoto et al., 1998; Gascoyne et al., 2003; Bailly-Maitre et al., 2001; Hillier and Tetsuka, 1998). Es decir, la regulación de la expresión génica mediada por los glucocorticoides puede ser positiva o negativa dependiendo del tipo celular. Esta bipolaridad se debe probablemente a un controlado *crosstalk* entre el receptor de glucocorticoides y múltiples moduladores nucleares y factores de transcripción que participan de otros caminos de señalización presentes en un determinado tejido. A partir de esta observación se generan los siguientes interrogantes acerca del impacto del origen celular y del fenotipo final en los efectos que tienen los glucocorticoides sobre el proceso de apoptosis; *i.e* 1) ¿la función anti-apoptótica de los glucocorticoides involucra la expresión o atenuación de los mismos o diferentes productos génicos que participan en sus efectos pro-apoptóticos?; 2) ¿el efecto anti-apoptótico está mediado por mecanismos opuestos al efecto pro-apoptótico?

Se han dedicado numerosos esfuerzos a la identificación de genes blanco de glucocorticoides involucrados en la muerte celular. En este sentido, en el presente trabajo y en otros estudios se demostró que tanto la expresión de *bcl-X* como los niveles relativos de la isoforma anti-apoptótica *bcl-X_L* están bajo el control de los glucocorticoides en forma dependiente del contexto celular (Chang et al., 1997; Gascoyne et al., 2003; Pecci et al., 1997; Vicent et al., 2002). Mientras en células endometriales los glucocorticoides y los progestágenos activan la expresión de *bcl-X*

y llevan a una acumulación relativa de la isoforma *bcl-X_L* (Pecci et al., 1997), en timocitos reprimen la expresión del gen y disminuyen los niveles relativos de dicha isoforma. De esta manera, *bcl-X* es uno de los genes blanco cuyo control diferencial en distintos tipos celulares involucra efectos anti- y pro-apoptóticos de las hormonas esteroideas.

bcl-X es considerado un gen clave en el control del desarrollo del proceso de apoptosis dependiente de hormonas esteroideas. Se observó que los patrones de expresión de *Bcl-X_{L/C}* son diferentes o incluso opuestos a los demostrados para *Bcl-2*, lo que sugiere que *Bcl-X_L* y *Bcl-2*, aunque poseen funciones similares en la regulación de la supervivencia y la muerte celular, no parecen tener efectos redundantes. Ambos se expresan en distintos estadios de diferenciación celular, lo que sugiere que la expresión de dichos genes es específica de tejido (Krajewski et al., 1994).

Para lograr un control adecuado de la apoptosis, la relación entre proteínas anti- y pro-apoptóticas (*i.e.* *Bcl-2-Bax* o *Bcl-X_L-Bcl-X_C*) debe ser regulada en forma precisa; y para ello, la expresión de *bcl-X* no sólo requiere un control cuidadoso de la transcripción sino también del *splicing*. La estructura compleja del gen de ratón con al menos 5 promotores diferentes ubicados río arriba del único marco de lectura abierto, apoya la hipótesis de que la expresión de las distintas isoformas en respuesta a diferentes estímulos podría estar mediada por el uso alternativo de promotores.

Los experimentos realizados en la primera parte de este trabajo demuestran que las hormonas esteroideas modulan la expresión del gen *bcl-X* a través de la activación de un promotor distal. Se identificaron dos novedosos HREs ubicados inmediatamente río arriba del promotor P4 de *bcl-X*, que unen específicamente al

GR y al PR *in vitro* con una afinidad sólo 2 veces menor que un HRE canónico descrito en el MMTV. La delección de ambos HREs contactados por los receptores hormonales *in vitro*, revierte la inducción hormonal mediada por P4 en ensayos de transfección, sugiriendo que dichos HREs participarían en la respuesta *in vivo* del gen *bcl-X*.

Coincidiendo con la finalización de esta primera parte del trabajo, *Gascoyne y col.* demostraron la existencia de otras 3 secuencias HRE ubicadas en las posiciones -2944 a -2930, -2885 a -2854 y -2330 a -2316 relativas al ATG del gen *bcl-X* de ratón, y una interacción *in vitro* de estos elementos con extractos nucleares de células derivadas de fibrosarcoma tratadas con dexametasona (Gascoyne et al., 2003). Sin embargo, esos HREs son diferentes a los descritos en este trabajo y sus estudios no abarcaron el uso selectivo de promotores controlado por glucocorticoides. De acuerdo a las transfecciones transitorias realizadas, sólo los HRE I y II descritos en esta tesis le confieren a P4 respuesta a esteroides en células de epitelio mamario. La construcción pP3, que contiene una de las tres regiones con elementos de respuesta a esteroides descritas por *Gascoyne y col.*, no respondió al tratamiento con dexametasona (Figura 10 A, calle 14) en células Cos-1 co-transfectadas con un vector de expresión que codifica para el GR. Sin embargo, sí lo hizo en respuesta al progestágeno R5020 en las mismas células co-transfectadas con un vector de expresión que codifica para el PR. En estas condiciones, la expresión de luciferasa aumentó en menos de dos veces respecto del control (Figura 10 B, calle 14). Por otro lado, el vector pP4- Δ HRE, que tiene delecionados los dos HREs descritos en este trabajo pero que contiene dos de las secuencias HRE descritas por *Gascoyne y col.* (Gascoyne et al., 2003), no respondió ni a dexametasona ni a R5020 en células HC11 o T47D, respectivamente (Figura 17, calle 5 vs calle 2).

Teniendo en cuenta estos resultados, es probable que el contexto celular determine la unión del GR o del PR a diferentes HREs en la proximidad de P4. Como se demostró de otros autores (Nordeen et al., 1990), la cooperatividad entre varias secuencias HRE contribuiría a la inducibilidad de un determinado promotor. Por lo tanto, el grado de ocupación de los diferentes HREs podría mediar el reclutamiento de diferentes factores ubícuos o específicos de tejido, determinando consecuentemente la expresión dependiente de hormonas de *bcl-X*. En este sentido, la presencia de varios HREs en una extensión corta de ADN podría proveer las bases para la regulación hormonal diferencial de este gen en un determinado contexto celular.

En la segunda parte de este trabajo, se observó la unión *in vivo* del GR a la región promotora P4 luego del tratamiento hormonal de las células mamarias HC11 en proliferación. El reclutamiento del receptor de glucocorticoides se correlacionó con un aumento en la unión de la ARNpol II (con la consecuente acumulación de transcritos generados por P4) y con un aumento en la relación de las isoformas *bcl-X_L/bcl-X_C*. Estos resultados avalan la hipótesis de que el GR podría mediar *in vivo* la activación de P4 en células de epitelio mamario de ratón en proliferación. Dado que P4 es el único promotor conocido de *bcl-X* que responde a las hormonas esteroideas en esta línea celular, resulta lógico pensar que la activación de P4 por esteroides genera principalmente la isoforma anti-apoptótica *bcl-X_L*, a pesar de que el mecanismo de activación diferencial aún no se conoce. Coherentemente con estos resultados, la inducción de la expresión de *bcl-X_L* mediada por glucocorticoides en células epiteliales mamarias se había demostrado con anterioridad (Schorr and Furth, 2000). Este efecto mediado por el GR resultó

independiente de prolactina y de la consecuente activación del STAT5A, y se asoció a una mayor supervivencia de células cultivadas en ausencia de suero.

Por el contrario, en timocitos de ratón los glucocorticoides reprimen la actividad de P4 y disminuyen tanto los niveles de ARNm de *bcl-X_L* como los niveles de la proteína correspondiente. La represión inducida por la dexametasona involucra un reclutamiento transitorio del GR a la región promotora P4, que está temporalmente acompañado por el reclutamiento dinámico de SRC-1, co-activador transcripcional; de BRG-1, componente del complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP, y de la ARN polimerasa II. Sin embargo, estos indicadores de activación génica son sólo transitorias y no llevan a la acumulación de transcritos generados a partir de P4 (Figura 32).

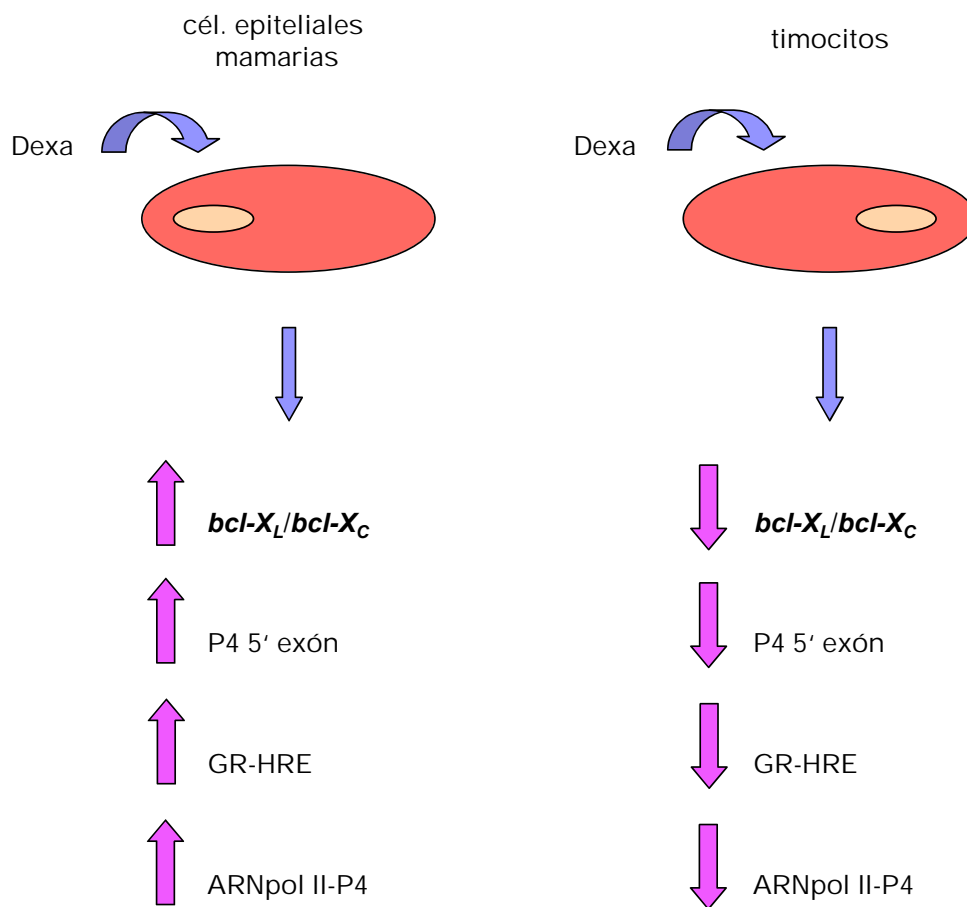


FIGURA 32. **Esquema comparativo de la regulación de la expresión de *bcl-X* específica de tejido en respuesta a glucocorticoides.**

Los resultados también mostraron que el STAT5B se activa luego del tratamiento hormonal y se recluta de manera estable al promotor al mismo tiempo que el GR. A diferencia de éste último, la unión del STAT5B perdura en el tiempo aún cuando el co-represor SMRT y HDAC3, que desacetila la histona H3, se asocian a P4. La cinética de asociación de SMRT y HDAC3 es paralela a la disociación del GR, SRC-1 y BRG-1, que median la interacción del receptor con los componentes del aparato basal de transcripción, incluida la ARN polimerasa II, lo que sugiere un efecto causal sobre la disminución en la acumulación de transcritos derivados de P4 observada en estos resultados.

El reclutamiento de co-factores en forma secuencial, cíclica y combinatoria ya se ha demostrado para el promotor endógeno del gen *presenilina 2* humano (pS2) mediante estudios cinéticos analizados por ChIP (Metivier et al., 2003). Olas de transcripción inicialmente improductivas que promueven el remodelado de la organización nucleosomal serían necesarias para la activación o represión de un determinado promotor.

En base a estos resultados, surgen varios interrogantes respecto al papel y al mecanismo por el cual se reclutan inicialmente el GR, el STAT5B, y se disocia posteriormente el receptor. Es por ello que es necesario discutir la función de los elementos reguladores en *cis* sobre el promotor de *bcl-X*, especialmente los HREs y el sitio de unión de STAT5. A pesar de no poder responder estas preguntas en forma concluyente, los resultados permiten sugerir algunas consideraciones relevantes.

En primer lugar, se observó que ambas isoformas, STAT5A y STAT5B, se expresan en timocitos de ratón y en la línea celular S49, mientras que sólo el STAT5A se detectó en las células de epitelio mamario HC11 en proliferación. Si bien

se demostró que el STAT5A y el STAT5B tienen un 96 % de homología (Liu et al., 1995), estas dos isoformas no son funcionalmente idénticas. En adipocitos y en la glándula mamaria se encontraron diferencias funcionales (Floyd and Stephens, 2003; Groner, 2002). De hecho, en este trabajo se muestra un reclutamiento *in vivo* diferencial de ambos factores sobre la región P4, según el tipo celular o el estadio de diferenciación del mismo. Se observó la unión del STAT5A, junto con la del GR, sólo en células mamarias durante la lactancia, y la unión del STAT5B (que se correlaciona con la ausencia de unión del receptor) en timocitos y en tejido mamario, ambos en condiciones de involución.

Previamente se demostró la interacción entre el GR y el STAT5 en diferentes tipos celulares (Cella et al., 1998; Debierre-Grockiego et al., 2003; Gottlicher et al., 1998; Richer et al., 1998; Stocklin et al., 1996; Tronche et al., 2004). Muchas de estas evidencias muestran de qué manera el STAT5 activa genes blanco; sin embargo poco se conoce acerca de la regulación negativa provocada por este factor. En particular, se describió la participación de citoquinas y glucocorticoides en el control de la proliferación, diferenciación y muerte celular de timocitos. Las citoquinas interfieren con el camino de señalización de los glucocorticoides en la regulación de la apoptosis y la expresión génica del sistema inmune mediante la activación de la vía de transducción de señales JAK-STAT (Biola et al., 2001). La actividad represora del STAT5 sobre la transcripción mediada por glucocorticoides en células linfoides podría involucrar una interacción directa del STAT5B con el GR, sin la participación de los elementos de unión de STAT5. Los glucocorticoides, por otra parte, también inhiben la vía de señalización JAK-STAT inducida por citoquinas (Bianchi et al., 2000), impidiendo la unión del STAT5 a sus genes blanco en células T. Este acoplamiento funcional en la transcripción mediada por factores STATs y

receptores hormonales nucleares podría depender del contexto del promotor y del nivel de activación del STAT5, y ocurriría independientemente de los niveles de co-activadores, como SRC-1 y CBP (Biola et al., 2001).

Además de los receptores de esteroides, el STAT5A y el STAT5B son necesarios para el crecimiento normal de la glándula mamaria, y se regulan positivamente durante la preñez, cuando los niveles de progesterona son elevados. En células de cáncer de mama tratadas sólo con esteroides, se observó que los factores STAT son activados por fosforilación de JAK2 y translocados al núcleo mediante su asociación física con el PR o el GR (Cella et al., 1998; Richer et al., 1998). Sorprendentemente, este resultado implicaría que los progestágenos y/o glucocorticoides pueden activar a la quinasa responsable de la fosforilación en tirosina de la JAK2, o que ésta y el STAT5 se asocian con otra proteína conteniendo fosfotirosina luego del tratamiento hormonal. Como la interacción entre el STAT5 y el PR se observó en fracciones nucleares aún a tiempos largos de tratamiento hormonal, también se sugirió que el STAT5 no activado, quizás como monómero, podría ser igualmente translocado al núcleo, co-transportado por el PR y servir de co-regulador de los mismos factores unidos al ADN. Por otro lado, se demostró que los progestágenos además sensibilizan a las células de cáncer de mama al tratamiento con citoquinas y factores de crecimiento, como ocurre con la prolactina o el EGF en la inducción de promotores a través del STAT5 (Richer et al., 1998). Estos resultados demuestran la convergencia de caminos de señalización de esteroides y de citoquinas o factores de crecimiento en múltiples niveles, lo que sugiere un mecanismo para la coordinación de eventos proliferativos y de diferenciación mediados por el PR/GR y el STAT5 en la glándula mamaria.

Eventos de fosforilación adicionales en residuos serina/treonina de los STATs podrían ser necesarios para la localización nuclear y la unión al ADN de estos factores, y también podrían regular interacciones con otros factores en forma específica, contribuyendo de esta manera a diferentes efectos fenotípicos causados por ciertas citoquinas que utilizan la vía JAK-STAT (Stocklin et al., 1996; Zhang et al., 1995). En el promotor del gen de la β -caseína, el sitio de unión del STAT5 resultó suficiente para la interacción funcional con el GR activado, que actúa como un co-activador transcripcional y promueve la transcripción de genes mediada por el STAT5. Éste último forma un complejo molecular con el GR, que se une al ADN independientemente de los HREs. Esta asociación disminuye la respuesta a los glucocorticoides de un promotor que contiene dichos elementos (Stocklin et al., 1996). No se desprende de los resultados que se presentan en este trabajo si el GR y el STAT5B llegan al promotor P4 de timo como heterodímeros o son reclutados individualmente a dicha región luego del tratamiento hormonal. En ambos casos, la unión podría ser a través de los HREs o del elemento de respuesta de STAT5. De todos modos, la co-inmunoprecipitación de ambos factores en extractos totales de S49 tratadas con dexametasona resultó negativa (datos no mostrados). Además, los experimentos con el inhibidor de la activación del STAT5 sugieren que el GR activado por ligando podría dirigirse al P4 independientemente del STAT5B en las células de timo, pero no se sabe si ocurre lo mismo en ausencia del inhibidor. Para responder esta pregunta se necesitaría ya sea un análisis de *footprinting in vivo* o el uso de mutantes del GR incapaces de unirse a los HREs o al factor STAT5.

La activación y represión de la transcripción son procesos dinámicos que involucran la remodelación de la cromatina por acetilasas y desacetilasas de histonas. La estructura relajada de la cromatina está generalmente asociada con la

activación génica y puede ser facilitada por la acetilación de las colas de histonas mediante el reclutamiento de acetiltransferasas de histonas (HATs) a la región promotora. Este fenómeno puede revertirse efectivamente a través del reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDACs), que podrían devolverle a la cromatina su estado condensado y como consecuencia silenciar la transcripción.

Con respecto al mecanismo de represión, los resultados demuestran el reclutamiento del SMRT a la región promotora P4 a los 25 minutos del tratamiento con dexametasona. La interacción funcional entre el STAT5 y el complejo co-represor SMRT se observó por primera vez en experimentos de doble híbrido (Nakajima et al., 2001). La sobreexpresión del SMRT suprimió la inducción de genes blanco de STAT5 por IL-3, sugiriendo un papel probable de este represor en la regulación negativa de la respuesta a STAT5, con la consecuente disminución de la expresión de sus genes blanco (Nakajima et al., 2001). La modulación de la función del STAT5 por el SMRT sería independiente de co-activadores que interactúan con el dominio de activación, de manera que la transcripción dependiente de STAT5 puede ser regulada a través de un balance de co-activadores y co-represores unidos simultáneamente a regiones distintas de la proteína.

Por otro lado, se describió la existencia de una isoforma de STAT5 truncada en el extremo carboxilo, que carece de dominio de transactivación y exhibe un potencial regulatorio negativo mediante su asociación con co-represores nucleares que silencian activamente a la cromatina como el SMRT (Ihle, 1996; Wang et al., 1996). Como los experimentos de ChIP que se realizaron en este trabajo se llevaron a cabo con un anticuerpo específico contra la región carboxi-terminal de STAT5B, si la isoforma truncada participa en la represión de P4 debería actuar como dímero con la isoforma completa, que contiene dicho dominio carboxilo.

Previamente se habían encontrado dos sitios consenso de unión del STAT5, varias bases río arriba del sitio de iniciación de la transcripción de P1, en una región regulatoria ubicada en el primer intrón del gen humano y murino de *bcl-X*, similares a los encontrados en el promotor de *β -caseína* (Socolovsky et al., 1999). Durante la diferenciación eritroide se observó que la eritropoyetina (EPO) induce la expresión de *bcl-X_L* a través de la activación del STAT5 que se une a estos sitios (Socolovsky et al., 1999). Aquí se describe un nuevo sitio funcional de unión del STAT5 localizado 213 pb río arriba de la TATA box del promotor P4. Se ubica 63 pb río abajo del HRE II descrito en este trabajo y se solapa con el HRE II descrito por Gascoyne y col. (Gascoyne et al., 2003). Los experimentos de CHIP no discriminan si el GR o el STAT5 se unen *in vivo* a los elementos descritos en el presente trabajo o a los analizados por este otro grupo.

Además, de acuerdo a estos resultados, tanto el GR como el STAT5B son capaces de interactuar directa e independientemente con sus respectivos elementos de respuesta en la región P4 del ADN desnudo. No obstante, con los ensayos de CHIP no se analiza la función de los distintos HREs, ni si el GR y el STAT5B compiten por el mismo sitio en el ADN. Como el STAT5B permanece unido a la región P4 mientras el GR se disocia luego del reclutamiento del SMRT, no se puede descartar una competencia entre el GR y el SMRT por la unión al STAT5B, en caso de que el GR y el STAT5B formen dímeros. Sin embargo, los resultados son igualmente compatibles con un efecto indirecto del SMRT sobre la compactación de la cromatina, que impediría la unión del GR y el concomitante reclutamiento de los co-activadores y de la maquinaria transcripcional (Figura 33).

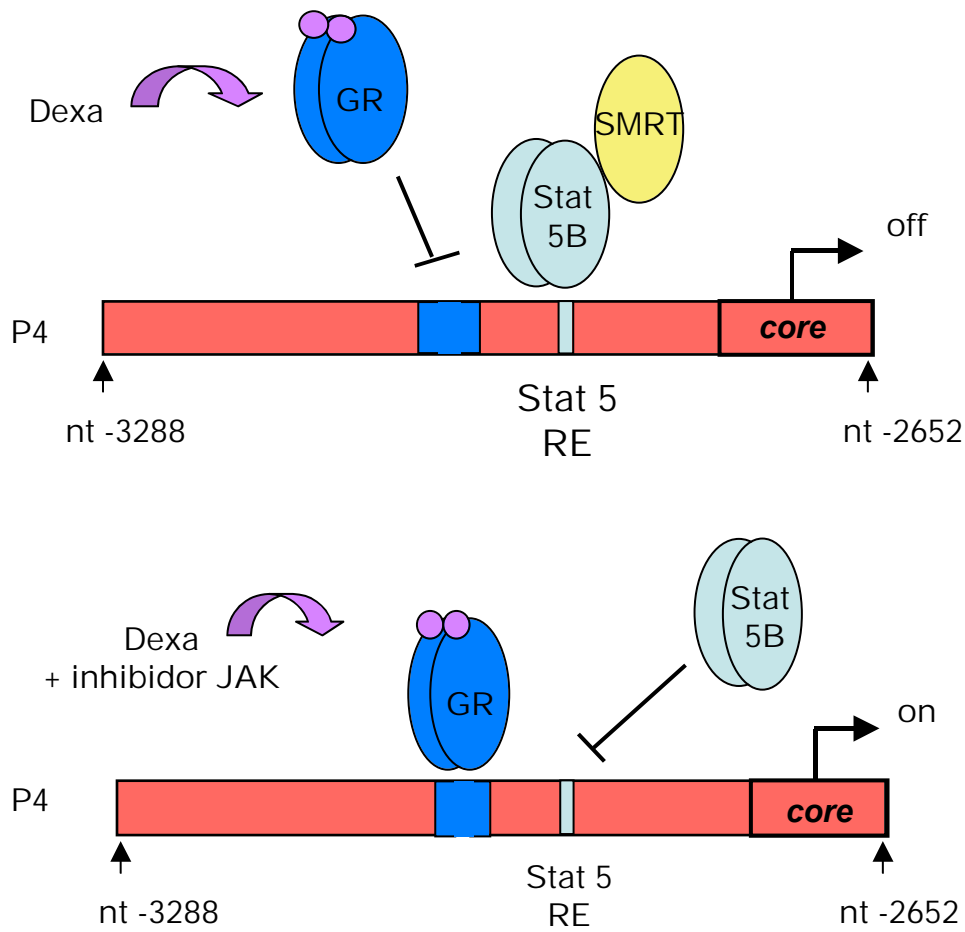


FIGURA 33. Regulación de la actividad de P4 en células linfoides en respuesta a glucocorticoides. El esquema superior muestra la represión del promotor mediado por el reclutamiento del STAT5B y del SMRT luego del tratamiento hormonal. El esquema inferior detalla la activación de P4 dada por la unión del GR en presencia de dexa y del inhibidor de JAK.

Finalmente, retomando la pregunta de cuál es el impacto del contexto celular y mediante qué mecanismos se regula la muerte celular dependiente de glucocorticoides, en este trabajo se demostró que al menos un gen clave en el proceso apoptótico, *bcl-X*, se expresa de manera opuesta en respuesta a glucocorticoides según el tipo celular. Además, en dicho control estaría involucrada la actividad del promotor P4 del gen y, mientras la activación del mismo está

mediada por la interacción directa del GR a los HREs presentes en ese promotor, la represión sería a través del reclutamiento del factor STAT5B, cuya expresión también es dependiente del tejido.

Como conclusión, la comprensión de la regulación de la transcripción del gen *bcl-X* en un tipo celular particular requiere la determinación de los exones 5', y el análisis de las múltiples secuencias regulatorias potenciales presentes en el contexto de la región promotora completa.

BIBLIOGRAFÍA

- Abastado, J.P. (1996) Apoptosis: function and regulation of cell death. *Res Immunol*, 147, 443-456.
- Adams, J.M. and Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-1326.
- Amsterdam, A. and Sasson, R. (2002) The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol*, 189, 1-9.
- Amsterdam, A., Tajima, K. and Sasson, R. (2002) Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol*, 64, 843-850.
- Andrews, N.C. and Faller, D.V. (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 19, 2499.
- Ariyoshi, K., Nosaka, T., Yamada, K., Onishi, M., Oka, Y., Miyajima, A. and Kitamura, T. (2000) Constitutive activation of STAT5 by a point mutation in the SH2 domain. *J Biol Chem*, 275, 24407-24413.
- Ashwell, J.D., Lu, F.W. and Vacchio, M.S. (2000) Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annu Rev Immunol*, 18, 309-345.
- Auboeuf, D., Honig, A., Berget, S.M. and O'Malley, B.W. (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science*, 298, 416-419.
- Bailly-Maitre, B., de Sousa, G., Boulukos, K., Gugenheim, J. and Rahmani, R. (2001) Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. *Cell Death Differ*, 8, 279-288.
- Beato, M., Herrlich, P. and Schutz, G. (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, 83, 851-857.
- Berg, M.N., Dharmarajan, A.M. and Waddell, B.J. (2002) Glucocorticoids and progesterone prevent apoptosis in the lactating rat mammary gland. *Endocrinology*, 143, 222-227.

- Bianchi, M., Meng, C. and Ivashkiv, L.B. (2000) Inhibition of IL-2-induced Jak-STAT signaling by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9573-9578.
- Biola, A., Lefebvre, P., Perrin-Wolff, M., Sturm, M., Bertoglio, J. and Pallardy, M. (2001) Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1. *Mol Endocrinol*, 15, 1062-1076.
- Bodwell, J.E., Webster, J.C., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A., Hu, J.M. and Munck, A. (1998) Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle-dependence. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65, 91-99.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. and Thompson, C.B. (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 74, 597-608.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S. and Jove, R. (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10, 105-115.
- Cella, N., Groner, B. and Hynes, N.E. (1998) Characterization of Stat5a and Stat5b homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. *Mol Cell Biol*, 18, 1783-1792.
- Chalepakis, G., Schauer, M., Cao, X.A. and Beato, M. (1990) Efficient binding of glucocorticoid receptor to its responsive element requires a dimer and DNA flanking sequences. *DNA Cell Biol*, 9, 355-368.
- Chang, T.C., Hung, M.W., Jiang, S.Y., Chu, J.T., Chu, L.L. and Tsai, L.C. (1997) Dexamethasone suppresses apoptosis in a human gastric cancer cell line through modulation of bcl-x gene expression. *FEBS Lett*, 415, 11-15.
- Chen, F., Demers, L.M., Vallyathan, V., Lu, Y., Castranova, V. and Shi, X. (1999) Involvement of 5'-flanking kappaB-like sites within bcl-x gene in silica-induced Bcl-x expression. *J Biol Chem*, 274, 35591-35595.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
- Cidlowski, J.A., King, K.L., Evans-Storms, R.B., Montague, J.W., Bortner, C.D. and Hughes, F.M., Jr. (1996) The biochemistry and molecular biology of

- glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. *Recent Prog Horm Res*, 51, 457-490; discussion 490-451.
- Compton, M.M. and Cidlowski, J.A. (1986) Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*, 118, 38-45.
- Cory, S. (1995) Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol*, 13, 513-543.
- Debierre-Grockiego, F., Fuentes, V., Prin, L., Gouilleux, F. and Gouilleux-Gruart, V. (2003) Differential effect of dexamethasone on cell death and STAT5 activation during in vitro eosinopoiesis. *Br J Haematol*, 123, 933-941.
- Di Croce, L., Vicent, G.P., Pecci, A., Bruscalupi, G., Trentalance, A. and Beato, M. (1999) The promoter of the rat 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene contains a tissue-specific estrogen-responsive region. *Mol Endocrinol*, 13, 1225-1236.
- Fang, W., Rivard, J.J., Mueller, D.L. and Behrens, T.W. (1994) Cloning and molecular characterization of mouse bcl-x in B and T lymphocytes. *J Immunol*, 153, 4388-4398.
- Feng, Z., Marti, A., Jehn, B., Altermatt, H.J., Chicaiza, G. and Jaggi, R. (1995) Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland. *J Cell Biol*, 131, 1095-1103.
- Floyd, Z.E. and Stephens, J.M. (2003) STAT5A promotes adipogenesis in nonprecursor cells and associates with the glucocorticoid receptor during adipocyte differentiation. *Diabetes*, 52, 308-314.
- Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Yamauchi-Takahara, K. and Kishimoto, T. (1997) Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes. *J Clin Invest*, 99, 2898-2905.
- Galigniana, M.D., Housley, P.R., DeFranco, D.B. and Pratt, W.B. (1999) Inhibition of glucocorticoid receptor nucleocytoplasmic shuttling by okadaic acid requires intact cytoskeleton. *J Biol Chem*, 274, 16222-16227.
- Garside, H., Stevens, A., Farrow, S., Normand, C., Houle, B., Berry, A., Maschera, B. and Ray, D. (2004) Glucocorticoid Ligands Specify Different Interactions with NF- κ B by Allosteric Effects on the Glucocorticoid Receptor DNA Binding Domain. *J Biol Chem*, 279, 50050-50059.

- Gascoyne, D.M., Kypta, R.M. and Vivanco, M.M. (2003) Glucocorticoids inhibit apoptosis during fibrosarcoma development by transcriptionally activating Bcl-xL. *J Biol Chem*, 278, 18022-18029.
- Godowski, P.J., Rusconi, S., Miesfeld, R. and Yamamoto, K.R. (1987) Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. *Nature*, 325, 365-368.
- Gonzalez-Garcia, M., Perez-Ballesteros, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L.H., Thompson, C.B. and Nunez, G. (1994) bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development*, 120, 3033-3042.
- Gottlicher, M., Heck, S. and Herrlich, P. (1998) Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med*, 76, 480-489.
- Grad, J.M., Zeng, X.R. and Boise, L.H. (2000) Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr Opin Oncol*, 12, 543-549.
- Grandis, J.R., Drenning, S.D., Zeng, Q., Watkins, S.C., Melhem, M.F., Endo, S., Johnson, D.E., Huang, L., He, Y. and Kim, J.D. (2000) Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4227-4232.
- Green, D.R. (1998) Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, 94, 695-698.
- Green, D.R. and Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.
- Grillot, D.A., Gonzalez-Garcia, M., Ekhterae, D., Duan, L., Inohara, N., Ohta, S., Seldin, M.F. and Nunez, G. (1997) Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J Immunol*, 158, 4750-4757.
- Groner, B. (2002) Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. *Domest Anim Endocrinol*, 23, 25-32.
- Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 13, 1899-1911.
- Guenther, M.G., Lane, W.S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M.A. and Shiekhhattar, R. (2000) A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev*, 14, 1048-1057.

- Heermeier, K., Benedict, M., Li, M., Furth, P., Nunez, G. and Hennighausen, L. (1996) Bax and Bcl-xs are induced at the onset of apoptosis in involuting mammary epithelial cells. *Mech Dev*, 56, 197-207.
- Hillier, S.G. and Tetsuka, M. (1998) An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries? *J Reprod Immunol*, 39, 21-27.
- Hoijman, E (2004) Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology*, 145, 418-425.
- Hyman, R. (1973) Studies on surface antigen variants. Isolation of two complementary variants for Thy 1.2. *J Natl Cancer Inst*, 50, 415-422.
- Ihle, J.N. (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell*, 84, 331-334.
- Kastner, P., Bocquel, M.T., Turcotte, B., Garnier, J.M., Horwitz, K.B., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1990) Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms. *J Biol Chem*, 265, 12163-12167.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-257.
- Khavari, P.A., Peterson, C.L., Tamkun, J.W., Mendel, D.B. and Crabtree, G.R. (1993) BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature*, 366, 170-174.
- Kiess, W. and Gallaher, B. (1998) Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol*, 138, 482-491.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Gascoyne, R., Berean, K., Krajewska, M. and Reed, J.C. (1994) Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes. *Am J Pathol*, 145, 515-525.
- Kroemer, G. and Reed, J.C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, 6, 513-519.
- Li, X., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2003) Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol*, 23, 3763-3773.

- Lippman, M., Bolan, G. and Huff, K. (1976) The effects of androgens and antiandrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res*, 36, 4610-4618.
- Liu, X., Robinson, G.W., Gouilleux, F., Groner, B. and Hennighausen, L. (1995) Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8831-8835.
- Lord, J.D., McIntosh, B.C., Greenberg, P.D. and Nelson, B.H. (2000) The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. *J Immunol*, 164, 2533-2541.
- MacCarthy-Morrogh, L., Wood, L., Brimmell, M., Johnson, P.W. and Packham, G. (2000) Identification of a novel human BCL-X promoter and exon. *Oncogene*, 19, 5534-5538.
- Mann, C.L. and Cidlowski, J.A. (2001) Glucocorticoids regulate plasma membrane potential during rat thymocyte apoptosis in vivo and in vitro. *Endocrinology*, 142, 421-429.
- Merlo, G.R., Graus-Porta, D., Cella, N., Marte, B.M., Taverna, D. and Hynes, N.E. (1996) Growth, differentiation and survival of HC11 mammary epithelial cells: diverse effects of receptor tyrosine kinase-activating peptide growth factors. *Eur J Cell Biol*, 70, 97-105.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M. and Gannon, F. (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, 115, 751-763.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S. and et al. (1995) Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*, 267, 1506-1510.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M.J., Heibein, J.A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C.F., Gauldie, J. and Bleackley, R.C. (2000) Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell*, 103, 491-500.

- Muchardt, C. and Yaniv, M. (1993) A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *Embo J*, 12, 4279-4290.
- Nakajima, H., Brindle, P.K., Handa, M. and Ihle, J.N. (2001) Functional interaction of STAT5 and nuclear receptor co-repressor SMRT: implications in negative regulation of STAT5-dependent transcription. *Embo J*, 20, 6836-6844.
- Nordeen, S.K., Suh, B.J., Kuhnel, B. and Hutchison, C.D. (1990) Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element. *Mol Endocrinol*, 4, 1866-1873.
- Opferman, J.T. and Korsmeyer, S.J. (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*, 4, 410-415.
- Pecci, A., Scholz, A., Pelster, D. and Beato, M. (1997) Progestins prevent apoptosis in a rat endometrial cell line and increase the ratio of bcl-XL to bcl-XS. *J Biol Chem*, 272, 11791-11798.
- Pecci, A., Viegas, L.R., Baranao, J.L. and Beato, M. (2001) Promoter choice influences alternative splicing and determines the balance of isoforms expressed from the mouse bcl-X gene. *J Biol Chem*, 276, 21062-21069.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Harrell, J.M. and DeFranco, D.B. (2004a) Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal*, 16, 857-872.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Morishima, Y. and Murphy, P.J. (2004b) Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem*, 40, 41-58.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. and Werner, T. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res*, 23, 4878-4884.
- Reed, J.C. (2003) Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell*, 3, 17-22.
- Reichardt, H.M., Horsch, K., Grone, H.J., Kolbus, A., Beug, H., Hynes, N. and Schutz, G. (2001) Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. *Eur J Endocrinol*, 145, 519-527.
- Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. and Schutz, G. (1998) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*, 93, 531-541.

- Richer, J.K., Lange, C.A., Manning, N.G., Owen, G., Powell, R. and Horwitz, K.B. (1998) Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. Progesterone receptors regulate signal transducers and activators of transcription expression and activity. *J Biol Chem*, 273, 31317-31326.
- Salomoni, P. and Pandolfi, P.P. (2002) The role of PML in tumor suppression. *Cell*, 108, 165-170.
- Savory, J.G., Hsu, B., Laquian, I.R., Giffin, W., Reich, T., Hache, R.J. and Lefebvre, Y.A. (1999) Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol*, 19, 1025-1037.
- Scheidereit, C., Geisse, S., Westphal, H.M. and Beato, M. (1983) The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumour virus. *Nature*, 304, 749-752.
- Schere-Levy, C., Buggiano, V., Quaglino, A., Gattelli, A., Cirio, M.C., Piazzon, I., Vanzulli, S. and Kordon, E.C. (2003) Leukemia inhibitory factor induces apoptosis of the mammary epithelial cells and participates in mouse mammary gland involution. *Exp Cell Res*, 282, 35-47.
- Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M. and Bertrand, R. (2004) Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation. *Oncogene*, 23, 3915-3931.
- Schorr, K. and Furth, P.A. (2000) Induction of bcl-xL expression in mammary epithelial cells is glucocorticoid-dependent but not signal transducer and activator of transcription 5-dependent. *Cancer Res*, 60, 5950-5953.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M.E. (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, 254, 439-459.
- Sevilla, L., Aperlo, C., Dulic, V., Chambard, J.C., Boutonnet, C., Pasquier, O., Pognonec, P. and Boulukos, K.E. (1999) The Ets2 transcription factor inhibits apoptosis induced by colony-stimulating factor 1 deprivation of macrophages through a Bcl-xL-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, 19, 2624-2634.
- Shiraiwa, N., Inohara, N., Okada, S., Yuzaki, M., Shoji, S. and Ohta, S. (1996) An additional form of rat Bcl-x, Bcl-xbeta, generated by an unspliced RNA, promotes apoptosis in promyeloid cells. *J Biol Chem*, 271, 13258-13265.

- Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Brugnara, C. and Lodish, H.F. (1999) Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*, 98, 181-191.
- Squier, M.K. and Cohen, J.J. (1997) Calpain, an upstream regulator of thymocyte apoptosis. *J Immunol*, 158, 3690-3697.
- Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F. and Groner, B. (1996) Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*, 383, 726-728.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-1316.
- Tronche, F., Opherk, C., Moriggl, R., Kellendonk, C., Reimann, A., Schwake, L., Reichardt, H.M., Stangl, K., Gau, D., Hoeflich, A., Beug, H., Schmid, W. and Schutz, G. (2004) Glucocorticoid receptor function in hepatocytes is essential to promote postnatal body growth. *Genes Dev*, 18, 492-497.
- Truss, M., Bartsch, J., Schelbert, A., Hache, R.J. and Beato, M. (1995) Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *Embo J*, 14, 1737-1751.
- Vicent, G.P., Pecci, A., Ghini, A., Piwien-Pilipuk, G. and Galigniana, M.D. (2002) Differences in nuclear retention characteristics of agonist-activated glucocorticoid receptor may determine specific responses. *Exp Cell Res*, 276, 142-154.
- Wang, D., Stravopodis, D., Teglund, S., Kitazawa, J. and Ihle, J.N. (1996) Naturally occurring dominant negative variants of Stat5. *Mol Cell Biol*, 16, 6141-6148.
- Wang, L.H., Kirken, R.A., Erwin, R.A., Yu, C.R. and Farrar, W.L. (1999) JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrophostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response. *J Immunol*, 162, 3897-3904.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, 14, 2060-2071.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G. and Youle, R.J. (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, 139, 1281-1292.
- Yamamoto, M., Fukuda, K., Miura, N., Suzuki, R., Kido, T. and Komatsu, Y. (1998) Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced

- apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology*, 27, 959-966.
- Yang, X.F., Weber, G.F. and Cantor, H. (1997) A novel Bcl-x isoform connected to the T cell receptor regulates apoptosis in T cells. *Immunity*, 7, 629-639.
- Yang, X.F., Ye, Q., Press, B., Han, R.Z., Bassing, C.H., Sleckman, B.P., Alt, F.W. and Cantor, H. (2002) Analysis of the complex genomic structure of Bcl-x and its relationship to Bcl-x(gamma) expression after CD28-dependent costimulation. *Mol Immunol*, 39, 45-55.
- Zhang, X., Blenis, J., Li, H.C., Schindler, C. and Chen-Kiang, S. (1995) Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science*, 267, 1990-1994.
- Zinn, K., DiMaio, D. and Maniatis, T. (1983) Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human beta-interferon gene. *Cell*, 34, 865-879.