



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MECANISMOS EPIGENÉTICOS QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA  
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DEL GEN DE PR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL

MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

ÁNGEL ZARAIN HERZBERG

Facultad de Medicina, UNAM

JUAN MIRANDA RÍOS

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



# I. Índice

I. Índice.....	3
II. Jurado de examen.....	5
III. Reconocimientos.....	6
IV. Agradecimientos.....	7
V. Resumen.....	8
VI. Antecedentes.....	9
6.1. Receptor a Progesterona.....	9
6.2. Regulación transcripcional del <i>PR</i> .....	13
6.3. Regulación epigenética del <i>PR</i> .....	16
6.3.1. Modificaciones post-traduccionales de histonas.....	16
6.3.2. Metilación del DNA.....	20
6.4. Mecanismos de regulación epigenética y transcripcional mediada por receptores nucleares.....	23
6.5. Mecanismos moleculares de regulación hormonal en cultivos hipotalámicos.....	24
VII. Aportación del proyecto.....	26
VIII. Hipótesis.....	26
IX. Objetivo.....	26
X. Metodología.....	27
10.1. Cultivo celular.....	27
10.2. Tratamientos.....	27
10.3. Extracción de RNA y PCR en tiempo real.....	28
10.4. Extracción de proteínas y caracterización por Western Blot.....	30
10.5. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	30
10.6. Inmunoprecipitación de DNA metilado e hidroximetilado (meDIP y hmeDIP).....	34
10.7. Análisis estadístico.....	35
XI. Resultados.....	36
11.1. Regulación de la expresión de las isoformas del gen <i>PR</i> en células mHypoE-N42.....	36
11.2. El estradiol regula el contenido de proteína total y fosforilada de los factores de transcripción ER $\alpha$ y Sp1.....	39

11.3.	El ER $\alpha$ es el responsable de la inducción de la isoforma PR-B mediada por estradiol	40
11.4.	El estradiol induce una ocupación diferencial de factores de transcripción relacionados con la regulación por estrógenos y de la RNA polimerasa II en los promotores de las isoformas del gen <i>PR</i>	41
11.5.	El estradiol induce una ocupación diferencial de marcas de histonas en los promotores de las isoformas del gen <i>PR</i>	44
11.6.	El estradiol no induce cambios en el contenido de 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina en los promotores de las isoformas del gen <i>PR</i>	47
11.7.	La progesterona regula la expresión de genes blanco del PR en las células mHypoE-N42	49
XII.	Discusión de resultados	51
12.1.	Resumen de los principales hallazgos	64
XIII.	Conclusiones	66
XIV.	Perspectivas	66
XV.	Referencias bibliográficas	67
XVI.	Anexos	77

## II. Jurado de examen.



PMDCB/1369/2015...2a

**Edgar Ricardo Vázquez Martínez**  
**Alumno (a) del Doctorado en Ciencias Bioquímicas**  
**P r e s e n t e**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 23 de noviembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Mecanismos epigenéticos que participan en la regulación de la expresión diferencial de las isoformas del gen PR**", dirigida por el Dr. **Marco Antonio Cerbón Cervantes**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Alejandro García Carrancá
VOCAL	Dr. Jesús Chimal Monroy
VOCAL	Dra. María Cristina Fernández Mejía
VOCAL	Dr. Ernesto Soto Reyes Solís
SECRETARIO	Dr. Alfonso Dueñas González

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**Cd. Universitaria, D.F., a 26 de noviembre de 2015**  
**COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO**

**DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO**

C.c.p. Tutor  
C.c.p. Archivo

BGP\*Igg

contacto:mdcbq@posgrado.unam.mx tel. 56237006

### III. Reconocimientos.

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes en el laboratorio 206 del Edificio F de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana del Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, UNAM.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes                      Facultad de Química, UNAM

Dr. Ángel Zarain Herzberg                                  Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Juan Miranda Ríos    Instituto de Investigaciones  
Biomédicas, UNAM

Se reconoce la asesoría del Dr. Ángel Zarain Herzberg de la Facultad de Medicina, UNAM y del Dr. Juan Miranda Ríos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM para la realización de esta tesis.

Se reconoce la colaboración del Dr. Ignacio Camacho Arroyo de la Facultad de Química, UNAM y de la Dra. Martha Patricia Ostrosky Wegman del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM para la realización de este trabajo.

Esta tesis fue apoyada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) No. IN210412 y IA202814, así como por el Programa de Apoyo a la Investigación para Estudiantes de Posgrado (PAIP) No. 5000-9108 y 5000-9141 de la UNAM.

El autor de esta tesis recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para realizar sus estudios de doctorado en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, con número de becario 240150. Se contó con apoyo por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

Durante los estudios de doctorado, se realizó una estancia internacional en el laboratorio de Miguel Beato del Centro de Regulación Genómica en Barcelona, España, la cual fue apoyada por el PAEP, la beca mixta del CONACyT y el Programa de Movilidad Internacional de la UNAM.

#### **IV. Agradecimientos.**

A mis padres por apoyarme de manera incondicional en todo momento y porque gracias a ellos he cumplido una meta más en la vida.

A mis hermanos y sobrinos por estar siempre presentes durante los momentos importantes.

A Lizbeth por su cariño, apoyo y paciencia, por acompañarme durante toda esta larga etapa de formación académica (y no académica) y por comenzar conmigo una nueva etapa permanente.

Al Dr. Cerbón que me ha apoyado desde que lo conozco, por sus enseñanzas que nunca terminan, por compartirme el gusto por la ciencia y por la fortuna de que seamos colaboradores.

A los Doctores Ángel Zarain y Juan Miranda que, además de enriquecer este trabajo con sus acertadas observaciones y correcciones, hicieron de los tutorales un momento ameno y de alto nivel científico.

Al Dr. Camacho por su apoyo, observaciones, correcciones y por el aprendizaje adquirido con cada trabajo.

A Guillermo y Miguel (CRG) por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por sus enseñanzas y por todo el apoyo para realizar la estancia (y curso).

A los miembros del jurado del examen de grado por su tiempo y valiosos comentarios para enriquecer el trabajo.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de estos estudios.

A Leticia García y la maestra Norma Trejo, después de un largo tiempo, por el seguimiento y asesoría con los trámites del posgrado.

A todos los amigos y colaboradores de la Facultad de Química, del Hospital Infantil de México, del laboratorio 206, del INPer, del CRG, de la preparatoria y todos los demás que han hecho esta etapa mucho más agradable.



## V. Resumen.

El Receptor a Progesterona (PR) pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y participa en la regulación de múltiples procesos relacionados y no relacionados con la reproducción. A partir del gen que codifica para el PR se presentan dos isoformas principales (PR-A y PR-B), cuya expresión génica se regula a partir de promotores específicos y su transcripción se lleva a cabo a partir de sitios de inicio de la transcripción alternativos. A pesar de que la regulación por estrógenos de ambas isoformas ha sido ampliamente descrita en el hipotálamo de roedores adultos, actualmente se desconoce dicha regulación en células hipotalámicas embrionarias, así como la participación de factores de transcripción y marcas epigenéticas que están involucrados.

El objetivo del presente trabajo consistió en establecer la participación de los factores de transcripción y mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de la expresión de las isoformas del gen *PR* en una línea celular embrionaria de hipotálamo de ratón (mHypoE-N42) mediante tratamientos con estradiol.

Los resultados mostraron que la expresión de la isoforma *PR-B* se indujo de forma transitoria a las 6 horas del tratamiento con estradiol, de una forma dependiente del Receptor de Estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Dicha inducción se asoció al incremento en la fosforilación del ER $\alpha$  en la serina 118 y al reclutamiento del ER $\alpha$  en el promotor de la isoforma *PR-B*. Posteriormente, se observó una disminución en la expresión de la isoforma *PR-B* a las 12 h del tratamiento con estradiol, la cual fue asociada a una disminución en el posicionamiento del factor de transcripción Sp1 y de la RNA polimerasa II en el promotor respectivo, así como a un menor enriquecimiento de la histona H3K4me3 en dicha región sin detectar cambios en la metilación o hidroximetilación del DNA. Por otra parte, no se encontraron cambios en la expresión de la isoforma *PR-A* dependientes de estradiol que pudieran estar relacionados con los factores de transcripción o marcas epigenéticas evaluadas en este estudio. El presente trabajo demuestra que en células hipotalámicas embrionarias existe una regulación diferencial de las isoformas del *PR* mediada por estradiol, y que la inducción de la isoforma *PR-B* está asociada a la interacción de factores de transcripción y cambios epigenéticos en su promotor respectivo.

## VI. Antecedentes.

### 6.1. Receptor a Progesterona

La progesterona participa en la regulación de múltiples funciones en el cerebro relacionadas con la reproducción, tal como la conducta sexual y la ovulación (Camacho-Arroyo et al. 1996). Muchos de las acciones mediadas por la progesterona dependen de la interacción con su receptor nuclear específico (Pgr, Uniprot: Q00175), el cual pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (O'Malley et al. 1970). De acuerdo a la nomenclatura internacional de genes para roedores y humanos (MGNC y HGNC, respectivamente), el receptor a progesterona (proteína) se identifica con las siglas Pgr (roedores). Por otro lado, la mayoría de los reportes en la literatura lo identifican de acuerdo a sus siglas en inglés en mayúsculas (PR), por lo que en el presente trabajo se referirá al receptor a progesterona de esta forma para evitar confusión. De igual forma, en el caso del receptor de estrógenos alfa (Esr1, Uniprot: P19785), se referirá a éste de acuerdo a sus siglas en inglés (ER $\alpha$ ), tal como con el receptor de estrógenos beta (ER $\beta$ , Esr2, Uniprot: O08537). Por otro lado, se seguirá la nomenclatura internacional para las demás proteínas y/o genes que se refieran en el presente trabajo. En el caso de los genes, de acuerdo a la nomenclatura internacional los genes se escribirán con cursivas y las proteínas sin cursivas.

El PR contiene diferentes dominios (Fig. 1a), dentro de los cuales se encuentran: el dominio amino terminal (NTD) que contiene a la función activadora 1 (AF1), el dominio de unión a DNA (DBD) seguido por la región bisagra (h) y el dominio de unión a ligando que contiene a la AF2 (ver Fig. 1a). El mecanismo clásico mediante el cual el PR activa la transcripción de sus genes blanco es el siguiente: en ausencia de ligando el PR se mantiene asociado con moléculas chaperonas como las proteínas de choque térmico 70/90 (complejo Hsp70/90); una vez que el PR interacciona con su ligando se induce un cambio conformacional que promueve su fosforilación, lo que a su vez provoca la disociación del complejo con

proteínas chaperonas, la dimerización y translocación al núcleo; posteriormente el receptor activado se une a los elementos de respuesta a progesterona (PRE) localizados en sus genes blanco, para después reclutar a los correguladores necesarios para inducir la transcripción (Fig. 2) (Jacobsen & Horwitz 2012; Helsén & Claessens 2014; Ceballos-Chávez et al. 2015; Lange et al. 2000; Villamar-Cruz et al. 2006).

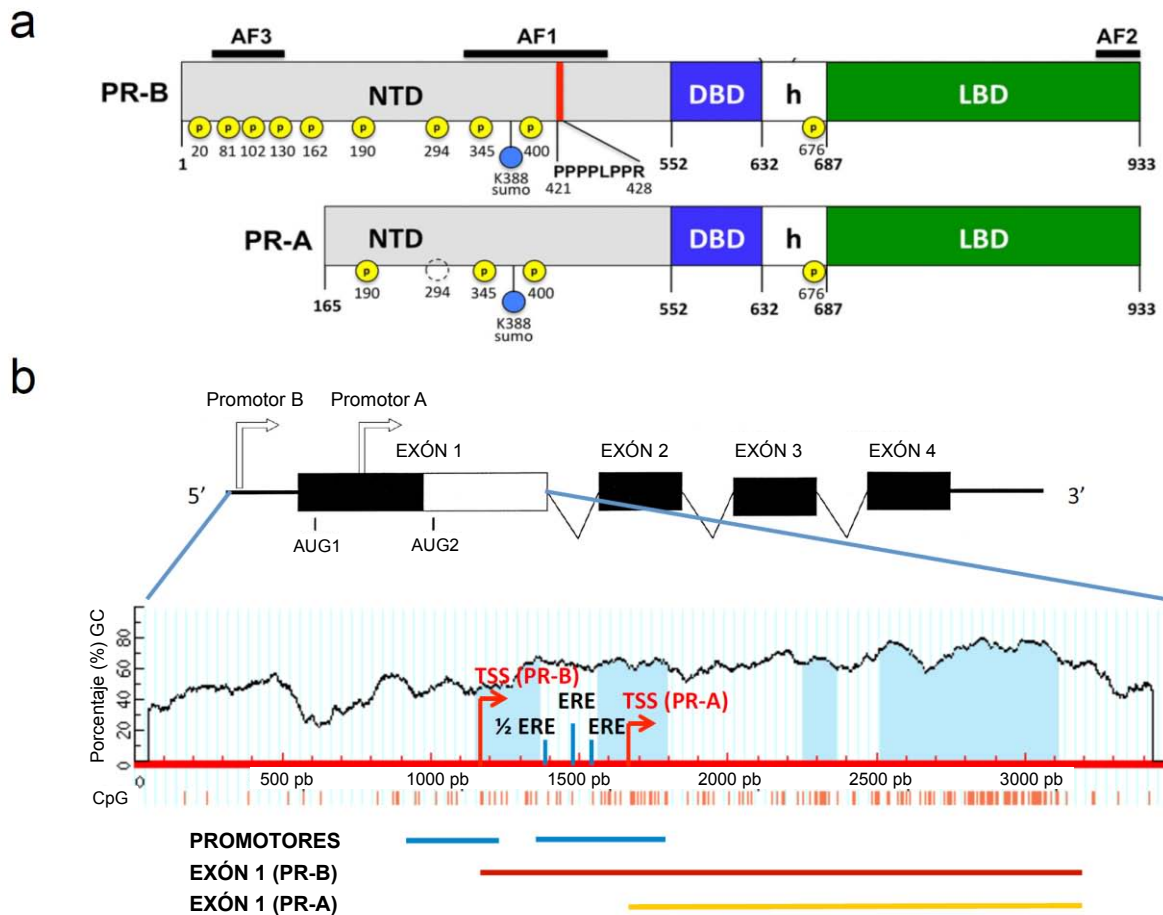


Fig. 1. Representación esquemática de las isoformas del Receptor a Progesterona (PR) y del gen que las codifica. a. Dominios y regiones de las isoformas del PR. Los sitios de fosforilación se muestran en amarillo y los sitios de sumoilación en azul, la región rica en prolina se muestra en rojo. b. Representación del gen *PR* (arriba) y vista aumentada de la región 5' (abajo). Se muestran los promotores, sitios de inicio de transcripción y codones alternativos para cada isoforma. Se muestran los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y una representación gráfica de las islas CpG contenidas en la región 5' del gen *PR* (columnas azules). Modificado de (Hill et al. 2012; Sasaki et al. 2001). Gráfico de islas CpG obtenido con el programa Methprimer. AUG1, codón de inicio de la isoforma PR-B; AUG2, codón de inicio de la isoforma PR-A; ERE, elementos de respuesta a estrógenos; TSS, sitio de inicio de la transcripción.

El PR se presenta como dos isoformas (PR-A y PR-B; el PR total que incluye ambas isoformas se definirá como PR), las cuales son producto de sitios de inicio de la transcripción alternativos y de la inducción de distintos promotores dentro del mismo gen (Fig. 1b) (Kraus et al. 1993). Se ha descrito que también existen otras isoformas del PR (PR-C, PR-S, PR-T y PR-M), las cuales han sido poco exploradas y no se ha establecido de manera clara su efecto funcional (Patel et al. 2015). A nivel de proteína, la isoforma PR-B contiene 164 aminoácidos en el extremo amino terminal que no contiene la isoforma PR-A, dentro de los cuales se encuentra la AF3 (Fig. 1a). La presencia de AF3 en la isoforma PR-B está asociada al reclutamiento de correguladores específicos en los promotores de los genes regulados por dicha isoforma, y por lo tanto a diferentes efectos funcionales respecto a la isoforma PR-A (Vegeto et al. 1993). Por lo general se asume que la isoforma PR-A actúa como represor transcripcional de los genes regulados por la isoforma PR-B. Sin embargo, también se ha reportado que ambas isoformas actúan como activadores transcripcionales de diferentes genes en un mismo contexto celular (Richer et al. 2002). Por lo tanto, el efecto funcional del PR en un contexto celular en particular, es el resultado de la proporción del contenido de ambas isoformas (Camacho-Arroyo et al. 2007; Guerra-Araiza et al. 2000). La proporción PR-A/PR-B varía en todos los tejidos dependiendo de la edad, sexo, estado hormonal y ciclo estral. Nuestro grupo de trabajo y otros grupos han demostrado que en el hipotálamo de roedores existe una variación en el contenido de ambas isoformas a lo largo del ciclo estral y como resultado de tratamientos con estradiol y progesterona, la cual ha sido asociada con la presentación de la conducta sexual. En particular, en el hipotálamo y el área preóptica de la rata hembra el estradiol induce la expresión de la isoforma PR-B en mayor proporción que la isoforma PR-A, lo cual se ha asociado al inicio de dicha conducta sexual (Camacho-Arroyo et al. 2007; Guerra-Araiza et al. 2003; White et al. 2007; Mendoza-Garcés et al. 2010; Mendoza-Garcés et al. 2013). Por lo general, la expresión de la isoforma PR-A es mayor, respecto a la expresión de la isoforma PR-B, en el hipotálamo de roedores adultos, lo cual también se ha observado en

una línea celular hipotalámica de origen embrionario (D12), en la cual la expresión de ambas isoformas es inducida por estradiol (Fitzpatrick et al. 1999).

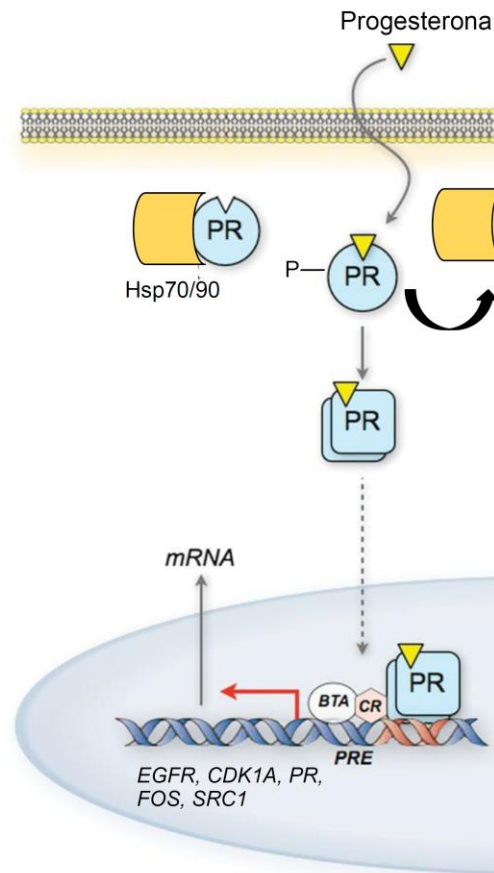


Fig. 2. Mecanismo clásico de acción del PR. La descripción del mecanismo se encuentra en el texto. Modificado de (Patel et al. 2015). Algunos de los genes blanco del PR se muestran en la parte inferior de la figura. BTA, maquinaria de transcripción basal; CR, correguladores; PRE, elementos de respuesta a progesterona.

Se ha demostrado que existe un dimorfismo sexual en cuanto a la expresión del PR en diferentes áreas del cerebro, lo cual ha sido asociado a eventos de diferenciación sexual durante el desarrollo. Los niveles más altos de contenido del PR en el cerebro se han observado en los núcleos del hipotálamo y área preóptica, los cuales están asociados a la regulación de conducta reproductiva y funciones neuroendócrinas en roedores (Quadros et al. 2007). Este dimorfismo sexual se ha atribuido principalmente a la exposición a estrógenos durante distintas etapas del desarrollo. El contenido del PR durante el desarrollo

embrionario es mayor en machos que en hembras en hipotálamo y área preóptica, lo que ha sido atribuido a los niveles altos de testosterona y la conversión de ésta en estradiol a través de la aromatasa (Quadros, Pfau, et al. 2002). Hasta el momento, se desconocen los mecanismos a través de los cuales se induce la expresión del *PR* en el hipotálamo durante el desarrollo embrionario y en particular, si existe una regulación diferencial de las dos isoformas.

## 6.2. Regulación transcripcional del *PR*

Los estrógenos son los principales reguladores de la expresión del *PR* a través de su receptor nuclear específico (ER), además de que influyen en el balance *PR-A/PR-B* (Guerra-Araiza et al. 2003). También existe evidencia de que los mecanismos no genómicos dependientes de estrógenos participan en la inducción del *PR* (Sá et al. 2013). En particular, se ha demostrado que la inducción del *PR* mediada por estradiol (estrógeno más potente) es inhibida al administrar el antagonista del ER (ICI 182780) en células hipotalámicas D12, lo que sugiere que al menos alguna isoforma de este receptor nuclear ( $ER\alpha$  o  $ER\beta$ ) está involucrada en la regulación del *PR* (Fitzpatrick et al. 1999). Estudios más recientes confirmaron que dicha regulación es mediada por el  $ER\alpha$  en el núcleo ventromedial del hipotálamo, región indispensable para el control de la conducta sexual (Sá et al. 2013). Además, existe una correlación entre el incremento máximo en los niveles de expresión de la isoforma *PR-B* y los niveles más altos de estradiol y  $ER\alpha$  en el hipotálamo de ratas en proestro (Guerra-Araiza et al. 2000), previo al inicio de la conducta sexual. Por otra parte, se ha demostrado que el  $ER\beta$  regula la localización del *PR* en el núcleo ventromedial del hipotálamo (Sá et al. 2015).

Resulta interesante que la isoforma *PR-B* no contiene en su promotor elementos de respuesta a estrógenos (ERE) a través de los cuales se une directamente el  $ER\alpha$  en sus promotores blanco (Kastner et al. 1990). Sin embargo, se ha reportado que el  $ER\alpha$  unido a su ligando es reclutado en el promotor del gen *PR* a

través de la interacción con los factores de transcripción Proteína Específica 1 (SP1) y Proteína Activadora 1 (AP1) en células MCF7 de cáncer de mama (Petz et al. 2002; Petz et al. 2004). A diferencia del ER $\alpha$ , el factor de transcripción SP1 permanece unido al promotor del gen de PR independientemente de la presencia de estrógenos. Una vez que el ER $\alpha$  se encuentra en el promotor de sus genes blanco, recluta una serie de correguladores que son específicos de acuerdo al gen, región reguladora, tiempo y contexto celular, para inducir cambios en la cromatina para activar la transcripción (Won Jeong et al. 2012). Recientemente se ha reportado que el ER $\alpha$  también se une a regiones reguladoras distales del gen *PR* en el núcleo ventromedial del hipotálamo (Gagnidze et al. 2013). A pesar de que la regulación transcripcional del *PR* ha sido ampliamente estudiada en modelos de cáncer de mama, actualmente existen pocos trabajos que describan los mecanismos de regulación transcripcional del *PR* en el hipotálamo, particularmente en células de tipo embrionario.

A pesar de que ambas isoformas del *PR* se expresan en el hipotálamo mediobasal (en el cual se encuentra el núcleo ventromedial), se ha demostrado que únicamente la isoforma *PR-B* se induce durante la tarde del proestro, para posteriormente disminuir su expresión durante la tarde del mismo, lo cual a su vez correlaciona con los niveles de estradiol y progesterona (Liu & Arbogast 2009; Mendoza-Garcés et al. 2013). Al contrario que el estradiol, la progesterona regula negativamente la expresión del gen *PR*, lo cual se ha confirmado en distintos estudios. En particular, se ha demostrado que el estradiol induce la expresión de ambas isoformas del *PR* y que la progesterona disminuye su expresión en el hipotálamo de ratas ovariectomizadas (Szabo et al. 2000; Camacho-Arroyo et al. 1998; Guerra-Araiza et al. 2002). Resulta interesante que en estos estudios los cambios inducidos por estradiol y progesterona son más acentuados para la isoforma *PR-B*, lo que sugiere que dicha isoforma es más sensible a la regulación hormonal que la isoforma *PR-A* en el hipotálamo. Dicha regulación de la isoforma *PR-B* mediada por estradiol y progesterona en el hipotálamo de ratas ovariectomizadas no se ha observado en individuos machos gonadectomizados, lo

que sugiere un papel funcional diferencial de dicha isoforma en las ratas hembras (Scott et al. 2002). Se ha reportado que tratamientos con estradiol inducen la expresión de la isoforma *PR-B* en el área preóptica de ratas ovariectomizadas (otra región indispensable para la regulación de la conducta sexual en roedores) y por el contrario tratamientos con progesterona disminuyen su expresión en dicha región, sin observar cambios en la expresión de la isoforma *PR-A* (Camacho-Arroyo et al. 1998).

Contrario a lo reportado en el hipotálamo de roedores adultos, existen pocos trabajos en los que se haya estudiado la expresión de las isoformas del gen *PR* durante el desarrollo. Al igual que en adultos, existe un dimorfismo sexual en la expresión del *PR* en el cerebro de roedores (Wagner 2008). En particular, la expresión del *PR* es indispensable para la diferenciación sexual del cerebro en machos, ya que éstos expresan mayores niveles del *PR* respecto a las hembras en diferentes regiones del cerebro desde el día embrionario 17 hasta el día posnatal 28 (Quadros et al. 2007; Quadros & Wagner 2008). En particular, el área preóptica es una región dimórfica y sensible a la regulación por estradiol en machos, así como indispensable para la diferenciación sexual y programación de la conducta sexual masculina en roedores (Lenz et al. 2012). Estudios realizados por el grupo del Dr. Cerbón, demostraron que la desfeminización de ratas hembras mediante tratamientos con estradiol y testosterona, estaba asociado a un aumento en la expresión del *PR* en hipotálamo y área preóptica (Arrieta et al. 2003). Lo anterior confirma que la regulación de la expresión del *PR* en machos durante el desarrollo es mediada por el estradiol, el cual se obtiene principalmente a través de la aromatización de la testosterona que es secretada en altas concentraciones por los testículos (Quadros, Goldstein, et al. 2002). La participación del *PR* durante la diferenciación sexual de los machos fue confirmada mediante tratamientos con el antagonista específico del *PR* (RU486) durante la etapa crítica de diferenciación sexual del cerebro, en los cuales se observó que la conducta sexual de los machos adultos tratados fue alterada (Lonstein et al. 2001). A pesar de la importancia de la regulación del *PR* durante el periodo crítico de diferenciación



sexual en roedores, actualmente no existen trabajos en los que se haya estudiado la regulación diferencial de la expresión de las isoformas del gen *PR* durante el desarrollo embrionario, así como tampoco los mecanismos moleculares a través de los cuales se lleva a cabo dicha regulación.

### **6.3. Regulación epigenética del *PR***

La definición clásica de epigenética consiste en el estudio de los cambios heredables en la función de los genes que no son resultado de modificaciones en la secuencia del DNA (Dupont et al. 2009). Sin embargo, se ha considerado que esta definición es limitada debido a los mecanismos moleculares que se han descubierto en los últimos años (Felsenfeld 2014). La regulación epigenética de la expresión génica involucra la modificación post-traducciona de las histonas, la metilación del DNA, interacciones distales, entre otras. Resulta interesante que las dos primeras marcas epigenéticas han sido muy estudiadas en diversos procesos patológicos (como el cáncer) como posibles blancos terapéuticos, por ser potencialmente reversibles (Biçaku et al. 2008; Hansberg-Pastor et al. 2013; Ren et al. 2007; Walton et al. 2008).

#### **6.3.1. Modificaciones post-traduccionales de histonas**

La cromatina es un complejo de DNA, histonas y proteínas tipo no histonas que se encuentra en el núcleo de las células. El nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina, el cual está compuesto por cuatro dímeros de cada histona (H2A, H2B, H3 y H4), las cuales se encuentran envueltas en aproximadamente 165 pb de DNA (Felsenfeld & Groudine 2003; Correll et al. 2012). Dichos nucleosomas se encuentran conectados entre sí por la histona H1 y el DNA de unión. Los extremos amino terminales de las histonas se denominan “colas de histonas”, las cuales son sujetas a modificaciones post-traduccionales tales como acetilación, metilación, fosforilación, entre otras (Rothbart & Strahl 2014). En general, el efecto de cada modificación de histona sobre la transcripción depende del residuo que sea

modificado, del tipo de modificación y de las modificaciones que existan en el mismo u otros residuos, así como en la misma y/o diferente histona (Kouzarides 2007) (Fig. 3).

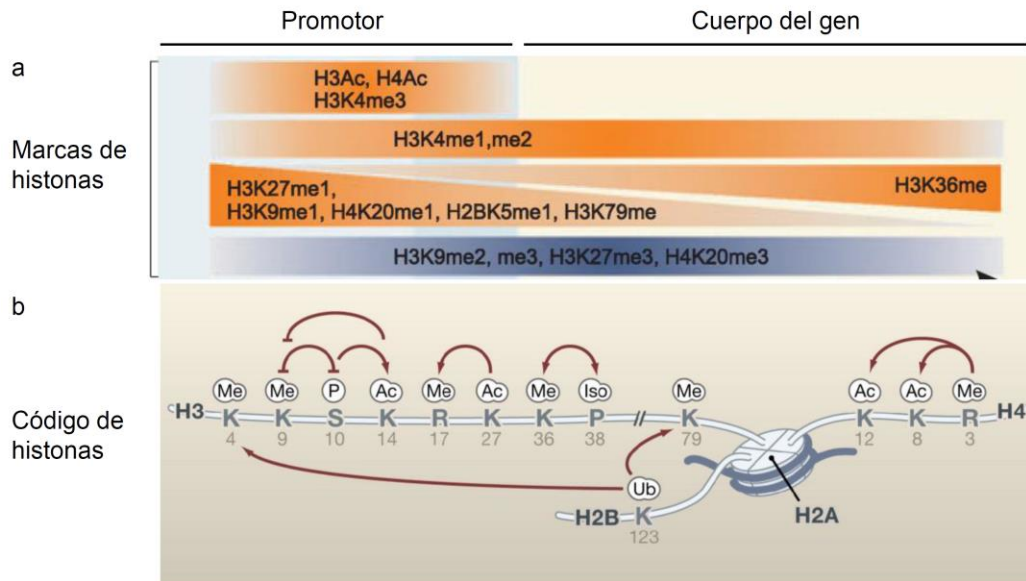


Fig. 3. Distribución de las modificaciones post-traduccionales de histonas en un gen y el efecto de cada modificación sobre otra. a. Distribución de las marcas de histonas (metilación y acetilación) en el promotor (lado izquierdo) y cuerpo del gen (lado derecho). Las marcas de histonas relacionadas con transcripción activa están marcadas en color naranja y las marcas de histonas relacionadas con represión transcripcional están marcadas en color azul. b. Efecto de algunas modificaciones post-traduccionales de histonas sobre otras. Los efectos positivos (que favorecen una modificación en particular o su efecto funcional) están señalados con una flecha y los efectos negativos (que inhiben una modificación en particular o su efecto funcional) con una línea horizontal. Modificado de (Wiench et al. 2011; Kouzarides 2007).

La acetilación de histonas es una marca típica de cromatina transcripcionalmente activa, ya que neutraliza la carga positiva de los residuos de lisina (que a su vez interactúan con el DNA por su carga negativa) reduciendo el nivel de compactación de la cromatina, además de que dicha modificación es reconocida por factores de transcripción (a través de un bromodominio) que promueven la transcripción (Sanchez & Zhou 2009; Kouzarides 2007). La acetilación de histonas es catalizada por acetil transferasas de histonas (HATs) y su remoción por desacetilasas de histonas (HDACs) (Lander et al. 2001; Oñate et al. 1995). Por otra parte, el efecto de la metilación de histonas en la transcripción depende del residuo que sea modificado, el cual es reconocido de manera específica por

proteínas o complejos proteicos que ejercerán un efecto sobre la transcripción (Taverna et al. 2007). En particular, en las regiones promotoras la metilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me) está asociada con activación transcripcional debido a que recluta proteínas que promueven la transcripción, tal como la subunidad TAF3 de la maquinaria de transcripción basal (TFIID) que reconoce a la H3K4me3 a través de un homeodominio (Musselman et al. 2012). Por otro lado, la metilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me) está asociada con represión transcripcional ya que es reconocida por proteínas que promueven la formación de heterocromatina como la proteína HP1 a través de un cromodominio que reconoce a la H3K9me3 y H3K9me2 (Benevolenskaya 2007; Klose & Zhang 2007; Barski et al. 2007; Musselman et al. 2012).

Actualmente, existen muy pocos trabajos en los que se haya estudiado la participación de las modificaciones de histonas en el promotor del gen *PR* en hipotálamo, la mayoría de los trabajos se han realizado en células de cáncer de mama, por lo que a continuación se describirán de manera breve los principales hallazgos en este modelo. En células MCF7 se ha descrito que los niveles de histonas H3 y H4 acetiladas son mayores en el promotor de *PR-A* respecto al de *PR-B* (Xu et al. 2004). En este trabajo también se estableció que el promotor de *PR-B*, a diferencia del promotor de *PR-A*, muestra un incremento en la acetilación de histonas dependiente de estrógenos. Se ha reportado que cuando se inhibe la activación transcripcional dependiente del ER $\alpha$  del gen *PR* en células de cáncer de mama, se reclutan en su promotor correpresores y desacetilasas de histonas (Leu et al. 2004). Por otra parte, en otro estudio se estableció que la expresión de *PR-B* en células de astrocitoma no es afectada por tratamientos con tricostatina A (inhibidor de desacetilasas de histonas) (Hansberg-Pastor et al. 2013). Lo anterior, sugiere que existen mecanismos distintos de regulación transcripcional para cada uno de los promotores a nivel de acetilación de histonas, que depende también del contexto celular.

Recientemente se ha reportado la participación de distintos correguladores en la regulación de la expresión génica del *PR* en la línea celular MCF7 (Won Jeong et al. 2012). Dentro de estos correguladores se encuentran metiltransferasas de histonas (KMT2A, EHMT2), coactivadores de receptores esteroideos (NCOA3) y el factor pionero para la unión del ER $\alpha$  a sus sitios blanco (FOXA1). En particular, mediante el silenciamiento con RNAs de interferencia pequeños (siRNAs) se estableció que las metiltransferasas de histonas KMT2A (que metila a la H3K4) y EHMT2 (que metila a la H3K9) participan como coactivador y correpresor, respectivamente. Además, en este estudio se observó que los diferentes correguladores se reclutaban de manera cíclica en las regiones reguladoras del gen *PR* en una forma dependiente del tiempo de exposición a estradiol, tal como se ha descrito en otros genes regulados por el ER $\alpha$  (Kangaspeska et al. 2008). Utilizando el mismo modelo, el grupo de Stratmann, et al., reportó que la desmetilasa de la histona H3K4, KDM5A, participa en la represión del *PR* (Stratmann & Haendler 2011). Por otra parte, en un modelo *in vivo* se demostró que el incremento de la histona H3K4me3 en el promotor del gen *PR* correlaciona con el incremento en la expresión de *PR-A* en miometrio durante el inicio del parto (Chai et al. 2012).

Utilizando un modelo *in vivo*, se estudiaron las modificaciones post-traduccionales de histonas que pudieran estar involucradas en la regulación transcripcional del gen *PR* en el hipotálamo ventromedial de rata con tratamientos de estradiol a tiempos cortos (Gagnidze et al. 2013). En este estudio, los niveles globales de H3Ac y H3K4me3 mostraron una leve inducción a las 6 h de tratamiento, mientras que la marca H3K9me3 mostró un comportamiento cíclico que dependía del tiempo. Además, el posicionamiento de las marcas H3Ac y H3K4me3 en cuatro regiones distintas cercanas a los promotores de *PR-A* y *PR-B* fue distinto dependiendo del tiempo de inducción y la región cerebral de estudio. Lo anterior sugiere que existe un patrón diferencial de modificaciones post-traduccionales de histonas en los promotores de ambas isoformas, el cual también está influenciado

por el tiempo de exposición al estradiol, al menos en el hipotálamo de roedores adultos.

### 6.3.2. Metilación del DNA

La metilación en la posición 5 de la citosina es una importante modificación epigenética ampliamente utilizada en mecanismos diversos como regulación transcripcional, inactivación del cromosoma X, impronta, entre otros (Siegfried & Cedar 1997). Se conoce que la incorporación y mantenimiento correcto de los patrones de metilación en los sitios CpG en el genoma son eventos esenciales durante el desarrollo, gametogénesis y diferenciación. Las metiltransferasas (DNMT) son las enzimas encargadas de mantener el patrón de metilación en el DNA, principalmente a través de la DNMT1 durante la replicación. La DNMT1 actúa únicamente sobre DNA hemimetilado, a diferencia de las metiltransferasas DNMT3A y DNMT3B cuyo sustrato puede ser DNA no metilado o hemimetilado (Ingrosso & Perna 2009).

Existen regiones en el genoma que están compuestas por al menos 60% de dinucleótidos CpG (10 veces más que el contenido promedio en el genoma) en una longitud de alrededor de 1000 pb, las cuales se definen como islas CpG (Antequera 2003). Por lo general, las islas CpG se encuentran desmetiladas y están presentes en los promotores de alrededor del 70% de los genes en el genoma humano (Saxonov et al. 2006). Se ha reportado que la hipermetilación en los promotores con una alta e intermedia densidad de islas CpG está asociada con represión transcripcional, mientras que el estado de metilación en los promotores con una baja densidad de islas CpG no afecta su estado transcripcional, el cual está mediado principalmente por modificaciones post-traduccionales de histonas (Weber et al. 2007).

Recientemente, se ha reconocido que el estado de metilación del DNA es resultado de un proceso altamente dinámico, el cual requiere la participación de

mecanismos de metilación y desmetilación activa (Gavin et al. 2013). De hecho, se ha demostrado la participación de la desmetilación activa en múltiples procesos durante el desarrollo y diferenciación (Kress et al. 2006; Shovlin et al. 2008; Niehrs 2009), aunque el mecanismo por el cual se lleva a cabo en mamíferos aún es controversial. Recientemente se ha propuesto un modelo en el cual la citosina metilada es sometida a una serie de reacciones de oxidación (catalizadas por las dioxigenasas TET) para obtener 5-carboxilcitosina, la cual es sustrato de la timina-DNA glicosilasa (TDG) para generar un sitio abásico que es reconocido y reparado por el sistema de reparación por escisión de bases (BER), el cual incorpora la citosina no metilada (He et al. 2011). La presencia del primer intermediario de las reacciones de oxidación (5-hidroximetilcitosina) en distintos tejidos ha destacado la importancia y posible participación de este mecanismo en procesos neuronales y patológicos como el cáncer (Guidotti et al. 2011; Yu et al. 2011), siendo este intermediario reconocido como la sexta base del genoma. El enriquecimiento de esta base en regiones promotoras correlaciona inversamente con el contenido de 5-metilcitosina y por lo general con la represión transcripcional (Iqbal et al. 2011). Cada vez existe mayor evidencia de que tanto la desmetilación activa del DNA como la 5-hidroximetilcitosina tienen una gran relevancia en procesos biológicos, principalmente en aquellos relacionados con el cáncer (Kroeze et al. 2015).

Tal como las modificaciones post-traduccionales de histonas, la metilación del DNA también tiene un papel indispensable en la regulación del *PR*, tal como se ha demostrado en diversos modelos patológicos de cáncer y endometriosis, en los cuales la expresión diferencial de ambas isoformas del *PR* está relacionada con el estado de metilación de sus respectivos promotores (Pathiraja et al. 2011; Hansberg-Pastor et al. 2013).

En particular, se ha reportado en carcinoma invasivo de glándula mamaria que la hipermetilación del gen *PR* está asociada a la pérdida de su expresión (Mirza et al. 2007), mientras que tratamientos con inhibidores de las DNMTs recuperan la

expresión del *PR* en líneas celulares de cáncer de mama que no expresan de manera endógena el *PR* (T47D-Y) ni el *ER* (MDA-MD-231) (Billam et al. 2010; Abdel-Hafiz & Horwitz 2015). De manera similar, en tumores cerebrales se ha reportado recientemente que tratamientos con inhibidores de las DNMTs producen un aumento en la expresión del *PR* en una línea celular derivada de astrocitoma humano grado III (U373) (Hansberg-Pastor et al. 2013). Por otra parte, este aumento de la expresión del *PR* inducido por los tratamientos con inhibidores de las DNMT no se observó en una línea celular derivada de un glioblastoma (D54), lo que sugiere que este tipo de células provenientes de un tumor más agresivo ha perdido la habilidad de regular la expresión del *PR* a través de la metilación del DNA (Hansberg-Pastor et al. 2013).

También se ha observado que, posterior al nacimiento, existen cambios dependientes de estrógenos en los patrones de metilación en el promotor del gen *PR* en el hipotálamo de roedores (Schwarz et al. 2010), así como en diferentes etapas del desarrollo embrionario (Gonzales et al. 2012). En un estudio reciente realizado por nuestro grupo de trabajo (Anexo 3), se demostró que en el hipotálamo de rata la regulación diferencial de la expresión génica de *PR-A* y *PR-B* durante la transición proestro-estro correlaciona con el estado de metilación en sus promotores respectivos (Mendoza-Garcés et al. 2013). Específicamente, se observó un incremento transitorio en la expresión de la isoforma *PR-B* durante la transición proestro-estro, mientras que la isoforma *PR-A* no mostró un cambio estadísticamente significativo en su expresión a lo largo de dicha transición. Resulta interesante que se observó un incremento en la metilación del promotor de *PR-B* a lo largo de la transición proestro-estro, mientras que el promotor de *PR-A* permanece desmetilado. Lo anterior correlaciona con la disminución de la expresión de *PR-B* a las 21:00 h del proestro, y resulta interesante que el incremento en la metilación del DNA en el promotor de *PR-B* involucra un sitio de unión al coactivador Sp1, lo cual explicaría la disminución en la expresión de dicha isoforma (Li et al. 2014). Se ha descrito que al comparar las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 (*PR+*) y C4 (*PR-*), el posicionamiento del coactivador SP1

en el promotor de *PR-B* correlaciona con la expresión de *PR-B* en células MCF7, y su ausencia con la expresión nula del *PR* en células C4 (Xu et al. 2004).

#### **6.4. Mecanismos de regulación epigenética y transcripcional mediada por receptores nucleares**

La regulación transcripcional a través de receptores nucleares es mediada por la unión de sus ligandos específicos, lo cual genera un cambio conformacional que permite el reclutamiento de distintos coactivadores y a su vez, la conversión del receptor en activador (Rosenfeld et al. 2006).

Contrario al modelo tradicional de regulación transcripcional, se ha demostrado que los receptores nucleares en ausencia de ligando reclutan complejos represores para evitar la activación constitutiva de sus genes blanco. En células MCF7, el ER $\alpha$  recluta a KDM1A (demetilasa de histonas) y a otros represores transcripcionales para asegurar la respuesta dependiente de estrógenos y evitar la expresión constitutiva de sus genes blanco en ausencia de estradiol (Garcia-Bassets et al. 2007). Este estudio también señaló que existe una participación importante de las modificaciones de histonas H3K4me2 y H3K9me2 durante este proceso, las cuales se encuentran enriquecidas de manera transitoria durante la activación transcripcional dependiente de estrógenos, lo que a su vez ha sido relacionado con la actividad de KDM1A y otras enzimas que modifican la metilación de histonas. Esto correlaciona con la observación de que la presencia de la modificación de histona H3K9me2 es necesaria para la activación transcripcional mediada por ER $\alpha$  (Perillo et al. 2008).

Este tipo de regulación transcripcional se ha observado en los receptores de la hormona tiroidea y del ácido retinoico (Privalsky 2004). Respecto a la regulación mediada por el PR, se ha demostrado que en células MCF7 el PR sin ligando recluta a un complejo represor que depende de la presencia de H3K9me3 (Vicent et al. 2013). El reclutamiento específico de correpresores y las modificaciones de



histonas particulares, dependen también del grupo de genes que son regulados (Garcia-Bassets et al. 2007).

En particular, la interacción del ER $\alpha$  unido a estradiol con el promotor de *TFF1* (gen regulado por estrógenos) en células MCF7 induce el reclutamiento de forma ordenada y cíclica de acetilasas y metilasas de histonas, así como de complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP para promover la transcripción. Esto se encuentra acoplado a la incorporación ordenada y cíclica del componente APIS de la subunidad 19S del proteasoma, desacetilasas de histonas y complejos correpresores en el mismo promotor para inhibir la transcripción, una vez que se ha llevado a cabo el ciclo transcripcional (Métivier et al. 2003).

### **6.5. Mecanismos moleculares de regulación hormonal en cultivos hipotalámicos**

El estudio de mecanismos moleculares *in vivo* a partir del hipotálamo es complejo debido a la arquitectura heterogénea de esta región neuroendócrina, así como a la gran variabilidad entre individuos y material de trabajo obtenido para técnicas moleculares. Para solucionar este problema, se han obtenido líneas celulares hipotalámicas inmortalizadas, cuyas clonas han sido clasificadas de acuerdo a los péptidos que expresan de forma estable, permitiendo el estudio de mecanismos diversos a nivel molecular (Dalvi et al. 2011). Por lo tanto, en el presente trabajo se tomará ventaja del comportamiento similar en roedores en cuanto a respuesta sexual y regulación del *PR* en hipotálamo, y se trabajará con cultivos hipotalámicos de ratón (Belsham et al. 2004).

Se ha demostrado que tratamientos con estradiol y progesterona influyen en la expresión del gen que codifica para la aromatasa (*Cyp19a1*) en la línea celular embrionaria mHypoE-N42 (Yilmaz et al. 2011). La regulación de la expresión del gen de la aromatasa está relacionada con la diferenciación y conducta sexual en roedores, al igual que las isoformas del gen de PR. Modelos en ratones Knock-Out

para el gen *Cyp19a1* han demostrado que las hembras homocigotas muestran una conducta sexual alterada respecto a hembras silvestres (Bakker et al. 2002). Al igual que con el PR, tratamientos con estradiol inducen la expresión del gen de la aromatasa, mientras que tratamientos con progesterona inhiben su expresión (Yilmaz et al. 2011; Yilmaz et al. 2009). Además, la línea celular mHypoE-N42 expresa a nivel de proteína y mensajero al PR y al ER $\alpha$ . Por lo tanto, esta línea celular constituye un posible modelo adecuado para estudiar los mecanismos moleculares de regulación de la expresión de las isoformas del gen *PR*.

## VII. Aportación del proyecto

Este proyecto permitirá establecer el mecanismo molecular mediante el cual se regula la expresión de las isoformas A y B del gen *PR* en la línea celular hipotalámica embrionaria mHypoE-N42 mediante tratamientos con estradiol.

Se trata de un modelo *in vitro* en el cual se determinará la posible participación de ciclos de activación/represión transcripcional en los promotores del gen *PR*.

## VIII. Hipótesis.

La expresión diferencial de las isoformas *PR-A* y *PR-B* en células mHypoE-N42 correlaciona con cambios en el enriquecimiento de las marcas de histona H3K9ac, H3K4me3 y H3K9me2, el estado de metilación del DNA y el reclutamiento de los factores de transcripción ER $\alpha$  y Sp1, los cuales ocurren de manera cíclica y específica en los promotores A y B del gen *PR*.

## IX. Objetivo

Establecer la participación de las modificaciones post-traduccionales de histonas H3K9ac, H3K4me3 y H3K9me2, la metilación del DNA y los factores de transcripción ER $\alpha$  y Sp1 en la regulación de la expresión genética mediada por estradiol de las isoformas del gen *PR* en la línea celular hipotalámica mHypoE-N42.

## **X. Metodología**

### **10.1. Cultivo celular**

Las células mHypoE-N42 de hipotálamo de ratón se obtuvieron con la compañía Cellutions Biosystems (Toronto, Canadá). Estas células son derivadas de cultivos primarios de hipotálamo de ratón (días 15, 17 y 18 de gestación), las cuales fueron inmortalizadas y aisladas por diluciones seriales hasta obtener una serie de clonas distintas. Las células se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa (Life Technologies, California, EUA) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina (Life Technologies, California, EUA). Las células se utilizaron en los pases 24 a 26 para los experimentos.

### **10.2. Tratamientos**

Previo a los tratamientos,  $2 \times 10^6$  células se mantuvieron en medio DMEM sin rojo de fenol (Life Technologies, California, EUA) y suero libre de hormonas hasta que mostraron una confluencia entre el 80-90%. Posteriormente las células se incubaron en medio DMEM sin rojo de fenol y sin suero durante toda la noche. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de estradiol (Sigma, Missouri, EUA) ó 0.002% de etanol (vehículo) durante 6 y 12 h. Para confirmar que la regulación de la expresión génica por estradiol era mediada por el ER $\alpha$  y no por otras isoformas, se evaluó el efecto de un antagonista altamente selectivo para el ER $\alpha$ , el dihidrocloruro de 1,3-Bis (4-hidroxifenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletoksi)fenol]-1H-pirazol (MPP, Tocris Bioscience, Bristol, UK). Se realizaron tratamientos solo con MPP (5 nM) o en combinación con 100 nM de estradiol. Finalmente, se hicieron tratamientos con progesterona (Sigma, Missouri, EUA) y progesterona con estradiol (ambos a 100 nM) durante 6 horas.

### 10.3. Extracción de RNA y PCR en tiempo real

El RNA total se aisló mediante el método de un solo paso basado en la extracción con isotiocianato/fenol/cloroformo utilizando el reactivo TRIzol (Life Technologies, California, EUA). La concentración del RNA extraído se determinó por fluorometría mediante el kit de cuantificación Quant-It RiboGreen (Life Technologies, California, EUA) y su integridad fue evaluada por electroforesis desnaturizante al 1% de agarosa. Se utilizaron 2 µg de RNA total para la obtención de cDNA de cadena sencilla por retrotranscripción mediante el kit SuperScript III First Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies, California, EUA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Posteriormente 5 µL del producto de la reacción anterior (equivalente a 100 ng) se sometieron a PCR por tiempo real en el equipo 7500 de Applied Biosystems (Life Technologies, California, EUA) para obtener la cuantificación relativa del transcrito correspondiente a cada una de las isoformas del gen *PR* (*PR-B* y *PR-A+PR-B*) por el método de Ct comparativo, utilizando para normalizar el transcrito correspondiente al gen *Gapdh* (ensayo: Mm99999915\_g1) y como sistema de detección las sondas TAQMAN (Life Technologies, California, EUA). Todos los productos de PCR fueron estudiados y analizados juntos durante los experimentos. Los niveles de expresión de la isoforma *PR-A* se obtuvieron al restar los niveles obtenidos del *PR* total (*PR-A+PR-B*) menos los niveles obtenidos de la isoforma *PR-B*. Todas las reacciones de PCR generaron un solo producto de PCR en el peso molecular esperado, confirmado mediante un gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (Biotium, EUA) y mediante una curva de desnaturización en el caso de los productos analizados por SYBR GREEN. Los oligonucleótidos y las condiciones que fueron empleadas para las reacciones de PCR se muestran en las tablas 1, 2 y 3. A partir de este punto, en los resultados y figuras se mencionará primero a la isoforma *PR-B* y después a la isoforma *PR-A*, ya que la isoforma *PR-B* corresponde al transcrito más grande y por lo tanto a la isoforma más grande a nivel de proteína (se encuentra en la parte superior del blot), así como su promotor se encuentra río arriba del promotor de la isoforma *PR-A*.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis por PCR en tiempo real.

Blanco	Secuencia (5'-3')	Detección	Aplicación
<i>PR-B</i>	Forward-CAGCACCGGCCACACCAGTT Reverse-CCAAGCGTGCAAGCAAGGGG Probe- ACACGTCTGGCGCTTCGCCCTCCCC	TaqMan	Expresión génica
<i>PR total</i>	Forward-ATTCTACTCGCTGTGCCTTACC Reverse-CATGGGTACCTGGAGTTTGA Probe- ATGTGGCAAATCCC	TaqMan	Expresión génica
<i>Src1</i>	Forward-TGCAGCCTTTTCATCATGGGA Reverse- GTTGTGTTGGATGGTGGCA	SYBR GREEN	Expresión génica
<i>Fos</i>	Forward-CAGCACCGGCCACACCAGTT Reverse-CCAAGCGTGCAAGCAAGGGG	SYBR GREEN	Expresión génica
<i>Gapdh</i>	Forward-GTCAAGGCCGAGAATGGGAA Reverse-GAAGGGGCGGAGATGATGAC	SYBR GREEN	Expresión génica
Promotor de <i>PR-B</i>	Forward-GGTGGGGCTGGCATGCTTCT Reverse-ACTCCCGCTATCTCCGGACTTCT Probe-TGGGCGGGCCTTCCTAGAGCGCCA	TaqMan	ChIP
Promotor de <i>PR-A</i>	Forward-CAGCACCGGCCACACCAGTT Reverse-CCAAGCGTGCAAGCAAGGGG Probe-ACACGTCTGGCGCTTCGCCCTCCCC	TaqMan	ChIP

Tabla 2. Condiciones generales para la PCR en tiempo real.

Reactivos	Concentración final
Master Mix (2X)	1 X
Sonda (20X) [sólo para ensayos TaqMan]	1X
DNA	5.0 µL (100 ng)
Agua	c.b.p. 20 µL

Tabla 3. Condiciones generales para los ciclos de amplificación.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	50	2 min.
2	95	10 min.
3	95	30 s.
4	60	1 min.
Repetir 2-4 por 40 ciclos		

#### 10.4. Extracción de proteínas y caracterización por Western Blot

Las células se homogeneizaron en buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.25% Desoxicolato de sodio) con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche, Basel, Suiza) para obtener proteínas totales centrifugando durante 30 minutos a 12500 rpm a 4°C. Las proteínas obtenidas se cuantificaron por el método de Bradford, utilizando una curva patrón con diferentes concentraciones de albúmina. Posteriormente 40 µg de proteína se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 7.5% a 95 V. La transferencia se llevó a cabo en una membrana de PVDF (Millipore, Massachusetts, EUA) utilizando una cámara semihúmeda (BioRad, California, EUA). La membrana se bloqueó durante 30 minutos a temperatura ambiente con 10% de leche en polvo baja en grasa y Tween al 0.1% en TBS. Se incubó toda la noche a 4°C con los anticuerpos para detectar al PR, la fosforilación del ER $\alpha$  en la serina 118 y Sp1 (Santa Cruz, Texas, EUA). Posteriormente se incubó durante una hora a temperatura ambiente el anticuerpo secundario acoplado a una peroxidasa de rábano y se reveló por quimioluminiscencia mediante el kit ECL (Amersham, Piscataway, EUA). Después las membranas fueron sometidas al “stripping” para remover los anticuerpos unidos con glicina ácida (25 mM, pH 2.5; 1% SDS) a temperatura ambiente durante 30 minutos, para ser incubadas con los anticuerpos para detectar al ER $\alpha$  y Gapdh (Santa Cruz, Texas, EUA) como control de carga en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Finalmente se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas mediante el software UVP Imaging System (UVP, EUA).

#### 10.5. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Las células se incubaron con formaldehído a una concentración final de 1% durante 10 min a temperatura ambiente en agitación suave. Posteriormente se detuvo la reacción de entrecruzamiento adicionando glicina a una concentración final de 0.125 M y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente en agitación

suave. Las células se lavaron con PBS frío (adicionado con PMSF 1mM), se rasparon y transfirieron a un tubo de 1.5 mL, se centrifugaron a 1000 RPM durante 3 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió el botón en 1 mL de Buffer de lisis (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8) con inhibidores de proteasas (Roche, Basel, Suiza).

Posteriormente se realizó la sonicación de la cromatina en un equipo SONICS Vibra Cell (Sonics, Connecticut, EUA) con las siguientes condiciones: 75% de amplitud, 10 segundos encendido y 60 segundos apagado, durante 6 pulsos. Se obtuvieron fragmentos de DNA con un tamaño modal de 1000 pb, el cual fue confirmado en un gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (Biotium, EUA). Se diluyeron (1:10) 25 µg de cromatina con buffer de dilución adicionado con inhibidores de proteasas. Se preclareó la cromatina con proteína A/G agarosa (Santa Cruz, Texas, EUA), colocando en agitación durante 1 hora a 4°C. Se colectó la proteína A/G centrifugando a 3000 RPM durante 1min a 4°C y se tomó 10% del sobrenadante (input) y el resto se incubó con 2-5 µg de anticuerpos para inmunoprecipitar a H3K9ac, H3K4me3, H3K9me2 y RNA Pol II (Abcam, Cambridge, Reino Unido), ERα y Sp1 (Santa Cruz, Texas, EUA) e IgG de conejo como control negativo (Santa Cruz, Texas, EUA) en agitación durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se agregaron 20 µL de proteína A/G y se incubó 1 h a 4°C en agitación. Se colectaron los complejos (anticuerpo/antígeno/DNA) centrifugando a 3000 RPM durante 1 min a 4°C y se lavaron con buffer bajo en sales, alto en sales y con cloruro de litio. Finalmente se lavaron los complejos con buffer TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). Los complejos se eluyeron al adicionar buffer de elución (SDS 1%, NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M) e incubar durante 15 min a temperatura ambiente. Se incubó con RNAsa (Promega, Wisconsin, EUA) durante 30 minutos a 37°C, para después hacer el desentrecruzamiento con proteinasa K (Roche, Basel, Suiza) durante toda la noche a 55°C y posteriormente con NaCl 5 M durante 6 h a 65°C. Se purificó el DNA mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, EUA). Los productos purificados se amplificaron por PCR en tiempo real en el equipo 7500 de Applied Biosystems (Life Technologies, California, EUA) para obtener el enriquecimiento de cada



muestra inmunoprecipitada utilizando como sistema de detección las sondas TAQMAN (Life Technologies, California, EUA). Cada ensayo TAQMAN se diseñó utilizando el software Primer3 para amplificar las regiones promotoras de cada isoforma del *PR* de acuerdo a estudios previos y bases de datos (Kraus et al. 1993; Kastner et al. 1990; Hagihara et al. 1994; Kent et al. 2002) (Fig. 4). La normalización se realizó utilizando la muestra input. Todas las reacciones de PCR generaron un solo producto de PCR en el peso molecular esperado, confirmado mediante un gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (Biotium, EUA), además de obtener un gráfico de PCR en tiempo real típico de la ChIP (Fig. 5). Los oligonucleótidos y las condiciones que fueron empleadas para las reacciones se muestran en las tablas 1, 4 y 5.

Tabla 4. Condiciones generales para la PCR en tiempo real.

Reactivos	Concentración final
Universal Master Mix (2X)	1 X
Sonda (20X)	1X
DNA	1.0 $\mu$ L
Agua	c.b.p. 20 $\mu$ L

Tabla 5. Condiciones generales para los ciclos de amplificación.

Paso	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
1	50	2 min.
2	95	10 min.
3	95	30 s.
4	64	3 min.
Repetir 2-4 por 50 ciclos		

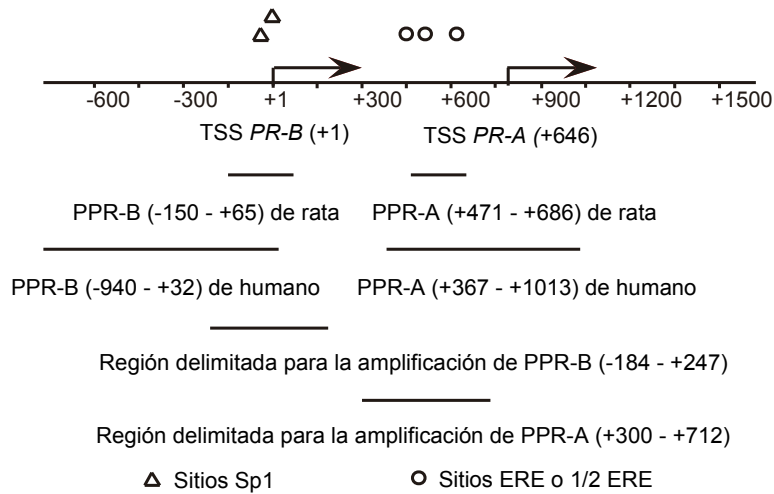
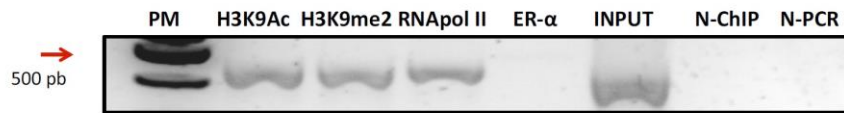
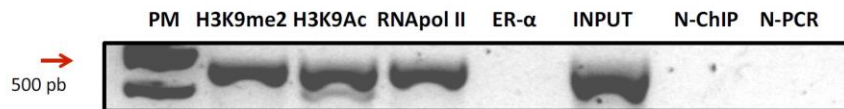


Fig. 4. Representación esquemática de los promotores del gen *PR* en *Mus musculus*. Se muestran las regiones promotoras y las regiones delimitadas por los primers del presente estudio. TSS, sitio de inicio de la transcripción; PPR-B, promotor de la isoforma B del *PR*; PPR-A, promotor de la isoforma A del *PR*; ERE, elemento de respuesta a estrógenos. Los sitios de unión a Sp1 están representados por triángulos, mientras que los ERE o medios ERE están representados por círculos.

a PPR-A



b PPR-B



c

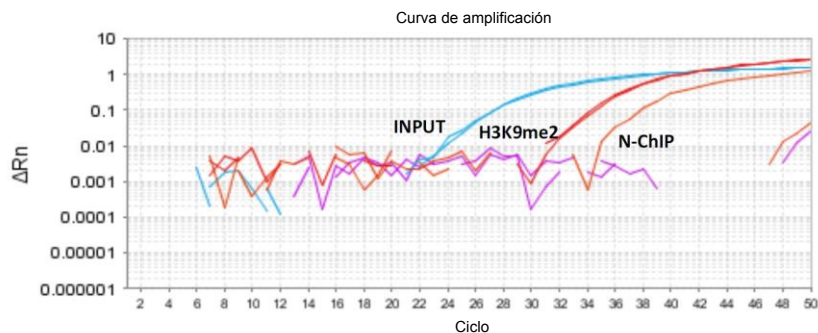


Fig. 5. Productos de amplificación obtenidos posterior a la técnica de ChIP. A) Se muestran los productos de amplificación por PCR en punto final en condiciones basales (sin hormona) y B) las curvas de amplificación obtenidas por el equipo de PCR en tiempo real del PPR-B posterior a la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-H3K9me2.

## 10.6. Inmunoprecipitación de DNA metilado e hidroximetilado (meDIP y hmeDIP).

La detección del DNA modificado ya sea, metilado o hidroximetilado, se llevó a cabo mediante la técnica de inmunoprecipitación, con modificaciones menores de acuerdo a metodología previamente reportada (Lee et al. 2012; Nestor & Meehan 2014). Se aisló DNA genómico de las células mHypoE-N42 mediante el kit Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega, Wisconsin, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se sonicaron 15 µg de DNA genómico mediante el equipo SONICS Vibra Cell a 40% de amplitud, 10 segundos encendido y 60 segundos apagado, durante 6 pulsos para obtener fragmentos de DNA con un tamaño modal de 1000 pb, el cual fue confirmado mediante un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Se diluyeron 2.5 µg de DNA sonificado con buffer TE, se desnaturalizó a 100°C durante 10 minutos y se incubó durante 5 minutos en hielo. En esta parte se tomó el 10% para el input. Posteriormente se agregó el buffer de inmunoprecipitación (10 mM fosfato de sodio, 140 mM NaCl, 0.05% Triton X-100) y se incubó con 1 µg de anticuerpo para 5mC o 5hmC (Zymo, California, EUA) con agitación oscilatoria a 4°C durante toda la noche. Se agregaron 20 µL de proteína A/G y se incubó durante 1 h a 4°C en agitación. Se colectaron y lavaron los complejos (anticuerpo/DNA) mediante la misma forma que para la ChIP. La elución se llevó a cabo mediante el buffer de elución para meDIP (SDS 0.5%, Tris-HCl 50 mM y EDTA 10 mM), se agregó 1 µL de Proteinasa K y se incubó durante toda la noche a 55°C. Posteriormente se centrifugó a 5000 RPM durante 1 min para recuperar la fracción inmunoprecipitada. Para la purificación del DNA inmunoprecipitado y la detección por PCR en tiempo real se llevó a cabo de la misma forma que en la ChIP. Para validar la especificidad de los anticuerpos utilizados que reconocen el DNA modificado y por lo tanto la inmunoprecipitación, se utilizaron los siguientes controles: para el anticuerpo que reconoce el DNA metilado se utilizaron oligonucleótidos que amplifican la región improntada *H19.1* en ratón, la cual se encuentra metilada (Lindner et al. 2014); para el anticuerpo que reconoce el DNA hidroximetilado se utilizaron oligonucleótidos que amplifican el locus 17,432,255 (pb) del cromosoma 12, el cual se encuentra hidroximetilado

en cerebro de ratón (Kinney et al. 2011). Como control exógeno para ambos anticuerpos, se utilizaron estándares que contienen citosinas metiladas, hidroximetiladas y no modificadas (D5405, Zymo, California, EUA).

#### **10.7. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software Graph Pad Prism 6 (Graph Pad, EUA). Los datos experimentales fueron representados como el promedio con desviación estándar de 3 o más réplicas independientes. En todos los casos se utilizó la prueba de ANOVA de una vía seguida por una prueba post hoc de Tukey para establecer las diferencias entre cada grupo de datos. Se consideró como diferencia estadísticamente significativa cuando la  $P < 0.05$ .

## XI. Resultados

Los resultados que se presentarán a continuación, forman parte del Anexo 1.

### 11.1. Regulación de la expresión de las isoformas del gen *PR* en células mHypoE-N42

La línea celular mHypoE-N42 fue obtenida a partir de cultivos primarios de hipotálamo de ratón (días 15, 17 y 18 de gestación), la cual constituye un modelo interesante para estudiar la regulación de las isoformas del gen *PR*, ya que durante dichas etapas del desarrollo existe una regulación diferencial del gen *PR* dependiendo del sexo y la exposición a hormonas. La respuesta a hormonas esteroides en las células mHypoE-N42, en particular por estradiol y progesterona, fue previamente demostrada por Yilmaz y colaboradores (Yilmaz et al. 2011; Yilmaz et al. 2009). Resulta interesante que dichos tratamientos hormonales modificaron la expresión del gen que codifica para la aromatasa, un gen indispensable para el desarrollo sexual del cerebro (Yilmaz et al. 2009; Yilmaz et al. 2011). Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio utilizando dicho modelo para elucidar la regulación de la expresión de las isoformas del gen *PR*.

Para establecer si existe una regulación diferencial de las isoformas del gen *PR* mediada por estrógenos en nuestro modelo de estudio, se realizaron diversos experimentos mediante tratamientos hormonales a distintos tiempos y concentraciones. En primer lugar, se realizó una curva dosis respuesta a diferentes concentraciones de estradiol durante 6 h, en la cual únicamente se observó una inducción significativa del contenido de proteína de la isoforma PR-B a la concentración de 100 nM de estradiol, respecto al vehículo (Figs. 6a y 6b). Tal como se esperaba, la isoforma predominante fue PR-A (Fig. 6a). Posteriormente, se evaluaron cuáles eran los efectos del estradiol en la expresión de las isoformas del gen *PR* a las 6 y 12 h. Los resultados mostraron que la expresión del transcrito de la isoforma *PR-B* fue inducida a las 6 h del tratamiento con estradiol, mientras que a las 12 h la expresión de *PR-B* tuvo una disminución muy marcada respecto

al vehículo y el tratamiento de 6 h (Fig. 6c). Por otra parte, durante los tratamientos con estradiol no se encontraron cambios significativos en la expresión de la isoforma *PR-A* al comparar con el vehículo. Únicamente se encontraron cambios significativos cuando se realizó la comparación entre los tratamientos de 6 y 12 h con estradiol, en los que se observó una disminución en la expresión de dicha isoforma a las 12 h.

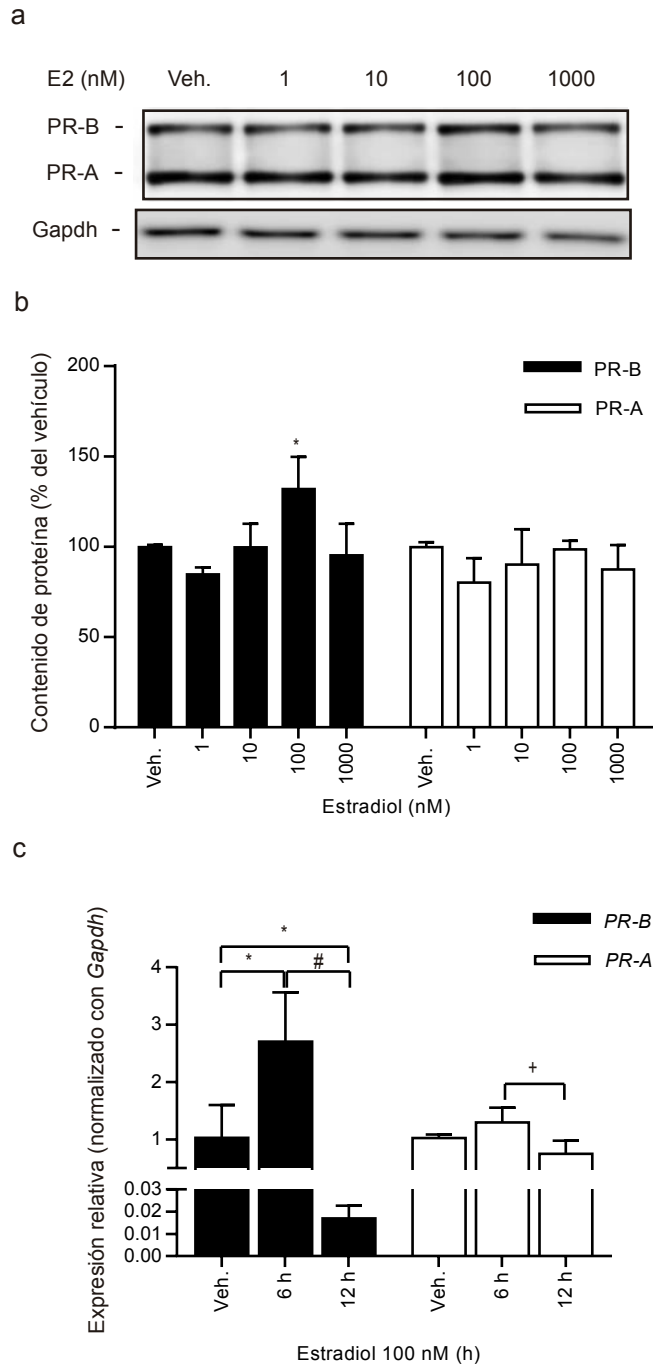


Fig. 6. El estradiol regula de manera diferencial la expresión de las isoformas del PR en la línea celular mHypoE-N42. Las células fueron tratadas de acuerdo a las especificaciones en la sección de Metodología para después extraer la proteína total o el RNA. Los resultados de la cuantificación del contenido de proteína se normalizaron con el contenido de *Gapdh* como control de carga. La expresión relativa de los transcritos PR-A o PR-B se calculó con el método  $\Delta\Delta C_t$ , normalizando con la expresión del gen de *Gapdh* como control endógeno. a) y b) Análisis por western blot del contenido de las isoformas del PR a las 6 h de tratamiento con estradiol. c) Expresión relativa del mRNA de las isoformas del gen *PR* a las 6 y 12 h de tratamiento con estradiol (100 nM) y vehículo (etanol). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con el vehículo a las 6 y 12 h (no mostrado). Los datos representan el promedio  $\pm$ DE de cuatro réplicas independientes. Veh, vehículo; E2, estradiol. \* $P < 0.05$  vs Veh.; # $P < 0.01$  vs 6 h; + $P < 0.05$  vs 6 h.

## 11.2. El estradiol regula el contenido de proteína total y fosforilada de los factores de transcripción ER $\alpha$ y Sp1

Tal como se mencionó anteriormente, los factores de transcripción ER $\alpha$  y Sp1 son dos de los principales reguladores de la expresión del gen *PR* (Camacho-Arroyo et al. 2003; Schultz et al. 2003), por lo que resulta interesante estudiar su contenido y marcas de activación o inhibición en nuestro modelo. Se evaluó el contenido proteico de ambos factores de transcripción, así como su estado de fosforilación (Fig. 7a). Contrario a lo esperado, a las 12 h del tratamiento con estradiol se observó un incremento en el contenido de ER $\alpha$  total, el cual se esperaba a las 6 h en el momento en que se induce la expresión de PR-B. Por otra parte, a las 6 h del tratamiento con estradiol se observó un incremento en el contenido de Sp1 total, mientras que a las 12 h se observó una disminución, aunque ésta no fue significativa. Para establecer si había una correlación entre los patrones de inducción de la expresión de *PR-B* y el estado funcional de ER $\alpha$  y Sp1, se estudió el estado de fosforilación de dichos factores de transcripción. En particular, para el caso del ER $\alpha$  se evaluó la fosforilación en la Ser118 que está asociada a su actividad transactivacional (Duplessis et al. 2011) y en el caso de Sp1 se evaluó la fosforilación total, ya que la hiperfosforilación de Sp1 está asociada a la pérdida del reclutamiento en sus sitios blanco (Yang et al. 2014). Respecto a la fosforilación en la Ser118 del ER $\alpha$ , se observó un incremento en los niveles de dicha modificación a las 6 h de tratamiento con estradiol respecto al vehículo y a las 12 h de tratamiento (Figs. 7a y 7b). Contrario a lo observado con el ER $\alpha$ , los niveles de fosforilación total de Sp1 fueron mayores respecto al tratamiento de 12 h con estradiol al comparar con el vehículo y las 6 h de tratamiento (Figs. 7a y 7c).



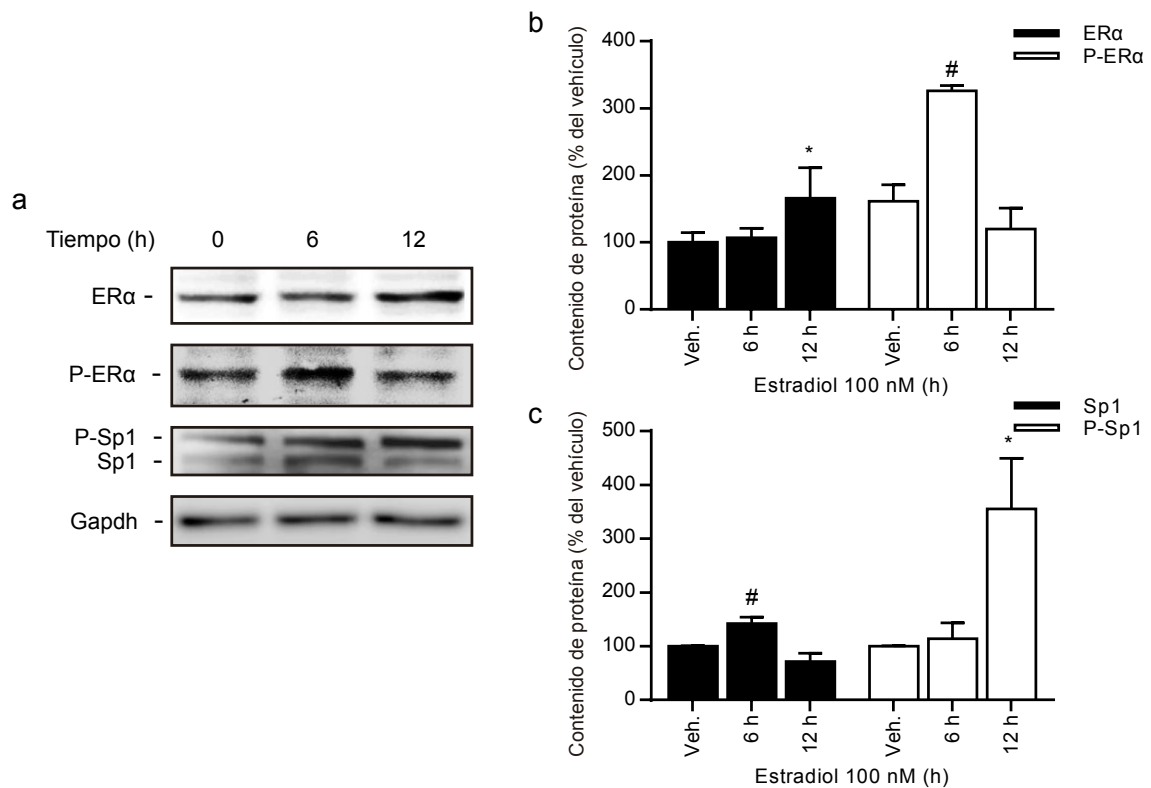


Fig. 7. El estradiol regula el contenido de proteína y el estado de fosforilación de los factores de transcripción ERα y Sp1 en la línea celular mHypoE-M42. Las células fueron tratadas con estradiol (100 nM) o vehículo (etanol) durante 6 y 12 h. Las proteínas obtenidas se analizaron mediante western blot. Los resultados se normalizaron utilizando Gapdh o la proteína total como control de carga. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con el vehículo a los 6 y 12 h (no mostrado). a) Western blots representativos de ERα, ERα fosforilado (Ser118), Sp1 y Sp1 fosforilado (Ser118), y Gapdh en las condiciones estudiadas. Se muestra el análisis densitométrico de ERα y ERα fosforilado (a) y Sp1 y Sp1 fosforilado (c). Los datos representan el porcentaje obtenido respecto a los niveles del vehículo (promedio  $\pm$  SE de tres a seis réplicas independientes). Veh, vehículo; E2, estradiol; P- ERα, ERα fosforilado en la Ser118; P-Sp1, fosforilación total de Sp1. \*P<0.05 vs Veh. y 6 h; #P<0.05 vs Veh. y 12 h.

### 11.3. El ERα es el responsable de la inducción de la isoforma PR-B mediada por estradiol

Para confirmar la participación del ERα en la inducción de la isoforma PR-B observada en el presente estudio, se realizaron tratamientos con un antagonista del ERα altamente selectivo (MPP), el cual de acuerdo a lo esperado, bloqueó la inducción de la isoforma PR-B dependiente de estradiol, sin afectar el contenido de la isoforma PR-A (Figs. 8a y 8b).

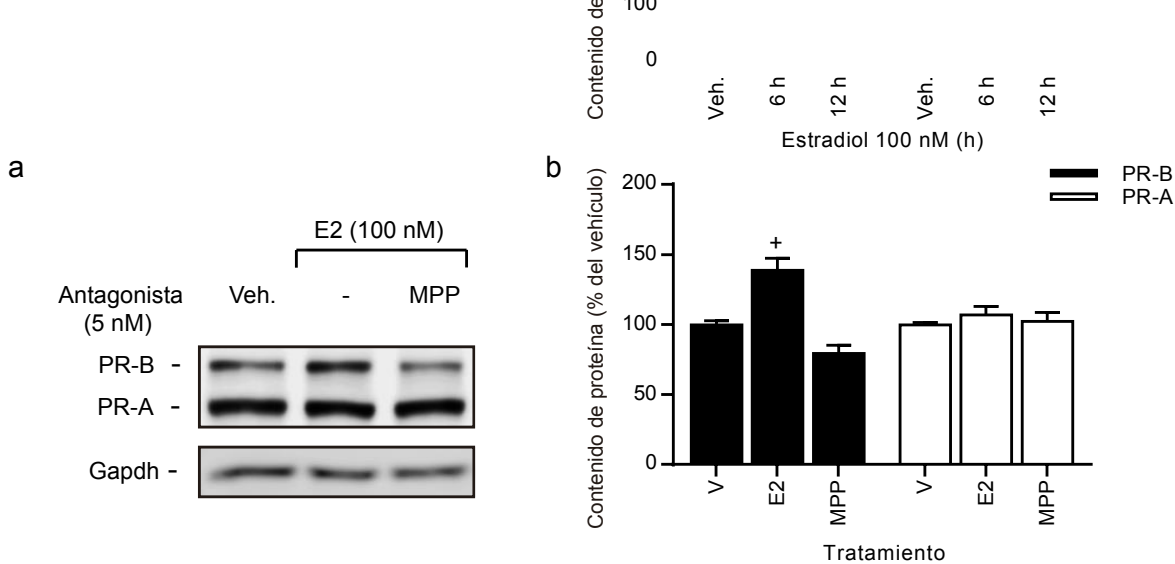


Fig. 8. El ER $\alpha$  es el responsable de la inducción de la isoforma PR-B dependiente de estradiol en la línea celular mHypoE-N42. Las células fueron tratadas con el antagonista selectivo del ER $\alpha$  (MPP, 5 nM), estradiol (100 nM) o ambos durante 6 h. Las proteínas obtenidas se analizaron mediante western blot. Los resultados se normalizaron utilizando Gapdh como control de carga. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con el vehículo a las 6 y 12 h (no mostrado). a) Western blots representativos del PR y Gapdh en las condiciones estudiadas. b) Análisis densitométrico de a). Los datos representan el porcentaje obtenido respecto a los niveles del vehículo (promedio  $\pm$ DE de tres a seis réplicas independientes). Veh, vehículo; E2, estradiol. +P<0.05 vs Veh. y MPP.

#### 11.4. El estradiol induce una ocupación diferencial de factores de transcripción relacionados con la regulación por estrógenos y de la RNA polimerasa II en los promotores de las isoformas del gen *PR*

Los resultados anteriores demuestran que existe una regulación diferencial de la expresión de las isoformas del gen *PR* mediada por estradiol y dependiente del ER $\alpha$ , y que el factor de transcripción Sp1 pudiera estar involucrado en dicha regulación. Los experimentos anteriores únicamente ofrecen un panorama global y por lo tanto una asociación entre los niveles y/o estado funcional de los factores de transcripción con la regulación de la expresión de las isoformas del gen *PR*, por lo que es necesario evaluar si dichos factores de transcripción, así como marcas epigenéticas asociadas, se encuentran presentes en los promotores de ambas isoformas del gen *PR*. Para ello, se evaluaron los efectos del estradiol a nivel local en ambos promotores de las isoformas del gen *PR*. Además de evaluar el reclutamiento de los factores de transcripción ya mencionados (ER $\alpha$  y Sp1) en los promotores de las isoformas del gen *PR*, se analizó el reclutamiento de la RNA pol

II a las 6 y 12 h de tratamientos con estradiol (Fig. 9), el cual es un indicador indirecto de la actividad transcripcional de un gen.

Respecto a la RNA pol II, el reclutamiento de ésta en el promotor de la isoforma *PR-B* fue menor a las 12 h del tratamiento con estradiol respecto al tratamiento de 6 h. Sin embargo, no se encontraron diferencias al comparar el enriquecimiento de la RNA pol II a las 6 y 12 h de tratamiento con estradiol y el vehículo (Fig. 9a). Por otro lado, no se observaron diferencias en el reclutamiento de la RNA pol II en el promotor de la isoforma *PR-A* en ninguno de los tratamientos (Fig. 9b).

De acuerdo a lo esperado, la ocupación del factor de transcripción Sp1 en el promotor de la isoforma *PR-B* mostró una ocupación similar durante los tratamientos con estradiol a las 6 h y con el vehículo, mientras que a las 12 h del tratamiento con estradiol no se detectó la presencia de Sp1 en dicho promotor (Fig. 9a). Respecto al ER $\alpha$ , éste fue detectado únicamente en el promotor de la isoforma *PR-B* a las 6 h del tratamiento con estradiol, ya que tanto en el vehículo como en los tratamientos de 12 h no se detectó su presencia en dicho promotor (Fig. 9a). Por otro lado, la ocupación de Sp1 y el ER $\alpha$  en el promotor de la isoforma *PR-A* fue menor respecto a la ocupación en el promotor de la isoforma *PR-B* en todos los tratamientos, además de que no fue diferente a lo observado en el control negativo de la CHIP, sugiriendo que dichos factores de transcripción no son reclutados en el promotor de la isoforma *PR-A* (Fig. 9b).

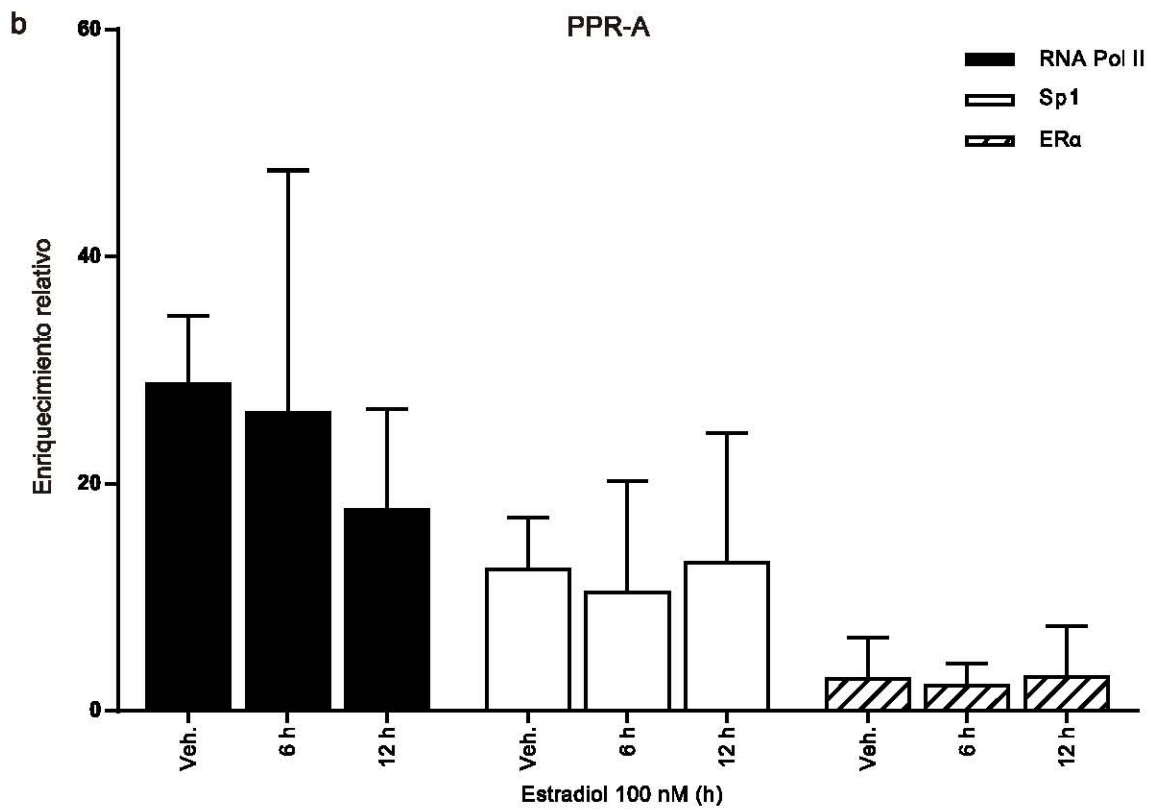
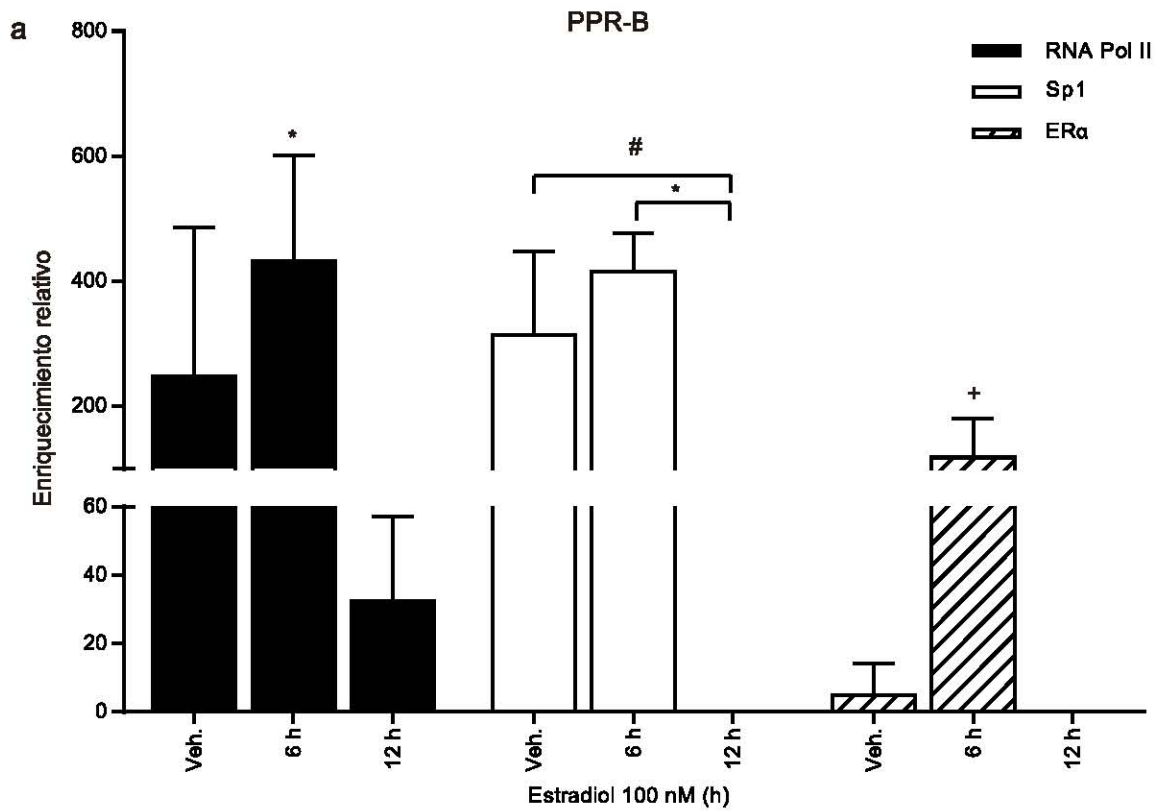


Fig. 9. El estradiol regula la ocupación diferencial de factores de transcripción y la RNA pol II en los promotores de las isoformas del gen *PR*. Las células mHypoE-N42 fueron tratadas con estradiol (100 nM) y vehículo (etanol) durante 6 y 12 h. La ocupación de la RNA pol II, Sp1 y ER $\alpha$  en los promotores de las isoformas *PR-B* (a) y *PR-A* (b) fue detectada mediante ChIP acoplado a tiempo real. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con el vehículo a las 6 y 12 h en ninguna de las proteínas inmunoprecipitadas (no mostrado). Los datos representan el enriquecimiento respecto al control negativo de la ChIP (promedio  $\pm$ DE de tres a seis réplicas independientes). Veh, vehículo; PPR-B, promotor de la isoforma *PR-B*; PPR-A, promotor de la isoforma *PR-A*. \*P<0.01 vs 12 h; #P<0.05 vs Veh.; +P<0.05 vs Veh. y 12h.

### 11.5. El estradiol induce una ocupación diferencial de marcas de histonas en los promotores de las isoformas del gen *PR*

Tal como se mencionó anteriormente, además de analizar el reclutamiento de factores de transcripción es indispensable conocer el estado epigenético de los promotores de los genes en estudio, ya que está asociado a la actividad transcripcional de los mismos. En el presente trabajo, se estudió el enriquecimiento de marcas de histonas relacionadas con cromatina transcripcionalmente activa (H3K9ac y H3K4me3) y transcripcionalmente reprimida (H3K9me2) bajo el mismo esquema de tratamientos con estradiol (Fig. 10). Se estudió la marca de histona H3K9me2 debido a que se ha reportado que el silenciamiento transitorio del gen *PR* está asociado al enriquecimiento de dicha marca de histona en el promotor respectivo, junto con la disminución del posicionamiento de la RNA pol II (Younger & Corey 2011). Respecto a la marca H3K9ac, no se encontraron diferencias en ninguno de los tratamientos (Figs. 10a y 10b). Resultó interesante que los niveles de dicha marca de histona fueron mayores en el promotor de la isoforma *PR-B* respecto a los niveles observados en el promotor de la isoforma *PR-A*, sugiriendo que la isoforma *PR-B* es transcripcionalmente más activa que *PR-A*.

Por otro lado, se observó un incremento en el enriquecimiento de la histona H3K4me3 en el promotor de la isoforma *PR-B* a las 6 h del tratamiento con estradiol, la cual además mostró una disminución dramática de dicha marca a las 12 h de tratamiento (Fig. 10a). A diferencia del promotor de la isoforma *PR-B*, no se encontró ninguna diferencia en el enriquecimiento de la marca H3K4me3 en el

promotor de la isoforma *PR-A* en ninguna de las condiciones estudiadas (Fig. 10b).

Finalmente, respecto a la marca de histona H3K9me2, se observó un incremento en el enriquecimiento de dicha marca en ambos promotores de las isoformas del gen *PR* a las 6 h de tratamiento con estradiol al comparar con el vehículo y las 12 h de tratamiento (Figs. 10a y 10b).

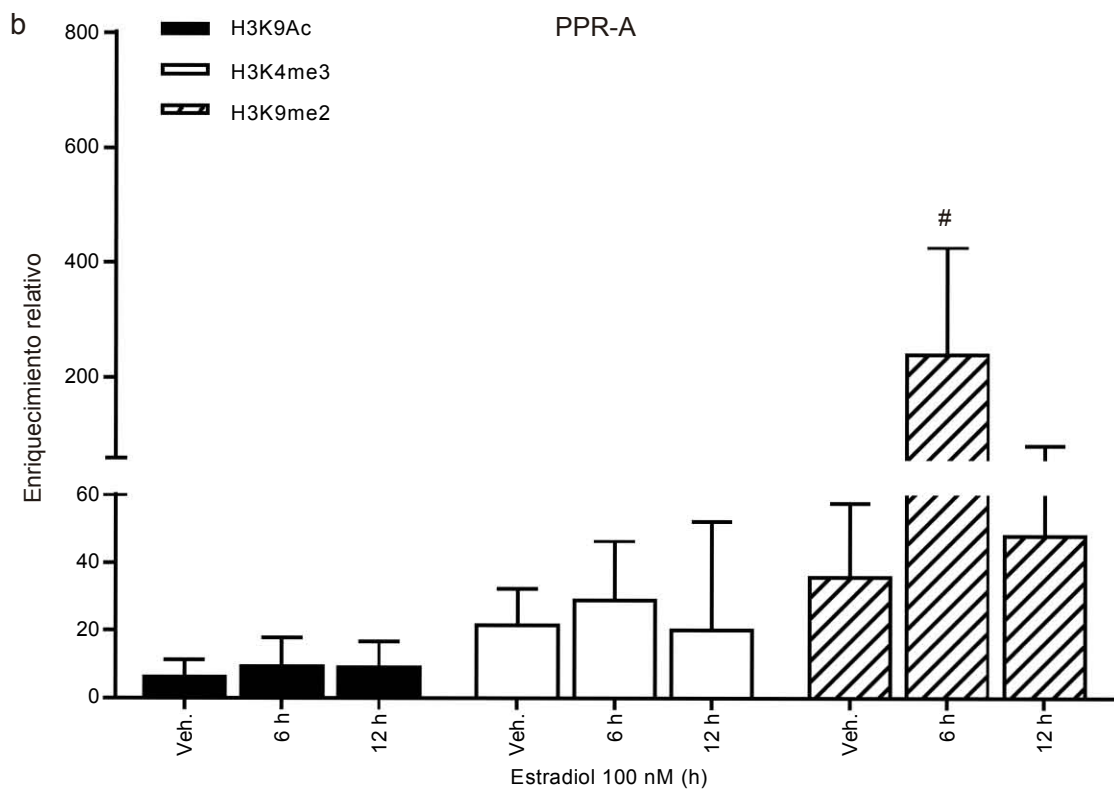
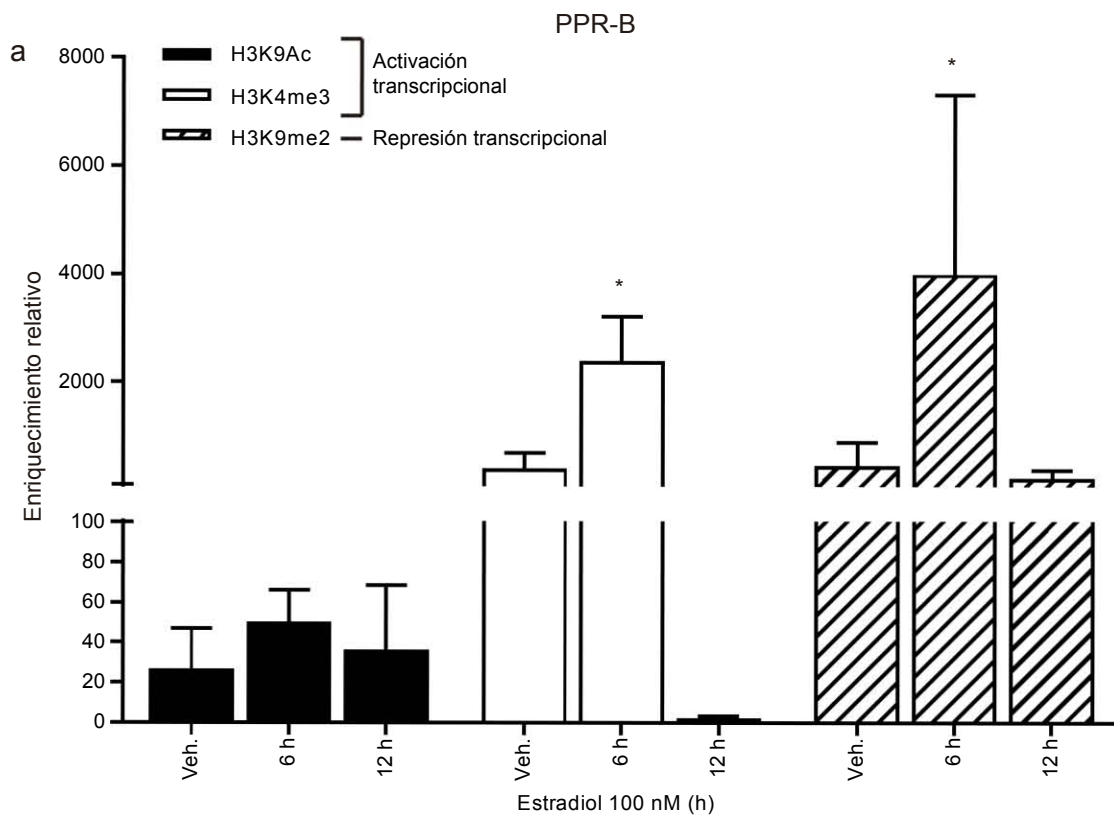


Fig. 10. El estradiol regula el enriquecimiento diferencial de marcas activas y represoras de histonas en los promotores de las isoformas del gen *PR*. Las células mHypoE-N42 fueron tratadas con estradiol (100 nM) y vehículo (etanol) durante 6 y 12 h. El enriquecimiento de las marcas de histonas H3K9Ac, H3K4me3 y H3K9me2 en los promotores de las isoformas *PR-B* (a) y *PR-A* (b) fue detectado mediante ChIP acoplado a tiempo real. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con el vehículo a las 6 y 12 h en ninguna de las proteínas inmunoprecipitadas (no mostrado). Los datos representan el enriquecimiento respecto al control negativo de la ChIP (promedio  $\pm$ DE de tres a seis réplicas independientes). Veh, vehículo; PPR-B, promotor de la isoforma *PR-B*; PPR-A, promotor de la isoforma *PR-A*. \* $P < 0.01$  vs Veh. y 12 h; # $P < 0.001$  vs Veh.

### 11.6. El estradiol no induce cambios en el contenido de 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina en los promotores de las isoformas del gen *PR*

Así como las modificaciones post-traduccionales de histonas juegan un papel indispensable en la regulación de la transcripción, el estado de metilación e hidroximetilación es un componente importante en la regulación epigenética de la expresión génica. Por lo tanto, los niveles de dichas modificaciones del DNA se estudiaron en los promotores de las isoformas del gen *PR*. El contenido de metilación e hidroximetilación fue mayor en el promotor de la isoforma *PR-A* que en el de la isoforma *PR-B*. Sin embargo, no se observaron cambios en el contenido de ninguna de estas modificaciones del DNA en presencia de estradiol en ninguno de los promotores (Fig. 11). Por otra parte, se observó un aumento en el contenido de metilación e hidroximetilación en el promotor de la isoforma *PR-A* a las 12 h de los tratamientos con estradiol y vehículo, siendo éste el único caso en el que se observó una diferencia entre los tratamientos de 6 y 12 h con el vehículo (Fig. 11b).



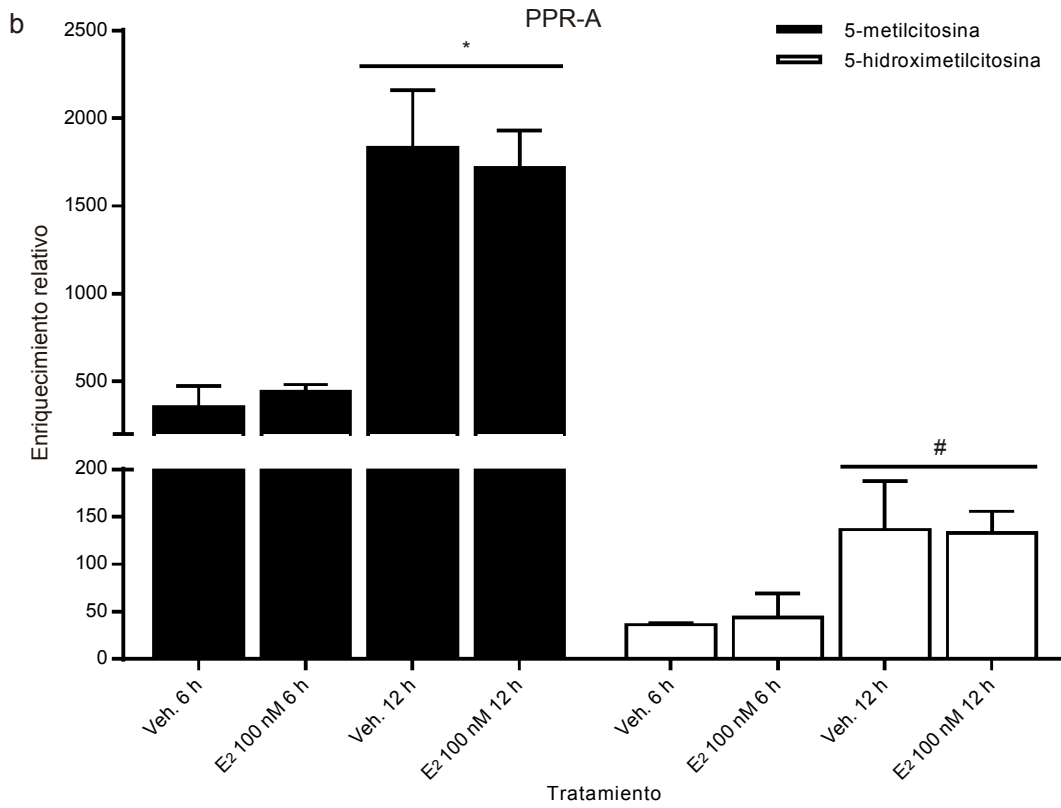
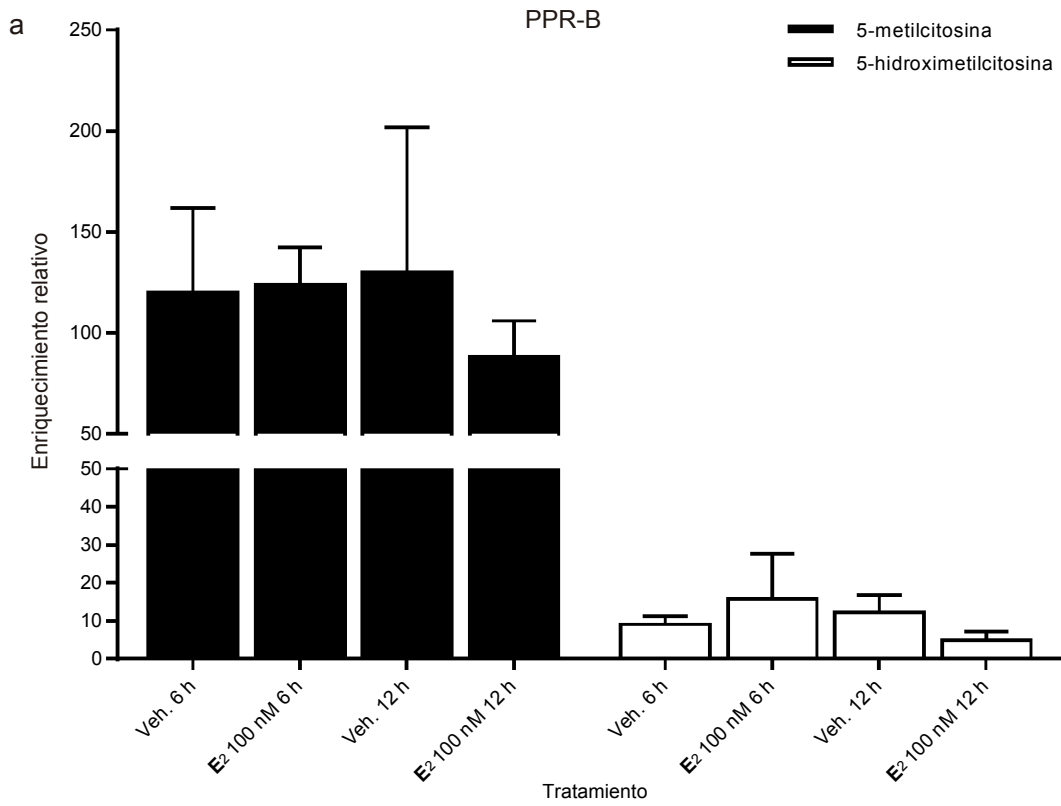


Fig. 11. El estradiol no afecta el enriquecimiento del DNA metilado e hidroximetilado en los promotores de las isoformas del gen *PR*. Las células mHypoE-N42 fueron tratadas con estradiol (100 nM) y vehículo (etanol) durante 6 y 12 h. El enriquecimiento del DNA metilado e hidroximetilado en los promotores de las isoformas *PR-B* (a) y *PR-A* (b) fue detectado mediante meDIP y hmeDIP acoplados a tiempo real. Los datos representan el enriquecimiento respecto al control negativo de la inmunoprecipitación (promedio  $\pm$ DE de tres a seis réplicas independientes). Veh, vehículo; PPR-B, promotor de la isoforma *PR-B*; PPR-A, promotor de la isoforma *PR-A*. \* $P < 0.0001$  vs 6 h; # $P < 0.05$  vs 6 h.

### 11.7. La progesterona regula la expresión de genes blanco del PR en las células mHypoE-N42

Para establecer si la regulación diferencial de la expresión de las isoformas del *PR* pudiera tener un efecto funcional en la línea celular mHypoE-N42, se estudió el efecto de la progesterona en la regulación de la expresión de genes blanco clásicos del PR (Fig. 6c). La expresión de la isoforma *PR-B* fue disminuida en los tratamientos de progesterona con estradiol o sólo progesterona, mientras que la expresión de la isoforma *PR-A* no se ve afectada (Fig. 12a). Por otra parte, únicamente la progesterona indujo la expresión de los genes *Src1* y *Fos* a las 6 h de tratamiento (Fig. 12b).

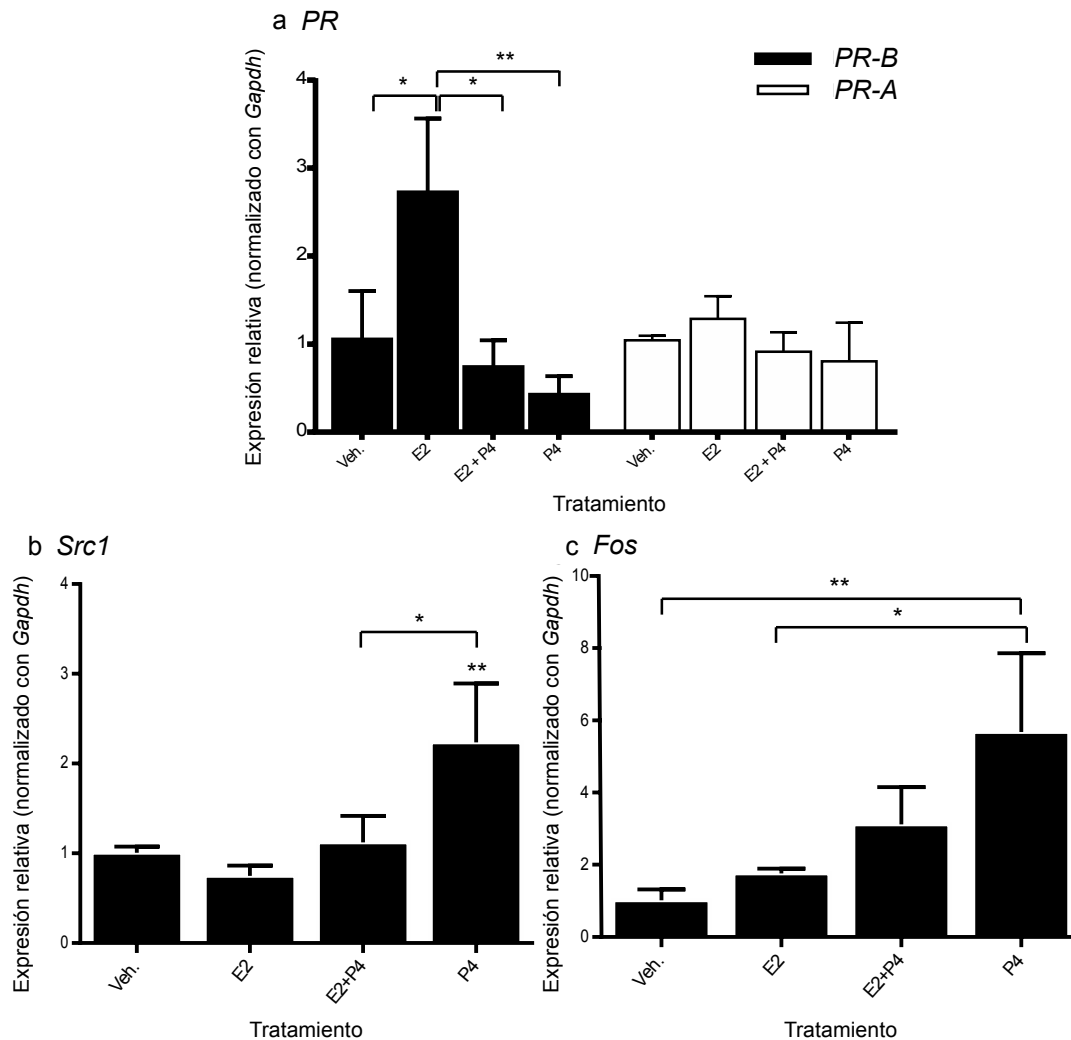


Fig. 12. La regulación por progesterona de genes blanco clásicos del PR sugiere que el receptor es funcional. Las células fueron tratadas de acuerdo a las especificaciones en la sección de Metodología para después extraer el RNA. La expresión relativa de los transcritos se calculó con el método  $\Delta\Delta Ct$ , normalizando con la expresión del gen de GAPDH como control endógeno. a) Expresión relativa de las isoformas del gen *PR* en el tratamiento de 6 h con estradiol (100 nM), estradiol mas progesterona (ambos a 100 nM), progesterona (100 nM) y vehículo (etanol). b) y c) Regulación de la expresión de los genes *Fos* and *Src1* mediada por estradiol y progesterona (100 nM). Los datos representan el promedio  $\pm$ DE de cuatro réplicas independientes. Veh., vehículo; E2, estradiol; P4, progesterona. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

## XII. Discusión de resultados

La regulación epigenética de la transcripción constituye un mecanismo molecular en el cual están involucrados un gran número de factores tales como la metilación e hidroximetilación del DNA, variantes y modificaciones post-traduccionales de histonas y RNAs no codificantes, los cuales contribuyen al efecto neto en los niveles de transcripción del gen que está siendo regulado (Koner mann et al. 2013). La regulación de la transcripción mediada por receptores nucleares constituye un modelo importante para el estudio de la contribución de dichos componentes, ya que por lo general los receptores nucleares reclutan un gran número de correguladores que participarán de manera activa en el recambio de histonas, en las modificaciones post-traduccionales de histonas, en la metilación del DNA y en el reclutamiento de RNAs no codificantes que impactarán en la expresión de un gen ya sea de manera positiva (activación de la transcripción por coactivadores) o negativa (represión de la transcripción por correpresores) (Garcia-Bassets et al. 2007; Vicent et al. 2013; Beato & Vicent 2012). La regulación de la transcripción del gen *PR* mediada por el ER $\alpha$  es un modelo clásico de receptores nucleares que ha sido ampliamente estudiado en células de cáncer de mama (Xu et al. 2004). Sin embargo, aún no se conocen por completo todos los mecanismos que participan en dicha regulación. Además, la regulación de un gen puede ser distinta dependiendo del contexto celular, a pesar de ser la misma región en el genoma, lo que refuerza la importancia de los mecanismos epigenéticos en la regulación de la transcripción (Koner mann et al. 2013). El presente estudio se centró en evaluar los mecanismos de regulación transcripcional de las isoformas del gen *PR* a través de marcas de histonas (H3K9Ac, H3K4me3 y H3K9me2), modificaciones covalentes del DNA (metilación e hidroximetilación) y factores de transcripción (ER $\alpha$  y Sp1) en un modelo *in vitro* de células hipotalámicas embrionarias, en las cuales se desconocen por completo los mecanismos a través de los cuales los estrógenos inducen la expresión de dichas isoformas, lo cual es indispensable durante la diferenciación sexual del cerebro (Quadros & Wagner 2008).

En el presente trabajo se demostró que el estradiol (100 nM) induce de manera transitoria la expresión de la isoforma *PR-B* en la línea celular mHypoE-N42, sin inducir cambios en la expresión de la isoforma *PR-A*. De acuerdo a otros estudios, la concentración de estradiol (100 nM) utilizada en el presente estudio es considerada mayor respecto a las concentraciones que se han reportado en otros modelos *in vitro*, en los cuales se ha observado una respuesta funcional con concentraciones desde 1 nM (Kuo et al. 2010). De acuerdo a los resultados del presente estudio, se ha demostrado mediante curvas de dosis respuesta que la concentración de 100 nM de estradiol es la mínima necesaria para inducir la expresión del gen que codifica para la aromatasa en la línea celular mHypoE-N42 (Yilmaz et al. 2009). Resulta interesante que el gen que codifica para la aromatasa y el gen *PR* son regulados por el ER $\alpha$  y ambos participan en el desarrollo sexual del cerebro (Schwarz et al. 2010), por lo que la concentración de estradiol empleada en el presente estudio pudiera generar una respuesta funcional en las células mHypoE-N42 que esté relacionada con su papel en un modelo *in vivo*. Por otro lado, es importante mencionar que la concentración de estradiol empleada para generar una respuesta biológica en este trabajo pudiera ser específica para la línea celular mHypoE-N42, ya que en condiciones fisiológicas se ha determinado que en hipotálamo de rata previo al nacimiento existe de 8.9 pg de estradiol por 1 miligramo de proteína (hembras) a 16.1 pg de estradiol por 1 miligramo de proteína (machos), lo cual es menor a la cantidad empleada en el presente trabajo (Amateau et al. 2004). La respuesta específica a distintas concentraciones de estradiol en los cultivos hipotalámicos puede deberse a diferencias en el tipo celular y la etapa del desarrollo a partir de la cual se realizaron dichos cultivos, ya que se ha propuesto que la regulación de la expresión del *PR* es más susceptible a responder a menores concentraciones de estradiol en el núcleo ventromedial del hipotálamo conforme avanza el desarrollo (región cerebral indispensable para la programación de la conducta sexual), lo cual refuerza la idea de que se requieren mayores concentraciones de estradiol para inducir la expresión del *PR* durante etapas del desarrollo embrionario que aquellas requeridas en células adultas que son altamente responsivas a estradiol

(Gonzales et al. 2008). Por lo tanto, la inducción del *PR-B* a la concentración de 100 nM de estradiol y no a concentraciones menores puede deberse a una menor susceptibilidad a la hormona en las células hipotalámicas embrionarias utilizadas en el presente trabajo. Esto a su vez, puede estar relacionado con el estado transcripcional y epigenético del promotor del gen *PR*, tal como se ha demostrado en células de cáncer de mama que han perdido la capacidad de regular la expresión del gen *PR* de una forma dependiente de estrógenos ya sea por la disminución de marcas activadoras de histonas o aumento en la metilación del DNA (Xu et al. 2004; Pathiraja et al. 2011; Badia et al. 2000). Se ha demostrado que en el hipotálamo, el estado de metilación de la región promotora del gen *PR* varía entre hembras y machos a lo largo del desarrollo, lo cual podría explicar la respuesta diferencial a la exposición a estradiol durante el desarrollo embrionario y edad adulta (Schwarz et al. 2010). Sería interesante estudiar el estado epigenético y la accesibilidad a factores de transcripción en los promotores de las isoformas del gen *PR* de los diferentes tipos de cultivos hipotalámicos en los que se ha encontrado una respuesta diferencial dependiendo de la concentración de estradiol utilizada para establecer si el componente epigenético es el que dicta dicha respuesta diferencial, similar a lo reportado en los modelos de cáncer de mama.

Resulta interesante que la inducción transitoria de la isoforma *PR-B* y ausencia de cambios en la expresión de la isoforma *PR-A* en respuesta a los tratamientos con estradiol que se observó en el presente estudio, también se ha observado en el hipotálamo de ratas durante el proestro y en distintos núcleos hipotalámicos durante el desarrollo (Quadros et al. 2007; Mendoza-Garcés et al. 2013). Lo anterior sugiere que también existe una regulación diferencial de las isoformas del gen *PR* en los modelos *in vivo*, sugiriendo que dicha regulación pudiera tener una relevancia biológica. En el modelo *in vivo*, la inducción de la isoforma *PR-B* y la ausencia de cambios en la expresión de la isoforma *PR-A* en el hipotálamo de ratas hembras durante la transición del proestro-estro está asociada al inicio de la conducta sexual (Mendoza-Garcés et al. 2013), mientras que durante el desarrollo embrionario se desconoce el efecto biológico de dicha regulación diferencial. De

acuerdo a los resultados del presente trabajo y a los estudios de Yilmaz y colaboradores, los efectos del estradiol en las células mHypoE-N42 pudieran estar relacionados con la diferenciación sexual del cerebro (Yilmaz et al. 2009; Yilmaz et al. 2011), tal como se ha demostrado en los modelos *in vivo* (Bakker et al. 2002; Lonstein et al. 2001). Por lo tanto, la inducción diferencial de la expresión de las isoformas del gen *PR* también pudiera estar involucrada con la diferenciación sexual del cerebro, aunque se requieren estudios en modelos *in vivo* para demostrarlo.

Es importante mencionar que la inducción transitoria de la isoforma *PR-B* dependiente de estradiol fue confirmada a nivel de proteína, lo que sugiere que los efectos del estradiol sobre los factores de transcripción y marcas epigenéticas observados en el presente estudio también están relacionadas con el contenido proteico de la isoforma *PR-B*, lo que a su vez indica que dicha regulación podría tener impacto en la actividad funcional del *PR* en esta línea celular. Esto fue confirmado al observar que tratamientos con progesterona regulan la expresión de genes blanco clásicos del *PR*, ya sea mediante represión o inducción de la transcripción. De acuerdo a previos reportes en la literatura, la progesterona inhibe la expresión del gen *PR* como mecanismo de retroalimentación negativa para evitar que la vía de señalización permanezca activa (Jacobsen & Horwitz 2012), tal como se observó en el presente trabajo. Por otro lado, resulta interesante que a diferencia de los tratamientos con progesterona, la expresión de sus genes blanco (*Fos* y *Src*) no se indujo cuando se administró estradiol junto con progesterona. Esto puede deberse a que el aumento en el contenido de la isoforma *PR-B* a las 6 h del tratamiento con estradiol cambió la cinética de inducción de los genes *Fos* y *Src*, induciendo de manera transitoria su expresión previo a las 6 h en los que se evaluó la expresión génica. Sería interesante estudiar la cinética de expresión de los genes regulados por el *PR* y si la regulación durante el tiempo es indispensable para el desarrollo sexual del cerebro.

Debido a que el ER $\alpha$  es el principal factor de transcripción que regula la expresión del *PR* en el cerebro (Camacho-Arroyo et al. 1998; Camacho-Arroyo et al. 2003),

se estudiaron los niveles de proteína total así como su estado de fosforilación en la Ser118. Previamente se ha reportado que la fosforilación del ER $\alpha$  en la Ser118 está directamente relacionada con su actividad transcripcional sobre sus genes blanco (Chen et al. 2000; Duplessis et al. 2011). En el presente trabajo, el aumento de los niveles de fosforilación del ER $\alpha$  (Ser118) correlacionaron con la inducción transitoria de la expresión de la isoforma *PR-B*, sugiriendo que existe una correlación entre la actividad transcripcional del ER $\alpha$  y la expresión de la isoforma *PR-B* en células hipotalámicas embrionarias. Actualmente, no existen estudios *in vivo* en los que se haya establecido la participación de la fosforilación del ER $\alpha$  en la serina 118, por lo que sería interesante investigar si la fosforilación de este residuo es indispensable para la programación sexual del cerebro durante el desarrollo, así como para el establecimiento de la conducta sexual en roedores.

Tal como se ha demostrado en los modelos *in vivo* (Sá et al. 2013; Sá et al. 2015), en el presente trabajo se demostró que el ER $\alpha$  es el responsable de la inducción de la isoforma *PR-B*. Resulta interesante que el ER $\alpha$  también es indispensable para la regulación de la conducta sexual en roedores adultos (Spiteri et al. 2010), sugiriendo que los hallazgos encontrados en el presente estudio están relacionados con el efecto funcional en el modelo *in vivo*. Por otra parte, este trabajo es el primero en establecer que la regulación dependiente de estradiol de la isoforma *PR-B* está relacionada con el reclutamiento del ER $\alpha$  en su promotor específico en células hipotalámicas y que probablemente éste sea el mecanismo que se presenta en el modelo *in vivo*. Por otra parte, y de acuerdo a otros estudios (Won Jeong et al. 2012; Gagnidze et al. 2013; Stratmann & Haendler 2011), no se detectó la presencia del ER $\alpha$  en el promotor de la isoforma *PR-A* en ninguna de las condiciones estudiadas, a pesar de la presencia de un sitio ERE en el promotor respectivo (Hagihara et al. 1994), lo que sugiere que dicha isoforma es regulada de manera independiente del ER $\alpha$  al menos en el presente estudio y los estudios mencionados, sugiriendo que la isoforma *PR-A* no participa en la respuesta funcional mediada por estradiol y progesterona en los modelos *in vivo*. Sin embargo, se ha reportado que la presencia de la isoforma *PR-A* es indispensable para la conducta sexual en los roedores adultos (White et al. 2007), lo que sugiere



que la proporción de ambas isoformas del PR es indispensable para el establecimiento de la conducta sexual en adultos (Mendoza-Garcés et al. 2010), más que la regulación de una isoforma en particular. Resulta interesante que en células de hipotálamo la isoforma que muestra una expresión diferencial es la isoforma PR-B, mientras que en otros tejidos como el miometrio la isoforma que se induce de manera diferencial respecto al tiempo es la isoforma PR-A, lo cual también correlaciona con el estado epigenético de sus promotores (Chai et al. 2012).

Recientemente se reportó por nuestro grupo de trabajo que existe un patrón de metilación transitorio en el promotor de la isoforma *PR-B* en el hipotálamo de rata durante el proestro, el cual involucra un sitio de unión a Sp1 altamente conservado (Mendoza-Garcés et al. 2013). Dicho patrón de metilación correlacionó con la expresión de la isoforma *PR-B*, sugiriendo que dicho sitio de unión a Sp1 es importante para la regulación transcripcional de dicha isoforma. Los resultados del presente estudio sugieren que Sp1 se encuentra reclutado en el promotor de la isoforma *PR-B* durante los tratamientos con vehículo y estradiol (a las 6 h), tal como se ha reportado previamente en células de cáncer de mama (Schultz et al. 2003; Xu et al. 2004). Resulta interesante que en este estudio se observó una disminución en los niveles totales de Sp1 junto con un aumento en los niveles de fosforilación a las 12 h de tratamiento con estradiol (Fig. 7), al momento en que la expresión de la isoforma *PR-B* fue disminuida y no se detectó la presencia de Sp1 en el promotor de dicha isoforma. De acuerdo a estos resultados, la hiperfosforilación de Sp1 se ha asociado a una disminución en la ocupación de este factor de transcripción en sus genes blanco (Tang et al. 2002; Yang et al. 2014). La ausencia del ER $\alpha$  en el promotor de la isoforma *PR-B* a las 12 h de tratamiento con estradiol pudo deberse a la ausencia de Sp1 en dicha región durante ese tiempo, ya que se ha reportado que es necesaria la presencia de Sp1 para el reclutamiento del ER $\alpha$  en el promotor del *PR* (Petz et al. 2004). Por otra parte, no se detectó la presencia de Sp1 en el promotor de la isoforma *PR-A*, contrario a lo reportado en células de cáncer de mama (Petz et al. 2004), en las cuales Sp1 se encuentra reclutado en el promotor de la isoforma *PR-A* de manera

similar a lo descrito en el presente estudio para el promotor de la isoforma *PR-B*, lo cual confirma que la regulación diferencial de ambas isoformas depende del contexto celular. Lo anterior sugiere que la presencia de Sp1 en el promotor de cada una de las isoformas del gen *PR* determina la sensibilidad a estradiol y por lo tanto la regulación de su expresión a través del ER $\alpha$ , que en el caso de las células mHypoE-N42 correspondería a la isoforma *PR-B* y para las células MCF7 a la isoforma *PR-A*, aunque se requieren mayores estudios para confirmar esta asociación. Por otro lado, se desconoce por completo si Sp1 y su estado de fosforilación participan durante el desarrollo sexual del cerebro o la conducta sexual en adultos, por lo que es necesario confirmar su participación en modelos *in vivo*. También se requieren más estudios para elucidar por completo la participación de la fosforilación de Sp1 en la regulación de la transcripción del *PR*, así como de otras isoformas del Sp que pudieran estar participando en su regulación, ya que se ha reportado que la fosforilación de Sp1 en residuos específicos puede repercutir en su actividad como factor de transcripción y que existen otras isoformas que participan en la regulación de la expresión del *PR* (Khan et al. 2007).

Respecto a la RNA pol II, los resultados demuestran que la disminución en su reclutamiento en el promotor de la isoforma *PR-B* durante los tratamientos con estradiol correlacionan con la marcada disminución en la expresión de la isoforma *PR-B*, así como con la ausencia de Sp1 en dicho promotor. Esto sugiere que Sp1 es requerido para el reclutamiento de la RNA pol II para mantener los niveles de transcripción basal de la isoforma *PR-B*, puesto que el reclutamiento de la RNA pol II únicamente disminuye cuando ya no está presente Sp1. La disminución del reclutamiento de la RNA pol II en los promotores de los genes regulados por el ER $\alpha$  posterior a la inducción de sus transcritos correspondientes se ha reportado previamente en células MCF7 de cáncer mama, en las cuales se ha descrito que la regulación cíclica de la expresión del gen *TFF1* está asociada a los niveles de enriquecimiento de marcas de histonas, metilación del DNA y factores de transcripción en su promotor respectivo (Kangaspeska et al. 2008). Esto sugiere que la regulación transitoria de la expresión génica mediada por el ER $\alpha$  constituye

un mecanismo general para evitar la expresión constitutiva de sus genes blanco, y en el caso particular de la isoforma *PR-B*, probablemente para programar el desarrollo sexual del cerebro durante tiempos específicos, tal como en la regulación de la conducta sexual de roedores adultos (Mendoza-Garcés et al. 2010). La ausencia de cambios en el reclutamiento de la RNA pol II entre el vehículo y el tratamiento con estradiol que indujo la expresión de la isoforma *PR-B* no descarta cambios en el estado de fosforilación de la RNA pol II que estén asociados a la activación de la transcripción como la fosforilación de la Ser2 del dominio carboxilo terminal, tal como se ha demostrado en otros estudios (Materne et al. 2015).

Por otro lado, la ausencia de cambios en la ocupación de la RNA pol II en el promotor de la isoforma *PR-A* correlacionó con la ausencia de cambios en la expresión de la isoforma respectiva. Resulta interesante que la disminución de la expresión de la isoforma *PR-A* a las 12 h del tratamiento con estradiol respecto a las 6 h de tratamiento, correlacionó con la ausencia de la RNA pol II a las 12 h de tratamiento con estradiol al comparar con el control negativo de la ChIP (no mostrado). Estos resultados correlacionaron con el aumento en la metilación del DNA del promotor de la isoforma *PR-A*, aunque dichos cambios no fueron diferentes del vehículo. Esto sugiere que a pesar de que dichos cambios tienen impacto en la expresión de la isoforma *PR-A*, no están relacionados con la exposición a estradiol y por lo tanto tampoco con su efecto funcional en las células mHypoE-N42.

La acetilación de histonas es una de las características típicas de cromatina transcripcionalmente activa debido al menor grado de compactación de la cromatina respecto a la que no se encuentra acetilada (Lander et al. 2001). La participación de la acetilación de histonas durante el desarrollo es indispensable para programar la conducta sexual del adulto tal como se ha demostrado con inhibidores de las HDACs (Matsuda et al. 2011), sin embargo no se ha estudiado el efecto de estos inhibidores en la expresión de las isoformas del gen *PR*. De acuerdo a estudios previos, en este trabajo se demostró que los niveles de

acetilación en los promotores de las isoformas del gen *PR* correlacionan con la ocupación de la RNA pol II en los promotores correspondientes (Xu et al. 2004; Chai et al. 2012). Lo anterior sugiere que el promotor de la isoforma *PR-B* es transcripcionalmente más activa que la isoforma *PR-A*, ya que la cromatina se encuentra menos compacta y por lo tanto pueden unirse factores de transcripción con mayor facilidad. En este caso, la isoforma transcripcionalmente más activa (*PR-B*) es regulada por el reclutamiento del ER $\alpha$  en su promotor, lo que hace vez induce cambios en la expresión génica. Por el contrario, los niveles menores de la histona H3K9Ac en el promotor de la isoforma *PR-A* respecto al promotor de *PR-B* están asociados a que no se reclutan los factores de transcripción Sp1 y ER $\alpha$ , evitando que responda a los tratamientos con estradiol. Contrario a los resultados obtenidos en el presente trabajo, estudios recientes han demostrado que el estradiol induce un enriquecimiento específico de histonas acetiladas en distintas regiones del promotor del gen *PR* en hipotálamo de ratón adulto (Gagnidze et al. 2013). Esto sugiere que la respuesta a estrógenos a nivel de acetilación de histonas en el promotor del gen *PR* es distinta dependiendo de la etapa del desarrollo, lo que a su vez indica que se reclutan distintos correguladores en cada una de las etapas, dando lugar a las diferentes respuestas a estradiol en el cerebro de adultos y embriones.

La marca de histonas H3K4me3 es otra marca característica de cromatina transcripcionalmente activa. Al igual que en el caso de la marca H3K9ac, se observó un enriquecimiento mayor de esta marca en el promotor de la isoforma *PR-B* respecto a la isoforma *PR-A*, lo que refuerza el hallazgo de que el promotor de la isoforma *PR-B* es más permisivo para la transcripción que el promotor de la isoforma *PR-A*. Además, el patrón de enriquecimiento de la marca H3K4me3 coincidió con la inducción transitoria de la expresión de la isoforma *PR-B* con estradiol, apoyando la idea de que el estradiol regula la expresión de la isoforma *PR-B* mediante mecanismos epigenéticos. Resulta interesante que el reclutamiento del ER $\alpha$  en el promotor de la isoforma *PR-B* también correlaciona con el aumento de la histona H3K4me3 y los niveles de expresión de dicha isoforma, ya que se ha reportado que dicha marca de histona promueve la

transcripción dependiente del ER $\alpha$  a través del reclutamiento de correguladores específicos que promoverán la transcripción de los genes blanco del ER $\alpha$  (Foulds et al. 2013). En el presente trabajo, la importancia de la metilación de la histona H3K4 se evidenció cuando disminuyó de manera dramática su enriquecimiento en el promotor de la isoforma *PR-B*, indicando que es un marcador del estado transcripcional de dicha isoforma, ya que su ausencia correlacionó con la ausencia del ER $\alpha$  y Sp1 y, la disminución en el reclutamiento de la RNA pol II en el promotor respectivo. El reclutamiento transitorio y dependiente de la región promotora se ha reportado previamente en hipotálamo de adulto (Gagnidze et al. 2013), por lo que la regulación por estradiol de la metilación de la H3K4 pudiera estar conservada de manera independiente de la etapa del desarrollo, al menos para la isoforma *PR-B*.

A diferencia de las marcas de histonas mencionadas anteriormente, la marca de histona H3K9me2 es una marca típica de represión transcripcional en regiones promotoras (Barski et al. 2007). Contrario a lo esperado, durante los tratamientos con estradiol se observó un aumento en el enriquecimiento de la histona H3K9me2 similar al observado para la histona H3K4me3 en ambos promotores del gen *PR*. Dicho aumento se esperaba a las 12 h del tratamiento con estradiol, en el cual se disminuyó la expresión de la isoforma *PR-B*. Lo anterior indica que ocurrió un enriquecimiento de ambas marcas de cromatina activa (H3K4me3) y reprimida (H3K9me2) en el promotor de la isoforma *PR-B* durante el tratamiento de 6 h con estradiol, lo cual podría ser producto de un mecanismo estricto de regulación transcripcional para evitar la expresión independiente de ligando o constitutiva, tal como se ha reportado en otros genes regulados por el ER $\alpha$  en células MCF7 de cáncer de mama (Garcia-Bassets et al. 2007). Al igual que en el presente estudio, se ha reportado que ambas marcas de histonas de activación y represión transcripcional se encuentran también presentes en los promotores de las isoformas del gen *PR* en miometrio humano, en el cual la isoforma que es inducida (*PR-A*) contiene un mayor contenido de marcas de histonas de activación transcripcional que la que no es inducida (*PR-B*) (Chai et al. 2012). Resulta interesante que la proporción de la expresión de ambas isoformas del gen *PR*

sufre un cambio tanto en el miometrio humano como en el hipotálamo de roedores, siendo la diferencia principal la isoforma que se induce (Chai et al. 2012; Mendoza-Garcés et al. 2013). Por otra parte, el enriquecimiento de la marca de histona H3K9me2 en el promotor de la isoforma *PR-A* durante el tratamiento de 6 h con estradiol fue el único cambio que se observó en el presente estudio, aunque esta modificación no se asoció a cambios en los niveles de expresión de la isoforma *PR-A* inducidos por estradiol, por lo que se requieren mayores estudios para establecer la participación de dicha modificación en la expresión de la isoforma *PR-A*. También existe la posibilidad de que los resultados obtenidos se deban a que exista un entrecruzamiento entre las señales de la histona H3K9me2 entre los promotores de ambas isoformas, debido a que se encuentran en una distancia muy cercana. Esto coincide con el patrón de distribución de la histona H3K9me2 y otras marcas de cromatina transcripcionalmente inactiva (como H3K27me3), las cuales se destruyen a lo largo de regiones genómicas a comparación de la marca H3K4me3 que sólo se encuentra distribuida en regiones discretas. La distribución de histonas en las que coexisten dos marcas que tienen efectos funcionales opuestos se describieron por primera vez en células “stem cell” (Bernstein et al. 2006). Estas células requieren un estricto control de la expresión génica, por lo que una vez que se ha inducido la expresión de un gen en particular, la expresión de éste se debe inhibir inmediatamente para controlar la expresión durante tiempos específicos. Este mecanismo de regulación transcripcional es mediado también por receptores nucleares a hormonas, los cuales deben de evitar la expresión independiente de ligando (Garcia-Bassets et al. 2007). En el caso de la expresión de la isoforma *PR-B* en las células mHypoEN42, probablemente se requieren eventos rápidos y estrictamente regulados para controlar el tiempo en el que se lleva a cabo el desarrollo sexual del cerebro.

La participación de la metilación del DNA en la regulación de la expresión génica del gen de PR se ha estudiado ampliamente tanto en modelos fisiológicos como patológicos (Mendoza-Garcés et al. 2013; Gaudet et al. 2009; Hansberg-Pastor et al. 2013; Li et al. 2014; Meyer et al. 2014; Pathiraja et al. 2011). Se ha reportado

que la metilación y desmetilación del DNA puede llevarse a cabo de manera cíclica en el promotor del gen *TFF1* en células MCF7 de cáncer de mama, el cual fue de manera dependiente de estradiol y el ER $\alpha$  (Kangaspeska et al. 2008). Además, en estudios previos de nuestro grupo de trabajo se demostró que existe un patrón diferencial de metilación en el promotor de la isoforma *PR-B* en el hipotálamo de rata durante la transición proestro-estro (Mendoza-Garcés et al. 2013). Contrario a lo esperado, en el presente estudio no se encontraron cambios en los niveles de metilación o hidroximetilación en los promotores de las isoformas del PR que fueran dependientes de estradiol. Se ha reportado en células MCF7 de cáncer de mama que los cambios en la metilación del DNA en el promotor de la isoforma *PR-B* ocurren como un evento tardío posterior al inhibir la señalización del ER $\alpha$  (Leu et al. 2004), lo cual explicaría la ausencia de cambios en la metilación del DNA en el presente trabajo, ya que no se analizaron tiempos más prolongados de exposición a estradiol. Tampoco se puede descartar que los cambios de metilación o hidroximetilación pudieran llevarse a cabo en sitios CpG específicos, los cuales se detectarían con técnicas más sensibles como secuenciación. Por otra parte, los niveles más elevados de metilación del DNA en el promotor de la isoforma *PR-A* respecto al promotor de la isoforma *PR-B*, podría confirmar la menor accesibilidad factores de transcripción en el primer caso. El hecho de que no hubiera diferencia en el enriquecimiento de las marcas de metilación e hidroximetilación del DNA en el promotor de la isoforma *PR-A* durante los tratamientos de estradiol y vehículo puede indicar que existe un mecanismo desconocido de regulación intrínseco de la expresión de la isoforma *PR-A* que es independiente de estradiol. Se ha demostrado que los patrones de metilación varían dependiendo de la etapa del ciclo celular (Brown et al.), por lo que probablemente el ciclo celular afectó el estado de metilación del promotor de la isoforma *PR-A*, teniendo los mismos niveles durante los tratamientos de estradiol y con el vehículo, reforzando la idea de que el estradiol no tiene efecto sobre el promotor de *PR-A*. Este mecanismo de regulación del promotor de la isoforma *PR-A* pudiera estar relacionado con el mantenimiento de los niveles constantes en la expresión de la isoforma respectiva, ya que también los niveles de

hidroximetilación se mantuvieron constantes (de acuerdo a los niveles de metilación) y por lo tanto la relación metilación/hidroximetilación se mantuvo sin cambios (no mostrado).

El hecho de que en el presente estudio la expresión de la isoforma PR-B fue regulada por estradiol, sugiere que la línea celular mHypoE-N42 proviene de un origen masculino, ya que estudios previos han reportado que el estradiol induce la expresión del PR en el núcleo ventromedial del hipotálamo durante etapas tempranas del desarrollo en machos pero no en hembras (Quadros & Wagner 2008). Sin embargo, se ha demostrado que la exposición prenatal al dietilestilbestrol (estrógeno sintético) en hembras induce la expresión del PR en regiones del cerebro que son relevantes para la conducta reproductiva, tales como el núcleo preóptico medial y el núcleo periventricular anteroventral (Quadros, Pfau, et al. 2002), lo que sugiere que la exposición a estrógenos durante la etapa de diferenciación sexual es la que determina la inducción del PR de manera independiente del sexo. Por lo tanto, se requieren mayores estudios para establecer por completo los mecanismos involucrados en la regulación diferencial de la expresión de las isoformas del gen de PR por estradiol en células hipotalámicas embrionarias, lo cual puede estar asociado a la regulación por estradiol de los procesos de programación prenatal y el dimorfismo sexual en el cerebro de roedores (Wagner et al. 1998; Quadros & Wagner 2008).



## 12.1. Resumen de los principales hallazgos

En el presente estudio se demostró que en la línea celular mHypoE-N42 el estradiol regula de manera diferencial la transcripción de las isoformas PR-B y PR-A del gen *PR* mediante la inducción de cambios en la ocupación de los factores de transcripción ER $\alpha$  y Sp1 y la histona H3K4me3 en los promotores de dichas isoformas. La inducción transitoria de la expresión de la isoforma *PR-B* dependiente del ER $\alpha$  a las 6 h del tratamiento con estradiol, se asoció con el incremento en la fosforilación del ER $\alpha$  en la Ser118 y con su reclutamiento en el promotor de la isoforma *PR-B*, lo cual a su vez correlacionó con el aumento de la marca de histona H3K4me3 en dicho promotor que sugiere un promotor transcripcionalmente activo. Posteriormente se observó una disminución muy marcada en la expresión de la isoforma *PR-B* a las 12h del tratamiento con estradiol, la cual fue asociada a una menor detección de Sp1, H3K4me3 y RNA pol II en el promotor respectivo, mientras que no se observaron cambios en el estado de metilación del DNA que pudieran asociarse a una represión transcripcional mediada por este mecanismo. Por otra parte, no se encontraron cambios dependientes de estradiol en la expresión de la isoforma *PR-A*, así como tampoco se detectaron cambios en la ocupación de factores de transcripción o marcas epigenéticas en su promotor respectivo que se asociaran a su estado transcripcional. En la figura 13 se muestra un esquema que resume los principales hallazgos encontrados en el presente estudio.

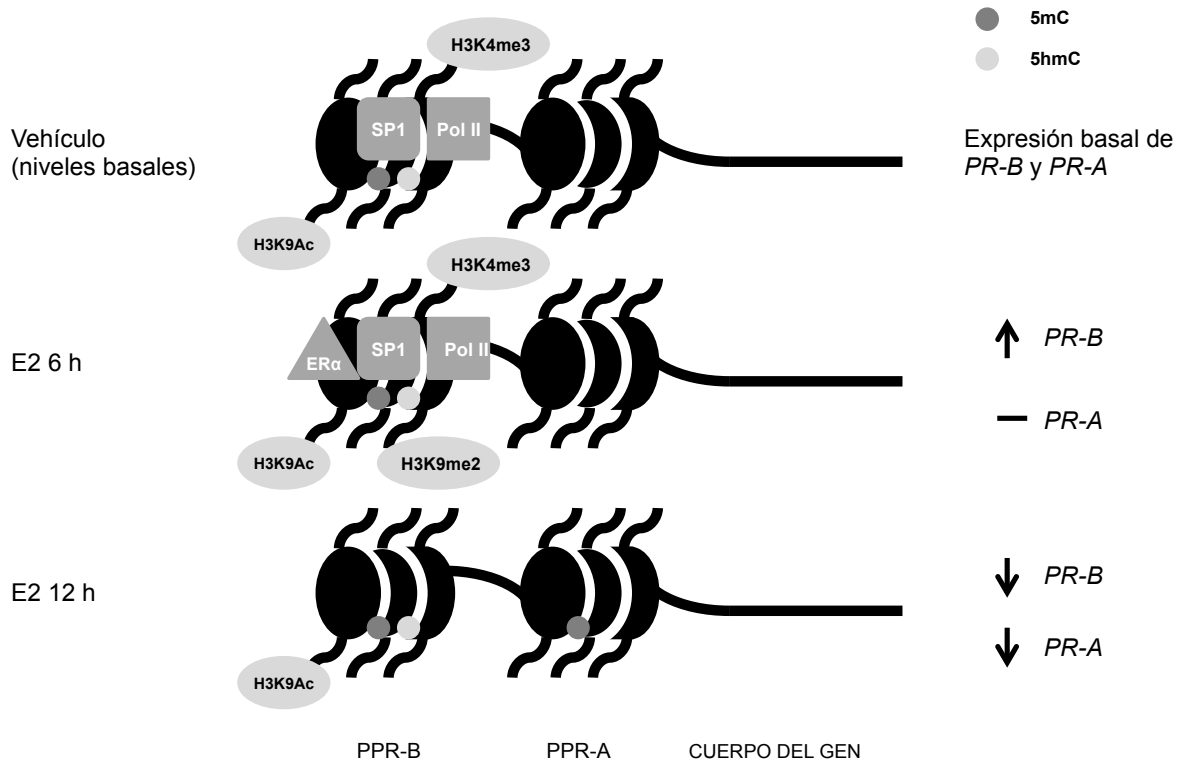


Fig. 13. Esquema que muestra los principales hallazgos encontrados en el presente estudio.

### **XIII. Conclusiones**

El presente trabajo demuestra que el estradiol induce una regulación diferencial de la expresión de las isoformas del gen de PR en una línea celular hipotalámica de origen embrionario (mHypoE-N42), la cual está relacionada con la metilación de histonas y el posicionamiento de los factores de transcripción ER $\alpha$  y Sp1 en sus promotores específicos en una forma dependiente del tiempo de exposición y del contexto genómico.

### **XIV. Perspectivas**

- Estudiar el papel de las distintas isoformas del factor de transcripción Sp1 y la participación del Sp1 fosforilado en la regulación de las isoformas del gen de PR.
- Estudiar la participación del PR en la regulación de la expresión de sus respectivas isoformas, como un mecanismo de retroalimentación negativa.
- Establecer la participación de interacciones distales entre sitios enhancer y los promotores del gen de PR en la regulación de la expresión de ambas isoformas.
- Comparar el transcriptoma de las células mHypoe-N42 a partir de tratamientos con estradiol y/o progesterona.
- Ahondar en el estudio de las modificaciones del DNA en el promotor del gen de PR.
- Validar en un modelo *in vivo* los resultados obtenidos en la línea celular.

## XV. Referencias bibliográficas

- Abdel-Hafiz, H.A. & Horwitz, K.B., 2015. Role of epigenetic modifications in luminal breast cancer. *Epigenomics*, pp.1–16.
- Amateau, S.K. et al., 2004. Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology*, 145(6), pp.2906–17.
- Antequera, F., 2003. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60(8), pp.1647–58.
- Arrieta, I. et al., 2003. Progesterone receptor gene and protein expression in the anterior preoptic area and hypothalamus of defeminized rats. *Journal of neurobiology*, 56(4), pp.338–46.
- Badia, E. et al., 2000. Long-term hydroxytamoxifen treatment of an MCF-7-derived breast cancer cell line irreversibly inhibits the expression of estrogenic genes through chromatin remodeling. *Cancer research*, 60(15), pp.4130–8.
- Bakker, J. et al., 2002. The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(20), pp.9104–9112.
- Barski, A. et al., 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), pp.823–37.
- Beato, M. & Vicent, G.P., 2012. Impact of chromatin structure and dynamics on PR signaling. The initial steps in hormonal gene regulation. *Molecular and cellular endocrinology*, 357(1-2), pp.37–42.
- Belsham, D.D. et al., 2004. Generation of a Phenotypic Array of Hypothalamic Neuronal Cell Models to Study Complex Neuroendocrine Disorders. *Endocrinology*, 145(1), pp.393–400.
- Benevolenskaya, E. V, 2007. Histone H3K4 demethylases are essential in development and differentiation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 85(4), pp.435–43.
- Bernstein, B.E. et al., 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), pp.315–26.
- Biçaku, E. et al., 2008. Selective inhibition of histone deacetylase 2 silences progesterone receptor-mediated signaling. *Cancer research*, 68(5), pp.1513–9.
- Billam, M., Sobolewski, M.D. & Davidson, N.E., 2010. Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 120(3), pp.581–92.

- Brown, S.E. et al., Variations in DNA methylation patterns during the cell cycle of HeLa cells. *Epigenetics*, 2(1), pp.54–65.
- Camacho-Arroyo, I. et al., 2003. Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 136(2), pp.447–452.
- Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A. & González-Morán, G., 2007. Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 146(4), pp.644–652.
- Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C. & Cerbón, M.A., 1998. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport*, 9(18), pp.3993–3996.
- Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A.M. & Cerbón, M.A., 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neuroscience letters*, 214(1), pp.25–8.
- Ceballos-Chávez, M. et al., 2015. The chromatin Remodeler CHD8 is required for activation of progesterone receptor-dependent enhancers. *PLoS genetics*, 11(4), p.e1005174.
- Chai, S.Y. et al., 2012. Term myometrium is characterized by increased activating epigenetic modifications at the progesterone receptor-a promoter. *Molecular Human Reproduction*, 18(8), pp.401–409.
- Chen, D. et al., 2000. Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7. *Molecular cell*, 6(1), pp.127–37.
- Correll, S.J., Schubert, M.H. & Grigoryev, S.A., 2012. Short nucleosome repeats impose rotational modulations on chromatin fibre folding. *The EMBO journal*, 31(10), pp.2416–26.
- Dalvi, P.S. et al., 2011. Immortalized neurons for the study of hypothalamic function. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 300(5), pp.R1030–R1052.
- Duplessis, T.T. et al., 2011. Phosphorylation of Estrogen Receptor  $\alpha$  at serine 118 directs recruitment of promoter complexes and gene-specific transcription. *Endocrinology*, 152(6), pp.2517–26.
- Dupont, C., Armant, D.R. & Brenner, C.A., 2009. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Seminars in reproductive medicine*, 27(5), pp.351–7.
- Felsenfeld, G., 2014. A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(1).

- Felsenfeld, G. & Groudine, M., 2003. Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), pp.448–53.
- Fitzpatrick, S.L. et al., 1999. Effect of estrogen agonists and antagonists on induction of progesterone receptor in a rat hypothalamic cell line. *Endocrinology*, 140(9), pp.3928–37.
- Foulds, C.E. et al., 2013. Proteomic analysis of coregulators bound to ER $\alpha$  on DNA and nucleosomes reveals coregulator dynamics. *Molecular cell*, 51(2), pp.185–99.
- Gagnidze, K. et al., 2013. Early histone modifications in the ventromedial hypothalamus and preoptic area following oestradiol administration. *Journal of neuroendocrinology*, 25(10), pp.939–55.
- Garcia-Bassets, I. et al., 2007. Histone Methylation-Dependent Mechanisms Impose Ligand Dependency for Gene Activation by Nuclear Receptors. *Cell*, 128(3), pp.505–518.
- Gaudet, M.M. et al., 2009. DNA hypermethylation of ESR1 and PGR in breast cancer: pathologic and epidemiologic associations. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(11), pp.3036–43.
- Gavin, D.P., Chase, K.A. & Sharma, R.P., 2013. Active DNA demethylation in post-mitotic neurons: a reason for optimism. *Neuropharmacology*, 75, pp.233–45.
- Gonzales, K.L. et al., 2012. Anatomically-specific actions of oestrogen receptor in the developing female rat brain: effects of oestradiol and selective oestrogen receptor modulators on progesterone receptor expression. *Journal of neuroendocrinology*, 24(2), pp.285–91.
- Gonzales, K.L., Tetel, M.J. & Wagner, C.K., 2008. Estrogen Receptor (ER)  $\beta$  modulates ER $\alpha$  responses to estrogens in the developing rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*, 149(9), pp.4615–4621.
- Guerra-Araiza, C. et al., 2003. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *Journal of neuroendocrinology*, 15(10), pp.984–990.
- Guerra-Araiza, C. et al., 2000. Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sciences*, 66(18), pp.1743–1752.
- Guerra-Araiza, C., Coyoy-Salgado, A. & Camacho-Arroyo, I., 2002. Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Research Bulletin*, 59(2), pp.105–109.
- Guidotti, A. et al., 2011. Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology*, 60(7-8), pp.1007–1016.
- Hagihara, K. et al., 1994. Nucleic acid sequence and DNase hypersensitive sites of the 5' region of the mouse progesterone receptor gene. *Biochemical and*

*biophysical research communications*, 205(2), pp.1093–101.

- Hansberg-Pastor, V. et al., 2013. The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines. *Steroids*, 78(5), pp.500–7.
- He, Y.-F. et al., 2011. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6047), pp.1303–7.
- Helsen, C. & Claessens, F., 2014. Looking at nuclear receptors from a new angle. *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), pp.97–106.
- Hill, K.K. et al., 2012. Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(2), pp.418–429.
- Ingrosso, D. & Perna, A.F., 2009. Epigenetics in hyperhomocysteinemic states. A special focus on uremia. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(9), pp.892–9.
- Iqbal, K. et al., 2011. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(9), pp.3642–3647.
- Jacobsen, B.M. & Horwitz, K.B., 2012. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Molecular and cellular endocrinology*, 357(1-2), pp.18–29.
- Kangaspeska, S. et al., 2008. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature*, 452(7183), pp.112–5.
- Kastner, P. et al., 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO journal*, 9(5), pp.1603–1614.
- Kent, W.J. et al., 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome research*, 12(6), pp.996–1006.
- Khan, S. et al., 2007. Role of specificity protein transcription factors in estrogen-induced gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of molecular endocrinology*, 39(4), pp.289–304.
- Kinney, S.M. et al., 2011. Tissue-specific distribution and dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in mammalian genomes. *The Journal of biological chemistry*, 286(28), pp.24685–93.
- Klose, R.J. & Zhang, Y., 2007. Regulation of histone methylation by demethyliminination and demethylation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(4), pp.307–18.
- Konermann, S. et al., 2013. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 500(7463), pp.472–6.

- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), pp.693–705.
- Kraus, W.L., Montano, M.M. & Katzenellenbogen, B.S., 1993. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 7(12), pp.1603–1616.
- Kress, C., Thomassin, H. & Grange, T., 2006. Active cytosine demethylation triggered by a nuclear receptor involves DNA strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), pp.11112–7.
- Kroeze, L.I., van der Reijden, B.A. & Jansen, J.H., 2015. 5-hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1855(2), pp.144–154.
- Kuo, J. et al., 2010. Sex differences in hypothalamic astrocyte response to estradiol stimulation. *Biology of sex differences*, 1(1), p.7.
- Lander, E.S. et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), pp.860–921.
- Lange, C.A., Shen, T. & Horwitz, K.B., 2000. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), pp.1032–7.
- Lee, B. et al., 2012. GADD45 $\alpha$  inhibition of DNMT1 dependent DNA methylation during homology directed DNA repair. *Nucleic acids research*, 40(6), pp.2481–93.
- Lenz, K.M., Nugent, B.M. & McCarthy, M.M., 2012. Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond. *Frontiers in neuroscience*, 6, p.26.
- Leu, Y.W. et al., 2004. Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer. *Cancer Research*, 64(22), pp.8184–8192.
- Li, X. et al., 2014. Decreased DNA Methylations at the Progesterone Receptor Promoter A Induce Functional Progesterone Withdrawal in Human Parturition. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 21(7), pp.898–905.
- Lindner, R. et al., 2014. DNA methylation temporal profiling following peripheral versus central nervous system axotomy. *Scientific data*, 1, p.140038.
- Liu, B. & Arbogast, L. a., 2009. Gene expression profiles of intracellular and membrane progesterone receptor isoforms in the mediobasal hypothalamus during pro-oestrus. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(12), pp.993–1000.
- Lonstein, J.S., Quadros, P.S. & Wagner, C.K., 2001. Effects of neonatal RU486 on adult sexual, parental, and fearful behaviors in rats. *Behavioral neuroscience*, 115(1), pp.58–70.



- Materne, P. et al., 2015. Promoter nucleosome dynamics regulated by signalling through the CTD code. *eLife*, 4, p.e09008.
- Matsuda, K.I. et al., 2011. Histone deacetylation during brain development is essential for permanent masculinization of sexual behavior. *Endocrinology*, 152(7), pp.2760–7.
- Mendoza-Garcés, L. et al., 2013. Differential DNA methylation pattern in the A and B promoters of the progesterone receptor is associated with differential mRNA expression in the female rat hypothalamus during proestrus. *Brain Research*, 1535, pp.71–77.
- Mendoza-Garcés, L., Camacho-Arroyo, I. & Cerbón, M.A., 2010. Effects of mating on progesterone receptor isoforms in rat hypothalamus. *Neuroreport*, 21(7), pp.513–516.
- Métivier, R. et al., 2003. Estrogen receptor- $\alpha$  directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, 115(6), pp.751–63.
- Meyer, J.L. et al., 2014. DNA methylation patterns of steroid receptor genes ESR1, ESR2 and PGR in deep endometriosis compromising the rectum. *International journal of molecular medicine*, 33(4), pp.897–904.
- Mirza, S. et al., 2007. Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ER $\alpha$  and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life sciences*, 81(4), pp.280–7.
- Musselman, C.A. et al., 2012. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nature structural & molecular biology*, 19(12), pp.1218–27.
- Nestor, C.E. & Meehan, R.R., 2014. Hydroxymethylated DNA immunoprecipitation (hmeDIP). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1094, pp.259–67.
- Niehrs, C., 2009. Active DNA demethylation and DNA repair. *Differentiation*, 77(1), pp.1–11.
- O'Malley, B.W., Sherman, M.R. & Toft, D.O., 1970. Progesterone “receptors” in the cytoplasm and nucleus of chick oviduct target tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 67(2), pp.501–8.
- Oñate, S.A. et al., 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5240), pp.1354–7.
- Patel, B. et al., 2015. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Human reproduction update*, 21(2), pp.155–73.
- Pathiraja, T.N. et al., 2011. Progesterone receptor isoform-specific promoter methylation: Association of PRA promoter methylation with worse outcome in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 17(12), pp.4177–4186.

- Perillo, B. et al., 2008. DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5860), pp.202–6.
- Petz, L.N. et al., 2004. Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 88(2), pp.113–122.
- Petz, L.N. et al., 2002. Estrogen receptor  $\alpha$  and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*, 143(12), pp.4583–4591.
- Privalsky, M.L., 2004. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annual review of physiology*, 66, pp.315–60.
- Quadros, P.S., Goldstein, a. Y.N., et al., 2002. Regulation of sex differences in progesterone receptor expression in the medial preoptic nucleus of postnatal rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 14(10), pp.761–767.
- Quadros, P.S., Pfau, J.L., et al., 2002. Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology*, 143(10), pp.3727–39.
- Quadros, P.S., Pfau, J.L. & Wagner, C.K., 2007. Distribution of progesterone receptor immunoreactivity in the fetal and neonatal rat forebrain. *The Journal of comparative neurology*, 504(1), pp.42–56.
- Quadros, P.S. & Wagner, C.K., 2008. Regulation of progesterone receptor expression by estradiol is dependent on age, sex and region in the rat brain. *Endocrinology*, 149(6), pp.3054–3061.
- Ren, Y. et al., 2007. Down-regulation of the progesterone receptor by the methylation of progesterone receptor gene in endometrial cancer cells. *Cancer genetics and cytogenetics*, 175(2), pp.107–16.
- Richer, J.K. et al., 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), pp.5209–5218.
- Rosenfeld, M.G., Lunyak, V. V & Glass, C.K., 2006. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes & development*, 20(11), pp.1405–28.
- Rothbart, S.B. & Strahl, B.D., 2014. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et biophysica acta*, 1839(8), pp.627–43.
- Sá, S.I. et al., 2015. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  have different roles in the induction and trafficking of progesterone receptors in hypothalamic ventromedial neurons. *The FEBS journal*, 282(6), pp.1126–36.
- Sá, S.I. et al., 2013. Role of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in the induction of progesterone receptors in hypothalamic ventromedial neurons. *Neuroscience*,

238(March), pp.159–167.

- Sanchez, R. & Zhou, M.-M., 2009. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Current opinion in drug discovery & development*, 12(5), pp.659–65.
- Sasaki, M. et al., 2001. Progesterone receptor B gene inactivation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer. *Cancer research*, 61(1), pp.97–102.
- Saxonov, S., Berg, P. & Brutlag, D.L., 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), pp.1412–1417.
- Schultz, J.R., Petz, L.N. & Nardulli, A.M., 2003. Estrogen receptor  $\alpha$  and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 201(1-2), pp.165–175.
- Schwarz, J.M., Nugent, B.M. & McCarthy, M.M., 2010. Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology*, 151(10), pp.4871–81.
- Scott, R.E.M., Wu-Peng, X.S. & Pfaff, D.W., 2002. Regulation and expression of progesterone receptor mRNA isoforms A and B in the male and female rat hypothalamus and pituitary following oestrogen treatment. *Journal of neuroendocrinology*, 14(3), pp.175–83.
- Shovlin, T.C. et al., 2008. Heterogeneity in imprinted methylation patterns of pluripotent embryonic germ cells derived from pre-migratory mouse germ cells. *Developmental biology*, 313(2), pp.674–81.
- Siegfried, Z. & Cedar, H., 1997. DNA methylation: a molecular lock. *Current biology : CB*, 7(5), pp.R305–7.
- Spiteri, T. et al., 2010. Estrogen-induced sexual incentive motivation, proceptivity and receptivity depend on a functional estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of the hypothalamus but not in the amygdala. *Neuroendocrinology*, 91(2), pp.142–54.
- Stratmann, A. & Haendler, B., 2011. The histone demethylase JARID1A regulates progesterone receptor expression. *FEBS Journal*, 278(9), pp.1458–1469.
- Szabo, M. et al., 2000. Progesterone receptor A and B messenger ribonucleic acid levels in the anterior pituitary of rats are regulated by estrogen. *Biology of reproduction*, 62(1), pp.95–102.
- Tang, M. et al., 2002. Progesterone receptor activates its promoter activity in human endometrial stromal cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 192(1-2), pp.45–53.
- Taverna, S.D. et al., 2007. How chromatin-binding modules interpret histone

- modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature structural & molecular biology*, 14(11), pp.1025–40.
- Vegeto, E. et al., 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 7(10), pp.1244–1255.
- Vicent, G.P. et al., 2013. Unliganded progesterone receptor-mediated targeting of an RNA-containing repressive complex silences a subset of hormone-inducible genes. *Genes & development*, 27(10), pp.1179–97.
- Villamar-Cruz, O. et al., 2006. Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Research Bulletin*, 69(3), pp.276–281.
- Wagner, C.K., 2008. Minireview: Progesterone receptors and neural development: A gap between bench and bedside? *Endocrinology*, 149(6), pp.2743–2749.
- Wagner, C.K., Nakayama, A.Y. & De Vries, G.J., 1998. Potential role of maternal progesterone in the sexual differentiation of the brain. *Endocrinology*, 139(8), pp.3658–61.
- Walton, T.J. et al., 2008. DNA demethylation and histone deacetylation inhibition co-operate to re-express estrogen receptor beta and induce apoptosis in prostate cancer cell-lines. *The Prostate*, 68(2), pp.210–22.
- Weber, M. et al., 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics*, 39(4), pp.457–66.
- White, M.M. et al., 2007. Hypothalamic progesterone receptor-A mediates gonadotropin surges, self priming and receptivity in estrogen-primed female mice. *Journal of Molecular Endocrinology*, 38(1-2), pp.35–50.
- Wiench, M., Miranda, T.B. & Hager, G.L., 2011. Control of nuclear receptor function by local chromatin structure. *FEBS Journal*, 278(13), pp.2211–2230.
- Won Jeong, K. et al., 2012. Gene-specific patterns of coregulator requirements by estrogen receptor- $\alpha$  in breast cancer cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 26(6), pp.955–66.
- Xu, X. et al., 2004. Transcription factor accessibility and histone acetylation of the progesterone receptor gene differs between parental MCF-7 cells and a subline that has lost progesterone receptor expression. *Gene*, 328(1-2), pp.143–151.
- Yang, H.-C. et al., 2014. Pin1-mediated Sp1 phosphorylation by CDK1 increases Sp1 stability and decreases its DNA-binding activity during mitosis. *Nucleic Acids Research*, 42(22), pp.13573–13587.
- Yilmaz, M.B. et al., 2009. Aromatase promoter I.f is regulated by estrogen receptor alpha (ESR1) in mouse hypothalamic neuronal cell lines. *Biology of*

*reproduction*, 81(5), pp.956–965.

Yilmaz, M.B. et al., 2011. Aromatase promoter 1.f is regulated by progesterone receptor in mouse hypothalamic neuronal cell lines. *Journal of molecular endocrinology*, 47(1), pp.69–80.

Younger, S.T. & Corey, D.R., 2011. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucleic acids research*, 39(13), pp.5682–91.

Yu, W. et al., 2011. Global analysis of DNA methylation by Methyl-Capture sequencing reveals epigenetic control of cisplatin resistance in ovarian cancer cell. *PloS one*, 6(12), p.e29450.

## XVI. Anexos

Artículos publicados relacionados con el trabajo de investigación.

1. Vázquez-Martínez, E.R., Camacho-Arroyo, I., Zarain-Herzberg, A., Rodríguez, M.C., Mendoza-Garcés, L., Ostrosky-Wegman, P. & Cerbón, M., 2015. Estradiol differentially induces progesterone receptor isoforms expression through alternative promoter regulation in a mouse embryonic hypothalamic cell line. *Endocrine*, En Prensa.
2. Vázquez-Martínez, E.R., Mendoza-Garcés, L., Vergara-Castañeda, E. & Cerbón, M., 2014. Epigenetic regulation of Progesterone Receptor isoforms: from classical models to the sexual brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 392(1-2), pp.115-24.
3. Mendoza-Garcés, L., Rodríguez-Dorantes, M., Alvarez-Delgado, C., Vázquez-Martínez, E.R., Garcia-Tobilla, P. & Cerbón, M.A., 2013. Differential DNA methylation pattern in the A and B promoters of the progesterone receptor is associated with differential mRNA expression in the female rat hypothalamus during proestrus. *Brain Research*, 1535, pp.71-7.

# Estradiol differentially induces progesterone receptor isoforms expression through alternative promoter regulation in a mouse embryonic hypothalamic cell line

Edgar Ricardo Vázquez-Martínez<sup>1</sup> · Ignacio Camacho-Arroyo<sup>1</sup> · Angel Zarain-Herzberg<sup>2</sup> · María Carmen Rodríguez<sup>3</sup> · Luciano Mendoza-Garcés<sup>4</sup> · Patricia Ostrosky-Wegman<sup>5</sup> · Marco Cerbón<sup>1</sup>

Received: 5 August 2015 / Accepted: 29 November 2015  
© Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** Progesterone receptor (PR) presents two main isoforms (PR-A and PR-B) that are regulated by two specific promoters and transcribed from alternative transcriptional start sites. The molecular regulation of PR isoforms expression in embryonic hypothalamus is poorly understood. The aim of the present study was to assess estradiol regulation of PR isoforms in a mouse embryonic hypothalamic cell line (mHypoE-N42), as well as the transcriptional status of their promoters. MHypoE-N42 cells were treated with estradiol for 6 and 12 h. Then, Western blot, real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, and chromatin and DNA immunoprecipitation experiments were performed. PR-B expression was transiently induced by estradiol after 6 h of treatment in an estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ )-dependent manner. This induction was associated with an increase in ER $\alpha$  phosphorylation (serine 118) and its recruitment to PR-B promoter. After 12 h of estradiol exposure, a

downregulation of this PR isoform was associated with a decrease of specific protein 1, histone 3 lysine 4 trimethylation, and RNA polymerase II occupancy on PR-B promoter, without changes in DNA methylation and hydroxymethylation. In contrast, there were no estradiol-dependent changes in PR-A expression that could be related with the epigenetic marks or the transcription factors evaluated. We demonstrate that PR isoforms are differentially regulated by estradiol and that the induction of PR-B expression is associated to specific transcription factors interactions and epigenetic changes in its promoter in embryonic hypothalamic cells.

**Keywords** Progesterone receptor isoforms · Estradiol · Epigenetic marks · Transcription factors · Hypothalamus · Histone acetylation

## Introduction

Progesterone receptor (PR) is a member of the nuclear receptor superfamily that regulates several reproductive and nonreproductive functions [1]. PR gene encodes two main isoforms, PR-A and PR-B, whose transcription is regulated by two specific promoters and alternative transcription start sites (TSS) [2]. PR-A differs from PR-B by lacking 164 amino acids at the amino terminus of the protein. PR-A usually functions as a transcriptional inhibitor of PR-B-regulated genes [3]. However, it has been also demonstrated that both PR isoforms act as transcriptional activators of different target genes in the same cell line [4]. Therefore, it has been proposed that PR function results from the counterbalancing proportion of both isoforms when they are expressed in the same cell type [5, 6]. It has been reported that there is a specific variation in PR

✉ Marco Cerbón  
mcerbon85@yahoo.com.mx

<sup>1</sup> Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, Coyoacán, 04510 Mexico, DF, Mexico

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico, Mexico

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Salud Pública, SSA, Cuernavaca, Mexico

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Geriátría, SSA, Cuernavaca, DF, Mexico

<sup>5</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico, Mexico

isoforms expression during the estrous cycle and under estradiol and progesterone treatments in the rodent hypothalamus. Particularly, PR-B isoform is induced by estradiol to a greater extent than PR-A in the hypothalamus and preoptic area of the female rat, and this differential regulation has been associated with the display of sexual behavior [7–12]. It has been reported that the expression of PR-A is higher than that of PR-B in the immortalized rat embryonic hypothalamic cell line, D12, and that the expression of both PR isoforms was induced by estradiol [13]. Moreover, it has been demonstrated that PR expression regulation by estradiol is sexually dimorphic during development in several brain regions, particularly in those that control sexual differentiation and reproductive behavior during adulthood, such as medial preoptic nucleus and the ventromedial nucleus of hypothalamus [14–16].

Expression of PR isoforms is mainly regulated by estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ), despite the lack of consensus estrogen responsive elements (ERE) in the PR gene promoter [17]. ER $\alpha$  is recruited to the PR gene promoter through interactions with specific protein 1 (SP1) and activator protein-1 (AP1) in MCF7 cells [18, 19]. In turn, ER $\alpha$  recruits transcriptional coregulators that induce changes in chromatin in order to activate transcription [20]. Moreover, both DNA methylation and chromatin basal states in the PR promoter region also influence the expression of PR isoforms, highlighting the importance of epigenetic processes in the regulation of this gene [21, 22]. We recently reported a transient and differential DNA methylation pattern of PR gene isoform promoters during the evening of proestrus in rat hypothalamus [10]. It has also been reported that estradiol induced a differential DNA methylation pattern of PR-A promoter in the mediobasal hypothalamus of developing rats [23].

It has been described a specific and a transient induction pattern of transcriptionally active and repressive histone marks in mouse hypothalamus after 6 h of estradiol treatment [24]. Furthermore, the authors found a specific enrichment of H3Ac and H3K4me3 histone marks on four different regions upstream of the TSS of PR-A which included PR-A promoter and other three regions near PR-A and PR-B promoters. Interestingly, this histone marks enrichment was dependent on the estradiol exposure time and the hypothalamic region. The authors also reported that ER $\alpha$  was not recruited on any of the four PR gene studied regions [24].

Although the regulation of PR isoforms expression by estradiol has been extensively reported in adult hypothalamic cells, there is lacking information about their regulation in embryonic hypothalamic cells, as well as the molecular mechanisms involved in such regulation. In this study, we used the estradiol responsive mHypoE-N42 mouse embryonic hypothalamic cell line as a model for

exploring PR isoforms regulation [25]. This cell line expresses PR-A and PR-B, and it has been previously used for analyzing the transcriptional regulation of the aromatase gene by estradiol [26].

The aim of this study was to assess the regulation of PR isoforms expression by estradiol in the mHypoE-N42 cell line, as well as the epigenetic changes and interaction of transcription factors on PR-A and PR-B promoters associated to such regulation.

## Materials and methods

### Cell culture and treatments

Mouse hypothalamic mHypoE-N42 cells were purchased from Cellutions Biosystems<sup>®</sup> (Toronto, Canada) and are derived from mouse embryonic hypothalamic primary cultures (from days 15, 17, and 18) although the sex of embryos was not determined. Cells were maintained in high-glucose DMEM medium (Life Technologies<sup>®</sup>, California, USA) supplemented with 10 % of fetal bovine serum (FBS). Cells were used for experiments at passages 24–26. Before treatments,  $2 \times 10^6$  cells were maintained in DMEM medium without phenol red and charcoal-stripped FBS until they reached a confluence of 80–90 %, and then cells were serum starved in the same medium overnight. Cells were treated with different concentrations of estradiol (Sigma<sup>®</sup>, Missouri, USA) or 0.002 % of ethanol (vehicle) for 6 and 12 h. In order to confirm that the estradiol regulation of gene expression was mediated by ER $\alpha$  and not by other estrogen receptor subtypes, the effect of a highly selective ER $\alpha$  antagonist, 1,3-bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinyloxy)phenol]-1H-pyrazole dihydrochloride (MPP, Tocris Bioscience, Bristol, UK), was evaluated. 5 nM of MPP was administered alone or in combination with 100 nM of estradiol. Subsequent methodological approaches and the corresponding experiments were performed from whole cell preparations.

### RNA isolation and real-time RT-qPCR

Total RNA was isolated with TRIzol<sup>®</sup> reagent (Life Technologies<sup>®</sup>, California, USA) and RT-qPCR was carried out using the SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix<sup>®</sup> (Life Technologies<sup>®</sup>, California, USA), as specified by the distributor. Total RNA isolated was quantified by the Quant-iT<sup>®</sup> RiboGreen<sup>®</sup> RNA Assay Kit (Life Technologies<sup>®</sup>, California, USA). 100 ng of cDNA were amplified using the 7500 real-time PCR system (Life Technologies<sup>®</sup>, California, USA). 1  $\mu$ l of RT reaction was subjected to PCR in order to simultaneously amplify a gene



fragment of PR-B isoform, total PR (PR-B + PR-A), and GAPDH. This was used as an internal control and was obtained from Life Technologies<sup>®</sup>, California, USA (Assay ID: Mm99999915\_g1). The sequences of the specific primers and probes for PR-B and total PR amplifications are depicted in Table 1. Negative controls without cDNA and with non-retrotranscribed RNA were included in all the experiments. All PCR products were always studied and analyzed together throughout the experiments. In order to obtain the relative quantification by the  $\Delta\Delta C_t$  method, TaqMan<sup>®</sup> probes (Life Technologies<sup>®</sup>, California, USA) were used as the detection system. Master Mix and TaqMan<sup>®</sup> assays were used at 1X. Cycling conditions were followed as specified by the distributor, with the exception of PR-B (50 °C for 2 min; 95 °C for 10 min; 50 cycles of 95 °C for 30 s and 64 °C for 3 min). PR-A expression levels were calculated by subtracting total PR minus PR-B expression levels. All assays produced a single PCR product at the molecular weight expected, as confirmed using 2 % agarose gels stained with GelRed<sup>®</sup> (Biotium<sup>®</sup>, USA).

### Western blot

Cells were homogenized in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % v/v NP40, 0.25 % w/v sodium deoxycholate) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche, Basel, Switzerland). Proteins were obtained by centrifugation at 12,500 rpm at 4 °C for 30 min and quantified by the Bradford method (BioRad, California, USA). Proteins (40 µg) were separated by denaturing electrophoresis in a 7.5 % polyacrylamide gel at 95 V. Gels were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Massachusetts, USA) by semidry transfer (BioRad, California, USA). Membranes were blocked with 10 % w/v nonfat dry milk and 0.1 % v/v Tween-20 at room temperature for 30 min. Membranes

were incubated with primary antibodies against PR, S118 phosphorylation of ER $\alpha$  and SP1 (Santa Cruz, Texas, USA) at 4 °C overnight. The respective secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase were incubated at room temperature for 1 h. Membranes were stripped with glycine (25 mM, pH 2.5; 1 % w/v SDS) at room temperature for 30 min and reprobed with the ER $\alpha$  and GAPDH primary antibodies (Santa Cruz, Texas, USA) as previously mentioned. Proteins were detected by chemiluminescence with the ECL kit (Amersham Piscataway, USA) and analyzed by densitometry using the Vision Works LS Software (UVP<sup>®</sup>, USA).

### Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Chromatin immunoprecipitation was carried out as previously described [26], with minor modifications. Briefly, treated cells were incubated with 1 % w/v of formaldehyde for 10 min and with 125 mM of glycine for 5 min. Cells were harvested and homogenized in a lysis buffer (1 % w/v SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8) containing a protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Chromatin shearing was performed in a Vibra Cell<sup>®</sup> sonicator (Sonics, Connecticut, USA) by 6 pulses of 10 s ON, 60 s OFF at 75 % amplitude, to obtain DNA fragments with a modal size of 1000 bp, which was confirmed by a 2 % w/v agarose gel stained with GelRed<sup>®</sup> (Biotium<sup>®</sup>, USA). 25 µg of chromatin were diluted 1:10 with buffer containing protease inhibitor cocktail. Precleared chromatin was incubated at 4 °C overnight with 2–5 µg of antibodies against H3K9ac, H3K4me3, H3K9me2, and RNA Pol II (Abcam<sup>®</sup>, Cambridge, UK), ER $\alpha$ , and SP1 (Santa Cruz, TX, USA). The immune complexes were incubated with protein A/G agarose (Santa Cruz, TX, USA) in agitation at 4 °C for 1 h. The immunoprecipitated products were washed with low salt wash buffer, high

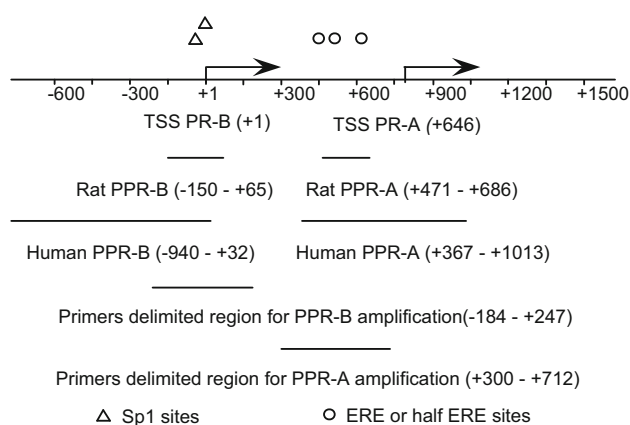
**Table 1** Primers and probes used for real-time PCR assays

Target	Sequence (5'–3')	Detection	Application
PR-B	Forward-CAGCACCGGCCACACCAGTT	TaqMan <sup>®</sup>	Gene expression
	Reverse-CCAAGCGTGCAAGCAAGGGG		
	Probe-ACACGTCTGGCGCTTCGCCCTCCCC		
Total PR	Forward-ATTCTACTCGCTGTGCCTTACC	TaqMan <sup>®</sup>	Gene expression
	Reverse-CATGGGTACACTGGAGTTTGA		
	Probe-ATGTGGCAAATCCC		
PR-B promoter	Forward-GGTGGGCTGGCATGCTTCT	TaqMan <sup>®</sup>	ChIP
	Reverse-ACTCCCGCTATCTCCGACTTCT		
	Probe-TGGGCGGGCTTCCTAGAGCGCCA		
PR-A promoter	Forward-CAGCACCGGCCACACCAGTT	TaqMan <sup>®</sup>	ChIP
	Reverse-CCAAGCGTGCAAGCAAGGGG		
	Probe-ACACGTCTGGCGCTTCGCCCTCCCC		

salt wash buffer, lithium chloride wash buffer, and TE buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). The complexes were eluted twice with elution buffer (1 % w/v SDS, 100 mM NaHCO<sub>3</sub>) for 15 min at room temperature. Samples obtained were incubated with RNase A solution (Promega, Wisconsin, USA) for 30 min at 37 °C. Reverse crosslinking was performed by incubating with Proteinase K (Roche, Basel, Switzerland) at 55 °C overnight and then with NaCl (5 M) for 6 h at 65 °C. The enriched genomic DNA was purified with the Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA). The purified products were amplified using the 7500 real-time PCR system (Life Technologies<sup>®</sup>, California, USA) to obtain the fold enrichment of each immunoprecipitated sample. TaqMan<sup>®</sup> probes (Life Technologies<sup>®</sup>, California, USA) were used for detection. TaqMan<sup>®</sup> assays were designed using Primer3 software in order to amplify the promoter regions of both PR isoforms according to previous studies and databases [2, 17, 27, 28] (Fig. 1). Cycling conditions were the following: 50 °C for 2 min; 95 °C for 10 min; 50 cycles of 95 °C for 30 s and 64 °C for 3 min. Normalization was carried out using the input sample (1 % v/v of diluted chromatin). Primers and probe used for PR isoform promoters are shown in Table 1. Both assays produced a single PCR product at the molecular weight expected, as confirmed using a 2 % w/v agarose gel stained with GelRed<sup>®</sup> (Biotium<sup>®</sup>, USA).

### Methylated and hydroxymethylated DNA immunoprecipitation

Immunoprecipitation of methylated and hydroxymethylated DNA was performed as previously reported [29, 30]



**Fig. 1** Schematic representation of PR gene promoters of *Mus musculus*. Promoter regions and primers delimited regions for PCR amplification are represented. TSS transcription start site, PPR-B PR-B isoform promoter region, PPR-A PR-A isoform promoter region, ERE estrogen responsive element. SP1 sites are represented by triangles, ERE or half ERE sites are represented by circles

with minor modifications. Briefly, genomic DNA was extracted from mHypoE-N42 cells using the Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA purification kit (Promega, Wisconsin, USA). 15 µg of genomic DNA were fragmented in a Vibra Cell<sup>®</sup> sonicator by 6 pulses of 10 s ON, 60 s OFF at 40 % amplitude, to obtain DNA fragments with a modal size of 1000 bp, confirmed by a 1.5 % w/v agarose gel stained with GelRed<sup>®</sup> (Biotium<sup>®</sup>, USA). 2.5 µg of sonicated DNA was diluted in TE buffer and denatured for 10 min at 100 °C, followed by snap-chilling samples on wet ice. 10 % v/v of sample was transferred on a clean tube for the input. Diluted DNA was incubated with immunoprecipitation buffer (10 mM Na-phosphate, 140 mM NaCl, 0.05 % v/v Triton X-100) and 1 µg of anti-methylcytosine or anti-hydroxymethylcytosine antibodies (Zymo<sup>®</sup>, California, USA) at 4 °C overnight on a rotating wheel. Collection and washing of the immune complexes were performed as described for ChIP. To release the DNA from the beads, samples were incubated with digestion buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5 % w/v SDS) and Proteinase K overnight at 55 °C in agitation. DNA purification and real-time PCR were performed as described for ChIP.

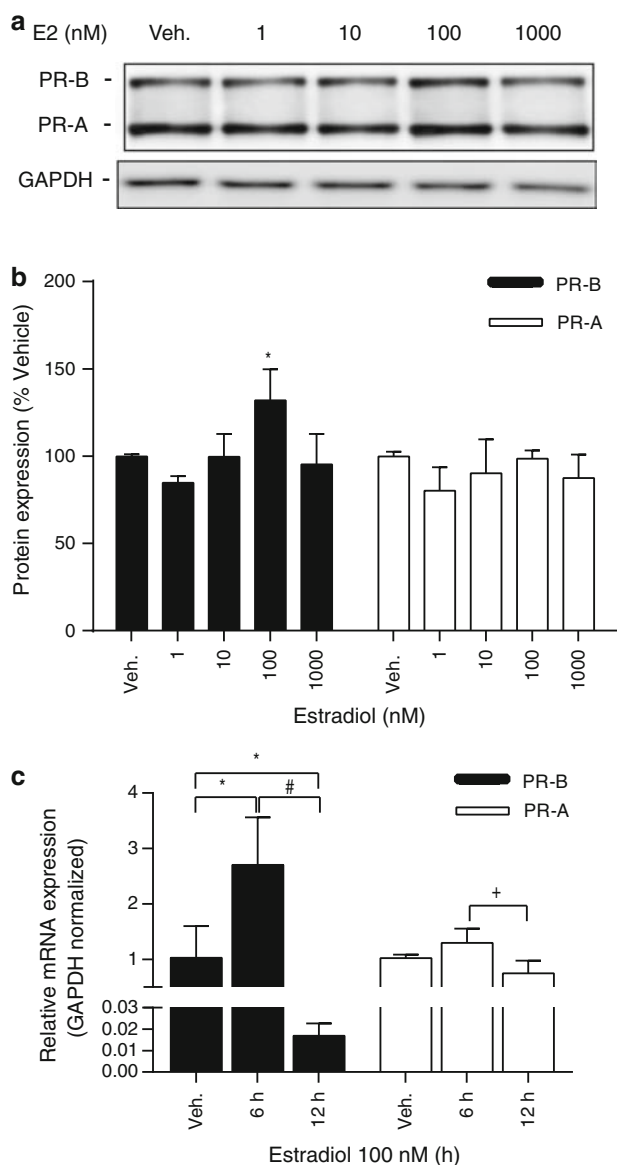
### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Graph Pad Prism<sup>®</sup> 6 software (Graph Pad software, USA). Experimental data are presented as mean with standard deviation from three or more independent experiments. One way ANOVA tests were performed in all data followed by Tukey post hoc test. Statistical differences were considered when  $P < 0.05$ .

## Results

### Regulation of PR isoforms expression in mHypoE-N42 cells

A series of experiments was performed to assess the effects of estradiol in both PR-A and PR-B expression in mHypoE-N42 cells. An estradiol dose–response curve was performed after 6 h of treatment, and a significant induction of PR-B protein content with 100 nM of estradiol was observed by Western blot (Fig. 2a, b). PR-A was identified as the predominant isoform (Fig. 2a). The regulation of PR isoforms expression by estradiol at mRNA level was assessed by RT-qPCR. A significant induction of PR-B mRNA expression after 6 h of treatment was followed by a marked decrease after 12 h (Fig. 2c). No significant changes in PR-A mRNA expression after estradiol



**Fig. 2** Estradiol differentially regulates PR isoforms expression in the mHypoE-N42 cell line. Cells were treated as specified in the “Materials and methods” section and then total protein or RNA were extracted. PR isoforms expression was normalized using GAPDH. Transcripts relative expression of PR-B and PR-A was calculated by the  $\Delta\Delta C_t$  method, and data were normalized using GAPDH gene as endogenous control. **a** and **b** Western blot analysis of PR isoforms content after 6 h of estradiol treatment. **c** PR isoforms relative mRNA expression after 6 and 12 h of estradiol (100 nM) and vehicle (ethanol 0.02 %) treatments. Significant differences between vehicle treatments at 6 and 12 h were not observed (data not shown). Data are expressed as mean  $\pm$  SD of four independent replicates. Veh vehicle, E2 estradiol. \* $P < 0.05$  versus Veh.; # $P < 0.01$  versus 6 h; + $P < 0.05$  versus 6 h

treatments were detected as compared to vehicle, although a decrease in PR-A mRNA expression after 12 h of estradiol treatment as compared with hormone treatment after 6 h was observed.

### Estradiol regulates the expression and phosphorylation of ER $\alpha$ and SP1 transcription factors

The expression and phosphorylation of ER $\alpha$  and SP1, two main transcription factors that regulate PR gene expression [17, 19, 31], were assessed by Western blot (Fig. 3a). An increase in ER $\alpha$  expression was observed after 12 h of estradiol treatment, while SP1 expression was increased at 6 h. In order to determine the functional status of these transcription factors, ER $\alpha$  (Ser118) and SP1 (total) phosphorylation was analyzed. Higher levels of Ser118 phosphorylation were found after 6 h of estradiol treatment as compared to vehicle and 12 h of estradiol treatment (Fig. 3a, b). An increase in the total phosphorylation levels of SP1 was found after 12 h of estradiol treatment (Fig. 3a, c).

As expected, treatment with the highly selective ER $\alpha$  antagonist (MPP) blocked the estradiol-dependent induction of PR-B protein content, without affecting PR-A protein content (Fig. 3d, e).

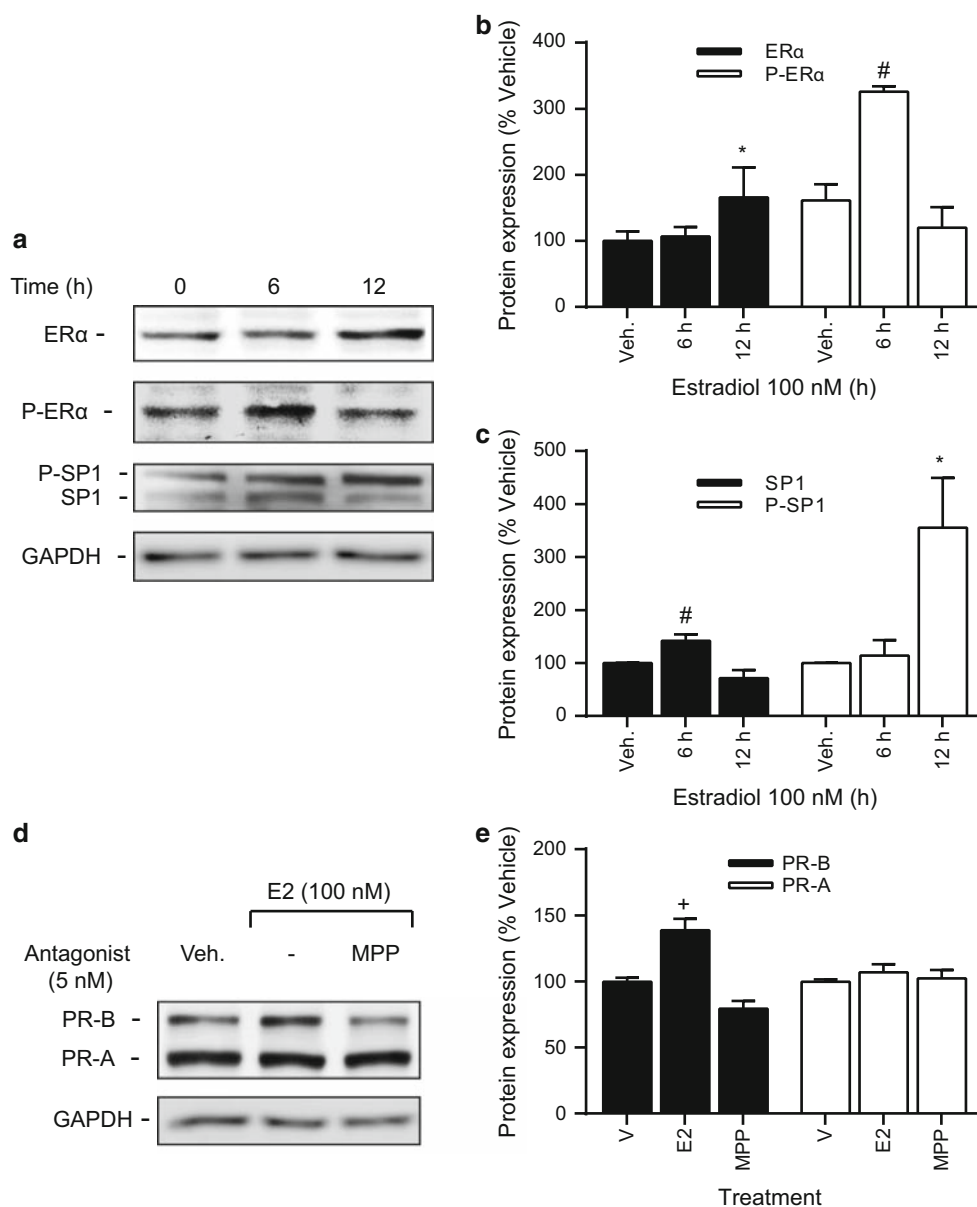
### Estradiol induces a differential occupancy of estrogen-related transcription factors and RNA pol II on PR isoform promoters

The local estradiol effects on both PR isoform promoters were assessed by ChIP. The recruitment of specific transcription factors of estrogen signaling (ER $\alpha$  and SP1) and RNA pol II was assessed after estradiol treatments (Fig. 4). RNA pol II was differentially recruited at PR-B promoter after 6 and 12 h of estradiol treatments (Fig. 4a). However, a significant difference between the 6 h of estradiol and vehicle treatments was not observed, but a significant decrease occurred at 12 h (Fig. 4a). In contrast, RNA pol II did not show a differential occupancy on PR-A promoter at any of the studied conditions (Fig. 4b).

SP1 occupancy was detected on PR-B promoter after vehicle and 6 h of estradiol treatment, but it was not detected after 12 h of estradiol treatment (Fig. 4a). On the other hand, SP1 and ER $\alpha$  occupancy on PR-A promoter was very low at all the studied conditions, and it was not statistically different from the negative control of ChIP assay (Fig. 4b and data not shown). Interestingly, ER $\alpha$  was only recruited on PR-B promoter after 6 h of estradiol treatment (Fig. 4a).

### Estradiol induces a specific enrichment of active and repressive histone marks on PR isoform promoters

In order to determine the epigenetic status of both PR isoform promoters after estradiol treatments, the analysis of



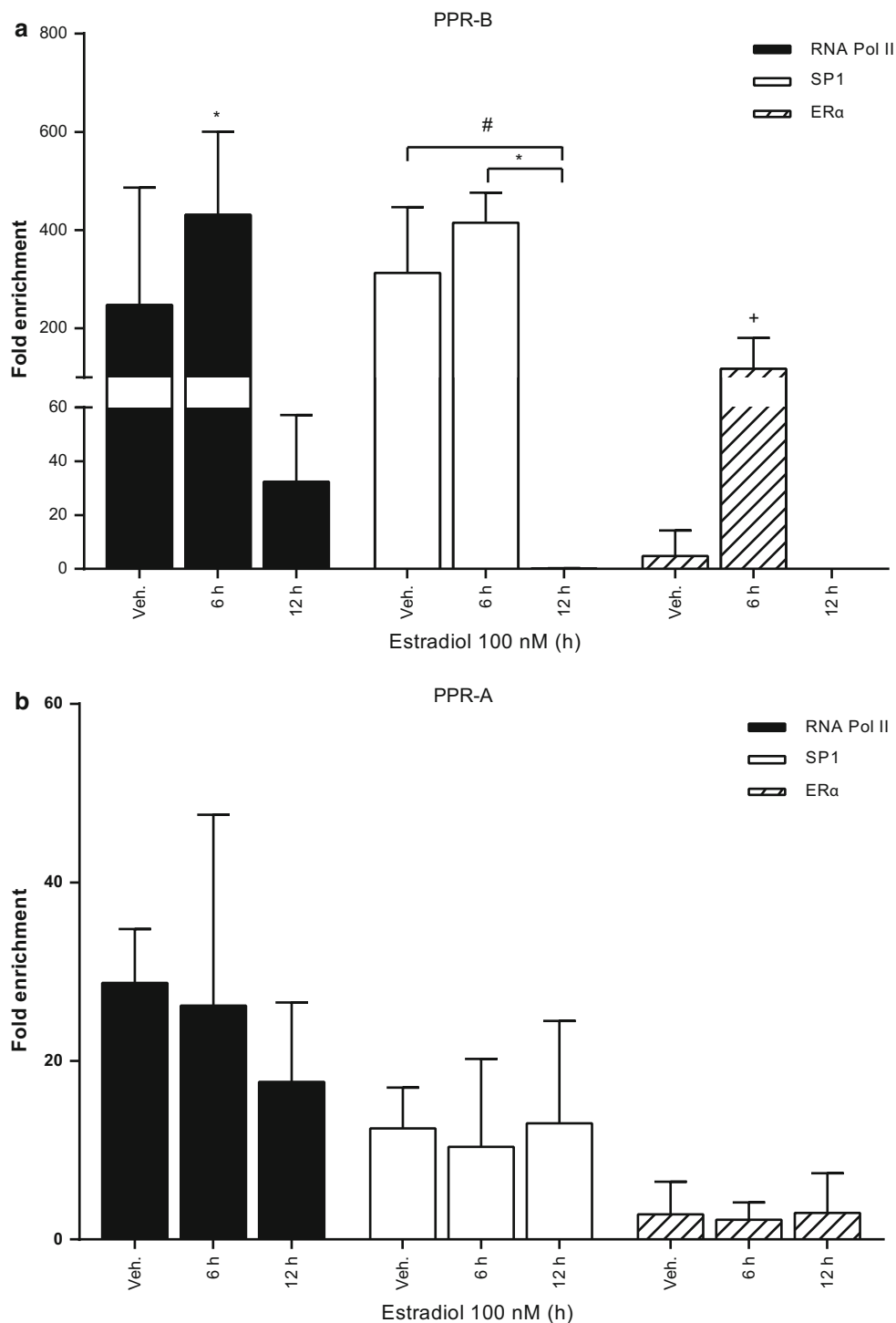
**Fig. 3** Regulation of estrogen-related transcription factors expression by estradiol in the mHypoE-N42 cell line. Cells were treated with estradiol (100 nM) or vehicle (ethanol 0.02 %) for 6 and 12 h. Proteins obtained were analyzed by Western blot. Data were normalized using GAPDH as loading control. Significant differences between vehicle treatments at 6 and 12 h were not observed in any of the studied proteins (data not shown). **a** Representative Western blots of ER $\alpha$ , phosphorylated ER $\alpha$  (Ser 118), SP1 and phosphorylated SP1 (total), and GAPDH at the studied conditions. Densitometric analysis of **b** ER $\alpha$  and phosphorylated ER $\alpha$  and **c** SP1 and phosphorylated

SP1. Levels are expressed as percent of the vehicle (mean  $\pm$  SD of three to six independent replicates). Phosphorylated ER $\alpha$  and SP1 expression levels were normalized using the total levels of each protein. **d** and **e** Blocking of the estradiol-dependent induction of PR-B by the ER $\alpha$  selective antagonist, MPP, expressed as percent of the vehicle (mean  $\pm$  SD of three to six independent replicates). *Veh* vehicle, *E2* estradiol, *P-ER $\alpha$*  phosphorylated ER $\alpha$  at Ser118; *P-SP1* total phosphorylated SP1. \* $P$  < 0.05 versus Veh. and 6 h; # $P$  < 0.05 versus Veh. and 12 h; + $P$  < 0.05 versus Veh. and MPP

histone marks related with active gene expression (H3K9Ac and H3K4me3) and gene repression (H3K9me2) was performed by ChIP (Fig. 5). The H3K9Ac histone mark was not altered at any of the studied conditions (Fig. 5a, b), although a higher enrichment of this histone mark on PR-B promoter was observed, as compared with

PR-A promoter. A differential enrichment of the H3K4me3 histone mark on PR promoters was observed (Fig. 5). A higher enrichment of the H3K4me3 mark on PR-B promoter as compared to PR-A promoter was found after vehicle and 6 h of estradiol treatment. Interestingly, H3K4me3 enrichment on PR-B promoter was not detected

**Fig. 4** Transcription factors and RNA pol II occupancy on PR isoform promoters regulation by estradiol. mHypoE-N42 cells were treated with estradiol (100 nM) and vehicle (ethanol 0.02 %) for 6 and 12 h. RNA pol II, SP1, and ER $\alpha$  occupancy on **a** PR-B and **b** PR-A promoters was analyzed by ChIP coupled to real-time PCR. Significant differences between vehicle treatments at 6 and 12 h were not observed in any of the immunoprecipitated studied proteins (data not shown). Data are expressed as fold enrichment (mean  $\pm$  SD of three to six independent replicates). Veh vehicle, PPR-B PR-B promoter, PPR-A PR-A promoter. \* $P < 0.01$  versus 12 h; # $P < 0.05$  versus Veh.; + $P < 0.05$  versus Veh. and 12 h

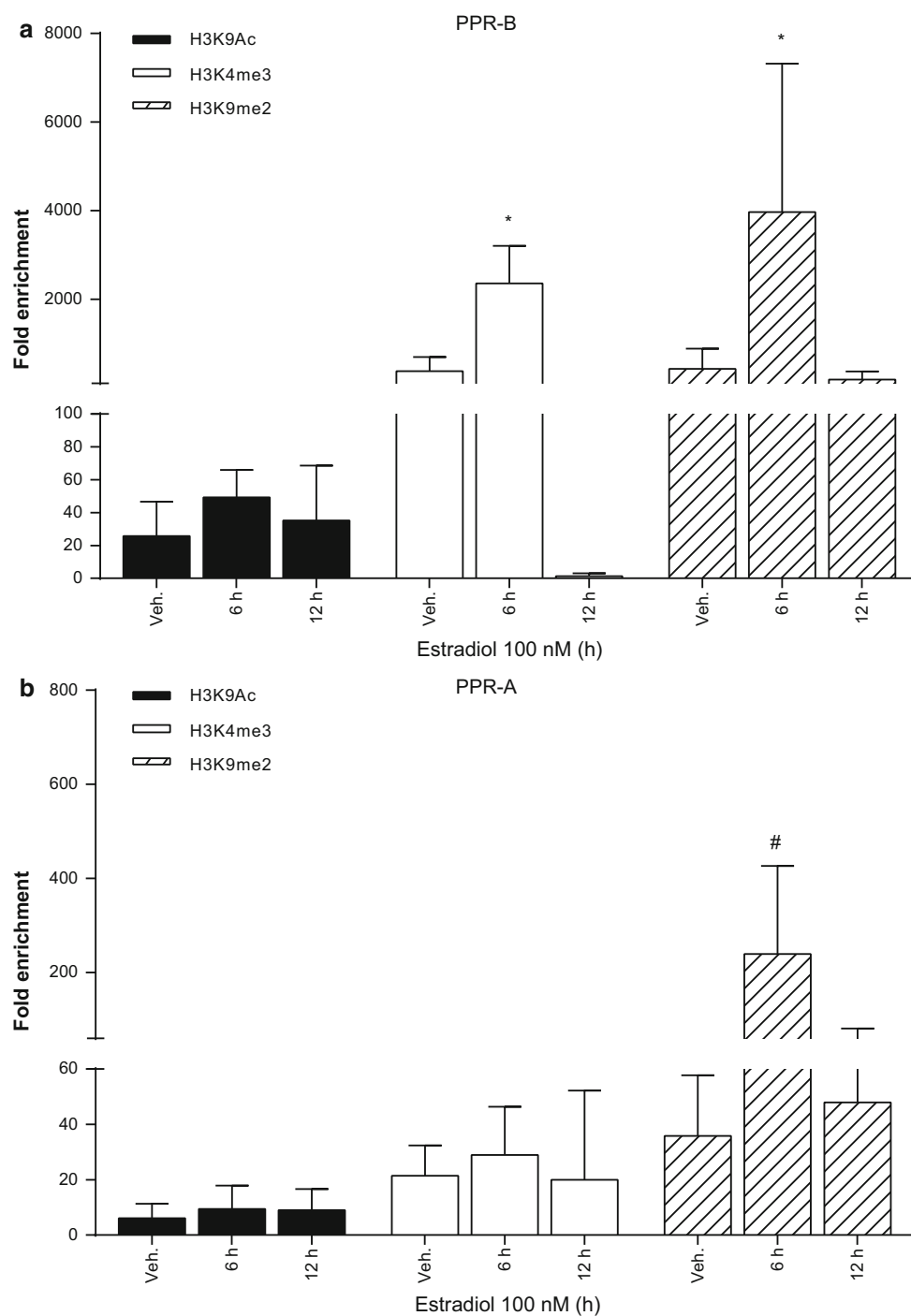


after 12 h of estradiol treatment (Fig. 5a). In contrast, we did not find any estradiol-dependent change in the H3K4me3 histone mark recruitment at PR-A promoter (Fig. 5b). Unexpectedly, estradiol-dependent transient enrichment of H3K9me2 after 6 h was found at both PR isoform promoters (Fig. 5a, b).

#### DNA methylation and hydroxymethylation marks at PR promoter are not affected by estradiol treatment

Another key component in epigenetic regulation is DNA methylation. In addition, the 5-hydroxymethylcytosine has

**Fig. 5** Active and repressive histone marks enrichment on PR isoform promoters is differentially regulated by estradiol. Cells were treated with estradiol (100 nM) and vehicle (ethanol 0.02 %) for 6 and 12 h. H3K9Ac, H3K4me3, and H3K9me2 enrichment on PR-B (a) and PR-A (b) promoters was analyzed by ChIP coupled to real-time PCR. Significant differences between vehicle treatments at 6 and 12 h were not observed in any of the immunoprecipitated studied proteins (data not shown). Data are expressed as fold enrichment (mean  $\pm$  SD of three to six independent replicates). Veh vehicle, PPR-B PR-B promoter, PPR-A PR-A promoter. \* $P < 0.01$  versus Veh. and 12 h; # $P < 0.001$  versus Veh

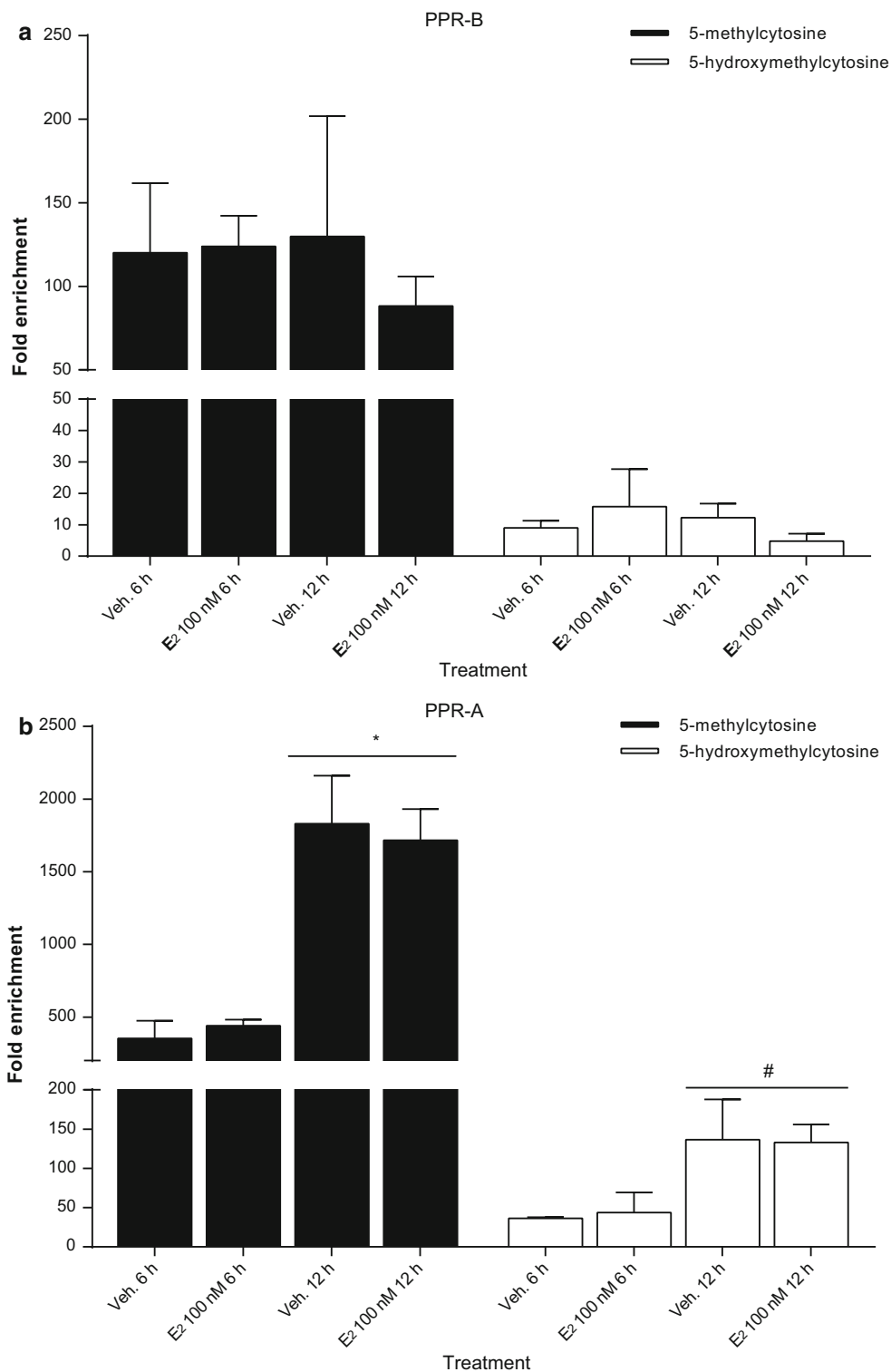


recently emerged as an intermediary of active DNA demethylation [32]. In the present study, estradiol-dependent changes in 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine content at either PR isoform promoters were not observed (Fig. 6). Interestingly, the 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine levels were higher on PR-A promoter than on PR-B promoter. An increase in both hydroxy and methyl cytosine levels on PR-A promoter was observed after 12 h of both vehicle and estradiol treatments (Fig. 6b).

## Discussion

In the present study, we demonstrate that PR isoforms are differentially regulated by estradiol at the transcriptional level through changes in promoter occupancy by transcription factors as well as by epigenetic changes in PR-A and PR-B promoters in a mouse embryonic hypothalamic cell line. The transient ER $\alpha$ -dependent induction of PR-B mRNA expression observed after 6 h of estradiol treatment

**Fig. 6** DNA methylation and hydroxymethylation levels in PR isoform promoters are not affected by estradiol treatments. mHypoE-N42 cells were treated with estradiol (100 nM) and vehicle (ethanol 0.02 %) for 6 and 12 h. 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine detection in PR-B (a) and PR-A (b) promoters was analyzed by immunoprecipitation coupled to real-time PCR. Data are expressed as fold enrichment (mean  $\pm$  SD of three to six independent replicates). *Veh* vehicle, *E2* estradiol, *PPR-B* PR-B promoter, *PPR-A* PR-A promoter. \* $P < 0.0001$  versus 6 h; # $P < 0.05$  versus 6 h



was associated with an increase in ER $\alpha$  phosphorylation at Ser118, as well as its recruitment on the PR-B promoter. In line with these data, a down regulation of PR-B mRNA expression after 12 h of estradiol treatment was associated with a decrease of SP1, H3K4me3, and RNA pol II

occupancy on its promoter. In contrast, estradiol modified neither PR-A mRNA expression nor the occupancy of transcription factors and epigenetic markers on its promoter.

We first demonstrated that estradiol (100 nM) produced a transient induction of PR-B mRNA expression in the

mHypoE-N42 cell line (Fig. 2c). Although this estradiol dose is considered higher than those reported in other studies [33], the functional relevance of this estradiol concentration has also been demonstrated in previous reports using this cell line, in terms of aromatase gene expression regulation in an ER $\alpha$ -dependent manner [23]. This differential response to estradiol doses between hypothalamic cultures could be due to the differences in cell type and developmental stage, since it has been proposed that PR expression within the ventromedial nucleus of the hypothalamus becomes more responsive to estradiol as development advances, which supports the idea that higher doses of estradiol are required to induce PR expression during early stages of development than those required in highly estradiol responsive adult cells [34]. Interestingly, the transient induction of PR-B and the absence of changes in PR-A mRNA expression after estradiol treatments observed in the present study were similar to that observed in the hypothalamus of proestrus rats and during development in several hypothalamic nuclei [10, 35]. In contrast to our results, the induction of PR mRNA expression is still observed after 48 h of estradiol administration in the hypothalamus of adult ovariectomized female rats [7, 12]. This suggests that time differences in the regulation of PR mRNA expression by estradiol depend on the developmental stage of the animal. In fact, PR protein content is transiently upregulated in the ventromedial nucleus of rat hypothalamus during embryonic development [35]. On the other hand, the 6 h transient induction of PR expression by estradiol observed in the present study has also been reported in the hypothalamus of adult ovariectomized female mice [24], which suggests that this short-term regulation of PR expression is species dependent. The transient induction of PR-B was also observed at protein level in the present study (data not shown), suggesting that the effects of estradiol on the transcription factors and epigenetic marks studied in the present work are also related with PR isoforms protein content, which in turn indicates that this regulation could have an impact on the functional role of PR in this cell line. Furthermore, PR-A was identified as the predominant isoform in the present study, as previously reported in embryonic rat hypothalamic cells [13].

ER $\alpha$  is the main transcription factor that regulates PR expression in the brain [7, 8, 36]. We therefore, assessed the phosphorylation status of ER $\alpha$  at Ser118, since it has been reported that phosphorylation at this residue is related with the transcriptional activity of ER $\alpha$  in its target genes [37, 38]. Accordingly, higher levels of phosphorylated ER $\alpha$  (Ser118) were found after 6 h of estradiol treatment (Fig. 2a). This finding correlates with the transient induction of PR-B mRNA expression observed after 6 h of estradiol treatment, suggesting that

there is a correlation between the transcriptional activity of ER $\alpha$  and PR-B mRNA expression in rodent embryonic hypothalamic cells.

The participation of ER $\alpha$  on PR expression was demonstrated using a selective ER $\alpha$  antagonist (Fig. 2d). Moreover, our ChIP data show that ER $\alpha$  is recruited on PR-B promoter after 6 h of estradiol treatment (Fig. 4a), which is in line with the induction of PR-B mRNA expression. On the other hand, and according to several studies, ER $\alpha$  occupancy on PR-A promoter was not detected at any of the studied conditions (Fig. 4b) [20, 24, 39] despite the presence of a half ERE site in this promoter [27]. The absence of ER $\alpha$  on PR-B promoter after 12 h of estradiol treatment could be due to the lack of SP1 presence on PR-B promoter region at this period of time, since it has been reported that SP1 is required for ER $\alpha$  recruitment [19].

Furthermore, we have recently reported that the dynamic DNA methylation pattern found in PR-B promoter in rat hypothalamus during proestrus transition involves a consensus and highly conserved SP1 site [10]. Our ChIP data suggest that SP1 is present on PR-B promoter after 6 h of estradiol and vehicle treatments, as previously reported [40, 41]. Interestingly, a downregulation of SP1 together with an increase in its phosphorylation after 12 h of estradiol treatment was observed (Fig. 3a), when PR-B mRNA expression was markedly decreased (Fig. 2c). In line with these results, hyperphosphorylation of SP1 has been associated with a decrease of its occupancy on target genes [42, 43]. On the other hand, we did not find SP1 occupancy on PR-A promoter. However, further studies are needed to investigate the role of other SP proteins such as SP3 or SP4 in PR isoforms regulation [44].

Regarding RNA pol II, our results demonstrate that a decrease of its recruitment on PR-B promoter at 12 h of estradiol treatment correlates with a marked decrease on PR-B mRNA expression (Fig. 2c, 4a), suggesting that SP1 is required for the recruitment of RNA pol II to maintain the transcriptional basal levels of PR-B. Interestingly, the transient occupancy of RNA pol II in the promoters of other estrogen-regulated genes has been previously reported in MCF7 human breast cancer cells [45]. In contrast, no differential occupancy of RNA pol II on PR-A promoter at the studied conditions was found (Fig. 4b), correlating with the absence of changes in PR-A mRNA expression after 6 h of estradiol treatments. Interestingly, no significant differences of RNA pol II occupancy on PR-A promoter between the negative control of ChIP assay and the 12 h of estradiol treatment were observed (data not shown), which correlates with the significant decrease on PR-A mRNA expression at this time point as compared with 6 h of estradiol treatment. Further studies are required in order to describe the recruitment of specific phosphorylated forms of RNA pol II that actively participate in ER $\alpha$ -dependent



PR transcription, as we did not find changes in total RNA pol II occupancy after 6 h of estradiol treatment.

Histone acetylation is one of the characteristic features of transcriptionally active chromatin [46]. A higher enrichment of the H3K9Ac histone mark on PR-B promoter as compared to PR-A promoter was observed (Fig. 5). This finding could explain the differential levels of RNA pol II occupancy on the corresponding PR isoform promoters (Fig. 3), which correlate with previous reports [41, 47].

The H3K4me3 histone mark is another of the classical hallmarks of transcriptionally active chromatin. As in the case of H3K9Ac histone mark, a higher enrichment of the H3K4me3 mark on PR-B promoter was found as compared with PR-A promoter, suggesting that PR-B promoter is transcriptionally more permissive than PR-A promoter (Fig. 5). In addition, the increase of the H3K4me3 histone mark after 6 h of estradiol treatment, as well as the marked decrease at 12 h, is in line with the transient induction of PR-B mRNA expression (Fig. 2c) and the corresponding decrease of RNA pol II and estrogen-related transcription factors occupancy on this promoter (Fig. 4a). In contrast, no changes in the H3K4me3 enrichment on PR-A promoter were observed at any of the studied conditions (Fig. 5b).

The H3K9me2 histone mark is a typical hallmark of transcriptional silencing on promoter regions [48]. The enrichment of both transcriptional active (H3K4me3) and repressive (H3K9me2) histone marks was increased after 6 h of estradiol treatment on PR-B promoter, which could be the result of a fine-tune regulation mechanism to avoid ligand-independent expression as previously reported on ER $\alpha$ -regulated genes in MCF7 breast cancer cells [49]. According to our results, it has been reported that both transcriptional active and repressive histone marks are also present on PR isoform promoters in the human term myometrium, in which the upregulated isoform (PR-A) was more extensively marked for transcriptional activation than the non-upregulated one (PR-B) [47]. On the other hand, the enrichment of the H3K9me2 histone mark after 6 h of estradiol treatment was the only estradiol-dependent change on PR-A promoter observed in the present study; however, this modification was not associated with estradiol-dependent changes on PR-A mRNA expression.

The participation of DNA methylation in PR gene expression regulation has been extensively described in pathological and physiological models [10, 50–54]. In the present study, we did not find any estradiol-dependent change in DNA methylation or hydroxymethylation of PR isoform promoters (Fig. 6). It has been reported that DNA methylation on PR-B promoter is observed as a late event after disrupting ER $\alpha$  signaling in MCF7 cells [55]. The higher enrichment of methylated DNA on PR-A promoter as compared with PR-B promoter would confirm the

transcription factor accessibility on the later one (Fig. 6). Interestingly, the increase of both 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine marks on PR-A promoter observed at 12 h was independent of estradiol exposure (Fig. 6b), which could be related with a particular intrinsic regulation mechanism of PR-A mRNA expression.

The fact that PR-B was regulated by estradiol in the present study suggests that the mHypoE-N42 cell line has a male origin, as previous studies have reported that estradiol induces PR expression in the neonatal ventromedial nucleus of hypothalamus in male but not in female rats [16]. However, it has been demonstrated that prenatal exposure to a synthetic estrogen (diethylstilbestrol) induces PR expression in other reproductive relevant brain areas of female rats such as the medial preoptic nucleus and the anteroventral periventricular nucleus [56]. Further studies are required to the complete understanding of molecular mechanisms involved in the differential regulation of PR isoforms mRNA expression by estradiol in embryonic hypothalamic cells, which in turn could be associated with estradiol mediated prenatal programming processes and sexual dimorphism in the rodent brain [15, 16].

The overall results of this study show that estradiol induces a differential regulation of PR isoforms expression in an embryonic hypothalamic cell line, which is associated with specific promoter occupancy of transcription factors and histone marks on PR-A and PR-B promoters.

**Acknowledgments** We acknowledge the technical support of Lucía Flores Peredo (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico) regarding ChIP technique and Patricia Mendoza-Lorenzo (División Académica de Ciencias Básicas, Unidad Chontalpa, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Mexico) for her assistance in real-time PCR experiments. This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) No. IN210412 and IA202814, and Programa de Apoyo a la Investigación para Estudiantes de Posgrado (PAIP) No. 5000-9108 and 5000-9141, from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, México). E.R.V.-M. is recipient of a Ph.D. scholarship from CONACYT (CVU 288806).

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

1. B.W. O'Malley, M.R. Sherman, D.O. Toft, Progesterone “receptors” in the cytoplasm and nucleus of chick oviduct target tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **67**, 501–508 (1970)
2. W.L. Kraus, M.M. Montano, B.S. Katzenellenbogen, Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1603–1616 (1993)
3. E. Vegeto, M.M. Shahbaz, D.X. Wen, M.E. Goldman, B.W. O'Malley, D.P. McDonnell, Human progesterone receptor A

- form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1244–1255 (1993)
4. J.K. Richer, B.M. Jacobsen, N.G. Manning, M.G. Abel, D.M. Wolf, K.B. Horwitz, Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 5209–5218 (2002)
  5. I. Camacho-Arroyo, A. González-Arenas, G. González-Morán, Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **146**, 644–652 (2007)
  6. C. Guerra-Araiza, M.A. Cerbón, S. Morimoto, I. Camacho-Arroyo, Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Science* **66**, 1743–1752 (2000)
  7. I. Camacho-Arroyo, C. Guerra-Araiza, M.A. Cerbón, Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *NeuroReport* **9**, 3993–3996 (1998)
  8. I. Camacho-Arroyo, A. González-Arenas, G. González-Agüero, C. Guerra-Araiza, G. González-Morán, Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **136**, 447–452 (2003)
  9. M.M. White, I. Sheffer, J. Teeter, E.M. Apostolakis, Hypothalamic progesterone receptor-A mediates gonadotropin surges, self priming and receptivity in estrogen-primed female mice. *J. Mol. Endocrinol.* **38**, 35–50 (2007)
  10. L. Mendoza-Garcés, M. Rodríguez-Dorantes, C. Álvarez-Delgado, E.R. Vázquez-Martínez, P. García-Tobilla, M.A. Cerbón, Differential DNA methylation pattern in the A and B promoters of the progesterone receptor is associated with differential mRNA expression in the female rat hypothalamus during proestrus. *Brain Res.* **1535**, 71–77 (2013)
  11. L. Mendoza-Garcés, I. Camacho-Arroyo, M.A. Cerbón, Effects of mating on progesterone receptor isoforms in rat hypothalamus. *NeuroReport* **21**, 513–516 (2010)
  12. C. Guerra-Araiza, A. Coyoy-Salgado, I. Camacho-Arroyo, Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Res. Bull.* **59**, 105–109 (2002)
  13. S.L. Fitzpatrick, T.J. Berrodin, S.F. Jenkins, D.M. Sindoni, D.C. Deecher, D.E. Frail, Effect of estrogen agonists and antagonists on induction of progesterone receptor in a rat hypothalamic cell line. *Endocrinology* **140**, 3928–3937 (1999)
  14. K.L. Gonzales, P. Quadros-Mennella, M.J. Tetel, C.K. Wagner, Anatomically-specific actions of oestrogen receptor in the developing female rat brain: effects of oestradiol and selective oestrogen receptor modulators on progestin receptor expression. *J. Neuroendocrinol.* **24**, 285–291 (2012)
  15. C.K. Wagner, A.Y. Nakayama, G.J. De Vries, Potential role of maternal progesterone in the sexual differentiation of the brain. *Endocrinology* **139**, 3658–3661 (1998)
  16. P.S. Quadros, C.K. Wagner, Regulation of progesterone receptor expression by estradiol is dependent on age, sex and region in the rat brain. *Endocrinology* **149**, 3054–3061 (2008)
  17. P. Kastner, A. Krust, B. Turcotte, U. Stropp, L. Tora, H. Gronemeyer, P. Chambon, Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* **9**, 1603–1614 (1990)
  18. L.N. Petz, Y.S. Ziegler, M.A. Loven, A.M. Nardulli, Estrogen receptor alpha and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* **143**, 4583–4591 (2002)
  19. L.N. Petz, Y.S. Ziegler, J.R. Schultz, H. Kim, J.K. Kemper, A.M. Nardulli, Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **88**, 113–122 (2004)
  20. J.K. Won, R. Chodankar, D.J. Purcell, D. Bittencourt, M.R. Stallcup, Gene-specific patterns of coregulator requirements by estrogen receptor- $\alpha$  in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **26**, 955–966 (2012)
  21. E.R. Vázquez-Martínez, L. Mendoza-Garcés, E. Vergara-Castañeda, M. Cerbón, Epigenetic regulation of Progesterone Receptor isoforms: from classical models to the sexual brain. *Mol. Cell. Endocrinol.* **392**, 115–124 (2014)
  22. L. Fleury, M. Gerus, A.C. Lavigne, H. Richard-Foy, K. Bystriky, Eliminating epigenetic barriers induces transient hormone-regulated gene expression in estrogen receptor negative breast cancer cells. *Oncogene* **27**, 4075–4085 (2008)
  23. J.M. Schwarz, B.M. Nugent, M.M. McCarthy, Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology* **151**, 4871–4881 (2010)
  24. K. Gagnidze, Z.M. Weil, L.C. Faustino, S.M. Schaafsma, D.W. Pfaff, Early histone modifications in the ventromedial hypothalamus and preoptic area following oestradiol administration. *J. Neuroendocrinol.* **25**, 939–955 (2013)
  25. P.S. Dalvi, A. Nazarians-Armavil, S. Tung, D.D. Belsham, Immortalized neurons for the study of hypothalamic function. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R1030–R1052 (2011)
  26. M.B. Yilmaz, A. Wolfe, H. Zhao, D.C. Brooks, S.E. Bulun, Aromatase promoter 1f is regulated by progesterone receptor in mouse hypothalamic neuronal cell lines. *J. Mol. Endocrinol.* **47**, 69–80 (2011)
  27. K. Hagihara, X.S. Wu-Peng, T. Funabashi, J. Kato, D.W. Pfaff, Nucleic acid sequence and DNase hypersensitive sites of the 5' region of the mouse progesterone receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1093–1101 (1994)
  28. W.J. Kent, C.W. Sugnet, T.S. Furey, K.M. Roskin, T.H. Pringle, A.M. Zahler, D. Haussler, The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* **12**, 996–1006 (2002)
  29. B. Lee, A. Morano, A. Porcellini, M.T. Muller, GADD45 $\alpha$  inhibition of DNMT1 dependent DNA methylation during homology directed DNA repair. *Nucleic Acids Res.* **40**, 2481–2493 (2012)
  30. C.E. Nestor, R.R. Meehan, Hydroxymethylated DNA immunoprecipitation (hmeDIP). *Methods Mol. Biol.* **1094**, 259–267 (2014)
  31. A. González-Arenas, V. Hansberg-Pastor, O.T. Hernández-Hernández, T.K. González-García, J. Henderson-Villalpando, D. Lemus-Hernández, A. Cruz-Barrios, M. Rivas-Suárez, I. Camacho-Arroyo, Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER $\alpha$  activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 379–386 (2012)
  32. D.P. Gavin, K.A. Chase, R.P. Sharma, Active DNA demethylation in post-mitotic neurons: a reason for optimism. *Neuropharmacology* **75**, 233–245 (2013)
  33. J. Kuo, N. Hamid, G. Bondar, P. Dewing, J. Clarkson, P. Micevych, Sex differences in hypothalamic astrocyte response to estradiol stimulation. *Biol. Sex Differ.* **1**, 7 (2010)
  34. K.L. Gonzales, M.J. Tetel, C.K. Wagner, Estrogen receptor (ER)  $\beta$  modulates ER $\alpha$  responses to estrogens in the developing rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology* **149**, 4615–4621 (2008)
  35. P.S. Quadros, J.L. Pfau, C.K. Wagner, Distribution of progesterone receptor immunoreactivity in the fetal and neonatal rat forebrain. *J. Comp. Neurol.* **504**, 42–56 (2007)
  36. L.N. Petz, A.M. Nardulli, Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the

- human progesterone receptor A promoter. *Mol. Endocrinol.* **14**, 972–985 (2000)
37. D. Chen, T. Riedl, E. Washbrook, P.E. Pace, R.C. Coombes, J.M. Egly, S. Ali, Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7. *Mol. Cell* **6**, 127–137 (2000)
  38. T.T. Duplessis, C.C. Williams, S.M. Hill, B.G. Rowan, Phosphorylation of estrogen receptor  $\alpha$  at serine 118 directs recruitment of promoter complexes and gene-specific transcription. *Endocrinology* **152**, 2517–2526 (2011)
  39. A. Stratmann, B. Haendler, The histone demethylase JARID1A regulates progesterone receptor expression. *FEBS J.* **278**, 1458–1469 (2011)
  40. J.R. Schultz, L.N. Petz, A.M. Nardulli, Estrogen receptor  $\alpha$  and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* **201**, 165–175 (2003)
  41. X. Xu, F.E. Murdoch, E.M. Curran, W.V. Welshons, M.K. Fritsch, Transcription factor accessibility and histone acetylation of the progesterone receptor gene differs between parental MCF-7 cells and a subline that has lost progesterone receptor expression. *Gene* **328**, 143–151 (2004)
  42. M. Tang, J. Mazella, J. Gao, L. Tseng, Progesterone receptor activates its promoter activity in human endometrial stromal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **192**, 45–53 (2002)
  43. H.-C. Yang, J.-Y. Chuang, W.-Y. Jeng, C.-I. Liu, A.H.J. Wang, P.-J. Lu, W.-C. Chang, J.-J. Hung, Pin1-mediated Sp1 phosphorylation by CDK1 increases Sp1 stability and decreases its DNA-binding activity during mitosis. *Nucleic Acids Res.* **42**, 13573–13587 (2014)
  44. S. Khan, F. Wu, S. Liu, Q. Wu, S. Safe, Role of specificity protein transcription factors in estrogen-induced gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *J. Mol. Endocrinol.* **39**, 289–304 (2007)
  45. S. Kangaspeska, B. Stride, R. Métivier, M. Polycarpou-Schwarz, D. Ibberson, R.P. Carmouche, V. Benes, F. Gannon, G. Reid, Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* **452**, 112–115 (2008)
  46. E.S. Lander, L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Showkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chissoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R.A. Gibbs, D.M. Muzny, S.E. Scherer, J.B. Bouck, E.J. Sodergren, K.C. Worley, C.M. Rives, J.H. Gorrell, M.L. Metzker, S.L. Naylor, R.S. Kucherlapati, D.L. Nelson, G.M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D.R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H.M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowan, A. Madan, S. Qin, R.W. Davis, N.A. Federspiel, A.P. Abola, M.J. Proctor, R.M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D.R. Cox, M.V. Olson, R. Kaul, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G.A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B.A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W.R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blöcker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J.A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D.G. Brown, C.B. Burge, L. Cerutti, H.C. Chen, D. Church, M. Clamp, R.R. Copley, T. Doerks, S.R. Eddy, E.E. Eichler, T.S. Furey, J. Galagan, J.G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L.S. Johnson, T.A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W.J. Kent, P. Kitts, E.V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T.M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J.V. Moran, N. Mulder, V.J. Pollara, C.P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A.F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y.I. Wolf, K.H. Wolfe, S.P. Yang, R.F. Yeh, F. Collins, M.S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K.A. Wetterstrand, A. Patrinos, M.J. Morgan, P. de Jong, J.J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y.J. Chen, J. Szustakowski, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001)
  47. S.Y. Chai, R. Smith, T. Zakar, C. Mitchell, G. Madsen, Term myometrium is characterized by increased activating epigenetic modifications at the progesterone receptor-A promoter. *Mol. Hum. Reprod.* **18**, 401–409 (2012)
  48. A. Barski, S. Cuddapah, K. Cui, T.-Y. Roh, D.E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev, K. Zhao, High-resolution profiling of histone methylation in the human genome. *Cell* **129**, 823–837 (2007)
  49. I. Garcia-Bassets, Y.S. Kwon, F. Telese, G.G. Prefontaine, K.R. Hutt, C.S. Cheng, B.G. Ju, K.A. Ohgi, J. Wang, L. Escoubet-Lozach, D.W. Rose, C.K. Glass, X.D. Fu, M.G. Rosenfeld, Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene activation by nuclear receptors. *Cell* **128**, 505–518 (2007)
  50. M.M. Gaudet, M. Campan, J.D. Figueroa, X.R. Yang, J. Lisowska, B. Peplonska, L.A. Brinton, D.L. Rimm, P.W. Laird, M. Garcia-Closas, M.E. Sherman, DNA hypermethylation of ESR1 and PGR in breast cancer: pathologic and epidemiologic associations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 3036–3043 (2009)
  51. V. Hansberg-Pastor, A. González-Arenas, M.A. Peña-Ortiz, E. García-Gómez, M. Rodríguez-Dorantes, I. Camacho-Arroyo, The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines. *Steroids* **78**, 500–507 (2013)
  52. X. Li, C. Chen, H. Luo, J.C. van Velkinburgh, B. Ni, Q. Chang, Decreased DNA methylations at the progesterone receptor promoter induce functional progesterone withdrawal in human parturition. *Reprod. Sci.* **21**, 898–905 (2014)
  53. J.L. Meyer, D. Zimbardi, S. Podgaec, R.L. Amorim, M.S. Abrão, C.A. Rainho, DNA methylation patterns of steroid receptor genes ESR1, ESR2 and PGR in deep endometriosis compromising the rectum. *Int. J. Mol. Med.* **33**, 897–904 (2014)
  54. T.N. Pathiraja, P.B. Shetty, J. Jelinek, R. He, R. Hartmaier, A.L. Margossian, S.G. Hilsenbeck, J.P.J. Issa, S. Oesterreich, Progesterone receptor isoform-specific promoter methylation: association of PRA promoter methylation with worse outcome in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **17**, 4177–4186 (2011)

- 
55. Y.W. Leu, P.S. Yan, M. Fan, V.X. Jin, J.C. Liu, E.M. Curran, W.V. Welshons, S.H. Wei, R.V. Davuluri, C. Plass, K.P. Nephew, T.H.M. Huang, Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer. *Cancer Res.* **64**, 8184–8192 (2004)
56. P.S. Quadros, J.L. Pfau, A.Y.N. Goldstein, G.J. De Vries, C.K. Wagner, Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology* **143**, 3727–3739 (2002)



At the Cutting Edge

## Epigenetic regulation of Progesterone Receptor isoforms: From classical models to the sexual brain



Edgar Ricardo Vázquez-Martínez<sup>a</sup>, Luciano Mendoza-Garcés<sup>b</sup>, Edgar Vergara-Castañeda<sup>a</sup>, Marco Cerbón<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, Av Universidad 3000, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Coyoacán, 04510, Distrito Federal, México, Mexico

<sup>b</sup>Instituto Nacional de Geriátria, Periférico Sur 2767, San Jerónimo Lídice, Magdalena Contreras, 10200, Distrito Federal, México, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 April 2014

Accepted 12 May 2014

Available online 21 May 2014

## Keywords:

Progesterone Receptor isoforms

Epigenetic regulation

Sexual brain

## ABSTRACT

Progesterone Receptor is a member of the nuclear receptor superfamily, which regulates several functions in both reproductive and non-reproductive tissues. Progesterone Receptor gene encodes for two main isoforms, A and B, and contains two specific promoters with their respective transcription start sites. The mRNA expression of both isoforms is mainly regulated by estrogens and specifically via the Estrogen Receptor Alpha, in a context specific manner. Furthermore, it has been reported in extensive physiological and pathological models that Progesterone Receptor isoforms regulation is related to the epigenetic state of their respective promoters. Epigenetic regulation of Progesterone Receptor isoforms in the brain is a recent and scarcely explored field in neurosciences. This review focuses on the epigenetic mechanisms involved in Progesterone Receptor regulation, emphasizing the implications for the sexual brain. Future directions for research about this important field are also discussed.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## Contents

0. Introduction	116
1. Epigenetic regulation of PR gene isoforms	116
1.1. Histone modifications	116
1.1.1. Histone modifications in breast cancer cells	117
1.1.2. Histone modifications in different cancer cells and other pathological models	117
1.1.3. Histone modifications in physiological models	118
1.2. DNA methylation	118
1.2.1. PR gene methylation in classical models	118
1.3. miRNAs	119
1.3.1. miRNAs and Progesterone Receptor regulation	119
1.4. Long range epigenetic regulation	119

**Abbreviations:** 3C, chromosome conformation capture; 5hmC, 5 hydroxymethylcytosine; Ago, Argonaute; AP1, Activator Protein 1; AZA, aza-2'-deoxycytidine; ChIP, chromatin immunoprecipitation; DHSS, Dnase I hypersensitive sites; DNMT, DNA methyl transferases; ERE, estrogen responsive elements; eRNA, enhancer RNA; ER $\alpha$ , Estrogen Receptor Alpha; H, histone; H3Ac, acetylated histone 3; H3K27me3, histone 3 trimethylated at lysine 27; H3K4me, histone 3 methylated at lysine 4; H3K4me, histone 3 methylated at lysine 4; H3K4me1, histone 3 monomethylated at lysine 4; H3K4me3, histone 3 trimethylated at lysine 4; H3K9Ac, histone 3 acetylated at lysine 9; H3K9me2, histone 3 dimethylated at lysine 9; H3K9me3, histone 3 trimethylated at lysine 9; H3R2me2a, histone 3 dimethylated at arginine 4 (asymmetric); H4Ac, acetylated histone 4; HATs, histone acetyl transferases; HDACs, histone deacetylases; JARID1A, Jumonji AT-rich interactive domain 1A; lncRNA, long non-coding RNA; MBH, mediobasal hypothalamus; miRNA, microRNA; MLL1, Myeloid Lymphoid or mixed lineage Leukemia; POA, preoptic area; PPRa, Progesterone Receptor isoform A promoter; PPRB, Progesterone Receptor isoform B promoter; PR, Progesterone Receptor; PRA, Progesterone Receptor isoform A; PRB, Progesterone Receptor isoform B; pri-miRNAs, primary miRNA transcripts; RISC, RNA-induced silencing complex; SB, sodium butyrate; SET1A, SET domain containing 1A; siRNA, small interfering RNA; SMYD3, SET and MYND domain-containing protein 3; SRC, Steroid Receptor Coactivator; SP1, Specific Protein 1; TSA, trichostatin A; UTR, Untranslated region; VMH, ventromedial nucleus of hypothalamus; VPA, valproic acid.

\* Corresponding author. Address: Av Universidad 3000, Colonia Universidad Nacional Autónoma de México, Delegación Coyoacán, CP 04510, Distrito Federal, México, Mexico. Tel.: +52 5556223820.

E-mail address: [mcerbon85@yahoo.com.mx](mailto:mcerbon85@yahoo.com.mx) (M. Cerbón).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.05.011>

0303-7207/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

2.	Epigenetic regulation of <i>PR</i> gene isoforms in the sexual brain . . . . .	119
2.1.	Histone modifications in the sexual brain . . . . .	120
2.2.	DNA methylation in sexual brain . . . . .	121
2.3.	Future directions . . . . .	121
3.	Conclusions . . . . .	121
	Acknowledgements . . . . .	121
	References . . . . .	121

## 0. Introduction

Steroid hormone nuclear receptors are transcription factors that regulate proliferation, growth and differentiation, as well as many other functions in several mammalian tissues. Progesterone Receptor (PR) belongs to the steroid receptor superfamily (O'Malley et al., 1970). *PR* gene expresses two main isoforms, *PRA* and *PRB*, which are regulated by two different promoters and transcription start sites (Kraus et al., 1993). *PRB* differs from *PRA* by having additional 164 amino acids at the amino terminus of the protein. Both isoforms have different functions that are mediated by specific molecular mechanisms of gene regulation (Vegeto et al., 1993). In fact, *PRA* usually functions as a transcriptional inhibitor of *PRB* gene targets. Moreover, it has been reported that both isoforms act as transcriptional activators of different genes in the same cell (Richer et al., 2002). This means that the physiological activity of PR is the result of the counterbalancing proportion of these isoforms when both are present in the same cells (Camacho-Arroyo et al., 2007; Guerra-Araiza et al., 2000). Indeed, our group and others have shown that there is a specific variation in PR isoforms throughout the estrous cycle and with hormonal treatments in the rodent brain. Interestingly, this pattern of variation has been associated with the onset of sexual behavior (Camacho-Arroyo et al., 1998; Guerra-Araiza et al., 2003; White et al., 2007; Mendoza-Garcés et al., 2010, 2013).

The main regulator of the balance between *PR* gene isoforms is the Estrogen Receptor Alpha (ER $\alpha$ ), which carries out this function via interaction with its specific ligand, despite the lack of consensus estrogen responsive elements (ERE) in the *PR* gene isoforms promoter regions (Kastner et al., 1990). It has been reported that ER $\alpha$  is recruited to the *PR* gene promoter through interactions with Specific Protein 1 (SP1) and Activator Protein-1 (AP1) in MCF7 cells (Petz et al., 2002, 2004). However, recent studies on the same cell line suggest that ER $\alpha$  is associated at distal regulatory regions of the *PR* gene after short times of estradiol exposure, rather than acting on the promoter region (Bonéy-Montoya et al., 2010; Won Jeong et al., 2012). In addition, ligand bound ER $\alpha$  recruits transcriptional coregulators that are dependent on the specific gene, regulatory region, time and cellular context (Won Jeong et al., 2012). These coregulators, in turn, induce changes in chromatin in order to activate transcription. The induction of the *PR* gene isoforms also depends on the DNA methylation and chromatin basal state of their promoters (Fleury et al., 2008).

This suggests a complex mechanism of *PR* gene regulation that involves the participation of epigenetic processes. In fact, it has been reported extensively in physiological and pathological models that *PR* gene regulation involves promoter epigenetic changes. Here we summarize the main findings regarding the epigenetic regulation of PR, emphasizing and discussing the recent advances in the field of neurosciences.

## 1. Epigenetic regulation of *PR* gene isoforms

Epigenetics is classically defined as the study of stable heritable changes in gene function that are not the result of modifications of

the DNA sequence (Dupont et al., 2009). However, due to the increasing knowledge of molecular mechanisms involved in this field, this definition is now considered limited (Felsenfeld, 2014). Epigenetic regulation of gene expression involves posttranslational modifications of histones, DNA methylation, noncoding RNAs, and long range interactions, among other events. The former two have been extensively studied in many pathological processes (such as cancer), as they are potentially reversible and therefore represent a promising target for therapeutics (Biçaku et al., 2008; Hansberg-Pastor et al., 2013; Ren et al., 2007; Walton et al., 2008). However, the differential expression of *PRB* and *PRA* isoforms in different physiological and pathological situations, particularly in non-reproductive tissues such as the brain, cannot be fully explained by the available information about the epigenetic regulation of PR isoform promoters.

### 1.1. Histone modifications

Chromatin is defined as a compact nuclear structure that contains the genomic DNA. The fundamental unit of chromatin is the nucleosome, which is integrated by a histones octamer that is composed of four dimers of each histone (H2A, H2B, H3 and H4) and is wrapped into approximately 146 bp DNA (Luger et al., 1997). Nucleosomes are connected to each other by histone H1 and linker DNA. The histone tails contain residues that are targets of post-translational modifications, such as acetylation, methylation and phosphorylation (Jenuwein and Allis, 2001).

Acetylation takes place as result of the enzymatic activities of histone acetyl transferases (HATs) that promote transcription (Lander et al., 2001; Oñate et al., 1995), and histone deacetylases (HDACs) that exert the opposite effect. In general terms, the effect of the other histone modifications depends on the particular residue that is being targeted as well as the combinatorial modifications in other residues and/or histones (Kouzarides, 2007).

These posttranslational modifications are made by specific coregulators, which are recruited by nuclear receptors after binding to their cognate DNA response elements on target genes. This in turn results in the formation of an active or repressive transcriptional complex that directs transcription (McKenna et al., 1999; Glass and Rosenfeld, 2000). Moreover, the requirement of specific coregulators depends on the nuclear receptor, tissue and regulated gene. For example, the induction of the *PR* gene in rodent brain requires mainly Steroid Receptor Coactivators 1 and 2 (SRC1 and SRC2), unlike MCF7 cells that only require SRC3 (Apostolakis et al., 2002; Molenda et al., 2002; Won Jeong et al., 2012). In addition, another layer of complexity results from the fact that some coregulators could function as coactivators or corepressors, depending on the cellular and gene context (Carling et al., 2004; Peterson et al., 2007; Catchpole et al., 2011; Won Jeong et al., 2012). Since there are comprehensive reviews of the function and regulation of nuclear receptor coregulators (Tetel et al., 2009; Tognoni et al., 2011; Tetel and Acharya, 2013), this section will focus particularly on the histone marks. First, we will describe the participation of histone modifications in classical models (Sections 1.1.1–1.1.3) and then focus on the sexual brain (Section 2.1).

### 1.1.1. Histone modifications in breast cancer cells

Participation of histone acetylation levels in *PR* gene regulation was first described in MCF7 cells, where the importance of this epigenetic mechanism was emphasized (Ruh et al., 1999). This pioneering study reported the potentiation of *PR* gene induction by combining estradiol and a HDAC inhibitor, trichostatin A (TSA). This potentiation effect was ER $\alpha$  dependent and correlated with a global increase of acetylated histone 4 (H4Ac).

However, another study using MCF7 and other breast cancer cell lines showed that both *PR* isoforms were downregulated (at the protein and mRNA levels) by treatments with other HDAC inhibitors (valproic acid and vorinostat) and by siRNA (small interfering RNA) depletion of HDAC2 (Biçaku et al., 2008). Moreover, treatments with TSA as well as TSA plus estradiol failed to induce the expression of *PR* gene isoforms in a *PR* negative MCF7 sub line (C4 cells) (Xu et al., 2004). In contrast, valproic acid (VPA) and estradiol treatments induce *PR* gene expression in the ER negative cell line, MDA-MB-231 (Fortunati et al., 2010). In addition, by using the MDA-MB-231 cell line, it has been shown that the ER $\alpha$  mediated and hormone dependent induction of the *PR* gene was transiently restored after TSA and 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA) treatments (Fleury et al., 2008). On the other hand, Xu et al. (2004) reported that the occupancy of SP1 and ER $\alpha$  at both *PR* gene promoters found in MCF7 cells is decreased for SP1 and completely absent for ER $\alpha$  in C4 cells, even though they showed similar acetylation marks (Xu et al., 2004). Interestingly, the latter study also reported specific ER $\alpha$  binding to the *PRB* gene promoter, causing a modest estradiol dependent regulation of histone acetylation. Taken together, these data suggest that *PR* gene regulation by histone acetylation depends on the particular acetylation marks, the balance between specific HDAC and/or HATS, and the regulatory and cellular context.

Although histone methylation has been less studied in breast cancer than histone acetylation, its important role in *PR* gene regulation has been demonstrated. Particularly, histone 3 methylated at lysine 4 (H3K4me) is a hallmark of transcriptional active chromatin, and this mark can be removed by the Jumonji AT-rich interactive domain 1A (JARID1A) enzyme (Benevolenskaya, 2007; Klose and Zhang, 2007). In fact, depletion of JARID1A leads to an increase in protein and mRNA *PRA* content and a hormone dependent increase in the H3K4me3 mark and RNA polymerase II occupancy in the *PRA* promoter (Stratmann and Haendler, 2011). In addition, a reduced expression of the *PR* gene is observed after depletion of the Myeloid Lymphoid or mixed lineage Leukemia (MLL1) and SET domain containing 1A (SET1A) H3K4 methyltransferases (Won Jeong et al., 2012). In that study, recruitment of both ER $\alpha$  and RNA polymerase II is similar to that previously described by Stratmann and Haendler (2011). Moreover, the authors showed a cyclical pattern of occupancy that was dependent on time and the regulatory region (Won Jeong et al., 2012), together with a specific enrichment of H3K4me3 on the *PRA* promoter (Stratmann and Haendler, 2011).

On the other hand, histone 3 methylated at lysine 9 (H3K9me) is another of the most common histone methylation marks. However, this is related with transcriptional silencing at promoter regions (Barski et al., 2007). Interestingly, the H3K9me2 mark is enriched at the *PRB* promoter after synthetic microRNA (miRNA) treatment in TD47 cells (see Section 2.3), which was correlated with a decrease in *PR* gene expression and ER $\alpha$  recruitment at the *PRB* promoter, without changes in DNA methylation (Younger and Corey, 2011).

Several studies indicate that ER $\alpha$  is the main regulator of the chromatin structure in the *PR* gene. Long term treatment of a derived MCF7 cell line (MVLN) with 4-hydroxytamoxifen (a non-steroidal antiestrogen) resulted in the partial disappearance of DNase I hypersensitive sites (DHSS) in the *PR* gene promoter, without altering the DNA methylation status (Badia et al., 2000). This was correlated with an irreversible decrease in *PR* expression,

which suggested a relationship between *PR* gene transcriptional regulation by ER $\alpha$  and chromatin remodeling.

Accordingly, another study on MCF7 cells demonstrated that disruption of ER $\alpha$  by siRNA triggers an epigenetic silencing of both *PR* isoforms (Leu et al., 2004). Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) revealed that siRNA ER $\alpha$  disruption was associated with a decrease in active chromatin marks (H3Ac, H3K9Ac and H3K4me) and ER $\alpha$  in the *PRB* promoter, as well as a time dependent recruitment of polycomb repressors, HDACs, DNA methyl transferases (DNMTs) and methyl CpG binding proteins, creating a transcriptionally repressive environment. In contrast to the report of Badia et al. (2000), the silencing of the *PR* gene was accompanied by an increase in promoter DNA methylation as a late event, which was indispensable to maintain silencing (Leu et al., 2004). These studies highlight the importance of ER $\alpha$  as the main contributor to the epigenetic state of the *PR* gene promoter in these models.

Histone modifications have been also found in distal regions in MCF7 cells (Bonéy-Montoya et al., 2010), which will be discussed in Section 1.4.

### 1.1.2. Histone modifications in different cancer cells and other pathological models

In addition to breast cancer cells, other cancer cells have been employed to study the epigenetic regulation of the *PR* gene, mainly by HDAC and DNA methylation inhibitors due to their therapeutic potential (Hansberg-Pastor et al., 2013; Ren et al., 2007; Walton et al., 2008).

Treatments with TSA and TSA plus AZA induced *PRB* expression in *PRB* negative endometrial cancer cell lines (KLE and HEC-1B) (Chu et al., 2014; Xiong et al., 2005). However, TSA and AZA failed to induce total *PR* expression in Ishikawa cells (*PR* positive cells) (Chu et al., 2014; Ren et al., 2007). In addition, TSA and AZA treatments in KLE and HEC-1B cells led to an increase in transcriptionally active histone marks (H3Ac, H4Ac and H3K4me), as well as a decrease in the silencing of the H3K9me histone mark on the *PRB* isoform promoter (Chu et al., 2014). In contrast, another HDAC inhibitor, LBH589, restored functional *PR* expression in Type I endometrial cancer cells with low basal *PR* (Yang et al., 2014).

Interestingly, in adenomyosis, a benign invasive gynecological condition characterized by *PRB* reduction in ectopic and eutopic endometrium (Bergeron et al., 2006; Nie et al., 2009), treatments with TSA and TSA plus AZA increased *PRB* protein and mRNA content in ectopic endometrial cells (Nie et al., 2010). A negative correlation between increased HDAC1 expression and decreased *PR* expression has been observed in endometriosis, another endometrial benign disease (Samartzis et al., 2013). These studies suggest that *PR* induction requires specific HDAC inhibitors for each cellular and regulatory context (such as in breast cancer cells) and that there is a similar *PR* regulation between tumoral and benign diseases in endometrium.

As in endometrial cancer cell lines, prostate cancer cells (LNCaP, DU-145 and PC-3) showed an increase in *PR* expression by treatments with TSA and TSA plus AZA (Walton et al., 2008). Interestingly, a recent report in astrocytoma U373 cells showed that treatments with TSA or TSA plus AZA did not affect *PR* expression (Hansberg-Pastor et al., 2013). The aforementioned studies highlight the importance of the cellular context in regard to *PR* induction.

The lack of *PR* and ER $\alpha$  expression in hepatocellular carcinoma is associated with poor patient outcome (Nagasue et al., 1991). *PR* is absent in Huh7, HepG2 and Hep3B hepatocellular carcinoma cell lines due to an enrichment of the silencing H3K27me3 histone mark (Kondo et al., 2007). Interestingly, TSA treatments increased *PR* gene expression, which emphasizes the importance of chromatin marks in non-reproductive tissues as well.

### 1.1.3. Histone modifications in physiological models

Considering the large number of studies on PR function in physiological models, there are few studies about histone modifications in PR isoforms regulation. In fact, there are only two current physiological models (pregnant myometrium and sexual brain) that involve histone marks (Chai et al., 2012, 2014; Gagnidze et al., 2013). The study that reported PR isoforms regulation by histone modifications in the brain will be addressed in Section 2.

In humans, both PR isoforms are expressed in the pregnant myometrium. *PRB* increases relative to *PRA* in order to favor cervical closure and myometrial quiescence (Merlino et al., 2007). However, this proportion is changed at the time of labor in favor of the *PRA* isoform, which in turn results in cervical opening and delivery (Merlino et al., 2007; Mesiano et al., 2011; Pieber et al., 2001). Interestingly, the *PRA* promoter contained significantly higher levels of active chromatin marks (H3Ac, H4Ac and H3K4me3) and occupancy of an H3K4 methyl transferase (SET and MYND domain-containing protein 3, SMYD3) than the *PRB* promoter, which was independent of the labor status (Chai et al., 2012, 2014). Moreover, an increase in H3K4me3 was detected at both promoters with the onset of labor, which was correlated with the decreased occupancy of an H3K4 demethylase (JARID1A) in the *PRA* promoter, thus explaining the *PRA* isoform upregulation (Chai et al., 2014). However, it was intriguing that the authors also detected repressive histone marks (H3K9me3, H3K27me3 and H3R2me2a) at both promoters. This could contribute to the knowledge of bivalent domains (Bernstein et al., 2006; Lomniczi et al., 2013), however, it deserves more investigation.

### 1.2. DNA methylation

One of the main recognized epigenetic DNA modifications that influence gene expression is DNA methylation. The DNA methylation process consists of the addition of a methyl group to cytosine at position 5 of the pyrimidine ring. This modification mostly occurs at CpG sites and, in general, in regions with at least 200 bp and 60% or more CpG sites, defined as CpG islands. However, DNA methylation can also occur in specific isolated CpG sequences. The DNA methylation process is highly related to chromatin modifications and involves changes in chromatin structure and function. In fact, this relationship suggests that one precedes the presence of the other, which reinforces the activation or silencing of a specific gene.

The methylation mechanism has been described in different cellular processes, such as development, differentiation and proliferation. It is well established that genomic stability and gene regulation depends on the DNA methylation mechanisms. One of the main described methylation processes is related to the inactivation of the X chromosome. This is achieved by regulating the *XIST* gene, whose transcript is expressed in the X chromosome of the placental mammals and acts as a major effector of the X inactivation process.

Currently, DNA methylation is recognized as a highly dynamic process, as it involves specific enzymes regulating active methylation and demethylation processes (Gavin et al., 2013). DNA methylation is performed by the group of enzymes called DNA methyl transferases (DNMTs). It has been reported that the DNMT3a and DNMT3b enzymes are responsible for *de novo* methylation. The DNMT1 enzyme, on the other hand, is responsible for maintaining methylation patterns after DNA replication through the methylation of a hemimethylated DNA template.

Active DNA demethylation is achieved by the reversion to cytosine through sequential oxidation processes and by the base excision repair mechanism (Kohli and Zhang, 2013).

Although DNA methylation has been implicated in the inhibition of gene expression, its effect depends on the specific

demethylated CpG sites. According to the location of intragenic or extragenic methylation regions, genes may be either induced or repressed, which depends on each gene. In mammals, DNA demethylation is present in the early development of an organism, when a zygote cell paternal genome is actively demethylated before the first cell division. Once the zygote has already had several cell divisions, there is demethylation of the maternal genome. Moreover, appropriate development demands *de novo* DNA methylation in the cell mass of the blastocyst, while cellular differentiation requires DNA methylation of a large number of genes. Disruption of these events causes death of the fetus, or precipitates pathological events, such as cancer, by uncontrolled cellular proliferation signals (Goldberg et al., 2007).

A great number of studies concur with the idea that DNA methylation is a major part of gene regulation.

#### 1.2.1. PR gene methylation in classical models

Various studies indicate that the *PR* gene could be differentially methylated, both in physiological and pathological models. For example, during labor, *PRA* gene expression increases in a significant manner while *PRB* gene expression is unaltered (Section 1.1.3). This differential expression correlates with a decreased DNA methylation at the *PRA* promoter, thus indicating that DNA methylation might represent the main epigenetic mechanism of PR differential expression in this physiological process, in which changes in the relative proportion of PR isoforms induce myometrium activity and parturition (Li et al., 2014).

In contrast to the scarcity of studies on *PR* gene methylation in physiological models, several studies have been performed in pathological conditions, such as breast cancer, endometrial disorders and ovarian tissues. Many studies performed more than 15 years ago indicated that the methylation of *PR* gene promoter could be associated with changes in its expression in different human tumors. Particularly, a series of studies indicated that an increase in the methylation of PR in endometrial tumors was associated with a decrease in total PR expression.

In contrast, there is a limited consensus on the rates of *PR* gene methylation with other tumors such as those found in breast cancer, a finding which may be due to different methodological strategies and the design of clinical studies. Frequently, the number of samples was insufficient and heterogeneous to obtain solid conclusions about the role of *PR* gene methylation in this disease. Some recent studies have evaluated the methylation status of *PRA* and *PRB* promoters in breast cancer (Gaudet et al., 2009; Pathiraja et al., 2011). Interestingly, one study (Pathiraja et al., 2011) which includes a significant number of patients, showed the association between *PR* promoter isoform-specific methylation and endocrine treatment response using anti-estrogens. However, the results of this study indicated that the mechanisms participating in the regulation of *PR* expression were other than promoter methylation. Interestingly, the authors demonstrated a specific correlation between *PRA* isoform methylation and antiestrogen resistant breast cancer, however, this deserves more investigation to determine the importance of *PR* gene methylation status during hormonal therapy (Pathiraja et al., 2011).

Recently a differentially isoforms promoter methylation pattern has been described in patients with intestinal endometriosis, where the *PRB* promoter was significantly more methylated than the *PRA* promoter. Hence, *PRA* was the predominant isoform expressed in this abnormal tissue (Meyer et al., 2014). Diverse studies in tumor tissues have highlighted the relevance of the relative proportion of PR isoforms in the alteration of cell functionality (for recent related information, see the review by Shao, 2013).



### 1.3. miRNAs

The microRNAs (miRNAs) are small (21–24 nucleotides), non-coding and single-stranded RNAs that have an important role in the regulation of gene expression. In fact, it has been hypothesized that miRNAs regulate up to one-third of the human genome at the post-transcriptional level (Huang and Li, 2012). The genes that generate these non-coding RNAs are located both at intragenic and intergenic regions within the genome. They are transcribed mainly by RNA polymerase II, and occasionally by RNA polymerase III, generating primary miRNA transcripts (pri-miRNAs). Subsequently, these pri-miRNAs are processed by the Drosha/Dgcr8 complex in order to produce miRNA precursors, which are exported to the cytoplasm by Exportin 5. Then an RNase III-like nuclease (Dicer) together with the participation of RNA modifying proteins dissociates the two RNA strands into a mature (single) miRNA (Adams et al., 2007; Huang and Li, 2012). The mature miRNA associates to the Argonaute (Ago) protein, a main component of the RNA-induced silencing complex (RISC), and heads to mRNA targets (Huang and Li, 2014). Canonically, miRNAs play a negative role in gene expression regulation by targeting complementary sequences at the 3' Untranslated region (UTR) region of mRNAs and leading to cleavage or translational repression.

#### 1.3.1. miRNAs and Progesterone Receptor regulation

Recently, it has been recognized that miRNAs play an important role in the regulation of PR expression and function. In myometrium, the miR-200 family has been linked to PR function, associated with uterine quiescence and contractility during pregnancy and the progression to labor (Renthal et al., 2010; Williams et al., 2012). However, regulation of the relative balance of PR isoform expression by miRNAs has not been directly proven during pregnancy and term labor.

In primates it has been found that miR-219-5p downregulates PR expression in a highly specific way through a primate-specific long non-coding RNA located immediately downstream of the PR locus (INCRNA-PGR-3p). In addition, miR-96 decreases PR expression in humans and rhesus monkeys, but not in rodents (Liu et al., 2012). It has been described that in breast cancer cells (MCF7, ZR75-1 and BT474) miR-513a-5p, a progestin upregulated miRNA, reduces estradiol induction of both PR isoforms expression by targeting the 3' UTR (Cochrane et al., 2012). Furthermore, Cui et al. (2011) have demonstrated in cultured mammary epithelial cells that miR-126-3p, by targeting 3' UTR, inhibits the expression of PR isoforms as well as the proliferation of these cells (Cui et al., 2011). Interestingly, it has been reported in breast cancer cells that an increased expression of miR-377 and miR-520f-520c predicts the positive status of PR, whereas an increased expression of miR-520g and miR-527-518a predicts the negative status of PR. Moreover, transcriptional silencing of both PR gene isoforms mediated by miRNA mimics (synthetic miRNAs) on T47D cells, introduces another mechanism of gene regulation. The targets of these synthetic miRNAs are ncRNA transcripts produced from the PR gene promoter (Younger and Corey, 2011).

The study of miRNAs and their role in PR regulation is an important field since miRNAs have potential use as disease biomarkers, important implications in physiological processes such as the menstrual cycle, and a role in the transition to pathogenic states, such as endometriosis and cancer (Panda et al., 2012; Rivas et al., 2012; Wang et al., 2013).

#### 1.4. Long range epigenetic regulation

Long range interactions are also one of the main mechanisms of the regulation of gene expression. In fact, there are genes regulated by an enormous amount of distal regulatory elements found as far as

megabases of distance from the transcription start site of genes (Kikuta et al., 2007; Nobrega et al., 2003). Enhancers are the most common regulatory regions that are found in the distal regions of proximal promoters, and possess multiple binding sites for transcription factors and coregulators (Heintzman et al., 2009). It has been suggested that enhancers physically interact with promoters by chromatin looping in order to regulate transcription (Tolhuis et al., 2002), which highlights the importance of nuclear architecture.

Genome wide analyses have revealed the presence of eight ER $\alpha$  associated genomic regions upstream of the PR gene (Carroll et al., 2006; Lin et al., 2007; Vega et al., 2006). These regions have been designated by their upstream location (in kilobases) relative to the transcription start site of PRB (with the exception of the 4 kb upstream site designated as PR + 4). Interestingly, most of these regions contain ERE or potential ERE sites (Bonéy-Montoya et al., 2010). In fact, ER $\alpha$  was associated with these distal regions after estradiol exposure in MCF7 cells, in a region and time dependent manner. In contrast, the enrichment of estrogen dependent histone acetylation, as well as the positioning of two ER $\alpha$  coactivators, were only observed at some of the PR gene distal regions.

Interestingly, by using chromosome conformation capture assays (3C) the authors showed that there was an increased interaction between most of the distal regions and the proximal PR promoter region in the presence of estradiol. The functional relevance of specific distal regions was demonstrated by using a reporter plasmid and mutation assays, which highlights the contribution of distal regions in the fine tuned PR gene regulation. Furthermore, ER $\alpha$  recruitment at the enhancer region has been associated with the H3K4me1 rather than the H3K4me3 mark (Stratmann and Haendler, 2011).

In addition, it has recently been reported that PR gene induction by estradiol is affected by the knockdown of an enhancer RNA (eRNA) located adjacent to the PR gene (Wu et al., 2013). eRNAs are bidirectional non coding RNAs transcribed on enhancers (Hah et al., 2011; Kim et al., 2010; Wang et al., 2011) that strengthen the formation of specific enhancer-promoter looping (Li et al., 2013). This finding suggests that localized modifications in chromatin organization are the result of another estradiol influenced regulation mechanism of PR gene expression (Bonéy-Montoya et al., 2010).

## 2. Epigenetic regulation of PR gene isoforms in the sexual brain

The coordination between behavior and reproduction is carried out in the brain, as defined by the organizational-activational hypothesis (Gorski and Wagner, 1965). This hypothesis supports that the presentation of male sexual behavior in adulthood is achieved by two processes. First, by the neural organization induced by androgen production in the developing male gonads and their subsequent aromatization to estrogens in the developing brain. Second, by the androgen production in adulthood which activates the previously organized brain. On the other hand, female sexual behavior is achieved by neural organization without estrogen influence during development and by the female gonad hormones in adulthood. In addition, the capability to modify sexual brain during critical period of differentiation, can be observed when female sexual behavior is removed by the defeminization process (Arrieta et al., 2003; Todd et al., 2005).

It has been suggested that the maintenance of developmental neural organization, required to respond to specific hormones in adulthood, is carried out by epigenetic regulation (McCarthy and Nugent, 2013). Moreover, we and others have demonstrated that epigenetic regulation is also a dynamic process in response to hormones in the adult brain. Accordingly, there are several reports that highlight the role of epigenetic regulation in the sexual brain.

These reports cover many topics, including the influence of early maternal care on brain development (Curley et al., 2011; Edelmann and Auger, 2011), the sex differences in the enrichment of specific histone marks of different brain regions (Tsai et al., 2009), and the influence of HDAC inhibitors on sexual performance (Matsuda et al., 2011). Additional information can be obtained from two reports (McCarthy and Nugent, 2013; Menger et al., 2010). In the current section, we focus on histone modifications and DNA methylation involved in PR regulation in the sexual brain.

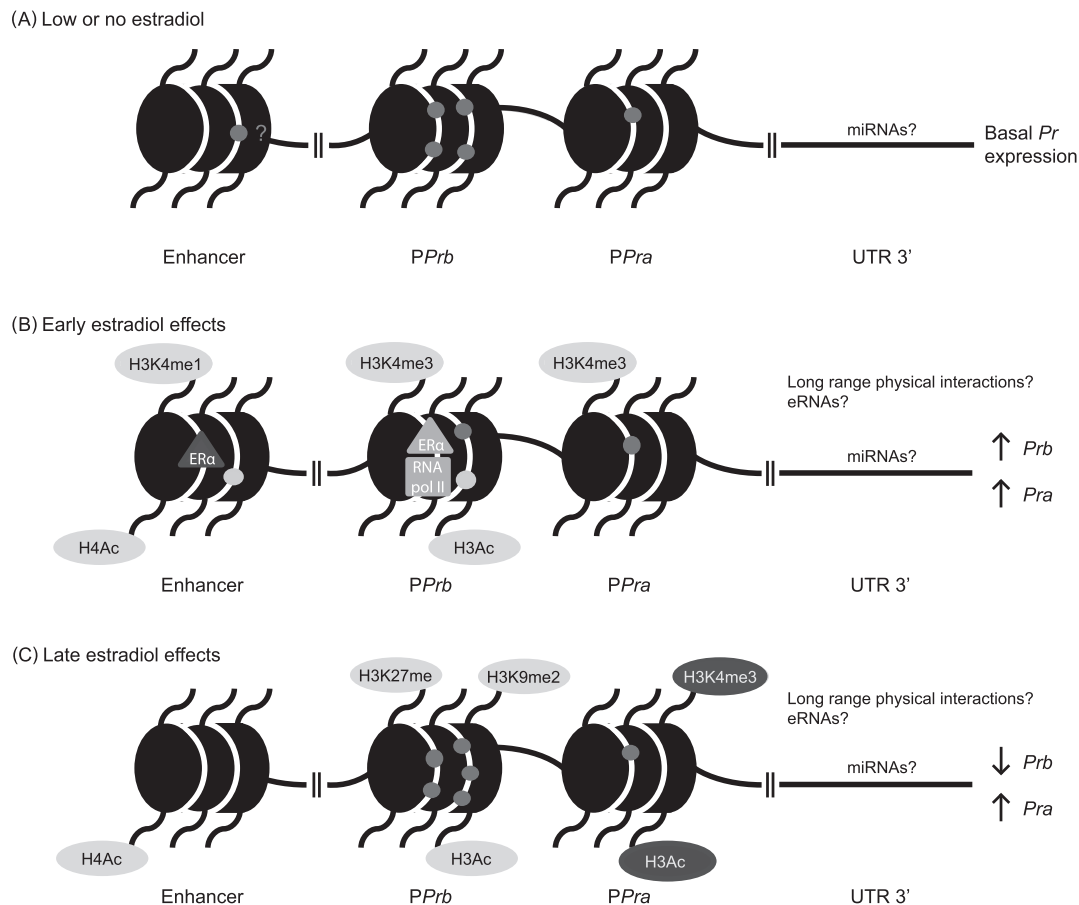
### 2.1. Histone modifications in the sexual brain

Estrogens are one of the main hormones involved in the acquisition of reproductive behavior in female rodents. In fact, estrogens and ER $\alpha$  are essential for the display of lordosis, which is the primary sexual behavior in female rodents. This behavior is controlled by the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH), a nucleus of the mediobasal hypothalamus (MBH) (Parsons et al., 1981; Pfaff and Sakuma, 1979; Pfaff, 1989). In the VMH, ER $\alpha$  directs the expression of lordosis associated genes in order to promote receptivity in female rodents (Mong and Pfaff, 2004). Particularly, the estradiol dependent induction of the PR gene in the VMH is one of the earliest and most important events in the presentation of sexual behavior in female rodents (Parsons et al., 1981).

We and others have shown that there is a specific variation in PR isoforms in the rodent brain throughout the estrous cycle and with hormonal treatments, and that this pattern of PR isoform expression is related to the onset of sexual behavior (Camacho-Arroyo et al., 1998; Guerra-Araiza et al., 2003; Mendoza-Garcés et al., 2010, 2013). Interestingly, it has been reported that the HDAC inhibitor, sodium butyrate (SB), promotes an estradiol and progesterone dependent increase in the average lordosis quotients of ovariectomized female mice (Bonthuis et al., 2011).

Recently, it has been reported that histone marks are involved in the transcriptional regulation of the PR gene in mouse VMH after a short time of estradiol treatments (Gagnidze et al., 2013). In that study, the global levels of transcriptionally active and repressive histone marks showed a specific and transient induction pattern between the first 6 h of estradiol treatment. Furthermore, a specific enrichment of H3Ac and H3K4me3 histone marks in four different regions of PR promoter was described. Interestingly, this was dependent on the time of exposure to estradiol and the brain region studied.

This differential pattern of histone marks in the promoters of both PR isoforms is consistent with the differential DNA methylation status found in our physiological model (Mendoza-Garcés et al., 2013), which suggests that both isoforms are differentially regulated at the epigenetic level in the sexual brain (Section 2.2). Moreover, Gagnidze observed that ER $\alpha$  was only recruited at two



**Fig. 1.** Epigenetic regulation of PR gene in the sexual brain by estradiol. The present model of PR gene isoforms regulation is based on the recent advances made on the epigenetic field in the MBH of female rodents, as well as in classical cell and tissue models. This model shows representative nucleosomes at each part of the PR gene, as well as distal and gene body regions (the figure is not in scale). For details of the model description refer to the text. Note that the DNA that is wrapping histones is represented by white lines, and linker DNA is represented by black lines. DNA methylation marks are represented by dark gray circles and proposed DNA hydroxymethylation marks are represented by light gray circles. Histone modifications enrichment after estradiol exposure are represented by dark gray ovals (reported in the sexual brain model) and by light gray ovals (reported in other models), both located at dark histone tails. Recruitment of ER $\alpha$  and RNA pol II after estradiol exposure is represented by a light gray triangle and square, respectively. The dark gray triangle represents the positioning of ER $\alpha$  in a breast cancer model. The effect of the corresponding epigenetic marks on PR gene isoforms expression level is indicated at the right of each figure by arrows.

enhancer sites after estradiol exposure (Gagnidze et al., 2013). However, the specific promoter region of the *PRB* isoform was not included.

## 2.2. DNA methylation in sexual brain

In the context of the regulation of sexual behavior, the MBH and preoptic area (POA) have been the most studied brain regions. It has been reported that PR expression in the POA and MBH is different between males and females during sexual differentiation in rodents, and this process depends on ER $\alpha$  activity.

It has been reported that the DNA methylation pattern of the PR promoter does not change between genders throughout growth and adulthood in POA and MBH hypothalamic areas. In contrast, significant differences in the methylation pattern of ER $\alpha$  during the critical period of sexual differentiation have been found (Schwarz et al., 2010).

Our group has recently described a transient methylation of the *PRB* promoter during the evening of proestrus, which has been correlated with a switch in the expression pattern of both protein and mRNA PR isoforms. This suggests an important role of DNA methylation of PR in sexual brain function (Mendoza-Garcés et al., 2013).

## 2.3. Future directions

Even though there are many studies about PR epigenetic regulation in different cell and tissue models, there is scarce research about the sexual brain. It is of great relevance to investigate if mechanisms reported in other models, such as miRNA and long range regulation, are involved in the regulation of the PR in brain areas, such as the VMH, as well as their role in sexual behavior. Recent results from our lab suggest that there is a specific methylation state in each PR isoform promoter, which correlates with the expression of each isoform during the day of proestrus (Mendoza-Garcés et al., 2013). In addition, our preliminary *in vitro* results suggest that there is a specific chromatin state in each promoter that correlates with estradiol induction of each isoform, as well as with the positioning of transcription factors and RNA polymerase II using a hypothalamic cell line (submitted for publication).

The specific analysis of epigenetic marks is of importance in the understanding of the complex regulation of PR, and its implication in reproduction and behavior, as well as in pathological models such endometriosis, infertility and cancer. Further studies are needed to determine the participation of other epigenetic mechanisms of regulation such as nuclear architecture and active DNA demethylation. Particularly, it has been demonstrated in HeLa cells that ER $\alpha$  has a nuclear localization and displays a specific relocalization after estradiol treatment associated with nuclear matrix dynamics (Matsuda et al., 2008). Thus, it would be of interest to determine if the PR gene co-localizes with ER distribution in hypothalamic neuronal nuclei such as the VMH. On the other hand, the importance of an active DNA demethylation intermediary, the 5 hydroxymethylcytosine (hmC), in the brain has been recently recognized (Gavin et al., 2013), suggesting another open field of investigation in PR isoforms regulation and their possible role in the sexual brain.

Along this line, we propose a model in which PR isoforms regulation in the MBH of female rodents is time and promoter dependent after estradiol exposure (Fig. 1). In this model we suggest that during early estradiol exposure there is an increase in the transcriptionally active histone marks in *PRB* promoter, a decrease in DNA methylation (Mendoza-Garcés et al., 2013), and recruitment of ER $\alpha$  and RNA pol II (data not published), which correlates with the induction of the respective isoform. In addition, during early estradiol exposure there is a modest increase in *PRA* isoform

expression, which could correlate with the increase of the H3K4me3 mark or the decrease in the positioning of H3K4me demethylases, as suggested in other models (Section 1.1).

On the other hand, this model suggests that during late estradiol exposure, there is an increase in DNA methylation and in the transcriptionally repressive histone marks in the *PRB* promoter, as well as a decrease in transcriptionally active histone marks and ER $\alpha$  and RNA pol II recruitment (submitted for publication), which correlates with the decrease in *PRB* isoform expression. In contrast, at this time of estradiol exposure there is a greater increase in *PRA* isoform expression, which correlates with the increase in the transcriptionally active histone marks in the *PRA* promoter (Gagnidze et al., 2013). Interestingly, the induction of *PRA* isoform is independent of the recruitment of ER $\alpha$ . Therefore, we propose that in sexual brain *PRB* isoform induction by estradiol is transient and ER $\alpha$  dependent, and correlates with the epigenetic state of its promoter. In contrast, it would seem that *PRA* induction is continuous and depends on other mechanisms of gene regulation apart from histone modifications, probably by ncRNAs or distal gene interactions.

## 3. Conclusions

Regulation of PR gene isoforms expression is quite complex and involves the participation of epigenetic mechanisms that are context dependent and tissue specific for each isoform. The elucidation of these mechanisms in the sexual brain would contribute to the explanation of the estrogen dependent PR action, as well as the regulation of sexual behavior and brain functions in physiological and pathological models.

## Acknowledgements

We acknowledge Bruce Allan Larsen for reviewing the use of English in the manuscript, and Dr. Martine Perrot-Applanat for the critical revision of the manuscript.

## References

- Adams, B.D., Furneaux, H., White, B., 2007. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol. Endocrinol.* 21, 1132–1147.
- Apostolakis, E.M., Ramamurthy, M., Zhou, D., Oñate, S., O'Malley, B.W., 2002. Acute disruption of select steroid receptor coactivators prevents reproductive behavior in rats and unmasks genetic adaptation in knockout mice. *Mol. Endocrinol.* 16, 1511–1523.
- Arrieta, I., Díaz-Ibáñez, L.B., Morales, T., Mendoza-Garcés, L., Morimoto, S., Moreno-Mendoza, N., Cerbón, M.A., 2003. Progesterone receptor gene and protein expression in the anterior preoptic area and hypothalamus of defeminized rats. *J. Neurobiol.* 15, 338–346.
- Badía, E., Duchesne, M.J., Semlali, A., Fuentes, M., Giamarchi, C., Richard-Foy, H., Nicolas, J.C., Pons, M., 2000. Long-term hydroxytamoxifen treatment of an MCF-7-derived breast cancer cell line irreversibly inhibits the expression of estrogenic genes through chromatin remodeling. *Cancer Res.* 60, 4130–4138.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K., 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823–837.
- Benevolenskaya, E.V., 2007. Histone H3K4 demethylases are essential in development and differentiation. *Biochem. Cell Biol.* 85, 435–443.
- Bergeron, C., Amant, F., Ferenczy, A., 2006. Pathology and physiopathology of adenomyosis. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 20, 511–521.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–326.
- Biçaku, E., Marchion, D.C., Schmitt, M.L., Münster, P.N., 2008. Selective inhibition of histone deacetylase 2 silences progesterone receptor-mediated signaling. *Cancer Res.* 68, 1513–1519.
- Bonéy-Montoya, J., Ziegler, Y.S., Curtis, C.D., Montoya, J.A., Nardulli, A.M., 2010. Long-range transcriptional control of progesterone receptor expression. *Mol. Endocrinol.* 24, 346–358.

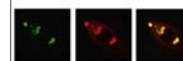
- Bonthuis, P.J., Patteson, J.K., Rissman, E.F., 2011. Acquisition of sexual receptivity: roles of chromatin acetylation, estrogen receptor- $\alpha$ , and ovarian hormones. *Endocrinology* 152, 3172–3181.
- Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., González-Morán, G., 2007. Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 146, 644–652.
- Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., Cerbón, M.A., 1998. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 9, 3993–3996.
- Carling, T., Kim, K.-C., Yang, X.-H., Gu, J., Zhang, X.-K., Huang, S., 2004. A histone methyltransferase is required for maximal response to female sex hormones. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7032–7042.
- Carroll, J.S., Meyer, C.A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T.R., Eeckhoutte, J., Brodsky, A.S., Keeton, E.K., Fertuck, K.C., Hall, G.F., Wang, Q., Bekiranov, S., Sementchenko, V., Fox, E.A., Silver, P.A., Gingeras, T.R., Liu, X.S., Brown, M., 2006. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat. Genet.* 38, 1289–1297.
- Catchpole, S., Spencer-Dene, B., Hall, D., Santangelo, S., Rosewell, I., Guenatri, M., Beatson, R., Scibetta, A.G., Burchell, J.M., Taylor-Papadimitriou, J., 2011. PLU-1/JARID1B/KDM5B is required for embryonic survival and contributes to cell proliferation in the mammary gland and in ER+ breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* 38, 1267–1277.
- Chai, S.Y., Smith, R., Fitter, J.T., Mitchell, C., Pan, X., Ilicic, M., Maiti, K., Zakar, T., Madsen, G., 2014. Increased progesterone receptor  $\alpha$  expression in labouring human myometrium is associated with decreased promoter occupancy by the histone demethylase JARID1A. *Mol. Hum. Reprod.* 20, 442–453.
- Chai, S.Y., Smith, R., Zakar, T., Mitchell, C., Madsen, G., 2012. Term myometrium is characterized by increased activating epigenetic modifications at the progesterone receptor- $\alpha$  promoter. *Mol. Hum. Reprod.* 18, 401–409.
- Chu, Y., Wang, Y., Zhang, G., Chen, H., Dowdy, S.C., Xiong, Y., Liu, F., Zhang, R., Li, J., Jiang, S.-W., 2014. Chromatin composition alterations and the critical role of MeCP2 for epigenetic silencing of progesterone receptor- $\beta$  gene in endometrial cancers. *Cell. Mol. Life Sci.*, in press.
- Cochrane, D.R., Jacobsen, B.M., Connaghan, K.D., Howe, E.N., Bain, D.L., Richer, J.K., 2012. Progesterone regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355, 15–24.
- Cui, W., Li, Q., Feng, L., Ding, W., 2011. MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. *Mol. Cell. Biochem.* 355, 17–25.
- Curley, J.P., Mashoodh, R., Champagne, F.A., 2011. Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm. Behav.* 59, 306–314.
- Dupont, C., Armand, D.R., Brenner, C.A., 2009. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin. Reprod. Med.* 27, 351–357.
- Edelmann, M.N., Auger, A.P., 2011. Epigenetic impact of simulated maternal grooming on estrogen receptor  $\alpha$  within the developing amygdala. *Brain Behav. Immun.* 25, 1299–1304.
- Felsenfeld, G., 2014. A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 6, a018200.
- Fleury, L., Gerus, M., Lavigne, A.C., Richard-Foy, H., Bystricky, K., 2008. Eliminating epigenetic barriers induces transient hormone-regulated gene expression in estrogen receptor negative breast cancer cells. *Oncogene* 27, 4075–4085.
- Fortunati, N., Bertino, S., Costantino, L., De Bortoli, M., Compagnone, A., Bandino, A., Catalano, M.G., Bocuzzi, G., 2010. Valproic acid restores ER  $\alpha$  and antiestrogen sensitivity to ER  $\alpha$ -negative breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 314, 17–22.
- Gagnidze, K., Weil, Z.M., Faustino, L.C., Schaafsma, S.M., Pfaff, D.W., 2013. Early histone modifications in the ventromedial hypothalamus and preoptic area following oestradiol administration. *J. Neuroendocrinol.* 25, 939–955.
- Gaudet, M.M., Campan, M., Figueroa, J.D., Yang, X.R., Lissowska, J., Peplonska, B., Brinton, L.A., Rimm, D.L., Laird, P.W., Garcia-Closas, M., Sherman, M.E., 2009. DNA hypermethylation of ESR1 and PGR in breast cancer: pathologic and epidemiologic associations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 3036–3043.
- Gavin, D.P., Chase, K.A., Sharma, R.P., 2013. Active DNA demethylation in post-mitotic neurons: a reason for optimism. *Neuropharmacology* 75, 233–245.
- Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14, 121–141.
- Goldberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E., 2007. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635–638.
- Gorski, R.A., Wagner, J.W., 1965. Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. *Endocrinology* 76, 226–239.
- Guerra-Araiza, C., Cerbón, M.A., Morimoto, S., Camacho-Arroyo, I., 2000. Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci.* 66, 1743–1752.
- Guerra-Araiza, C., Villamar-Cruz, O., González-Arenas, A., Chavira, R., Camacho-Arroyo, I., 2003. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J. Neuroendocrinol.* 15, 984–990.
- Hah, N., Danko, C.G., Core, L., Waterfall, J.J., Siepel, A., Lis, J.T., Kraus, W.L., 2011. A rapid, extensive, and transient transcriptional response to estrogen signaling in breast cancer cells. *Cell* 145, 622–634.
- Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Peña-Ortiz, M.A., García-Gómez, E., Rodríguez-Dorantes, M., Camacho-Arroyo, I., 2013. The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines. *Steroids* 78, 500–507.
- Heintzman, N.D., Hon, G.C., Hawkins, R.D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L.F., Ye, Z., Lee, L.K., Stuart, R.K., Ching, C.W., Ching, K.A., Antosiewicz-Bourget, J.E., Liu, H., Zhang, X., Green, R.D., Lobanenkov, V.V., Stewart, R., Thomson, J.A., Crawford, G.E., Kellis, M., Ren, B., 2009. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459, 108–112.
- Huang, V., Li, L.-C., 2012. MiRNA goes nuclear. *RNA Biol.* 9, 269–273.
- Huang, V., Li, L.-C., 2014. Demystifying the nuclear function of argonaute proteins. *RNA Biol.* 11, 18–24.
- Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P., 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9, 1603–1614.
- Kikuta, H., Laplante, M., Navratilova, P., Komisarczuk, A.Z., Engström, P.G., Fredman, D., Akalin, A., Caccamo, M., Sealy, I., Howe, K., Ghislain, J., Pezeron, G., Mourrain, P., Ellingsen, S., Oates, A.C., Thisse, C., Thisse, B., Foucher, I., Adolf, B., Gelling, A., Lenhard, B., Becker, T.S., 2007. Genomic regulatory blocks encompass multiple neighboring genes and maintain conserved synteny in vertebrates. *Genome Res.* 17, 545–555.
- Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J.M., Costa, A.M., Bear, D.M., Wu, J., Harmin, D.A., Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., Markenscoff-Papadimitriou, E., Kuhl, D., Bito, H., Worley, P.F., Kreiman, G., Greenberg, M.E., 2010. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* 465, 182–187.
- Klose, R.J., Zhang, Y., 2007. Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 307–318.
- Kohli, R.M., Zhang, Y., 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472–479.
- Kondo, Y., Shen, L., Suzuki, S., Kurokawa, T., Masuko, K., Tanaka, Y., Kato, H., Mizuno, Y., Yokoe, M., Sugauchi, F., Hirashima, N., Orito, E., Osada, H., Ueda, R., Guo, Y., Chen, X., Issa, J.-P.J., Sekido, Y., 2007. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol. Res.* 37, 974–983.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Kraus, W.L., Montano, M.M., Katzenellenbogen, B.S., 1993. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol. Endocrinol.* 7, 1603–1616.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrum, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, R.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickinson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramsay, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrino, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Leu, Y.-W., Yan, P.S., Fan, M., Jin, V.X., Liu, J.C., Curran, E.M., Welshons, W.V., Wei, S.H., Davuluri, R.V., Plass, C., Nephew, K.P., Huang, T.H.-M., 2004. Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer. *Cancer Res.* 64, 8184–8192.
- Li, W., Notani, D., Ma, Q., Tanasa, B., Nunez, E., Chen, A.Y., Merkurjev, D., Zhang, J., Ohgi, K., Song, X., Oh, S., Kim, H.-S., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2013. Functional

- roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* 498, 516–520.
- Li, X., Chen, C., Luo, H., van Velkinburgh, J.C., Ni, B., Chang, Q., 2014. Decreased DNA Methylations at the Progesterone Receptor Promoter A Induce Functional Progesterone Withdrawal in Human Parturition. *Reprod. Sci.*, in press.
- Lin, C.-Y., Vega, V.B., Thomsen, J.S., Zhang, T., Kong, S.L., Xie, M., Chiu, K.P., Lipovich, L., Barnett, D.H., Stossi, F., Yeo, A., George, J., Kuznetsov, V.A., Lee, Y.K., Charn, T.H., Palanisamy, N., Miller, L.D., Cheung, E., Katzenellenbogen, B.S., Ruan, Y., Bourque, G., Wei, C.-L., Liu, E.T., 2007. Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS Genet.* 3, e87.
- Liu, J.-L., Liang, X.-H., Su, R.-W., Lei, W., Jia, B., Feng, X.-H., Li, Z.-X., Yang, Z.-M., 2012. Combined analysis of microRNome and 3'-UTRome reveals a species-specific regulation of progesterone receptor expression in the endometrium of rhesus monkey. *J. Biol. Chem.* 287, 13899–13910.
- Lomniczi, A., Loche, A., Castellano, J.M., Ronnekleiv, O.K., Bosch, M., Kaidar, G., Knoll, J.G., Wright, H., Pfeifer, G.P., Ojeda, S.R., 2013. Epigenetic control of female puberty. *Nat. Neurosci.* 16, 281–289.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Matsuda, K., Nishi, M., Takaya, H., Kaku, N., Kawata, M., 2008. Intracellular mobility of estrogen receptor alpha and progesterone receptors in association with nuclear matrix dynamics. *J. Cell. Biochem.* 103, 136–148.
- Matsuda, K.I., Mori, H., Nugent, B.M., Pfaff, D.W., McCarthy, M.M., Kawata, M., 2011. Histone deacetylation during brain development is essential for permanent masculinization of sexual behavior. *Endocrinology* 152, 2760–2767.
- McCarthy, M.M., Nugent, B.M., 2013. Epigenetic contributions to hormonally-mediated sexual differentiation of the brain. *J. Neuroendocrinol.* 25, 1133–1140.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., O'Malley, B.W., 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20, 321–344.
- Mendoza-Garcés, L., Camacho-Arroyo, I., Cerbón, M.A., 2010. Effects of mating on progesterone receptor isoforms in rat hypothalamus. *Neuroreport* 21, 513–516.
- Mendoza-Garcés, L., Rodríguez-Dorantes, M., Alvarez-Delgado, C., Vázquez-Martínez, E.R., García-Tobilla, P., Cerbón, M.A., 2013. Differential DNA methylation pattern in the A and B promoters of the progesterone receptor is associated with differential mRNA expression in the female rat hypothalamus during proestrus. *Brain Res.* 1535, 71–77.
- Menger, Y., Bettscheider, M., Murgatroyd, C., Spengler, D., 2010. Sex differences in brain epigenetics. *Epigenomics* 2, 807–821.
- Merlino, A.A., Welsh, T.N., Tan, H., Yi, L.J., Cannon, V., Mercer, B.M., Mesiano, S., 2007. Nuclear progesterone receptors in the human pregnancy myometrium: evidence that parturition involves functional progesterone withdrawal mediated by increased expression of progesterone receptor-A. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1927–1933.
- Mesiano, S., Wang, Y., Norwitz, E.R., 2011. Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: do they hold the key to birth timing? *Reprod. Sci.* 18, 6–19.
- Meyer, J.L., Zimbardi, D., Podgaec, S., Amorim, R.L., Abrão, M.S., Rainho, C.A., 2014. DNA methylation patterns of steroid receptor genes *ESR1*, *ESR2* and *PGR* in deep endometriosis compromising the rectum. *Int. J. Mol. Med.* 33, 897–904.
- Molenda, H.A., Griffin, A.L., Auger, A.P., McCarthy, M.M., Tetel, M.J., 2002. Nuclear receptor coactivators modulate hormone-dependent gene expression in brain and female reproductive behavior in rats. *Endocrinology* 143, 436–444.
- Mong, J.A., Pfaff, D.W., 2004. Hormonal symphony: steroid orchestration of gene modules for sociosexual behaviors. *Mol. Psychiatry* 9, 550–556.
- Nagasue, N., Kohno, H., Yamano, A., Kimoto, T., Chang, Y.C., Nakamura, T., 1991. Progesterone receptor in hepatocellular carcinoma. Correlation with androgen and estrogen receptors. *Cancer* 67, 2501–2505.
- Nie, J., Lu, Y., Liu, X., Guo, S.-W., 2009. Immunoreactivity of progesterone receptor isoform B, nuclear factor kappaB, and IkappaBalpha in adenomyosis. *Fertil. Steril.* 92, 886–889.
- Nie, Jichan, Liu, Xishi, Guo, S.-W., 2010. Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in adenomyosis and its rectification by a histone deacetylase inhibitor and a demethylation agent. *Reprod. Sci.* 17, 995–1005.
- Nobrega, M.A., Ovcharenko, I., Afzal, V., Rubin, E.M., 2003. Scanning human gene deserts for long-range enhancers. *Science* 302, 413.
- O'Malley, B.W., Sherman, M.R., Toft, D.O., 1970. Progesterone “receptors” in the cytoplasm and nucleus of chick oviduct target tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 501–508.
- Oñate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W., 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354–1357.
- Panda, H., Chuang, T.-D., Luo, X., Chegini, N., 2012. Endometrial miR-181a and miR-98 expression is altered during transition from normal into cancerous state and target *PGR*, *PGRMC1*, *CYP19A1*, *DDX3X*, and *TIMP3*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1316–1326.
- Parsons, B., Rainbow, T.C., Pfaff, D.W., McEwen, B.S., 1981. Oestradiol, sexual receptivity and cytosol progesterin receptors in rat hypothalamus. *Nature* 292, 58–59.
- Pathiraja, T.N., Shetty, P.B., Jelinek, J., He, R., Hartmaier, R., Margossian, A.L., Hilsenbeck, S.G., Issa, J.-P.J., Oesterreich, S., 2011. Progesterone receptor isoform-specific promoter methylation: association of PRA promoter methylation with worse outcome in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 17, 4177–4186.
- Peterson, T.J., Karmakar, S., Pace, M.C., Gao, T., Smith, C.L., 2007. The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) corepressor is required for full estrogen receptor alpha transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5933–5948.
- Petz, L.N., Ziegler, Y.S., Loven, M.A., Nardulli, A.M., 2002. Estrogen receptor alpha and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 143, 4583–4591.
- Petz, L.N., Ziegler, Y.S., Schultz, J.R., Kim, H., Kemper, J.K., Nardulli, A.M., 2004. Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 113–122.
- Pfaff, D.W., 1989. Features of a hormone-driven defined neural circuit for a mammalian behavior. Principles illustrated, neuroendocrine syllogisms, and multiplicative steroid effects. *Ann. NY Acad. Sci.* 563, 131–147.
- Pfaff, D.W., Sakuma, Y., 1979. Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Physiol.* 288, 189–202.
- Pieber, D., Allport, V.C., Hills, F., Johnson, M., Bennett, P.R., 2001. Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 875–879.
- Ren, Y., Liu, X., Ma, D., Feng, Y., Zhong, N., 2007. Down-regulation of the progesterone receptor by the methylation of progesterone receptor gene in endometrial cancer cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 175, 107–116.
- Renthal, N.E., Chen, C.-C., Williams, K.C., Gerard, R.D., Prange-Kiel, J., Mendelson, C.R., 2010. MiR-200 family and targets, ZEB1 and ZEB2, modulate uterine quiescence and contractility during pregnancy and labor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 20828–20833.
- Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Manning, N.G., Abel, M.G., Wolf, D.M., Horwitz, K.B., 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 277, 5209–5218.
- Rivas, M.A., Venturutti, L., Huang, Y.-W., Schillaci, R., Huang, T.H.-M., Elizalde, P.V., 2012. Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progesterin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. *Breast Cancer Res.* 14, R77.
- Ruh, M.F., Tian, S., Cox, L.K., Ruh, T.S., 1999. The effects of histone acetylation on estrogen responsiveness in MCF-7 cells. *Endocrine* 11, 157–164.
- Samartzis, E.P., Noske, A., Samartzis, N., Fink, D., Imesch, P., 2013. The expression of histone deacetylase 1, but not other class I histone deacetylases, is significantly increased in endometriosis. *Reprod. Sci.* 20, 1416–1422.
- Schwarz, J.M., Nugent, B.M., McCarthy, M.M., 2010. Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology* 151, 4871–4881.
- Shao, R., 2013. Progesterone receptor isoforms A and B: new insights into the mechanism of progesterone resistance for the treatment of endometrial carcinoma. *Ecancermedicallscience* 7, 381.
- Stratmann, A., Haendler, B., 2011. The histone demethylase JARID1A regulates progesterone receptor expression. *FEBS J.* 278, 1458–1469.
- Tetel, M.J., Acharya, K.D., 2013. Nuclear receptor coactivators: regulators of steroid action in brain and behaviour. *J. Neuroendocrinol.* 25, 1209–1218.
- Tetel, M.J., Auger, A.P., Charlier, T.D., 2009. Who's in charge? nuclear receptor coactivator and corepressor function in brain and behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 328–342.
- Todd, B.J., Schwarz, J.M., McCarthy, M.M., 2005. Prostaglandin-E2: a point of divergence in estradiol-mediated sexual differentiation. *Horm. Behav.* 48, 512–521.
- Tognoni, C.M., Chadwick, J.G., Ackeifi, C.A., Tetel, M.J., 2011. Nuclear receptor coactivators are coexpressed with steroid receptors and regulated by estradiol in mouse brain. *Neuroendocrinology* 94, 49–57.
- Tolhuis, B., Palstra, R.-J., Splinter, E., Grosveld, F., de Laat, W., 2002. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active  $\beta$ -globin locus. *Mol. Cell* 10, 1453–1465.
- Tsai, H.-W., Grant, P.A., Rissman, E.F., 2009. Sex differences in histone modifications in the neonatal mouse brain. *Epigenetics* 4, 47–53.
- Vega, V.B., Lin, C.-Y., Lai, K.S., Kong, S.L., Xie, M., Su, X., Teh, H.F., Thomsen, J.S., Yeo, A.L., Sung, W.K., Bourque, G., Liu, E.T., 2006. Multiplatform genome-wide identification and modeling of functional human estrogen receptor binding sites. *Genome Biol.* 7, R82.
- Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Wen, D.X., Goldman, M.E., O'Malley, B.W., McDonnell, D.P., 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 7, 1244–1255.
- Walton, T.J., Li, G., Seth, R., McArdle, S.E., Bishop, M.C., Rees, R.C., 2008. DNA demethylation and histone deacetylation inhibition co-operate to re-express estrogen receptor beta and induce apoptosis in prostate cancer cell-lines. *Prostate* 68, 210–222.
- Wang, D., Garcia-Bassets, I., Benner, C., Li, W., Su, X., Zhou, Y., Qiu, J., Liu, W., Kaikkonen, M.U., Ohgi, K.A., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Fu, X.-D., 2011. Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA. *Nature* 474, 390–394.
- Wang, P.-Y., Gong, H.-T., Li, B.-F., Lv, C.-L., Wang, H.-T., Zhou, H.-H., Li, X.-X., Xie, S.-Y., Jiang, B.-F., 2013. Higher expression of circulating miR-182 as a novel biomarker for breast cancer. *Oncol. Lett.* 6, 1681–1686.
- White, M.M., Sheffer, I., Teeter, J., Apostolakis, E.M., 2007. Hypothalamic progesterone receptor-A mediates gonadotropin surges, self priming and receptivity in estrogen-primed female mice. *J. Mol. Endocrinol.* 38, 35–50.
- Williams, K.C., Renthal, N.E., Condon, J.C., Gerard, R.D., Mendelson, C.R., 2012. MicroRNA-200a serves a key role in the decline of progesterone receptor function leading to term and preterm labor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 7529–7534.

- Won Jeong, K., Chodankar, R., Purcell, D.J., Bittencourt, D., Stallcup, M.R., 2012. Gene-specific patterns of coregulator requirements by estrogen receptor- $\alpha$  in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 26, 955–966.
- Wu, J., Li, Q., Wang, X., Yu, S., Li, L., Wu, X., Chen, Y., Zhao, J., Zhao, Y., 2013. Neuroprotection by curcumin in ischemic brain injury involves the Akt/Nrf2 pathway. *PLoS One* 8, e59843.
- Xiong, Y., Dowdy, S.C., Gonzalez Bosquet, J., Zhao, Y., Eberhardt, N.L., Podratz, K.C., Jiang, S.-W., 2005. Epigenetic-mediated upregulation of progesterone receptor B gene in endometrial cancer cell lines. *Gynecol. Oncol.* 99, 135–141.
- Xu, X., Murdoch, F.E., Curran, E.M., Welshons, W.V., Fritsch, M.K., 2004. Transcription factor accessibility and histone acetylation of the progesterone receptor gene differs between parental MCF-7 cells and a subline that has lost progesterone receptor expression. *Gene* 328, 143–151.
- Yang, S., Xiao, X., Jia, Y., Liu, X., Zhang, Y., Devor, E.J., Meng, X., Thiel, K.W., Leslie, K.K., 2014. Epigenetic modification restores functional PR expression in endometrial cancer cells. *Curr. Pharm. Des.* 20, 1874–1880.
- Younger, S.T., Corey, D.R., 2011. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucl. Acids Res.* 39, 5682–5691.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)

Brain Research



## Research Report

# Differential DNA methylation pattern in the A and B promoters of the progesterone receptor is associated with differential mRNA expression in the female rat hypothalamus during proestrus



Luciano Mendoza-Garcés<sup>a,\*</sup>, Mauricio Rodríguez-Dorantes<sup>b</sup>,  
 Carolina Álvarez-Delgado<sup>a</sup>, Edgar Ricardo Vázquez-Martínez<sup>a</sup>,  
 Pilar García-Tobilla<sup>b</sup>, Marco A. Cerbón<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., México

<sup>b</sup>Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4809 Arenal Tepepan, Tlalpan, 14610 México, D.F., México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 21 August 2013

Available online 27 August 2013

#### Keywords:

Progesterone receptor

Hypothalamus

Transient DNA methylation

### ABSTRACT

In rodents, the display of reproductive behavior occurs during the proestrus–estrus transition of the estrus cycle. This behavior is regulated by estradiol and progesterone mainly via their intracellular receptors. Two isoforms of the progesterone receptor have been described (A and B), and they have different promoters for their regulation. It has been demonstrated that the mRNA for both isoforms changes during the proestrus–estrus transition. It has been recently established that DNA methylation can be transient and cyclical in gene promoters, however, these changes have only been reported *in vitro* but not in physiological models. The aim of this study was to analyze the pattern of DNA methylation in the PR (A and B) promoter regions during the proestrus–estrus transition in the rat hypothalamus and its correlation with the regulation of mRNA expression. The results demonstrated a differential mRNA expression of the progesterone receptor (A and B) isoforms. The expression of total PR did not change significantly during the proestrus day, while the expression of isoform B increased significantly at 17:00 h, followed by a significant decrease at 21:00 h of the proestrus day. Interestingly, we also found that the isoform A promoter was mainly unmethylated at all studied time points. In contrast, the isoform B promoter showed a transient methylation increase during the evening of proestrus. The overall results indicate that there is a switch of progesterone receptor isoforms expression during the evening of proestrus that is related to the differential gene methylation patterns of their promoter regions, mainly for the isoform B promoter.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

\*Corresponding author. Present address: Instituto Nacional de Geriatria Periférico Sur 2767 San Jerónimo Lídice, Magdalena Contreras, 10200 México, D.F., México.

E-mail address: [lume5@hotmail.com](mailto:lume5@hotmail.com) (L. Mendoza-Garcés).

## 1. Introduction

In rodents, the display of reproductive behavior occurs during the proestrus–estrus transition of the estrus cycle, and this behavior depends mainly on the effects of estradiol ( $E_2$ ) and progesterone ( $P_4$ ) (Edwards and Pfeifle, 1983). The effects exerted on reproductive behavior by these hormones are mediated by their intracellular receptors. These intracellular receptors work as nuclear transcription factors by regulating gene expression and genomic networks (O'Malley, 1990).

Two isoforms of the progesterone receptor (PR), known as PR-A (86 KDa) and PR-B (110 KDa), have been described. Both isoforms are encoded by the same gene, but are regulated by two different promoters with their respective transcription start sites (Kastner et al., 1990). It has been reported that the pattern of protein expression of the PR isoforms changes during the proestrus–estrus transition in rat hypothalamus. Specifically, the PR-A protein content increases, while PR-B decreases significantly during the deployment of reproductive behavior (Mendoza-Garcés et al., 2010). In addition, it has been demonstrated that the mRNA for both PR isoforms also changes during this period. PR-B mRNA reaches its greatest expression at 17:00 h of proestrus and then declines; while the total PR mRNA does not change during the transition (Liu and Arbogast, 2009). These data show that there is a transient and differential expression of PR isoforms, indicating a regulation at the transcriptional level.

The PR gene contains CpG islands in the 5' upstream region of the promoter (Kastner et al., 1990). CpG islands are areas rich in CG dinucleotides that are within the promoter region of several genes (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). *De novo* methylation and hypermethylation of CpG islands in the promoter have been linked to gene silencing (Issa et al., 1996). Interestingly, an association between PR gene methylation and expression silencing has been demonstrated in different tumors from reproductive tissues.

Other authors have reported that in promoters with few or absence of CpG islands some particular CpG dinucleotides may participate as regulatory elements of gene expression (Han et al., 2011; Hartung et al., 2012).

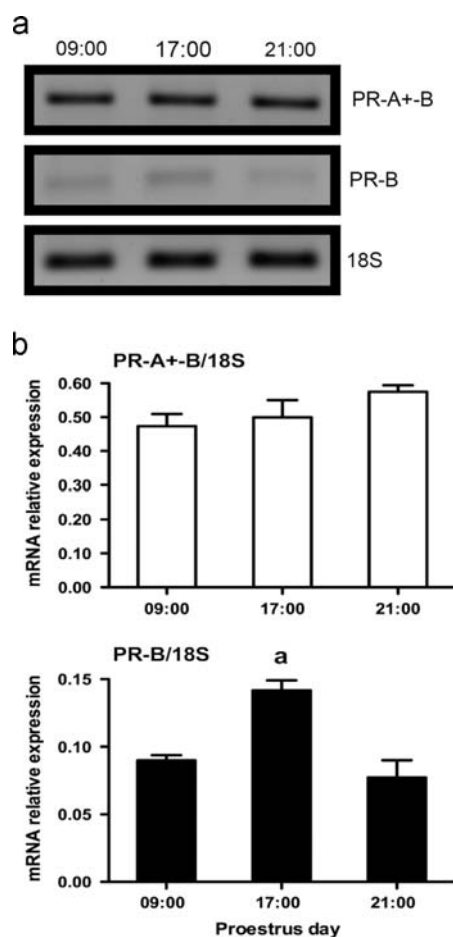
DNA methylation has been described as a stable and heritable process. However, in a series of pioneering experiments, Kangaspeska et al. have described a mechanism of cyclic methylation and demethylation in CpG dinucleotides of gene promoters that encode pS2 (also known as TFF1 Trefoil Factor 1), thus demonstrating that methylation can in fact be a dynamic process (Kangaspeska et al., 2008). Additionally, the expression of estrogen receptor  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) changes according to different methylation modifications; both pS2 and  $ER\alpha$  genes respond to estrogens, and display epigenetic regulation (Wilson et al., 2008). It is unknown if these mechanisms can be involved in the dynamic regulation of PR isoforms during various physiological processes, such as neuroprotection, sexual behavior, maternal behavior, and multiple functions which have been described in the Central Nervous System (CNS). In addition, there is no information about the methylation pattern of CpG sites in the A and B promoter regions of the PR gene in the rat hypothalamus during the proestrus–estrus transition, in which there is a display of sexual

behavior. The aim of this study was to analyze the DNA methylation pattern of PR isoforms promoters during the proestrus–estrus transition in the hypothalamus, and its correlation with the regulation of mRNA expression.

## 2. Results

We evaluated the transcriptional regulation of PR gene isoforms during the proestrus day by amplification of the corresponding PCR products (Fig. 1a). We observed that total PR did not change significantly during all studied time points (Fig. 1b). Interestingly, a significantly higher expression of the PR-B isoform was observed at 17:00 h compared with a lower expression at 09:00 and 21:00 h of proestrus.

The hormonal levels during the proestrus day are depicted in Table 1; all hormonal levels were consistent with those expected for a proestrus–estrus transition. Our results demonstrate that at 17:00 h of proestrus both hormones are at their



**Fig. 1** – PR isoforms expression pattern during the proestrus–estrus transition. (a) RT-PCR representative image for mRNA PR isoforms and 18S at 09:00, 17:00 and 21:00 h of the proestrus–estrus transition in the rat hypothalamus. (b) Analysis of the PR isoforms expression intensity in the three time points studied. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n=5$ ), a  $p < 0.05$  compared with 09:00 and 21:00 h. Animals were maintained in a 14:10 h light/dark cycle (lights on 06:00 h).



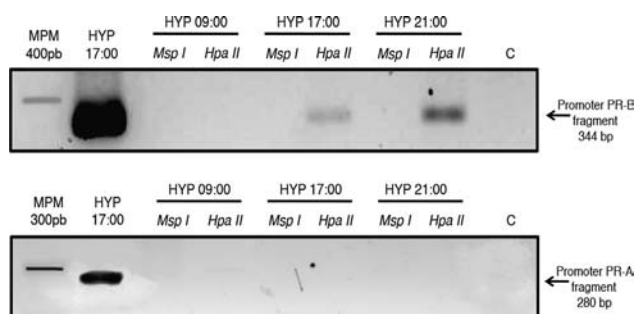
**Table 1 – P<sub>4</sub> and E<sub>2</sub> Serum levels during proestrus–estrus transition in female rats.**

Hour	E <sub>2</sub> (pg/ml)	P <sub>4</sub> (ng/ml)
09:00	34.37 ± 7.17	19.32 ± 4.28
17:00	64.88 ± 5.48 <sup>a</sup>	54.30 ± 11.33 <sup>b</sup>
21:00	24.77 ± 8.24	47.45 ± 8.00

Results are mean ± SEM (n=5),

<sup>a</sup> p < 0.05 compared with 09:00 and 21:00.

<sup>b</sup> p < 0.05 compared with 09:00.



**Fig. 2 – CCGG methylation sites in the PR promoter region of rat hypothalamus in the proestrus–estrus transition. Representative image of a PCR with DNA digested by CpG methylation sensitive (*HpaII*) and non-sensitive (*MspI*) restriction enzymes. Undigested genomic DNA of rat hypothalamus (HYP) was used as control. C is PCR without DNA.**

highest serum concentrations. P<sub>4</sub> shows its lowest serum concentration at 09:00 h of proestrus while E<sub>2</sub> concentrations are lowest at 21:00 h of proestrus (Table 1).

We analyzed the PR gene promoter methylation pattern by CpG methylation sensitive and non-sensitive restriction enzymes. Digestion of total DNA was performed with the methylation-sensitive restriction enzyme *HpaII*, which does not cut hemi-methylated or methylated C<sup>5</sup>-MeCGG sequences. The promoter region contains *Hpa II* sensitive sites at +280, +295, +507, +552 and +725, relative to the PR-B promoter transcription start site (Kraus et al., 1993). We observed that at least one of the PR-A promoter sites (+507, +552 and +725) was not methylated; hence, we did not obtain an amplification band after performing the PCR (Fig. 2). On the other hand, we observed that sites +280 and +295 showed transient methylation, since at 17:00 and 21:00 h of proestrus an amplification band was detected, but it was absent at 09:00 h. Interestingly, we observed a lower band intensity at 17:00 h than at 21:00 h, which suggests that there is an increase in the methylation process in the evening of proestrus.

To confirm the methylation status during the proestrus day, we used the bisulfite sequencing primers method (BSP), in which the PCR products were cloned for further sequencing. The results demonstrate that the A promoter region was almost completely unmethylated. Interestingly, CpG sites within the B promoter presented an increase in methylation during the

transition hours of proestrus, as it is depicted in Fig. 3, thus demonstrating a transient methylation of promoter B.

### 3. Discussion

Previous studies show the differential function of PR isoforms in several cultured cells and tissues. It has been demonstrated that PR isoforms interact with different coactivators and corepressors. In addition, the interaction between the coregulator and the PR isoform can be ligand-dependent and -independent (Gao and Nawaz, 2002; Scarpin et al., 2009). Interestingly, while both of the isoforms were essential for SKF-facilitated sexual behavior, PR-A appeared to play a more important role in the 8-bromo-cAMP-facilitated lordosis response, raising the possibility of distinct intracellular signaling pathways mediating the responses (Mani et al., 2006). The previous data open the possibility of modulating cell- and/or tissue-specific responses to progesterone through differential expression PR isoforms. However, the evidence supporting the differential regulation of PR-A and PR-B isoform expression is still scarce.

In this work we provide evidence that there is a transient DNA methylation in the PR-B gene promoter region during the proestrus day in the rat hypothalamus. In addition, we found changes in PR isoform expression during this period of time. Indeed, in the three studied time points of the proestrus day the isoform A mRNA is more abundant than isoform B mRNA. The difference in the expression of isoform B is statistically significant at 17:00 h of proestrus compared to 09:00 and 21:00 h. These results are in line with previous reports that showed variations in mRNA PR isoforms during the proestrus-estrus transition (Liu and Arbogast, 2009). Our results confirm and explain in more detail the differential and specific regulation of PR isoforms at the transcriptional level during this physiological condition.

In this work we performed a series of experiments in order to demonstrate that there is a specific methylation pattern of the PR-B and -A promoter regions in the rat hypothalamus. For this aim, we analyzed the methylation pattern at CpG sites during the proestrus day. There are 21 CpG sites in the PR-A promoter region; most of them are unmethylated at all the studied time points of the proestrus day. Indeed, only +650 and +693 sites are methylated at 21:00 h (Fig. 3). The results presented here are consistent with the idea that there is a relation between an unmethylated promoter and mRNA expression of the gene.

In contrast to PR-A, the PR-B promoter showed a differential methylation pattern during the evening of proestrus. The methylation of 9 CpG sites within the B promoter increased in the course of the evening of proestrus, as shown in Fig. 3. These results correlate well with the changes observed in the mRNA expression level of the PR-B isoform. On the other hand, up-regulation of both isoforms in response to E<sub>2</sub> stimulation has been described, although the two promoters did not contain classical Estrogen Response Elements (ERE). Furthermore, in HeLa cells the treatment with E<sub>2</sub> induced and increased PR-B promoter activity five-fold via ER $\alpha$ , but not by ER $\beta$  (Flotto et al., 2004). It has been reported that estrogens up-regulate expression of the ER $\alpha$  gene in most

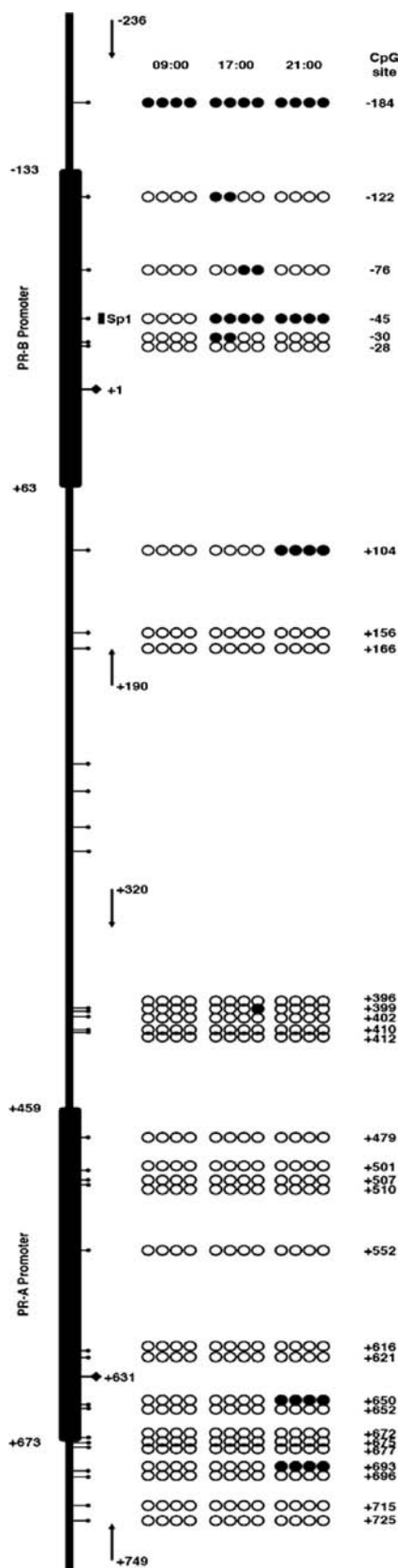
mammalian tissues (Robertson et al., 2002). In the present study  $E_2$  concentration was lower at 09:00 h than at 17:00 h in evening of proestrus. These data correlated well with the low

expression of PR-B in the morning of proestrus (09:00 h). In contrast, when estradiol levels were increased during the evening of proestrus, its expression was significantly increased before the promoter became significantly methylated (Fig. 1). A further decrease in estradiol concentration in the evening of proestrus and methylation of the PR-B promoter correlate well with the decrease in PR-B mRNA levels (as shown in Figs. 1 and 3).

Recently, it has been demonstrated that 5-azacytidine administration is followed by an increase in PR-B isoform expression, without changes in the expression of the PR-A isoform (Hansberg-Pastor et al., 2013). In line with this, it has been previously reported that gene promoter demethylation using demethylation agents restores protein expression in different cancer cell lines (Zhang et al., 2011). Various studies have demonstrated the correlation between the expression of the PR-B isoform and promoter methylation changes in different pathophysiological conditions. Specifically, hypermethylation of PR-B has been demonstrated in breast cancer, endometriosis, and endometrial tumors as well as in cultured cells *in vitro*, with a concomitant reduction of PR-B expression (Gaudet et al., 2009; Jichan et al., 2010; Lee et al., 2009; Liu et al., 2004).

Furthermore, recent reports on genome analysis indicate that the methylation pattern on CpG sites in the PR-A and -B promoter regions during development is modified. According to ours and other reports, these changes occur mainly in the B promoter region (Mitchell et al., 2013), thus indicating that changes in the methylation patterns of the PR promoter region may play an important role in the switch of PR isoforms expression in different types of cells and physiological conditions.

It has been reported that the -45 CpG site (Fig. 3) is part of a recognition sequence of the Sp1 transcription factor in the PR-B promoter region (Kraus et al., 1993). Interestingly, in electrophoretic mobility shift assay experiments for Sp1 interactions, it has been demonstrated that methylation within the consensus Sp1 binding site did not reduce Sp1/Sp3 binding, whereas methylation outside the consensus binding site induced a significant decrease in Sp1/Sp3 binding and further regulated gene expression. This observation is similar to our finding of an increasing methylation process at the CpGs close to the Sp1 site in the PR-B region (Fig. 3); and correlates well with our observation of a subsequent decrease



**Fig. 3 – Methylation pattern of PR gene promoters. Schematic representation of PR isoforms promoters. Thick bars on the main line represent the reported promoter length. +1 and +631 are the isoform B and isoform A transcription start sites respectively; arrows represent primers that were used in the amplification of the fragments for the methylation analysis of CpG sites. Representation of methylation state of CpG sites at different times of the proestrus–estrus transition, each column of circles represents 5 clones of an animal, 4 animals were evaluated at each time point studied; black circles correspond to methylated CpG sites; the numeral in the rows of circles correspond to (CpG sites) with respect to the transcription start site of isoform B. ■ is Sp1 binding site.**

in PR-B expression, which is in agreement with a previous report by Liu and Arbogast (Liu and Arbogast, 2009). The persistent methylation observed at the CpG site upstream of the Sp1 site in the PR promoter seems to be a landmark methylation location of Sp1, because during the proestrus phase an increased methylation in the contiguous CpG site becomes apparent, as it can be observed in Fig. 3. This observation suggests that there is an inactivation of this transcription factor as it has been previously described (Li et al., 2004).

To our knowledge, this is the first report regarding the differential methylation pattern of the PR gene promoter region in a physiological condition. These results support and extend previous observations of transient methylation patterns in the promoter regions of estrogen regulated genes related to transcriptional gene expression (Kangaspeska et al., 2008).

In conclusion, the overall results suggest that there is a switch of PR isoforms expression during the evening of proestrus, which is related to the differential gene methylation patterns of their promoter regions, mainly for the PR-B promoter.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animals

All animals were maintained and handled in accordance with the Guidelines of the Mexican Law of Animal Protection (NOM-062-ZOO-1999). Rats were purchased from the UNAM-Harlan Center. Adult female Wistar rats (200–250 g) were maintained under a 14:10 h light/dark cycle (lights on 06:00 h), with food and water available *ad libitum*. Two month-old female rats were used. Their estrus cycle was monitored by daily vaginal smears and only those rats that had at least 4 continuous 4-day estrus cycles were included in the experiments. Rats in the proestrus-estrus transition were selected and killed at 09:00, 17:00 and 21:00 h of proestrus. All rats were killed by decapitation, the brain was obtained and the hypothalamus was dissected according to the Atlas of Paxinos and Watson (Paxinos et al., 1980). The hypothalamus was defined as a block of tissue bounded rostrally by the optic chiasma, caudally by the mammillary body, laterally by the hypothalamic sulci and dorsally by a cut 5 mm deep, commonly known as the Medial Basal Hypothalamus (MBH). The MBH fragment included the arcuate nucleus, periventricular nucleus, part of the ventromedial hypothalamus, as well as the median eminence (Liu and Arbogast, 2009).

### 4.2. Rt-PCR

Total RNA was extracted using the AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN<sup>®</sup>, MD, USA) and was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis. Total RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm using NanoDrop<sup>™</sup> 2000 (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, MA, USA) and integrity was verified by a denaturant 1% agarose gel electrophoresis in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was converted to cDNA by M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen<sup>®</sup>, NY, USA). A reaction

volume of RT, which corresponded to 100 ng of cDNA, was taken to make endpoint PCR to amplify PR isoforms and 18S ribosomal RNA was used as a loading control. The primers used to amplify the fragment of PR-B (243 bp) were 5'-[ACT GAG CTG CAG GCA AAG]-3' for the sense primer and 5'-[GGC ACA GCG ACT GCT GA]-3' for the antisense primer. Primers used to amplify the fragment that is common to PR-A and PR-B (292 bp) were 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT G]-3' (sense) and 5'-[CCC GAA TAT AGC TTG ACC TC]-3' (antisense). Primers used to amplify the 18S gene were 5'-[AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG]-3' (sense) and 5'-[CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA]-3' (antisense). The 25  $\mu\text{l}$  PCR reaction had: 100 ng of cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM for each dNTP, 0.5  $\mu\text{M}$  for each primer and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Negative controls without cDNA and reaction of RT without RNA were included in all experiments. After the initial denaturation step at  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min, the PCR was performed for 25 cycles. Cycle profile for the amplification of PR and 18S genes was:  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s;  $60^{\circ}\text{C}$ , 30 s; and  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 min. A final extension was performed for 5 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . PCR products were separated in a 2% agarose gel and were detected with ethidium bromide. The image was obtained and analyzed using VisionWorksLS Image Acquisition and Analysis Software 6.7.2 (UVP<sup>®</sup>, CA, USA). The intensity of the PR or 18S bands was quantified by densitometry using VisionWorksLS (UVP<sup>®</sup>, CA, USA). Expression levels of PR isoforms were normalized with 18S. PR-A+B and PR-B relative expression was calculated by dividing the signal intensity of the PR-A+B or PR-B segment between the signal intensity of the amplification segment of 18S.

### 4.3. Methylation-sensitive enzyme digestion

Extracted DNA was digested with endonucleases. Restriction enzymes used were *MspI* and *HpaII* (New England Biolabs<sup>®</sup> Inc., MA, USA), both enzymes cut at CCGG sequences and only *HpaII* is sensitive to methylation (it does not cut methylated sequences:  $\text{C}^5\text{-MeCGG}$ ). Digestion was performed according to the manufacturer's instructions. The reaction of 15  $\mu\text{l}$  was: 200 ng of DNA, 1.5  $\mu\text{l}$  of buffer and 1  $\mu\text{l}$  of enzyme. The thermocycler reaction was performed at  $37^{\circ}\text{C}$  for 3 h, then at  $70^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Subsequently, 2  $\mu\text{l}$  of digested products were used to amplify the respective fragments of PR promoters containing CCGG sequences. Primer sequences used to amplify the PR-B promoter fragment (344 bp) were 5'-[GCG GGC CTT CST AGA GCG]-3' (sense) and 5'-[GCC GTG CTG AAG CAG GCC]-3' (antisense). The primers to amplify the PR-A promoter fragment (280 bp) had the following sequences: 5'-[GGA GAT CCC ACG GGT CCG]-3' (sense) and 5'-[ACT ACA GAC GAT GCG TCC G]-3' (antisense). 2  $\mu\text{l}$  of digested DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM of each dNTP, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer and 2.5 units of Taq DNA polymerase were taken to a final volume of 25  $\mu\text{l}$  of PCR mix. Negative controls without DNA and with undigested DNA were included in all experiments. After the initial denaturation step at  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min, the PCR was performed for 30 cycles; the cycle profile for PR-B promoter fragment amplification was:  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s;  $61^{\circ}\text{C}$ , 30 s; and  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 min. The cycle profile for PR-A promoter fragment amplification was:  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s;  $55^{\circ}\text{C}$ , 30 s; and  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 min. The final extension

was performed at 72 °C for 5 min. PCR products were separated in a 2% agarose gel, detected with ethidium bromide and analyzed as described in Section 4.2.

#### 4.4. Bisulfite sequencing PCR (BSP)

DNA was extracted with the AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN®, MD, USA) and treated with bisulfite with the EZ DNA Methylation™ kit (ZYMO® Research Corp, CA, USA) for bisulfite sequencing PCR (BSP). The sequences of the PR-B promoter primers (427 bp) were 5'-[TTG AAG TTT TTA TAA AAA TTT TGT TT]-3' (sense) and 5'-[AAA CCC TAA AAC TAA AAA ATA ACC C]-3' (antisense). PR-A promoter primers (430 bp) used were 5'-[GGG TAA AAG TTT TTT GAA AAT TTG TT]-3' (sense) and 5'-[ATA CTA ACT TCC CTA AAA AAA ATC C]-3' (antisense). The PCR mix (50 µl) was: 2 µl of DNA treated with bisulfite, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. After the initial denaturation step at 95 °C for 5 min, the PCR was performed for 40 cycles. The cycle profile for the amplification of the PR promoters was: 95 °C, 30 s; 59 °C, 30 s; and 72 °C, 1 min. The final extension of the cycle was performed at 72 °C for 5 min. PCR products were separated in a 1% agarose gel and were detected with ethidium bromide. The QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®, MD, USA) was used to obtain PCR products dissolved in water, the samples were then quantified by NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific®, MA, USA). The pGEM®-T Easy Vector System (Promega Corp.® WI, USA) was used for cloning the PCR products. Following the cloning of the PCR products, the Zippy™ Plasmid Miniprep Kit (ZYMO® Research Corp, CA, USA) was used for the purification of the plasmid. The obtained samples were sequenced in the Applied Biosystems Sequencing and Genotyping Unit (Life Technologies™ Corp. CA, USA) at INMEGEN.

#### 4.5. Radioimmunoassay (RIA)

E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> levels were measured by radioimmunoassay. Specific double antibody radioimmunoassay was performed in independent serum samples from groups of four rats for each experimental condition. All samples were stored at -70 °C until analyzed. E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> quantification was performed as previously described (Abraham, 1975), using the solid-phase <sup>125</sup>I technique, with the Coat-A-Count kit (Diagnostic Products Corporation®, CA, USA), following the method described by the manufacturer. The sensitivity of the assays was 5.4 pg/ml for E<sub>2</sub> and 8.3 ng/ml for P<sub>4</sub>. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were of 5.3 and 8%, respectively for E<sub>2</sub>, and 6.5 and 10%, respectively for P<sub>4</sub>.

#### 4.6. Statistical analysis

Values were expressed as mean ± SEM. For the analysis of mRNA expression and the analysis of hormone serum concentrations, statistically significant differences (*P* < 0.05) were calculated using a 1-way ANOVA and a post hoc Tukey's test. All statistical analyses were performed using Prism 4 for Macintosh (GraphPad® Software, Inc.).

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the National Council for Science and Technology (CONACyT) and PAPIIT and PAIP from National Autonomous University of Mexico. Luciano Mendoza-Garcés received a scholarship from CONACyT (#130644, period 2008–2012).

## REFERENCES

- Abraham, G.E., 1975. Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. *J. Steroid Biochem.* 6, 261–270.
- Edwards, D.A., Pfeifle, J.K., 1983. Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation. *Physiol. Behav.* 30, 437–443.
- Flotto, T., Niederacher, D., Hohmann, D., Heimerzheim, T., Dall, P., Djahansouzi, S., Bender, H.G., Hanstein, B., 2004. Molecular mechanism of estrogen receptor (ER)α-specific, estradiol-dependent expression of the progesterone receptor (PR) B-isoform. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 131–142.
- Gao, X., Nawaz, Z., 2002. Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer: role of steroid receptor coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 4, 182–186.
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261–282.
- Gaudet, M.M., Campan, M., Figueroa, J.D., Yang, X.R., Lissowska, J., Peplonska, B., Brinton, L.A., Rimm, D.L., Laird, P.W., Garcia-Closas, M., Sherman, M.E., 2009. DNA hypermethylation of ESRI and PGR in breast cancer: pathologic and epidemiologic associations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 3036–3043.
- Han, H., Cortez, C.C., Yang, X., Nichols, P.W., Jones, P.A., Liang, G., 2011. DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4299–4310.
- Hansberg-Pastor, V., Gonzalez-Arenas, A., Pena-Ortiz, M.A., Garcia-Gomez, E., Rodriguez-Dorantes, M., Camacho-Arroyo, I., 2013. The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines. *Steroids* 78, 500–507.
- Hartung, T., Zhang, L., Kanwar, R., Khrebtukova, I., Reinhardt, M., Wang, C., Therneau, T.M., Banck, M.S., Schroth, G.P., Beutler, A.S., 2012. Diametrically opposite methylome-transcriptome relationships in high- and low-CpG promoter genes in postmitotic neural rat tissue. *Epigenetics* 7, 421–428.
- Issa, J.P., Baylin, S.B., Belinsky, S.A., 1996. Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res.* 56, 3655–3658.
- Jichan, N., Xishi, L., Guo, S.W., 2010. Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in adenomyosis and its rectification by a histone deacetylase inhibitor and a demethylation agent. *Reprod. Sci.* 17, 995–1005.
- Kangaspeska, S., Stride, B., Metivier, R., Polycarpou-Schwarz, M., Ibberson, D., Carmouche, R.P., Benes, V., Gannon, F., Reid, G., 2008. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452, 112–115.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P., 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9, 1603–1614.
- Kraus, W.L., Montano, M.M., Katzenellenbogen, B.S., 1993. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol. Endocrinol.* 7, 1603–1616.

- Lee, B., Du, H., Taylor, H.S., 2009. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium. *Biol. Reprod.* 80, 79–85.
- Li, L., He, S., Sun, J.M., Davie, J.R., 2004. Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem. Cell Biol.* 82, 460–471.
- Liu, B., Arbogast, L.A., 2009. Gene expression profiles of intracellular and membrane progesterone receptor isoforms in the mediobasal hypothalamus during pro-oestrus. *J Neuroendocrinol.* 21, 993–1000.
- Liu, Z.J., Zhang, X.B., Zhang, Y., Yang, X., 2004. Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. *FEBS Lett.* 567, 327–332.
- Mani, S.K., Reyna, A.M., Chen, J.Z., Mulac-Jericevic, B., Conneely, O.M., 2006. Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Mol. Endocrinol.* 20, 1322–1332.
- Mendoza-Garcés, L., Camacho-Arroyo, I., Cerbon, M.A., 2010. Effects of mating on progesterone receptor isoforms in rat hypothalamus. *Neuroreport* 21, 513–516.
- Mitchell, C.M., Sykes, S.D., Pan, X., Pringle, K.G., Lumbers, E.R., Hirst, J.J., Zakar, T., 2013. Inflammatory and steroid receptor gene methylation in the human amnion and decidua. *J. Mol. Endocrinol.* 50, 267–277.
- O'Malley, B., 1990. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol. Endocrinol.* 4, 363–369.
- Paxinos, G., Watson, C.R., Emson, P.C., 1980. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J. Neurosci. Methods.* 3, 129–149.
- Robertson, J.A., Farnell, Y., Lindahl, L.S., Ing, N.H., 2002. Estradiol up-regulates estrogen receptor messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma (Ishikawa) cells by stabilizing the message. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 125–135.
- Scarpin, K.M., Graham, J.D., Mote, P.A., Clarke, C.L., 2009. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl. Recept. Signal* 7, e009.
- Wilson, M.E., Westberry, J.M., Prewitt, A.K., 2008. Dynamic regulation of estrogen receptor- $\alpha$  gene expression in the brain: a role for promoter methylation? *Front Neuroendocrinol.* 29, 375–385.
- Zhang, W., Wang, L., Fan, Q., Wu, X., Wang, F., Wang, R., Ma, Z., Yang, J., Lu, S.H., 2011. Arsenic trioxide re-sensitizes ER $\alpha$ -negative breast cancer cells to endocrine therapy by restoring ER $\alpha$  expression in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 26, 621–628.