

**Tesis de Doctorado
PEDECIBA Biología**



**Análisis del rol del contexto celular en la funcionalidad de
las proteínas a través del estudio del receptor de
estrógenos y la EMT en células tumorales de mama**

Lic. Tamara Fernández Calero

**Directora de Tesis
Dra. Mónica Marín**

**Codirector de Tesis
Dr. Hugo Naya
Dr. Gilles Flouriot**

TRIBUNAL

Presidente: Dr. Alfonso Cayota

Vocales: Dr. Uriel Koziol

Dr. Pablo Smircich

RESUMEN

El receptor de estrógenos alfa (ER α) es un factor de transcripción capaz de mediar los efectos de los estrógenos. Una de las características más llamativas del ER α es su amplia distribución en el organismo y la variedad de funciones que cumple en diferentes sistemas y tejidos. Su respuesta a distintos ligandos puede ser tipo celular específica, por lo que el receptor tiene una gran plasticidad en su actividad que depende del contexto celular. Uno de los factores fundamentales involucrados en la actividad del receptor es su conformación. Los cambios conformacionales que sufre el receptor durante su actividad son múltiples y necesarios para su correcta función. En este contexto, nos preguntamos si al menos parte de los efectos tejido-específicos observados en la modulación del ER α , podrían estar relacionados con diferencias estructurales o conformacionales del ER α (aunque sutiles) en cada tejido.

En el marco de una línea de investigación cuyo objetivo es establecer la contribución del contexto celular y la cinética de traducción en la estructura, plegamiento y funcionalidad *in vivo* de proteínas nos preguntamos si el camino transitado durante la síntesis del ER α puede influenciar su conformación inicial teniendo consecuencias en su actividad. Estas diferencias conformacionales podrían ser consecuencia de variaciones de la cinética de traducción como consecuencia de variaciones en la maquinaria traduccional en los distintos tipos celulares.

Para abordar la hipótesis de trabajo, nos propusimos investigar posibles variantes de estructura y conformación que puede presentar el ER α en la célula donde se sintetiza y establecer si la cinética de traducción vinculada a mutaciones sinónimas pueden afectar el plegamiento, la actividad biológica y la respuesta a distintos ligandos. Para ello se comparó la funcionalidad y la localización subcelular del ER α codificado por la secuencia silvestre (wt) y por la variante sinónima ER α Ala87, que es un polimorfismo presente en 5-10% de la población. Utilizando células HepG2 y HeLa transfectadas transitoriamente, pudimos demostrar que la actividad funcional de ERAla87 así como su localización subcelular difieren de las de ER α de tipo salvaje, en una forma dependiente del tipo celular. Estas diferencias no parecen estar definidas por diferencias en la cantidad de receptor producido, ni por la estructura secundaria del ARN mensajero ni por cambios en la unión de proteínas al mismo.

Por otra parte, a través de un modelo de Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) basada en la línea celular MCF7 derivada de cáncer de mama, nos propusimos investigar diferencias en el contexto celular y en la maquinaria de traducción que puedan explicar la actividad tipo celular específica del ER α endógeno en estas células. La EMT es un proceso a través del cual células epiteliales diferenciadas adquieren un fenotipo mesenquimal inmaduro desdiferenciado y es un proceso en el que se ha observado un cambio de funcionalidad del receptor. El modelo experimental utilizado consta de 3 componentes: (i) células MCF7 control (epiteliales diferenciadas), (ii) MCF7 MKL1 Δ N200 que sobreexpresan una variante de MKL1 de localización nuclear y que induce la EMT (desdiferenciadas), y (iii) células MCF7 MKL1 Δ C301 que expresan otra variante de MKL1 con características de células epiteliales diferenciadas.

En este modelo, primero confirmamos cambios en la actividad transcripcional del ER α entre las distintas líneas celulares. Utilizando microarrays se mostró la pérdida de la inducción de expresión de genes por E2 asociada a la localización nuclear de MKL1. Además, mediante inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a secuenciación masiva (ChIP-Seq), se mostró que se producen cambios en los sitios de unión del ER α al ADN. Estos cambios, al menos en parte, podrían explicar la pérdida de respuesta al E2.

A continuación, analizamos los cambios mayores de expresión génica, a nivel transcripcional y traduccional, como una aproximación a la caracterización de la EMT y las diferencias del contexto celular relacionado a estas líneas. Utilizando Ribosome Profiling junto con RNA-seq, nuestros resultados sugieren que durante la EMT se induce un aumento en la biogénesis de ribosomas y un aumento en la actividad traduccional, ambos regulados a nivel de la traducción, y que además, aparecen acompañados por un cambios relevantes en la actividad metabólica de la célula. En particular se destaca la identificación de cambios de expresión de isoenzimas que cumplen roles clave en el metabolismo energético.

En resumen, utilizando estrategias complementarias, pudimos mostrar que diferencias en el contexto de síntesis del receptor de estrógenos podrían explicar cambios en su funcionalidad. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento de la funcionalidad del receptor de estrógenos y en particular son una pequeña contribución al entendimiento de posibles mecanismos que subyacen a parte de su actividad tipo celular específica. Asimismo abre nuevas interrogantes sobre el rol del contexto celular y de la maquinaria de traducción en su funcionalidad. En particular, nos impulsa a profundizar en un futuro cercano las propiedades estructurales del receptor que puedan encontrarse asociadas a estos cambios de funcionalidad. Los resultados además ponen de manifiesto la importancia de considerar al contexto celular como un todo para nuevas investigaciones. Mucho queda por recorrer para entender desde diferentes perspectivas su impacto.

INDICE

RESUMEN	1
INDICE	3
INTRODUCCION	6
1. Cinética de traducción y el plegamiento de proteínas	7
1.1. Plegamiento de proteínas en el contexto celular	7
1.1.1. Importancia del plegamiento de proteínas	7
1.1.2. El plegamiento cotraduccional y sus posibles consecuencias sobre el plegamiento	7
1.2. Cinética de traducción y sus posibles consecuencias en el plegamiento	11
1.2.1 Cinética de traducción	11
1.2.2 Cinética de traducción y plegamiento	12
1.2.3 Factores que pueden determinar la cinética de traducción	13
i. ARNt	13
ii. Uso de codones	14
iii. mRNA: estructura y unión a proteínas	15
iv. Componentes de la maquinaria de traducción	16
v. Control de calidad cotraduccional (chaperonas)	17
1.2.4 Cinética, plegamiento y el contexto celular	17
2. El receptor de estrógenos alfa (ERα) como modelo	18
2.1 Importancia biológica del ER α	18
2.2 Estructura del ER α	19
2.3 Actividad del ER α	20
2.3.1 Actividad genómica dependiente de ligando	20
i. Activación transcripcional directa	20
ii. Activación transcripcional indirecta	22
iii. Represión transcripcional	22
2.3.2 Actividad no genómica dependiente de ligando	23
2.3.3 Actividad independiente de ligando	23
2.3.4 Entrecruzamiento de vías de señalización	23
2.4 El contexto celular y funcionalidad del ER α	23
2.4.1 Actividad tipo celular específica	24
2.4.2 Posibles mecanismos subyacentes a su actividad contexto celular específica	24
3. La transición epitelio-mesenquimal como modelo de estudio para la actividad tipo celular - específica del ERα	25
3.1. Generalidades de la Transición Epitelio Mesenquimal	25
3.1.1. Cambios característicos de la EMT	26
3.1.2. Cambios en la expresión génica durante la EMT	28
3.1.2. Heterogeneidad celular durante la EMT	29

3.2 EMT, tumores de mama y el ER α	29
3.2.1 Incidencia y mortalidad de los tumores de mama	29
3.2.2 Clasificación de los tumores de mama	30
3.2.3. Heterogeneidad en los tumores de mama	32
3.2.4. Relación entre la EMT, la clasificación de tumores de mama y el ER	32
3.3 Modelo EMT derivado de la línea celular MCF7	33
3.3.1. La vía MKL1/actina como inductora de la EMT	33
3.3.2. El modelo celular MCF7, MCF7 MKL1 Δ N200 y MCF7 MKL1 Δ C310	34
OBJETIVOS	35
Objetivo general	36
Objetivos específicos	36
RESULTADOS	37
Capítulo 1. Estudio de la funcionalidad de un polimorfismo sinónimo del receptor de estrógenos, ERαAla87	38
1.1 Introducción	38
1.1.1 Polimorfismos sinónimos ¿variabilidad genómica sin consecuencias?	38
1.1.2 ER α Ala87 elección del polimorfismo sinónimo de estudio	40
1.2 Resultados	41
1.2.1 Actividad genómica directa	41
1.2.2 Actividad genómica indirecta	42
1.2.3 Actividad no genómica	42
1.2.4 Localización subcelular	42
1.3. Discusión	43
1.4. Conclusión	46
Capítulo 2. Estudio de los efectos de la translocación nuclear de MKL1 en la funcionalidad del ERα y la resistencia hormonal	80
2.1 Introducción	80
2.1.1 El receptor y la resistencia endocrina en tumores de mama	80
2.1.2 Elección del modelo celular para el estudio de la funcionalidad del receptor	81
2.2 Resultados	83
2.2.1 La acumulación nuclear de MKL1 favorece la invasividad y disminuye la eficiencia de transactivación de ER α	83
2.2.2 La acumulación nuclear de MKL1 se asocia con resistencia endocrina en los tumores de mama.	83
2.2.3 La resistencia a las terapias hormonales se asocia a cambios funcionales del ER α	84
2.3 Discusión	87
2.4 Conclusión	89
Capítulo 3. Estudio de la adaptación celular inducida por la translocación nuclear de MKL1	105
3.1 Introducción	105

3.1.1 La maquinaria de traducción y el cáncer	105
3.1.2 El contexto celular a través del perfil de expresión transcripcional y traduccional	107
3.2 Resultados	108
3.2.1 Patrones generales de expresión	108
3.2.2. Los genes expresados diferencialmente validan la inducción de una EMT en células MKL1 Δ N200	109
3.2.3 Regulación transcripcional y traduccional durante la EMT	109
3.2.4. Caracterización de la expresión de la maquinaria traduccional	110
3.2.5. Cambios en el metabolismo celular	112
3.3 Discusión	113
3.4 Conclusión	118
DISCUSION	140
CONCLUSION	147
BIBLIOGRAFIA	149

INTRODUCCION

1. Cinética de traducción y el plegamiento de proteínas

1.1. Plegamiento de proteínas en el contexto celular

1.1.1. Importancia del plegamiento de proteínas

El repertorio de proteínas que se encuentran dentro de una célula son fundamentales en la definición de su estado y función. Las proteínas son las efectoras de casi todas las funciones celulares y pueden ser tan diversas como las funciones que desempeñan. Para cumplir su función biológica en contextos celulares específicos, cada proteína debe presentar una estructura tridimensional adecuada. Esta estructura, denominada nativa, define su función. Sólo aquellas proteínas que se encuentren correctamente plegadas serán capaces de interactuar en forma específica con las moléculas adecuadas. El ambiente celular se encuentra abarrotado de moléculas por lo cual el contacto entre ellas es constante y se vuelve de vital importancia la especificidad en las interacciones. Muchas proteínas pueden presentar más de una conformación nativa entre las cuales alternar su estado, por ejemplo, para regular su actividad. Este es el caso de algunas enzimas que presentan un estado activo y uno inactivo. Más allá de las particularidades de cada caso, el estado nativo refiere a proteínas correctamente plegadas capaces de ejercer su función en el ambiente celular.

La primera consecuencia directa que puede resultar de problemas en el plegamiento de proteínas es justamente la pérdida de función. Enfermedades como la fibrosis quística, la fenilcetonuria y la hipercolesterolemia familiar están asociadas con problemas en el plegamiento de proteínas específicas (Fraser-Pitt and O'Neil, 2015; Mukherjee et al., 2015; Sweeney et al., 2017). En algunos casos las proteínas que no alcanzan su conformación nativa pueden, además, resultar perjudiciales para la célula en forma independiente de su función. Estas proteínas mal plegadas pueden unirse entre sí formando agregados que se acumulan en el interior celular y resultan tóxicos para la célula. Enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad del Parkinson la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Creutzfeld-Jacob y la enfermedad de Huntington se han descrito como asociadas a la acumulación de agregados (Ross and Poirier, 2004; Sweeney et al., 2017; Tutar et al., 2013).

1.1.2. El plegamiento cotraduccional y sus posibles consecuencias sobre el plegamiento

¿Qué determina que una proteína se encuentre en su conformación nativa? Dada una secuencia de aminoácidos específica que define la estructura primaria de una proteína, existe un número enormemente grande de estructuras tridimensionales posibles. ¿Cómo es entonces que una proteína adquiere su estructura tridimensional particular? Levinthal planteó en 1961 a través de su llamada “paradoja del plegamiento de proteínas” la necesidad de una “fuerza” que guíe el plegamiento. Afirmó que no sería posible que una proteína alcance su conformación nativa en un lapso de tiempo razonable para los estándares celulares, a través de una búsqueda aleatoria entre las diferentes posibilidades (Levinthal, 1969). A la luz de los experimentos realizados previamente por White y Anfinsen, Levinthal sugirió que esta fuerza debía ser la secuencia de aminoácidos. White y Anfinsen

mostraron como, *in vitro*, la ribonucleasa pancreática bovina (RNasa) luego de ser desnaturalizada es capaz de recuperar tanto su actividad enzimática como su estructura secundaria y terciaria (Anfinsen et al., 1961; White, 1961). Estos hallazgos son consistentes con la hipótesis de que la información necesaria para el plegamiento debe residir en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Efectivamente, hoy se encuentra ampliamente aceptado que son las características de las cadenas laterales de los aminoácidos quienes definen las interacciones débiles que se pueden establecer en la proteína y en consecuencia su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria. Por lo tanto, el plegamiento puede ser acelerado y guiado por la rápida formación de interacciones débiles locales entre aminoácidos que luego determinan el plegamiento adicional del polipéptido. En otras palabras, las secuencias de aminoácidos locales que forman interacciones estables sirven como puntos de nucleación en el proceso de plegamiento (Levinthal, 1969).

Desde los experimentos de Anfinsen y White se han descrito múltiples ejemplos de renaturalización *in vitro* de proteínas que presentan una gran diversidad de características bioquímicas y estructurales. La renaturalización de cada proteína se ha descrito en condiciones particulares que dependen de las características de cada una de ellas. Los tiempos de renaturalización, que pueden ir de minutos a horas, así como los caminos recorridos por las proteínas para llegar a su conformación nativa dependerá fuertemente de las condiciones ambientales particulares.

A finales de los años 80 el proceso de plegamiento comenzó a analizarse bajo la hipótesis del “*foldng funnel*” o embudo de plegamiento (revisado en (Onuchic et al., 1997)). Esta hipótesis analiza al plegamiento de proteínas desde una perspectiva energética. La idea principal es que el paisaje energético que sigue una proteína durante su plegamiento se asemeja a un embudo. Este embudo guía a la proteína hacia su estructura nativa, de baja energía. El camino, sin embargo, no es directo, sino que presenta “trampas” en las que la proteína puede caer y ser retenida de forma transitoria (Bryngelson et al., 1995; Leopold et al., 1992). En estas trampas energéticas los péptidos presentan conformaciones intermedias. Esta hipótesis plantea que no existe un único camino definido para llegar a su conformación final. Por el contrario, plantea que hay una multiplicidad de rutas de plegado a través de las cuales las proteínas pueden transitar alternativamente, atravesando distintos intermediarios estructurales (Figura 1).

Pero ¿cómo ocurre el plegamiento de proteínas dentro de la célula? El ambiente celular abarrotado de moléculas es muy distinto al ambiente al que se someten las proteínas durante el plegamiento *in vitro* donde las concentración de macromoléculas rondan los 10 g/l (Pielak, 2005). Por ejemplo, en *Escherichia coli* se estimó que la concentración de ARN y proteínas se encuentra entre 300-400 g/l (Zimmerman and Trach, 1991), mientras que en el citoplasma de células de cultivo de tejidos de mamíferos se estimó entre 200-300 g / l (Lanni et al., 1985). Es más, se cree que estas estimaciones se encuentran entre 2 y 10 veces por debajo de los valores reales (Milo, 2013). Las elevadas concentraciones de macromoléculas intracelulares generan grandes cantidades de superficies altamente interactivas donde, interacciones proteína-proteína, incluidas las interacciones “quinarias” débiles, pueden tener un impacto en el plegamiento (McConkey, 1982).

Dentro de este ambiente abarrotado, el primer contacto que tiene una proteína que está siendo traducida *in vivo* es con el microambiente generado por los ribosomas que la traducen, las proteínas asociadas a estos ribosomas y el resto de la maquinaria de traducción. En efecto, los péptidos emergentes pueden interactuar directamente con la superficie del ribosoma (Deckert et al., 2016; Knight et al., 2013). Las interacciones péptido-ribosoma pueden estabilizar la cadena polipeptídica a medida que esta está siendo sintetizada y emerge del ribosoma, lo que a su vez puede permitir que elementos de la estructura secundaria, como alfa hélices, se formen dentro del túnel de salida (Lu and Deutsch, 2005; Woolhead et al., 2004; Wruck et al., 2017). A este proceso de plegamiento que no implica cadenas polipeptídicas ya sintetizadas en su longitud completa, sino cadenas nacientes, en crecimiento, unidas a los ribosomas que se van plegando al emerger de ellos, se le denomina plegamiento cotraduccional. Desde mediados de los 80's se han llevado a cabo experimentos que muestran que el plegamiento inicial de proteínas *in vivo* es cotraduccional. El plegamiento cotraduccional se ha estudiado con una variedad de métodos (Revisado en (Komar, 2018)) y se ha mostrado tanto en procariotas (Evans et al., 2008; Kolb et al., 2000; Nicola et al., 1999) como en eucariotas, y en este último caso, tanto en el citosol (Frydman et al., 1999; Nicola et al., 1999) como en proteínas que son trasladadas al retículo endoplasmático (Chen et al., 1995; Kowarik et al., 2002).

¿Qué efecto puede tener sobre su plegamiento la interacción de las cadenas polipeptídicas con el ribosoma durante su síntesis? A través de ellas el ribosoma puede estabilizar conformaciones intermedias estableciendo vías de plegamiento que conducen a su estructura terciaria nativa. Las conformaciones intermedias pueden o no permanecer en la estructura final o prevalecer en solución (Holtkamp et al., 2015; Kaiser et al., 2011). La retención de estados de plegamiento no nativos puede, de esta manera, evitar que la cadena caiga en trampas cinéticas, como un plegado estable de conformaciones no nativas, que pueden formarse cuando solo una parte de una proteína ha sido sintetizada (Holtkamp et al., 2015; Kaiser et al., 2011, Hsu et al., 2009). Por lo tanto, el ribosoma podría tener un efecto tipo chaperonina que protege la cadena naciente del plegamiento incorrecto, la agregación y la degradación por las proteasas celulares hasta que la proteína completa su síntesis y emerge por completo del ribosoma (Kaiser et al., 2011; Cabrita et al., 2016; Evans et al., 2008; Thomen et al., 2017). En otras palabras, las restricciones espaciales dentro del túnel peptídico del ribosoma definen el número de posibles vías de plegamiento que pueden ser parcialmente compartidas o no por vías postraduccionales (Wruck et al., 2017). Estas conformaciones intermedias aparecen como mínimos adicionales en el paisaje energético y permiten la extensión del concepto de embudo de plegamiento (Figura 1. sección verde) para describir el comportamiento de un conjunto más diverso de proteínas en condiciones más relevantes desde el punto de vista fisiológico (Clark, 2004).

Las reacciones de plegamiento *in vivo* están organizadas espacialmente de modo que algunas interacciones serán preferidas sobre otras. Este punto es absolutamente central, por ejemplo, para el plegado de proteínas de membrana (Gidalevitz et al., 2013). De la misma forma que las interacciones péptido-ribosoma, el resto de las interacciones del péptido naciente con las moléculas que forman el microambiente que lo rodean pueden tener un rol en su plegamiento estabilizando, desestabilizando, permitiendo o impidiendo conformaciones intermedias de plegamiento. Entre estas moléculas se encuentran factores

de traducción, ARNs de transferencia (ARNt), aminoacil ARNt sintetasas, el propio ARN mensajero (ARNm) que está siendo traducido, chaperonas y otros factores que dependerán de la proteína que está siendo sintetizada como pueden ser las partículas de reconocimiento de señales (SRPs) y translocasas entre otras. En particular, las chaperonas cotraduccionales cumplen un rol fundamental, previniendo interacciones inespecíficas, asistiendo a su proceso de plegamiento y protegiendo a los polipéptidos nacientes de la agregación. Las chaperonas cotraduccionales tienen roles reguladores activos en la modulación de la traducción de proteínas (Zhang et al., 2014; Pausch et al., 2015).

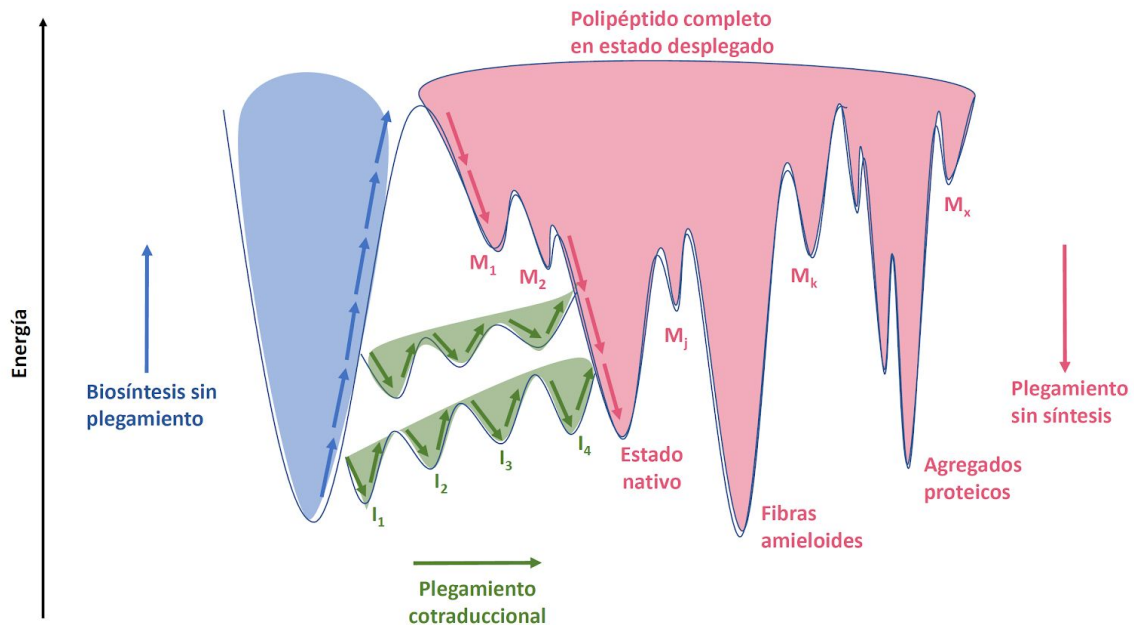


Figura 1. Sección transversal de un embudo de plegamiento que incluye al plegamiento cotraduccional. El embudo de la izquierda representa el caso hipotético de la biosíntesis de proteínas sin plegamiento (flechas azules). El eje vertical representa la energía conformacional del polipéptido, mientras que la circunferencia del embudo representa el espacio conformacional disponible para el polipéptido. A medida que el péptido emerge del ribosoma, las conformaciones disponibles aumentan (el embudo se vuelve más ancho) a medida que aumenta la longitud del péptido y continúa sin plegarse, se moverá hacia donde la energía es mayor (arriba). La superficie azul representa procesos que involucran la formación de enlaces covalentes y la hidrólisis; El proceso de biosíntesis y plegamiento cotraduccional constituye un movimiento de izquierda a derecha. La superficie verde representa interacciones no covalentes asociadas con el plegamiento de proteínas. Cuando el polipéptido de longitud completa parcialmente plegado se libera del ribosoma, podrá plegarse en su estado nativo a través de las vías definidas por el embudo de plegamiento de la derecha (flechas rosadas). El modelo de plegamiento cotraduccional se ve como un proceso mediante el cual el polipéptido naciente se pliega a través de una serie de intermedios a medida que emerge del ribosoma, reteniendo así una energía más baja de lo que sería el caso para la síntesis sin plegamiento. Este proceso se da dentro de un "túnel". Una vez que el péptido naciente comienza su proceso en un túnel particular, se mantendrá en él. Dentro del túnel, el polipéptido naciente en cada etapa de la biosíntesis podrá acceder a múltiples conformaciones, definiendo así un embudo de plegado similar al del polipéptido de longitud completa (flechas rosadas); Cuando suficiente polipéptido ha

emergido del ribosoma para comenzar a asumir cierta estructura se comienzan a formar intermediarios de plegamiento (por ejemplo I_1 , I_2 e I_3). La figura se encuentra simplificada y muestra algunas de las especies en cada paso del túnel de síntesis. La posición en el embudo de biosíntesis (azul) en que comienza el túnel refleja la longitud del polipéptido nascente requerido para estabilizar un subconjunto de estados conformacionales; Los diferentes túneles se incluyen para indicar que algunos polipéptidos pueden requerir secuencias N-terminales más largas antes de que las estructuras se estabilicen. Luego de emerger por completo del ribosoma, del empaquetamiento del segmento C-terminal del polipéptido y de las etapas de isomerización finales, el polipéptido nascente de longitud completa se pliega alcanza su estructura nativa. La vía de plegamiento cotraduccional mantiene una barrera energética inferior a la que se produciría con la síntesis en ausencia de plegado y, por lo tanto, se esperaría que se produjera más rápidamente. También parece que el plegamiento cotraduccional permitiría que el polipéptido evite trampas cinéticas que pueden encontrarse durante el replegamiento de polipéptidos de longitud completa que le podrían llevar a adoptar otras estructuras (M_n) diferentes a su estructura nativa. Modificado de (Fedorov and Baldwin, 1997)

1.2. Cinética de traducción y sus posibles consecuencias en el plegamiento

1.2.1 Cinética de traducción

La traducción *in vivo* de una proteína puede llevar, en promedio, entre unos pocos segundos y algunos minutos. Este tiempo depende del organismo, del largo de la proteína y del contexto celular.

En procariotas, por ejemplo, los tiempos requeridos para el inicio de la traducción han sido estimados en un promedio de 15-20 segundos (Kennell and Riezman, 1977; Siwiak y Zielenkiewicz, 2013) aunque pueden oscilar entre valores tan pequeños como 1s (Mitarai et al., 2008) y algunos minutos (Siwiak y Zielenkiewicz, 2013). El tiempo requerido para la terminación de la traducción y el reciclado de ribosomas es de alrededor de 1s cada uno (Mitarai et al., 2008). Por otra parte, la tasa de elongación de una proteína puede variar entre 10 y 22 aminoácidos por segundo a 37°C (Guet et al., 2008; Bremer y Dennis, 1996; Proshkin et al., 2010; Dalbow y Young, 1975; Milo y Phillips, 2016). Por lo tanto, una proteína de longitud promedio de 325 aminoácidos de *E.coli* (Dill et al.; 2011; Zhang, 2000) se puede traducir en aproximadamente 30–100s a 37°C. Por ejemplo, en *E.coli* la proteína LacZ de 1025aa se traduce, en condiciones estándar de crecimiento, en 82s (Sørensen et al., 1989).

En eucariotas, el rango de tiempos estimado para el inicio de la traducción puede ir también desde pocos segundos hasta varios minutos según la especie y el gen (Siwiak y Zielenkiewicz, 2013). En particular, a partir de la cuantificación de la cantidad de inicios de traducción por minuto, el tiempo de inicio de la traducción a 37°C en células de mamífero se calcula entre 17 y 45s (Yan et al., 2016). De la misma manera, el tiempo promedio requerido para la traducción de cada codón varía ampliamente según la especie, el gen y la temperatura: 3-10aa/s a 30°C en *Saccharomyces cerevisiae* (Karpinets et al., 2006), 3-5aa/s en células de mamífero en cultivo (Yan et al., 2016, Oloffson et al., 1987), 6aa/s en células de ratón (Ingolia et al., 2011), 5-8aa/s *Neurospora crassa* (Karpinets et al., 2006). Debido a

que las velocidades de traducción son en general menores que para procariotas, los tiempos requeridos para la síntesis de una proteína completa son, en general, mayores.

Los rangos de tiempos mencionados anteriormente son rangos promedio. En efecto, la velocidad de traducción durante la síntesis de una cadena polipeptídica no es homogénea. A comienzos de los años 60, surgió por primera vez la idea de que existen puntos o regiones localizadas en el ARNm donde la traducción es relativamente lenta (Englander y Page; 1965; Itano, 1966). Utilizando los datos publicados por Naughton y Dintzis (Naughton y Dintzis, 1962) que mostraron que el ensamblaje de una cadena de hemoglobina transcurre secuencialmente desde su extremo amino-terminal (N-terminal) hasta el terminal carboxi-terminal (C-terminal), Englander y Page mostraron que el agregado de aminoácidos no se realiza a una tasa uniforme durante la síntesis (Englander y Page, 1965). Estas observaciones fueron posteriormente confirmadas por Winslow e Ingram (Winslow e Ingram, 1966). Desde estas primeras aproximaciones realizadas sobre la hemoglobina A, se han utilizado una amplia gama de técnicas que han permitido estudiar la cinética de traducción de diversas proteínas (Revisado parcialmente en Chekulaeva y Landthaler, 2016). La evidencia sugiere que cada proteína tiene una cinética de síntesis particular y que durante su síntesis la velocidad con que es traducido cada codón es variable.

1.2.2 Cinética de traducción y plegamiento

¿Cómo puede influir la cinética de traducción en el plegamiento cotraduccional de proteínas? Hace más de 30 años, se postuló que las velocidades a las que se traducen las regiones de los polipéptidos afectan el plegamiento, y que, por ejemplo, las secuencias de los genes han evolucionado de forma que pausas en la traducción permitan separar temporalmente la síntesis de dominios definidos de ciertas proteínas y coordinar su plegamiento cotraduccional (Purvis, 1987).

Varios estudios posteriores mostraron como cambios en alguno de los factores que determinan la cinética de traducción pueden alterar la eficiencia en el plegamiento o alguna de las propiedades de la proteína resultante (Cortazzo et al., 2002; Zhang et al., 2009, Bhur et al., 2016, Goodman et al., 2013, Horjales et al., 2007). Sin embargo, no fue hasta recientemente que se encontró que existe una relación directa entre la velocidad con que se va traduciendo un polipéptido y su plegamiento cotraduccional *in vitro*. Utilizando pinzas ópticas, el grupo liderado por Hegner siguió, en forma simultánea, la velocidad de traducción de ribosomas individuales y el plegamiento del péptido naciente en tiempo real (Wruck et al., 2017). Encontraron, por una parte, que la velocidad con la que es traducido influye en el tiempo que el péptido naciente tiene para interactuar con su entorno ayudando así a definir su vía de plegamiento. Por ejemplo, tanto pausas transitorias como el enlentecimiento gradual de la traducción se producen en lugares particulares de la secuencia, facilitando la formación de estructuras secundarias. Por otra parte, el péptido naciente ya plegado aplica una tensión a la cadena naciente dentro del túnel del ribosoma que, a su vez, puede evitar eventos de frenado no programados (Wruck et al., 2017).

Por lo tanto, la cinética de traducción, puede regular las vías de plegamiento que sigue una proteína. Las pausas pueden permitir el plegamiento de conformaciones intermedias de las

regiones N-terminales, y evitar interacciones no deseadas que puedan alterar el camino hacia la conformación nativa.

1.2.3 Factores que pueden determinar la cinética de traducción

La velocidad con la que cada codón es traducido podría verse afectada por una conjunción de diversos factores. Entre los factores determinantes están los asociados a la abundancia y las propiedades de los ARNt encargados de la decodificación codón-aa, el uso no aleatorio de codones sinónimos, la estructura del ARNm (Wen et al., 2008; Chen et al., 2013., Mao et al., 2014; Yang et al., 2014; Goodman et al., 20013; Kudla et al., 2009), la composición de la maquinaria traduccional y las interacciones de la maquinaria traduccional y el péptido nascente con el ambiente (Wruck et al., 2017). Las colisiones entre ribosomas en los polisomas, la cooperación entre la traducción y la maquinaria de transcripción en el caso de procariontes (Larson et al., 2014) y la concentración de Mg^{2+} (Borg y Ehrenberg, 2015), también pueden jugar un rol en la velocidad de traducción de cada codón. Es el resultado de esta compleja interacción que define que algunos codones se traduzcan más rápido o más lento que el promedio. Inclusive, algunos de estos factores tienen variaciones circunstanciales o estocásticas, por lo que el tiempo de traducción podría ser diferente para el mismo codón en un contexto celular determinado.

Algunas de las consecuencias sobre la velocidad de traducción codón específica descritas son las siguientes:

i. ARNt

Los ARNt están implicados en la decodificación de los codones en aminoácidos. Cada codón es traducido por un set particular de ARNt. Cada vez que se agrega un nuevo aminoácido al péptido, el ribosoma “decodifica” el codón del ARNm que se encuentra en su sitio aceptor (A), seleccionando un aminoacil-ARNt afín de entre el pool de ARNt celular. La abundancia de los aminoacil-ARNt afines que compiten entre sí, la naturaleza del apareamiento de bases codón-anticodón y la identidad de los residuos unidos a los tRNAs que forman el enlace peptídico durante la traducción de cada codón afectan la velocidad de decodificación (Varenne et al., 1984; Fluitt et al., 2007; Stadler and Fire, 2011; Dana and Tuller, 2014; Nedialkova et al., 2015).

La disponibilidad de los ARNt afines al codón es un determinante clave de la velocidad del ribosoma durante la traducción de un codón. Los codones con los ARNt de alta abundancia se traducen más rápido que los codones leídos por los ARNt de baja abundancia (Varenne et al., 1984; Dana and Tuller, 2014).

La afinidad codón-anticodón también es determinante de la velocidad de traducción. En el sitio A del ribosoma, las interacciones codón-anticodón suceden en las dos primeras posiciones según el apareamiento de bases de Watson-Crick. Además, la tercera posición del codón puede formar apareamientos no estándar denominados *wobbling* o balanceo, lo que permite que algunos ARNt se usen para decodificar varios codones. Por ejemplo, los codones GAA y GAG son decodificados por los mismos ARNt, pero el codón GAA se traduciría 3 veces más rápido que el codón GAG (Sorensen y Pedersen, 1991).

Modificaciones en la posición 34 de los ARNt, primera posición en el anticodón y donde se puede dar el *wobbling*, pueden favorecer la unión codón-anticodón en el caso de apareamientos no estándar (Revisado en Agris et al., 2007). En general, la traducción de codones mediante apareamientos no estándar con sus ARNt afines son más lentos que los que se traducen mediante apareamientos tipo Watson-Crick (Stadler y Fire, 2011). Sin embargo, debe considerarse el rol de la altamente frecuente modificación postranscripcional de la base 34 en el anticodón de los ARNt. Por ejemplo, la pérdida de modificaciones presentes en grupos de ARNt con U34, que permiten el *wobbling* codon-anticodon, induce pausas en la traducción de los codones afines a ellos (Nedialkova et al., 2015).

Otro factor implicado es la reactividad intrínseca del residuo aminoacídico unido al ARNt en el sitio P del ribosoma. La identidad de este residuo, que ya forma parte del péptido nascente, puede afectar la velocidad de traducción del codón en el sitio A. En los casos en que la velocidad de apareamiento del ARNt al codón en el sitio A no es limitante, la velocidad con que se forma el enlace peptídico, pasaría a ser un factor predominante en el tiempo de traducción del codón (Muto e Ito, 2008; Wohlgemuth et al., 2008). La velocidad con la que se forma el enlace peptídico depende directamente de la reactividad que disminuye en el orden Lys = Arg > Ala > Ser > Phe = Val > Asp >> Pro, siendo Pro el más lento. Sin embargo, cuando la velocidad de apareamiento del ARNt al codón en el sitio A es limitante, como para el ARNt-Phe, la velocidad de la traducción del codón en el sitio A sería siempre la misma e igual al tiempo de apareamiento del ARNt con el codón en el sitio A. Esto sucede en forma independiente de la identidad del residuo unido al ARNt en el sitio P (Wohlgemuth et al., 2008).

La cinética de disociación del ARNt desacilado que se encuentra en el sitio E, también influye en la velocidad que lleva el ribosoma que está traduciendo y puede alterar la dinámica de la síntesis de proteínas. La constante de disociación depende en gran medida de la identidad del ARNt, la fuerza iónica de la solución y la temperatura de reacción (Choi y Puglisi, 2017).

ii. Uso de codones

Directamente asociado a los ARNt se encuentra el uso de codones. Cada aminoácido, en general, está codificado por más de un codón. Estos codones son sinónimos pero no equivalentes. Para traducir cada codón hay un set de ARNt y estos no son necesariamente compartidos entre los codones sinónimos. A su vez, cada proteína es codificada por un conjunto de codones particulares. Los tripletes utilizados en la codificación de proteínas no parecen haber sido seleccionados al azar. Por una parte, la selección de un codón específico en una secuencia codificante puede estar restringida por diversas razones: la presencia de motivos de unión a proteínas, señales de reconocimiento, estructura del ARNm (Chamary y Hurst, 2005), selección de *splicing* alternativo (Chamary y Hurst, 2005). Un cambio en un codón sinónimo puede alterar cualquiera de estas características. Por otra parte, a pesar de estas restricciones, en algunos organismos así como en sets de genes asociados a funciones específicas, hay codones que son preferidos sobre otros (Sharp et al., 1986; Ermolaeva, 2001; Frenkel-Morgenstern et al., 2012; Gingold et al., 2014; Jeacock et al., 2018). Se han asociado muchos factores intentando explicar esta preferencia denominada uso de codones: contenido GC de los organismos (Winkler y Wood, 1988),

Isocoros (Musto et al., 2001) y eficiencia de traducción (Lavner y Kotlar, 2005; Plotkin et al., 2004).

En muchos organismos procariotas y algunos eucariotas (principalmente unicelulares) existe una relación directa entre la abundancia de los ARNt y el uso de codones: los codones más usados son decodificados por los ARNt más abundantes. Esto apoyó la teoría de la selección traduccional como una fuerza evolutiva que modeló el uso de codones para mejorar la eficiencia de traducción (Hershberg and Petrov, 2008). Es decir, el sesgo en el uso de codones sería una consecuencia de la población de ARNt celulares. Sin embargo, para muchos organismos y en particular en humano, no se detectó esta relación y la selección traduccional como fuerza modeladora del uso de codones es muy controvertida (Urrutia y Hurst, 2001). Muchos de los detractores de esta corriente argumentan que la evidencia sugiere una presión sobre el uso de codones para el control de la cinética de la traducción y no para un aumento de su eficiencia y precisión (Yang y Nielsen, 2008). Argumentan que los codones preferidos no son siempre ventajosos si el plegamiento óptimo requiere una traducción lenta. En este caso, el control de la cinética de traducción se ejerce mediante la utilización diferencial de codones comunes asociados a ARNt abundantes y raros asociados a ARNt poco abundantes. Los codones raros serían utilizados para enlentecer la traducción en regiones específicas dado que la incorporación de los ARNt asociados requieren tiempos mayores. Es decir, la combinación correcta de codones permitiría regular la velocidad de los ribosomas y separar temporalmente eventos de plegamiento, asegurando la formación de intermediarios de plegamiento correctos y evitando interacciones "no deseadas" entre el péptido nascente y su entorno (Yang y Nielsen, 2008; Pintó et al., 2018).

iii. mRNA: estructura y unión a proteínas

La estructura secundaria del ARNm se ha asociado al enlentecimiento de la traducción ya que los ribosomas deben desarmar cada estructura que encuentran a su paso para poder traducirlo mediante su actividad RNA helicasa. Estructuras fuertes se correlacionan con pausas más largas y pueden inclusive parar la traducción (Wen et al., 2008). Se ha descrito que este enlentecimiento podría encontrarse acoplado a la disociación del ARNt del sitio E (Chen et al., 2013). Para determinar la complejidad de la estructura secundaria del ARNm se han utilizado diversas estrategias incluidas predicciones.

La asociación entre una traducción más lenta y estructuras fuertes del ARNm hace suponer que los ARNm altamente traducidos deberían presentar estructuras secundarias poco fuertes y complejas para que su traducción sea más rápida y eficiente. En efecto, se ha descrito que el aumento de la estructura secundaria cerca del sitio de inicio de la traducción se correlaciona con la disminución de la expresión y que existe una fuerte correlación entre los codones que disminuyen la estructura secundaria y los que aumentan la expresión de proteínas (Goodman et al., 2013; Kudla et al., 2009). Sin embargo, otros estudios reportan una correlación positiva entre la estabilidad de la estructura secundaria del ARNm y la síntesis de proteínas. Esto se explica en el marco de un compromiso entre la eficiencia en la traducción y su precisión. Quienes encuentran esta correlación sugieren que los genes altamente expresados tienden a tener ARNm con estructuras secundarias fuertes ya que estas sirven como frenos para controlar la velocidad y, por lo tanto, la fidelidad de la

traducción (Yang et al., 2014). Por otra parte, las fuertes estructuras se ven aliviadas en genes de alta expresión cuando los ribosomas adyacentes están cerca impidiendo la formación de estructuras secundarias y es, en estos casos, el uso de codones que determina la tasa de elongación (Mao et al., 2014). Por lo tanto, existiría una relación entre la estructura del ARNm y el uso de codones, de forma de mantener el compromiso eficiencia-precisión, dónde residuos estructuralmente o funcionalmente importantes se encuentran en regiones con del ARNm con estructuras secundarias fuertes para garantizar la precisión, mientras que se sacrifica la precisión por la velocidad en residuos en regiones de baja complejidad estructural (Yang et al., 2014).

iv. Componentes de la maquinaria de traducción

Otros factores que juegan un rol importante en la regulación de la velocidad de traducción son los propios componentes de la maquinaria de traducción. Entre los que juegan un rol más evidente están los factores de traducción. Los niveles de expresión y las modificaciones postraduccionales de distintos factores de iniciación, elongación y terminación regulan específicamente cada una de estas etapas de la traducción (Dever, 2002; Hershey et al., 2012, 2012; Mugnier and Tuite, 1999). Cada factor puede acelerar o enlentecer no sólo etapas diferentes de la traducción, sino también la traducción de codones en genes particulares asociadas a características específicas de las secuencias codificantes o ARNm. Por ejemplo EF-P en procariontas y su análogo IF-5A en eucariotas y arqueas evitan que el ribosoma se detenga durante la síntesis de proteínas que contienen residuos de prolina consecutivos, convirtiéndose así en un factor esencial para la síntesis de proteínas que contienen *stretches* o tramos de prolina (Lassak et al., 2016). Tanto IF-5A como EF-P dependen de modificaciones para su activación. En particular, IF-5A depende estrictamente de desoxi-hipusinación (hipusinilación) de una lisina conservada (Lassak et al., 2016).

Otro de los componentes fundamentales de la maquinaria de traducción interactuando con el ARNm que está siendo traducido es el propio ribosoma. La heterogeneidad en la composición de los ribosomas como resultado de la expresión diferencial y las modificaciones postraduccionales de las proteínas ribosomales, la diversidad del ARN ribosomal (ARNr) y la actividad de los factores asociados al ribosoma pueden generar ribosomas "especializados" que pueden tener un fuerte impacto en la forma en que se traduce (Genuth and Barna, 2018a). Además, los componentes constitutivos del ribosoma también pueden ejercer actividades más especializadas en virtud de sus interacciones con elementos reguladores del ARNm, tales como los sitios internos de entrada del ribosoma (IRES), marcos de lectura abiertos (uORF) o UTRs (Genuth and Barna, 2018a). La heterogeneidad de los ribosomas podría generar también cambios sustanciales en las propiedades fisicoquímicas del complejo macromolecular, como por ejemplo en su carga eléctrica lo cual, a la luz de lo reportado por el grupo de Knight, podría tener un efecto en la interacción entre el ribosoma y el péptido naciente y alterar la cinética de la traducción (Knight et al., 2013).

Las interacciones entre los distintos elementos de la maquinaria traduccional también pueden tener un efecto en la cinética. Este es el caso de la colisión entre los propios ribosomas que están en plena traducción. Las colisiones pueden ser utilizadas como frenos

a la traducción o reguladoras de su eficiencia (Ferrin and Subramaniam, 2017; Mitarai et al., 2008).

v. Control de calidad cotraduccional (chaperonas)

Las chaperonas asisten al plegamiento del péptido nascente y previenen su agregación. Cada vez existe más evidencia de que las chaperonas co-traduccionales se encuentran asociadas a los ribosomas y tienen roles activos en la regulación de la traducción de proteínas. Por ejemplo, RAC, una de los complejos presente en todos los eucariotas, regula directamente la traducción de proteínas mediante el acoplamiento mecánico del plegamiento cotraduccional con la elongación de la traducción (Zhang et al., 2014).

1.2.4 Cinética, plegamiento y el contexto celular

El acoplamiento entre la velocidad de traducción y el plegamiento parece garantizar una traducción de alta fidelidad que resulta en proteínas en su conformación nativa (Wruck et al., 2017). Para cada proteína la cinética de su traducción dependerá entonces del contexto celular (población de ARNt y de los componentes de la maquinaria de traducción), de la naturaleza del ARNm (estructura secundaria, motivos de unión a distintos componentes) y de la naturaleza de la proteína (los residuos definirán la interacción con la maquinaria). Una limitación fundamental de casi todos los estudios que analizan los efectos de estos factores que influyen en la velocidad de traducción es que se consideran de forma aislada, descuidando la posibilidad de que múltiples factores actúen de manera coordinada (Gorochofski et al., 2015). Por ejemplo, parece haber una compensación entre la estructura secundaria y la elección del codón basado en la concentración de ARNt para suavizar los efectos independientes de estos dos factores y reducir la posibilidad de puntos excesivamente lento o rápido que sean potencialmente perjudiciales (Gorochofski et al., 2015).

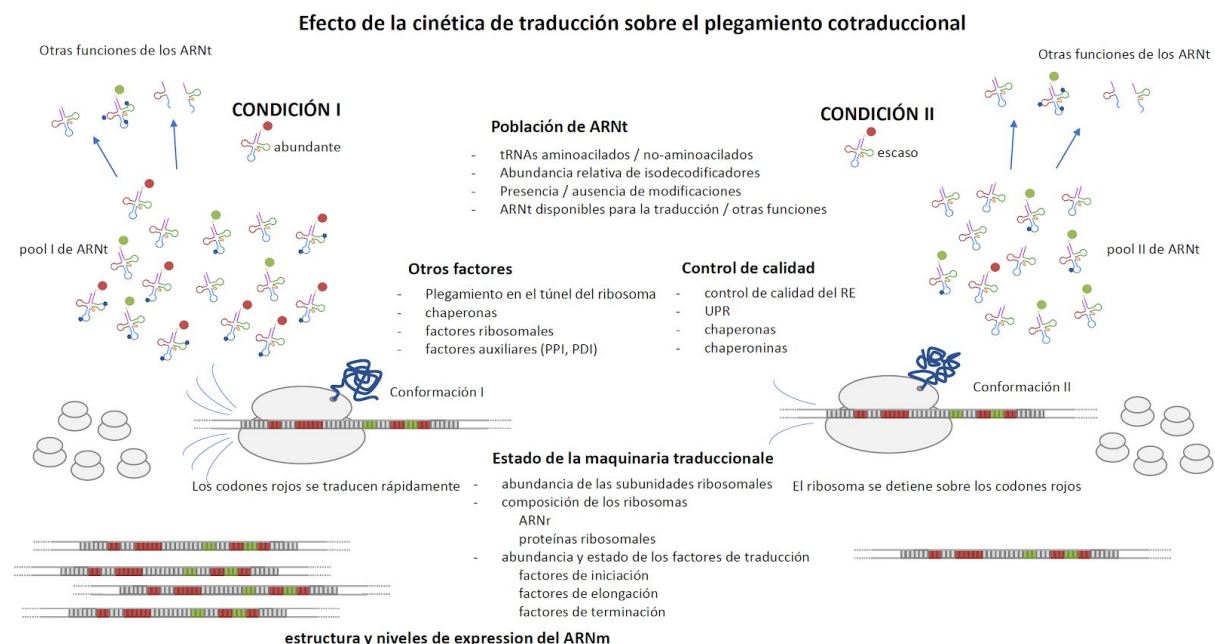


Figura 2. Representación esquemática de los efectos de la cinética de traducción sobre el plegamiento co-traducciona l de proteínas. Se ilustran dos condiciones, que representan ribosomas que leen el mismo codón: (I) los ribosomas avanzan a alta velocidad en presencia de una abundancia relativa determinada del correspondiente ARNt aminoacilado afín (aa-ARNt); (II) los ribosomas se ralentizan o se estancan cuando el aa-ARNt análogo es escaso. Se producen diferentes conformaciones del polipéptido que emerge del ribosoma durante la traducción. Los ARNt aminoacilados están representados por diferentes colores en su extremo 3'. Las poblaciones rojas y verdes de aa-tRNA son las parejas afines de los codones rojo y verde, respectivamente. Las bases modificadas se indican con puntos azules. Se incluye una pequeña fracción de ARNt no aminoacilado. La figura esquematiza diferentes mecanismos implicados en el plegamiento y homeostasis de proteínas. PPI: peptidil-prolil isomerasa; PDI: proteína disulfuro-isomerasa; RE: retículo endoplásmico; UPR: respuesta proteica desplegada

En particular, el contexto celular en el que se da la traducción puede variar ampliamente al variar el tipo celular, las condiciones de crecimiento, si la célula está sometida a estrés e inclusive difiere entre regiones o compartimentos dentro de la célula. Por ejemplo, existen sets de ARNt y de las enzimas asociadas a su biosíntesis y procesamiento cuya expresión es inducida específicamente en células diferenciadas o en proliferación (Gingold et al., 2014). Lo mismo sucede al comparar la expresión de ARNt y factores de traducción entre células proveniente de distintos tipos tumorales (Zhang et al., 2018). De la misma manera, existe una gran heterogeneidad en la composición de los ribosomas en distintas líneas celulares (Guimaraes and Zavolan, 2016; Gupta and Warner, 2014) y una gran heterogeneidad en la traducción entre regiones especializadas de una misma célula (Wang et al., 2016).

¿Pueden estas variaciones en las condiciones celulares modificar la cinética de traducción de algunas proteínas específicas (Figura 2)? En ese caso ¿se podría pensar en un plegamiento tipo celular específico o tejido específico?

2. El receptor de estrógenos alfa (ER α) como modelo

2.1 Importancia biológica del ER α

Los estrógenos son una clase de hormona esteroidea que regulan el desarrollo y la fisiología del sistema reproductivo de vertebrados, tanto femenino como masculino. En humanos, son producidas principalmente en los ovarios en mujeres y en los testículos en hombres. A pesar de que su función principal se ha asociado al sistema reproductivo también cumplen roles fundamentales en el sistema óseo (Bado et al., 2017; Khalid and Krum, 2016), cardiovascular (Iorga et al., 2017; Knowlton and Lee, 2012), adiposo (Kim et al., 2014) y nervioso (Maggi et al., 2004), así como en el comportamiento (Sundermann et al., 2010; Wharton et al., 2012).

Los estrógenos han sido asociados también a diversas patologías como obesidad, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Burns and Korach, 2012; Deroo and Korach, 2006). La relación entre el cáncer de mama y hormonas esteroideas se conoce desde 1896 cuando Beatson descubrió que la extirpación de los ovarios provocó la remisión de cáncer de mama. Sin embargo, no fue hasta casi un siglo después que se descubrió la existencia de proteínas capaces de unirse a estrógenos que servían como marcadores para el pronóstico de la eficiencia de la terapia hormonal (McGuire, 1973). Más de una década después, en 1986, el receptor de estrógenos alfa (ER α) fue clonado de células MCF-7 (Green et al., 1986; Greene et al., 1986) mientras que el ER β de próstata de rata fue clonado recién en 1996. Estos dos receptores (ER α y ER β) son los mediadores principales de los efectos de los estrógenos. Las vías de señalización de los estrógenos se estimulan o inhiben de forma selectiva en función de un equilibrio entre la actividad del receptor de estrógeno (ER) ER α y el ER β . Tras la identificación de dominios específicos del ER α (Kumar et al., 1987) se mostró que el receptor funciona como un factor de transcripción dependiente de ligando, y que media los efectos de los estrógenos regulando la expresión de genes específicos en cada contexto celular. Actualmente se conoce que también es capaz de participar en la regulación de la expresión génica mediante otros mecanismos que no involucran su función como factor de transcripción así como también en forma independiente de ligando (ver sección 2.3).

2.2 Estructura del ER α

El ER α pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y comparte con ellos su estructura modular (Figura 3.a) (Moggs and Orphanides, 2001). En su forma completa tiene 595 aminoácidos de largo y 66 kDa de peso molecular. Se estructura formando 5 dominios, los cuales están específicamente involucrados en las distintas actividades del receptor (Revisado en Kumar et al., 2011; Ruff et al., 2000; Yaşar et al., 2016). Los dominios son:

- *Dominio A/B*: dominio amino terminal muy poco conservado, contiene la función de transactivación AF-1 que se encuentra involucrada en la activación transcripcional de genes blanco tanto en forma dependiente como independiente de ligando.
- *Dominio C*: dominio de unión al ADN altamente conservado, con dos motivos estructurales característicos en dedos de zinc.
- *Dominio D*: región bisagra.
- *Dominio E*: dominio de unión al ligando y que permite la dimerización del receptor. Contiene una segunda región de transactivación denominada AF-2 involucrada principalmente en la activación transcripcional de genes blanco en respuesta al ligando.

- *Dominio F*: dominio C-terminal

Existen algunas variantes del receptor que se expresan en forma tipo celular específica. Entre ellas las más destacadas son la forma de 46 kDa que carece del dominio A/B y la forma de 36 kDa que también carece del dominio A/B y además de parte del dominio E y todo el F (Yaşar et al., 2016).

2.3 Actividad del ER α

¿Cómo actúa el ER α ? Existen múltiples vías descritas a través de las cuales el ER α lleva a cabo sus funciones. Algunas de ellas involucran la inducción o la represión de la transcripción de genes blanco, otras involucran cambios en la señalización de cascadas de quinasas, algunas son dependientes de ligando mientras que otras no. En la Figura 3.b se muestra un resumen de las vías de actividad del ER α .

2.3.1 Actividad genómica dependiente de ligando

i. Activación transcripcional directa

El receptor de estrógenos es capaz de unirse directamente a regiones específicas del ADN en los promotores de genes blanco para modular su transcripción. Estas regiones denominadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE) son secuencias palindrómicas de unos 13nt de largo cuya secuencia consenso es 5'-GGTCAnnnTGACC-3' (Klinge, 2001). Durante muchos años se creyó que la activación del receptor era suficiente para la inducción de la transcripción de sus genes blanco: la unión al ligando induce un cambio conformacional en el receptor, lo libera de un complejo inhibitorio compuesto por varias proteínas chaperonas y desencadena la dimerización del receptor que es capaz de translocar al núcleo y unirse a los EREs para regular la transcripción (Shang et al., 2000).

En este contexto, las funciones de transactivación AF1 y AF2 juegan un rol fundamental en la transactivación de genes blanco. Estas regiones de unión a correguladores de la transcripción exhiben propiedades de transactivación distintas, donde la actividad AF2 depende completamente de la unión al ligando mientras que AF1 no. Sin embargo, la actividad transcripcional completa de ER α procede a través de una sinergia entre estas dos funciones (Métivier et al., 2001).

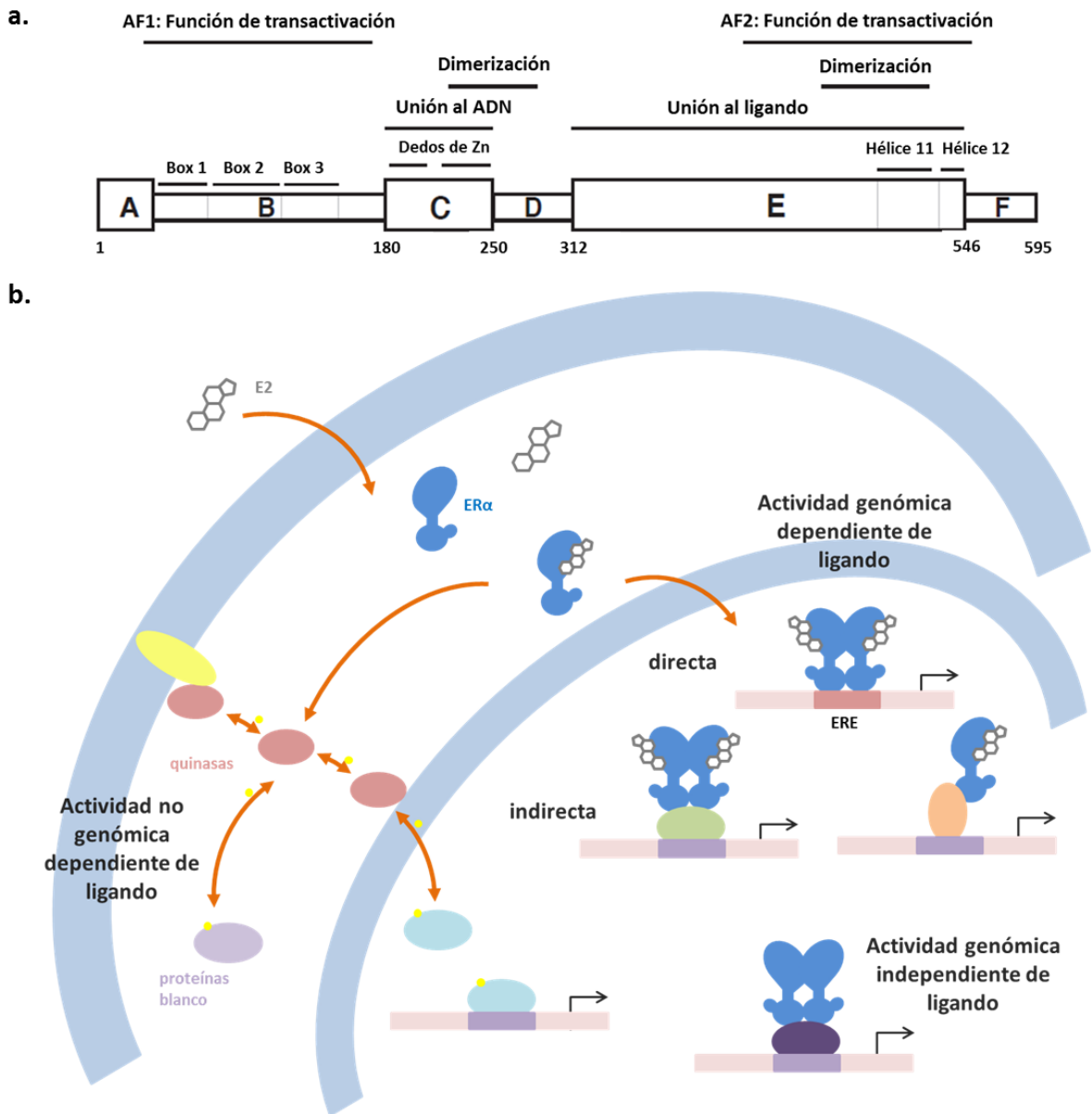


Figura 3. El ER α y su actividad celular. a. Dominios del ER α . La estructura del ER está compuesta por varios dominios. Se representan los dominios y regiones que cumplen roles importantes en su función. A/B: dominio N-terminal que contiene la función de transactivación AF1; C: dominio de unión al ADN. Participa en la dimerización del receptor; D: dominio bisagra. E: dominio de unión al ligando. Contiene la función de transactivación AF2 y también participa en la dimerización; F: dominio C-terminal. **b. Mecanismos de acción del ER α .** El ER α puede actuar a través de varios mecanismos. En las vías genómicas clásicas de actividad, cuando el ER α se une a su ligando es capaz de translocarse al núcleo e inducir la expresión de genes blanco. Esto lo puede hacer uniéndose directamente al ADN en motivos de unión denominados ERE o indirectamente al participar como cofactores de otros factores de transcripción. El ER α también es capaz de inducir la expresión de genes blanco en forma independiente de ligando. Por otra parte, el ER α puede participar en la activación de cascadas de quinasas, en lo que se llama vía no genómica o vía rápida de acción del ER α . A través de esta última también participa en la regulación de la actividad de blancos y en la expresión génica. Figura inspirada en (Nadal et al., 2001)

Hoy en día está claro que la activación del receptor es mucho más compleja. Requiere la acumulación coordinada de docenas de cofactores con diversas funciones (Carroll, 2016). Estos cofactores incluyen por ejemplo modificadores de la cromatina, proteínas que actúan como *scaffolds* o andamios para el ensamblaje de complejos, entre otros (Glass and Rosenfeld, 2000; Shang et al., 2000).

Además de estar regulada por los niveles de todos sus cofactores, la actividad transcripcional del receptor también está regulada por su estado de modificación postraduccional. La fosforilación de residuos específicos del receptor es requerida para su activación en algunos contextos celulares siendo inclusive capaz de interferir con su capacidad de dimerización, mientras que en otros contextos es capaz de potenciar su actividad a pesar de no ser esenciales para su función (Chen et al., 2000; Rogatsky et al., 1999; Sheeler et al., 2003; Williams et al., 2009).

Para agregar complejidad a este sistema, hoy en día se reconoce que el receptor puede también regular a sus genes blanco interactuando con el ADN a grandes distancias de los mismos. Efectivamente, aproximadamente el 95% de los sitios de unión del receptor al ADN son secuencias potenciadoras de la transcripción que se encuentran a grandes distancias de los genes blanco (Carroll et al., 2006). Inclusive, en algunas situaciones, la unión del receptor a elementos potenciadores puede contribuir a la transcripción de ARN no codificantes, incluidos ARN transcritos a partir de los propios sitios potenciadores (Hah et al., 2011; Li et al., 2013).

ii. Activación transcripcional indirecta

El receptor también puede participar en la regulación de la actividad transcripcional de otros factores de transcripción como SP1 (Saville et al., 2000) y miembros del complejo FOS/JUN (AP-1) (Jakacka et al., 2001; Kushner et al., 2000; Safe and Kim, 2008). Sin unirse en forma directa al ADN, puede formar complejos proteína-proteína con estos factores de transcripción y regular la expresión génica de sus genes blanco. Por ejemplo el receptor actúa como cofactor de c-Jun y modula genes bajo el control del elemento de respuesta AP-1 (Jakacka et al., 2001; Kushner et al., 2000).

iii. Represión transcripcional

Hace más de 10 años que estudios a gran escala han demostrado que la gran mayoría de los genes blanco regulados por el receptor son reprimidos y no activados (Frasor et al., 2003; Kininis et al., 2007). En contraste al gran conocimiento que hay sobre los mecanismos de activación transcripcional, no hay consenso sobre los mecanismos que regulan la represión transcripcional por medio del receptor. Los mecanismos propuestos incluyen el *squelching* o silenciamiento por competencia con cofactores (Guertin et al., 2014), la acción directa de correpresores acompañado de la desacetilación de histonas (Varlakhanova et al., 2010), la participación de elementos de la maquinaria basal de transcripción (Hao et al., 2007) entre otros (Stossi et al., 2009).

2.3.2 Actividad no genómica dependiente de ligando

El receptor también puede actuar mediante un mecanismo "no genómico", en el que una pequeña fracción del receptor completo o variantes transcripcionales se localizan en la membrana plasmática o cerca de ella e inducen la activación de varias quinasas que pueden interferir con la transcripción génica (Li et al., 2003; Razandi et al., 2004; Wang et al., 2006; Warner and Gustafsson, 2006).

La evidencia sugiere que el receptor es capaz de interactuar con proteínas de membrana que son clave en los procesos de señalización celular e inclusive es capaz de ensamblarse como parte de un gran complejo de señalización. Estas proteínas incluyen receptores tirosin-quinasas (EGFR, IGFR, HER2) (Arpino et al., 2008; Song et al., 2004), otras proteínas tirosin-quinasas como SRC y proteínas G (Wyckoff et al., 2001). Estas interacciones desencadenan vías de señalización a través de mensajeros secundarios, que conducen a la activación de la vía MAPK (RAF/MEK/MAPK) y de la vía PI3K/AKT. En consecuencia, estas quinasas regulan la actividad de diversas proteínas, entre ellas son capaces de activar al propio receptor y sus correguladores, pudiendo así amplificar la actividad genómica de ER α (Kato et al., 1995; Martin et al., 2000)

2.3.3 Actividad independiente de ligando

El receptor puede ser activado en ausencia de ligando como consecuencia de su interacción con vías de señalización activadas por otras proteínas como EGF e IGF1 o por neurotransmisores (Ignar-Trowbridge et al., 1992; Ma et al., 1994; Power et al., 1991). También puede ser activado en ausencia de ligando como consecuencia de su fosforilación mediada por quinasas. Poco se conoce sobre los mecanismos involucrados en la activación independiente de ligando. En algunos contextos celulares, es necesaria la fosforilación de sitios específicos para su activación mientras que en otros la fosforilación del receptor no es suficiente para su activación a pesar de permitir el reclutamiento de cofactores (Maggi, 2011; Williams et al., 2009).

2.3.4 Entrecruzamiento de vías de señalización

Múltiples participantes son comunes a varias de las vías de señalización del receptor, entre ellos factores de transcripción, cofactores y elementos de las cascadas de quinasas. Esto abre la puerta a mecanismos de autorregulación a través de retroalimentaciones que se generan en dichos puntos comunes a las distintas vías.

2.4 El contexto celular y funcionalidad del ER α

Una de las características más llamativas del receptor de estrógenos es su amplia distribución en el organismo y la variedad de funciones que cumple en cada contexto celular. Además, su respuesta a distintos ligandos puede ser tipo celular específica, por lo que el receptor tiene una gran plasticidad en su actividad que depende del contexto celular.

2.4.1 Actividad tipo celular específica

La respuesta del receptor a ligandos es en muchos casos tejido específica. Por ejemplo, los Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos o SERMs (de su sigla en inglés Selective Estrogens Receptors Modulators) constituyen una clase de ligandos, en su mayoría no esteroideos que, dependiendo de la célula y tejido donde actúan, pueden funcionar como agonistas o antagonistas (Martinkovich et al., 2014). El efecto tejido específico de estos ligandos se utiliza desde hace muchos años como estrategia para el tratamiento de distintas patologías y para el tratamiento, por ejemplo, de síntomas menopáusicos. Un ejemplo es el Raloxifeno, utilizado en la prevención y tratamiento de la osteoporosis, que actúa como antagonista en el tejido mamario y como agonista en tejido óseo pero no así en el útero (Black et al., 1994; Ettinger et al., 1999; Martinkovich et al., 2014). El Tamoxifeno, por su parte, utilizado en el tratamiento de cáncer de mama con respuesta hormonal, y en el tratamiento de prevención del mismo, actúa como antagonista en el tejido mamario pero tiene actividad agonista en el útero y está asociado a un aumento del riesgo de cáncer uterino (HU et al., 2015).

Otro de los contextos en los que se ha descrito actividad del receptor tipo celular específica es entre células diferenciadas y no diferenciadas. Esto se encuentra relacionado a la contribución relativa ejercida por las funciones de transactivación AF1 y AF2 en la actividad transcripcional de ER α que depende del estado de diferenciación de la célula. En experimentos de transfección transitoria utilizando líneas celulares que no expresan el receptor se observó que cuanto más diferenciada es una célula, la señalización ER α se encuentra mediada fundamentalmente a través de la función AF-1. En contraste, AF-2 es la función dominante involucrada en la actividad transcripcional en células desdiferenciadas (Mérot et al., 2004). Por ejemplo, las células Hela, originarias de un carcinoma de cuello uterino, presentan un fenotipo pobremente diferenciado y exhiben un contexto celular estrictamente permisivo para la función de transactivación AF2 de ER α . En cambio, la línea celular de hepatocarcinoma HepG2 es más diferenciada y en ellas AF1 es la función de transactivación dominante implicada en la actividad transcripcional de ER α (Berry et al., 1990; Mérot et al., 2004). Curiosamente, las líneas celulares tumorales que expresan de forma endógena al ER α exhiben un contexto celular permisivo AF1, mientras que las células tumorales que presentan un contexto estrictamente permisivo a AF2 son siempre ER α negativas (Kerdivel et al., 2014).

2.4.2 Posibles mecanismos subyacentes a su actividad contexto celular específica

Existen diversos mecanismos que pueden contribuir a la actividad tipo celular específica del ER α :

1. Los niveles de expresión del propio receptor y de sus múltiples variantes transcripcionales.
2. La expresión celular específica de los correguladores y enzimas necesarias para la activación / inactivación de ER α .
3. Los eventos epigenéticos, como la accesibilidad de la cromatina, que seleccionan los sitios de unión al ADN disponibles en cada sistema celular (EREs y potenciadores lejanos).

4. Los niveles tejido-específicos de cada uno de los tipos de estrógenos y de otras hormonas o ligandos capaces de regular la actividad del receptor. Cada uno de ellos tiene una capacidad diferencial para inducir una conformación alostérica del dominio de unión al ligando del receptor.
5. Presencia de modificaciones postraduccionales en sitios específicos de cada una de las variantes del receptor.
6. Estequiometría entre ER α y ER β .

En resumen, es la interacción entre ligando, receptores, secuencias de ADN, cofactores, contexto de la cromatina y presencia/ausencia de modificaciones postraduccionales lo que define la regulación transcripcional por ER α (Maggi, 2011; Moggs and Orphanides, 2001; Welboren et al., 2009). En cualquiera de estos contextos, la conformación que el receptor adopta como consecuencia de esta multiplicidad de interacciones juega un rol fundamental para su actividad resultante (Allegretto, 2002; Celik et al., 2007; Gee and Katzenellenbogen, 2001; Kumar et al., 2011; Michalides et al., 2004; Paige et al., 1999; Tamrazi et al., 2003; Zwart et al., 2010). Los cambios conformacionales que sufre el receptor son múltiples y dada la importancia de su conformación para su actividad, cabe preguntarse si el camino transitado durante su síntesis puede influenciar su conformación inicial teniendo consecuencias, a posteriori, en su actividad.

3. La transición epitelio-mesenquimal como modelo de estudio para la actividad tipo celular - específica del ER α

3.1. Generalidades de la Transición Epitelio Mesenquimal

La transición epitelio-mesenquimal (EMT: del inglés Epithelial to Mesenchymal Transition) es un proceso conservado evolutivamente durante el cual se regula la expresión génica de células epiteliales diferenciadas de forma que estas adquieren un fenotipo mesenquimal inmaduro. Es un proceso biológico esencial para el desarrollo embrionario y para los procesos de sanación de heridas (Polyak and Weinberg, 2009). Durante la fase temprana del desarrollo humano, la transición está involucrada en la plasticidad y la morfogénesis de las células madre necesarias para la gastrulación y el desarrollo de órganos (Nakaya and Sheng, 2008). En el organismo adulto, la conservación del tejido puede regularse mediante la EMT (y mediante el proceso inverso, transición mesenquimo-epitelial (MET)), y puede conducir a la reconstrucción de tejidos cuando suceden heridas y la restauración de la homeostasis celular después de procesos inflamatorios.

La EMT también se observa en cáncer y otras patologías (Polyak and Weinberg, 2009). Muchos tipos de carcinomas dependen de la activación de la transición. Uno de los pasos cruciales en la progresión del cáncer es la individualización de las células pertenecientes a tumores primarios que es acompañada por la desdiferenciación a tipos celulares mesenquimales y su posterior diseminación. Este programa pleiotrópico es uno de los procesos subyacentes a esta transformación, confiriéndole a las células tumorales múltiples

rasgos asociados con alto grado de malignidad (Dongre and Weinberg, 2019; Felipe Lima et al., 2016; Morel et al., 2008; Rhim et al., 2012).

3.1.1. Cambios característicos de la EMT

Las células que forman láminas epiteliales en varios tejidos normalmente muestran polaridad apical-basal y se mantienen unidas lateralmente por múltiples tipos de uniones. Entre los distintos tipos de uniones encontramos: uniones estrechas, uniones adherentes (formadas por E-cadherina en su superficie que están conectadas al citoesqueleto de actina), uniones *gap* o comunicantes que permiten interacciones químicas directas entre las células vecinas, desmosomas conectados a los filamentos intermedios del citoesqueleto y las interacciones célula-ECM mediadas por integrinas y otras moléculas. Esta organización es crucial para la integridad estructural de epitelios. La integridad estructural es una propiedad clave de los tejidos epiteliales: los epitelios externos sirven como barreras protectoras contra los riesgos ambientales, y los epitelios internos crean subdominios definidos y fisiológicamente controlados (Radisky, 2005).

Durante la transición, las células epiteliales pierden las características de células diferenciadas. En este proceso se interrumpen las uniones célula célula, las células pierden su polaridad característica, se produce la degradación de la membrana basal subyacente y se reorganiza la matriz extracelular. Las células reorganizan ampliamente sus fibras de actina adquiriendo polaridad frontal-posterior y características de células inmaduras, que incluyen alta plasticidad celular, motilidad, invasividad y resistencia a la apoptosis (Dongre and Weinberg, 2019; Gugnoni et al., 2016; Lamouille et al., 2014). En los procesos tumorales, la degradación de la membrana basal junto con la reorganización de la matriz extracelular contribuye a la invasión y la diseminación metastásica (Dongre and Weinberg, 2019; Polyak and Weinberg, 2009). Una representación del proceso se muestra en la Figura 4.a.

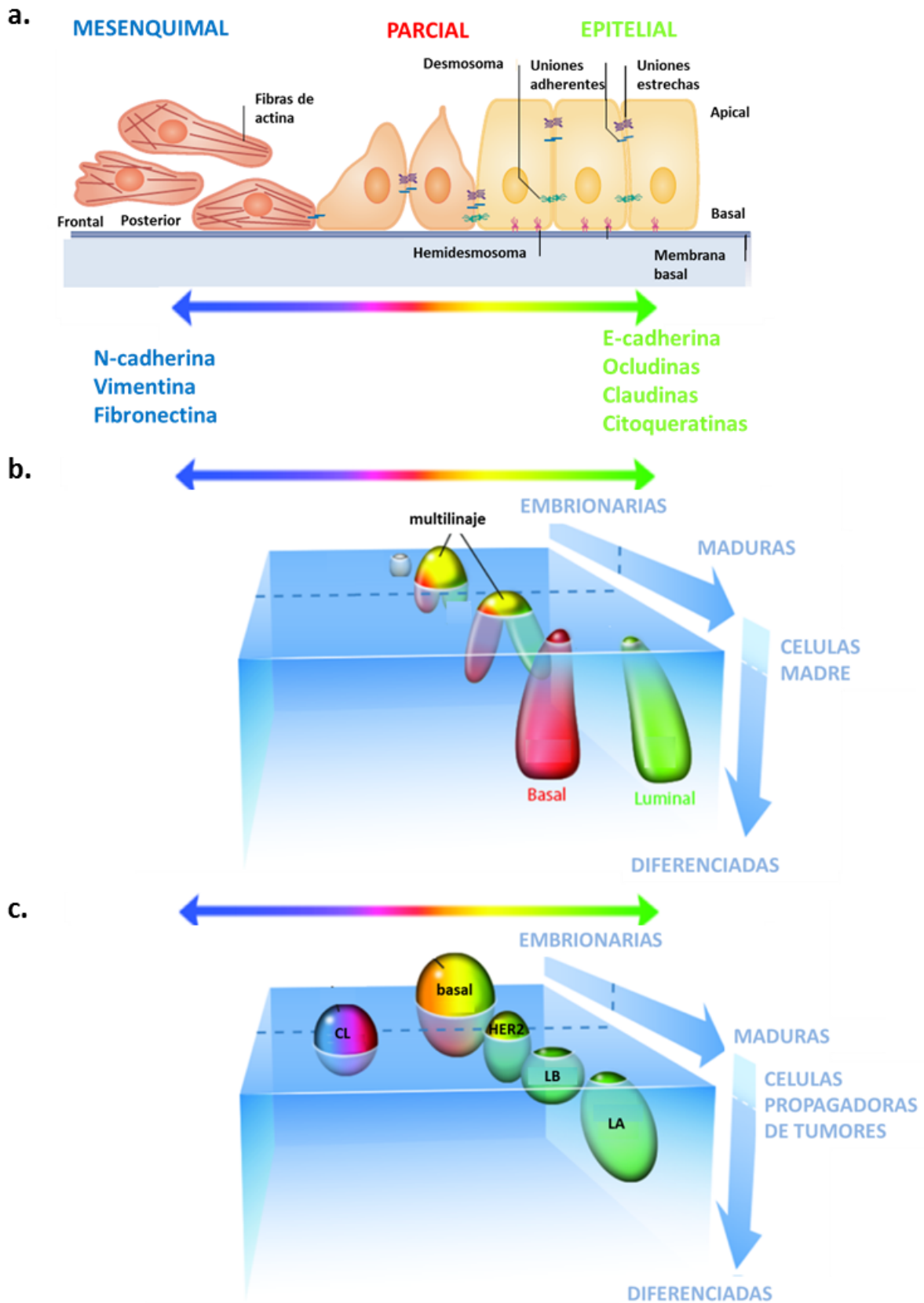


Figura 4. a. Esquema de un programa típico de EMT. Las células epiteliales que muestran polaridad apical-basal se mantienen unidas por uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas y están unidas a la membrana basal subyacente mediante hemidesmosomas. Estas células expresan moléculas que están asociadas con el estado

epitelial y ayudan a mantener la polaridad celular. La inducción de la transición epitelial-mesenquimal (EMT) conduce a la expresión de los factores de transcripción inductores de la EMT, que inhiben la expresión de genes asociados con el estado epitelial (enumerados en el cuadro verde) y activar concomitantemente la expresión de genes asociados con el estado mesenquimal (enumerados en el cuadro azul). Estos cambios en la expresión génica resultan en cambios celulares que incluyen el desensamblado de las uniones de células epiteliales y la disolución de la polaridad de las células apical. Esta pérdida progresiva de características epiteliales se acompaña de la adquisición de un conjunto parcial de características mesenquimales con retención de ciertas características epiteliales; en determinadas circunstancias, se puede adquirir un conjunto completo de características mesenquimales. Las células mesenquimales muestran polaridad antero-posterior y un citoesqueleto ampliamente reorganizado y expresan un conjunto distinto de moléculas que promueven y mantienen el estado mesenquimal. Durante la EMT, las células se vuelven móviles y adquieren capacidades invasivas. La EMT es un proceso reversible y las células mesenquimales pueden revertir al estado epitelial al someterse a una transición epitelial mesenquimal (MET). EMT y MET ocurren durante el desarrollo normal y durante la progresión del cáncer. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las células de carcinoma en los tumores que surgen espontáneamente muy raramente avanzan a un estado mesenquimal completo Figura adaptada de (Dongre and Weinberg, 2019).

b. Distribución de estados del epitelio mamario normal en función del nivel de desarrollo, estado de diferenciación y fenotipo epitelial/mesenquimal. Los cambios en el potencial de las células para entrar en el estado de células madre a lo largo del desarrollo pueden conceptualizarse en un espacio de coordenadas que relaciona la abundancia y diferenciación de células madre (eje y) con la progresión del desarrollo (eje z) y los fenotipos epiteliales / mesenquimales (eje x). Los diversos tipos de células dentro del epitelio mamario ocupan distintas regiones en este espacio durante el curso del desarrollo. Figura traducida de (Wahl and Spike, 2017).

c. Distribución de los diferentes subtipos de cáncer de mama en función del nivel de desarrollo, estado de diferenciación y fenotipo epitelial/mesenquimal. Los diferentes subtipos intrínsecos de cáncer de mama ocupan parte del mismo espacio que el epitelio mamario normal, lo que conduce a perfiles de expresión génica y mecanismos moleculares operativos parcialmente compartidos. CL Claudin Low, BL basal like, H2 Her2-like, LB luminal B, LA Luminal A. La heterogeneidad inter tumoral e intratumoral puede depender además de las diferencias locales en la expresión de reguladores clave la expresión y cuya actividad puede verse afectada por factores autocrinos o paracrinos producidos en el epitelio o microambiente. Además, los antecedentes genéticos y las influencias microambientales, incluidas las respuestas inmunitarias y las tensiones locales y sistémicas, pueden afectar la agresividad al cambiar los umbrales que distinguen las células madre de las no madre. Figura traducida de (Wahl and Spike, 2017).

3.1.2. Cambios en la expresión génica durante la EMT

Debido a la complejidad del proceso, durante la transición se activan factores de transcripción y vías de señalización en las células epiteliales que controlan los cambios moleculares y morfológicos (Škovierová et al., 2018). La inducción de EMT parece ser específica del tipo de tejido y del tipo celular (Radisky, 2005) aunque existen mecanismos y vías de regulación comunes a todas las transiciones. Algo similar sucede con los mecanismos efectores. Las principales vías que se han descrito como involucradas son las

vías TGF- β , Notch y Wnt. También la expresión diferencial de los factores transcripcionales SNAI (Snail), Zeb y Twist son comunes a varias vías.

Se han descrito interacciones recíprocas entre cambios mecánicos o de forma celular y la reprogramación genética. Es decir, hay cambios en la expresión génica que inducen cambios en la forma celular y cambios en la forma celular que inducen cambios en la expresión (Chen et al., 1997; Nelson et al., 2005)

Otros mecanismos que inducen la transición son por ejemplo el silenciamiento del receptor de estrógenos (Felipe Lima et al., 2016) y la expresión de determinados microRNAs, como miR-200 (Felipe Lima et al., 2016; Haraguchi et al., 2016). En otros casos, la activación de la EMT implica señales pleiotrópicas, como señales del microambiente celular o como en el caso de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en respuesta a la exposición a las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) (Mori et al., 2004; Radisky, 2005).

Como consecuencia de la inducción de la EMT, las células disminuyen o pierden la expresión de marcadores epiteliales, como E-cadherina, claudinas, ocludinas y citoqueratinas, y aumentan los marcadores mesenquimales, como S100A4, vimentina, N-cadherina y algunas integrinas (Voutsadakis, 2016).

3.1.2. Heterogeneidad celular durante la EMT

Tanto células epiteliales normales como neoplásicas muy rara vez avanzan a un estado completamente mesenquimal. Suelen adquirir un estado parcialmente epitelial y parcialmente mesenquimal resultando en una población celular heterogénea donde sólo parte de los marcadores se expresan en pequeños conjuntos de células. La transición es por lo tanto, a menudo representada como células que ingresan a varios estados celulares discretos dispuestos a lo largo del espectro epitelial-mesenquimal de fenotipos (Dongre and Weinberg, 2019; Voutsadakis, 2016; Wahl and Spike, 2017).

3.2 EMT, tumores de mama y el ER α

3.2.1 Incidencia y mortalidad de los tumores de mama

El cáncer de mama es el cáncer más común en mujeres en todo el mundo y es la segunda causa de mortalidad por cáncer. Más del 90% de las muertes relacionadas con el cáncer de mama son causadas por metástasis en sitios distantes (Liu et al., 2016).

Una variedad de factores clínicos y patológicos son usados de manera rutinaria para categorizar pacientes con cáncer de mama y así poder determinar la terapia más adecuada para su tratamiento y evaluar su pronóstico. Entre los factores evaluados se incluyen la edad del paciente, estado de los ganglios linfáticos axilares, tamaño del tumor, características histológicas, la presencia de receptores hormonales y caracterización molecular (Bagaria et al., 2014; Prat et al., 2015; Schnitt, 2010). La combinación de estos factores, determina la biología y la agresividad del tumor, pero también brinda la oportunidad de tratarlo de manera adecuada.

3.2.2 Clasificación de los tumores de mama

Clasificación por histopatología

Los patrones de crecimiento y las características citológicas de los tumores son usados para clasificar a los tumores de mama en carcinomas *in situ* (no invasivos) y carcinomas invasivos. El carcinoma *in situ* se subclasifica además como ductal (DCIS) o lobular (LCIS). DCIS es considerablemente más común que su contraparte y abarca un grupo heterogéneo de tumores que se subclasifican en varios subtipos (Li et al., 2005; Malhotra et al., 2010). Los carcinomas invasivos también son un grupo heterogéneo de tumores clasificados en subtipos histológicos. De ellos, el carcinoma ductal infiltrante (IDC) es el más común y representa el 70-80% de todas las lesiones invasivas. IDC se subclasifica además en tumores bien diferenciados (grado 1), moderadamente diferenciados (grado 2) o poco diferenciados (grado 3) (Li et al., 2005; Malhotra et al., 2010).

Presencia de receptores hormonales

Los tumores son evaluados mediante inmunohistoquímica para determinar la presencia de receptores hormonales. Los tumores pueden ser clasificados según la presencia de receptores de estrógenos en ER α positivos (ER α +) o negativos (ER α -) y según la presencia del receptor de progesterona en PR positivos (PR +) o negativos (PR -). Los tumores que presentan estos receptores hormonales tienen mejor pronóstico ya que tienen la capacidad de responder a terapias hormonales debido a la presencia de los receptores. Aproximadamente un 70% de los tumores de mama son positivos para los dos o al menos uno de los receptores.

Los tumores de mama también son clasificados según la presencia o ausencia del receptor tirosín quinasa HER2. Los tumores HER2+ sintetizan un exceso de receptor debido a la presencia de una amplificación del gen, el cual se encuentra en múltiples copias en el genoma (copias completas o parciales). Como consecuencia, las células tumorales crecen y se dividen de manera descontrolada por lo que los tumores son considerados más agresivos que los PR+ y/o ER α +. Sin embargo, la presencia del HER2 permite desarrollar estrategias para el tratamiento que tienen como objetivo bloquear el funcionamiento del receptor que es fundamental para la supervivencia de la célula tumoral. Aproximadamente el 20% de los tumores de mama son HER2+.

En el 10% de los tumores de mama, la evaluación del estado de los tres receptores resulta negativa. Este tipo de tumor se denomina triple negativo y son los que tienen peor pronóstico ya que es muy probable que no respondan a terapias hormonales ni a fármacos desarrollados para el bloqueo de la actividad HER2. Algunos tumores primarios que son clasificados como positivos para la presencia de receptores hormonales son capaces de adquirir nuevas características y evolucionar hacia tumores triple negativos. Por ejemplo, aproximadamente el 40% de los tumores mamarios que surgen de pacientes con cáncer de mama primario con ER α positivo dejan de responder a la terapia endocrina y cambian de un fenotipo epitelial bien diferenciado a uno metastásico.

Para uso clínico, este esquema simple de clasificación en base a la presencia de las tres proteínas marcadoras, es el más utilizado para la selección del tipo de tratamiento (Clarke et al., 2015).

Clasificación en base al perfil molecular

Debido a la heterogeneidad de los tumores de mama, se desarrollaron varias plataformas para clasificarlos en base a sus perfiles de expresión génica. En general, la clasificación molecular tiene dos objetivos principales: estimar el pronóstico de un paciente y/o determinar qué tratamiento específico debe recibir un paciente. Existen también otras formas de clasificación que tienen por objetivo explorar las bases moleculares del cáncer de mama y no se utilizan para uso clínico (Clarke et al., 2015).

Existen al menos 5 plataformas que se usan en la clínica: *Recurrence Score (RS)* basada en la evaluación por RT-PCR de la expresión de 21 genes (RS; Oncotype DX; Genomic Health, Inc., Redwood City, CA); PAM50 y PAM50 - ROR, basados en el análisis por microarrays de la expresión de 50 genes (Prediction Analysis of Microarrays y PAM50 Risk of Recurrence; Prosigna; NanoString Technologies, Seattle, WA); MammaPrint and Blueprint basados en la evaluación con microarrays de la expresión de 70 y 80 genes respectivamente (Agendia, Irvine, CA); EndoPredict (Myriad Genetics, Inc., Salt Lake City, UT) y Breast Cancer Index (BCI; Biotheranostics, Inc., San Diego, CA). En base a la expresión génica evaluada a través de estas plataformas los tumores se pueden clasificar según su subtipo molecular y según su riesgo de recurrencia (Gao and Swain, 2018).

Los subtipos moleculares más utilizados para la clasificación son:

- Luminal A: Incluye tumores que son ER positivos y PR positivos, pero negativos para HER2. Presentan muy baja expresión del marcador de proliferación Ki67. En general responden a la terapia hormonal y a la quimioterapia. Son de baja recurrencia (Gao and Swain, 2018).
- Luminal B: Comprende aproximadamente un 40% de los tumores de mama. Incluye tumores que son ER positivos, PR negativos y HER2 positivos. Es probable que respondan a la quimioterapia, a la terapia hormonal y al tratamiento dirigido a HER2. Sin embargo tienen altos porcentajes de recurrencia (Gao and Swain, 2018; Li et al., 2016).
- HER2 positivos: Incluye tumores que son ER negativos y PR negativos, pero HER2 positivos. Probablemente responden a la quimioterapia y al tratamiento dirigido a HER2.
- Basales: Representan del 10% al 25% de todos los tumores, dependiendo de la demografía de la población, y representan aproximadamente el 50% -75% del subtipo triple negativo. Es importante tener en cuenta que, mientras que los cánceres triple negativos son frecuentemente tumores basales, los cánceres triple negativos pueden caer con menos frecuencia en cualquiera de los otros subtipos.

Estos tumores fueron llamados basales debido a la expresión única de las citoqueratinas 5, 6 o 17, que generalmente se expresan en la capa epitelial basal de la piel y las vías respiratorias. Son, en general, altamente proliferativos. No responden bien a las terapias convencionales (Perou, 2010)

- *Claudine low*: Bajos en claudina: Es el grupo tumoral identificado más recientemente. El nombre del subtipo se basa en que estos tumores exhiben una baja expresión de muchos de los genes de claudina, incluidos claudina 3, 4 y 7. Son ER α , PR y HER2 negativos por lo que a veces son considerados un subgrupo de los tumores basales. Presentan gran resistencia a las quimioterapias convencionales (Dias et al., 2017; Perou, 2010; Prat and Perou, 2011).

Cabe destacar, que a pesar de que algunos esquemas de clasificación se usan ampliamente, los mismos tienen grandes limitaciones (Clarke et al., 2015). Por ejemplo, el sistema descrito anteriormente, que es el más utilizado, no es estadísticamente robusto (Mackay et al., 2011). Inclusive, algunos esquemas de clasificación no son mejores predictores que conjuntos de genes aleatorios por lo que hay que considerarlos con cautela (Venet et al., 2011).

3.2.3. Heterogeneidad en los tumores de mama

Los tumores de mama son heterogéneos. La heterogeneidad es evidente dentro y entre tumores (Polyak, 2011). La heterogeneidad intratumoral se puede ver en la mezcla de tipos de células presentes en muchos tumores (heterogeneidad celular) y también en la expresión de marcadores clave como el receptor ER α (heterogeneidad molecular). Por ejemplo, el análisis inmunohistoquímico de la expresión de ER α puede mostrar un amplio rango de intensidad entre las distintas células del tumor. En aquellos tumores ER α + a menudo se encuentran células ER α -. Además, las medidas generalmente se realizan en un solo punto de tiempo, pero la expresión de ER α está regulada y puede fluctuar. Por ejemplo, el porcentaje de células positivas y negativas de un tumor puede variar con el tiempo y con la aplicación de tratamientos (Clarke et al., 2015). Por lo tanto, la heterogeneidad tiene aspectos espaciales y temporales que pueden ser más dinámicos de lo que se ha considerado hasta ahora (Aleskandarany et al., 2018; Clarke et al., 2015; Currin et al., 2016).

3.2.4. Relación entre la EMT, la clasificación de tumores de mama y el ER

Como se mencionó anteriormente, muchos tipos de carcinomas dependen de la activación de la transición. Durante el curso de la progresión tumoral, la EMT puede conferir a las células tumorales rasgos asociados con alto grado de malignidad (Dongre and Weinberg, 2019; Felipe Lima et al., 2016; Morel et al., 2008; Rhim et al., 2012).

En este contexto, entre los subtipos de tumores de mama, los tumores luminales parecen tener células únicamente en el borde epitelial del espectro EMT, con células más diferenciadas, ER positivas. Por su parte, los tumores basales, triple negativos, son más heterogéneos con células desdiferenciadas que abarcan el espectro desde células

pluripotenciales hasta variantes mesenquimales (Figura 4.c) (Wahl and Spike, 2017). El ER juega un rol trascendental en el desarrollo de la transición en células tumorales de mama. Su silenciamiento en MCF7 por ejemplo, células derivadas de tumores de mama clasificadas como luminales, es capaz de inducir la EMT (Al Saleh et al., 2011).

3.3 Modelo EMT derivado de la línea celular MCF7

3.3.1. La vía MKL1/actina como inductora de la EMT

En células tumorales de mama, la vía de señalización de MKL1/actina es una de las vías que induce la EMT. MKL1, también conocido como MRTFA o MAL, tiene un dominio de activación de la transcripción pero no tiene dominio de unión al ADN (Cen et al., 2003; Miralles et al., 2003) por lo que actúa como coactivador de la transcripción interactuando con otros factores de transcripción, en particular con el factor de respuesta a suero SRF (Vartiainen et al., 2007). Juntos controlan las funciones de motilidad y contracción celular (Vartiainen et al., 2007) además de ser capaces de inducir la reprogramación de las células a células pluripotenciales.

MKL1 es un regulador clave de la dinámica de la actina y la función de motilidad celular. MKL1 entra y sale del núcleo en un proceso controlado por el pool de actina globular (G-actina). En el citoplasma, MKL1 se une a los monómeros de G-actina que lo mantienen en su forma inactiva. Cuando las moléculas de G-actina polimerizan en filamentos (F-actina), MKL1 se disocia y transloca al núcleo donde se une a al factor SRF para promover la inducción de genes blanco de SRF (Flouriot et al., 2014; Miralles et al., 2003; Vartiainen et al., 2007). Entre estos genes se encuentran los genes que regulan la formación de F-actina. Es así que MKL1 es un regulador maestro de la forma celular.

MKL1 y SRF son necesarios para la invasión de células tumorales y metástasis. Como se mencionó anteriormente, uno de los pasos cruciales en la progresión del cáncer es la dediferenciación de las células de los tumores primarios para su posterior diseminación. La activación de la transición es uno de los mecanismos esenciales a través de los cuales se da este proceso. En células del tipo epitelial la vía MKL1/actina puede ser activada por la pérdida de uniones célula-célula que ocurre en la EMT (Micalizzi et al., 2010) ya que MKL1 puede sensor directamente los niveles de polimerización de actina (Wu et al., 2007; Zheng et al., 2009). Por otra parte, la activación de la vía MKL1/actina por otros mecanismos resulta en la activación de la EMT (Flouriot et al., 2014; Kerdivel et al., 2014).

3.3.1. La vía MKL1/actina y el ER

La localización nuclear de ER y MKL1 en células de cáncer de mama es mutuamente excluyente (Kerdivel et al., 2014). La activación de la vía MKL1 / actina en células de cáncer de mama sensibles a estrógenos conduce a la resistencia hormonal asociada con una disminución severa en la expresión de ER α , PR y HER2 (Kerdivel et al., 2014). De acuerdo con esto, MKL1 es principalmente citoplasmático e inactivo en líneas celulares de cáncer de mama luminal ER α -positivas tales como MCF-7.

Por otra parte, la vía actina / MKL1 también es capaz de regular la actividad transcripcional del ER (Huet et al., 2009, 2008). La inhibición de la actividad de MKL1 favorece la función de transactivación AF1 del ER α ; en contraste, la activación de MKL1 silencia la actividad de AF1, reduciendo drásticamente su eficiencia de transactivación, que luego actúa exclusivamente a través de AF2. Esto se encuentra estrechamente vinculado al hecho observado según el cual cuanto más diferenciada es una célula, más se encuentra mediada la señalización del ER a través de AF1. En contraste, AF2 es la única función de transactivación activa en células que han alcanzado su EMT (Mérot et al., 2004).

3.3.2. El modelo celular MCF7, MCF7 MKL1 Δ N200 y MCF7 MKL1 Δ C310

Para profundizar sobre los mecanismos involucrados y las consecuencias que tiene la activación de la vía MKL1/actina en la inducción de la EMT, así como los efectos sobre la expresión y actividad de ER α , el equipo de Gilles Flouriot desarrolló un modelo celular derivado de células MCF7 (Kerdivel et al., 2014).

Establecieron subclones de MCF7 que expresan un mutante de MKL1 con el dominio N-terminal deletado (MCF7MKL1 Δ N200). Esta región deletada contiene los motivos RPEL (sitios de unión de actina) y como consecuencia, MKL1 no se puede unir a la actina, se encuentra de forma permanente en el núcleo y presenta una actividad constitutiva (vía MKL1/actina activada constitutivamente). En estas células se observa el aumento de la transcripción de genes blanco de SRF como c-fos, α -actina y el propio SRF, así como de su cantidad de proteína. Además, presentan un perfil típico de tumores de tipo basal con una disminución de la expresión de los receptores hormonales ER α , PR y HER2 y de marcadores de escape hormonal como GATA3 (Kerdivel et al., 2014). Concomitantemente con un corrimiento hacia el lado mesenquimal de espectro asociado a una adquisición de características basales de estas células, también se observa un aumento de marcadores mesenquimales como la disrupción de fibras de E-cadherina y un aumento de la expresión de vimentina y de actina (Kerdivel et al., 2014).

Por otra parte, el grupo estableció clones de MCF7 que carecen de parte del dominio C-terminal que contiene la función de transactivación (MCF7 MKL1 Δ C301). En estos clones, MKL1 no puede ejercer su función de coactivador de SRF y pueden ser utilizados como control de la actividad transcripcional de MKL1. Estas células presentan un fenotipo diferenciado epitelial acentuado (Kerdivel et al., 2014).

Por tanto, estas líneas celulares constituyen un modelo interesante para el estudio de distintos contextos celulares donde el receptor presenta una actividad diferencial. Las células MCF7 MKL1 Δ N200 tienen características de células mesenquimales desdiferenciadas, y el receptor está en un contexto permisivo a AF2. Mientras tanto en las células MCF7 MKL1 Δ C301 con características de células epiteliales diferenciadas, el receptor se encuentra en un contexto permisivo a AF1.

OBJETIVOS

Objetivo general

Este proyecto se enmarca en una línea de investigación cuyo objetivo es establecer la contribución del contexto celular y la cinética de traducción en la estructura, plegamiento y funcionalidad *in vivo* de proteínas.

Como hipótesis, pensamos que al menos parte de los efectos tejido-específicos observados en la modulación del ER α , podrían estar relacionados con diferencias estructurales o conformacionales del ER α (aunque sutiles) en cada tejido. Estas diferencias conformacionales podrían ser consecuencia de variaciones de la cinética de traducción como consecuencia de variaciones en la maquinaria traduccional en los distintos tipos celulares. Entre los factores de la maquinaria de traducción que podrían influir se encuentran cambios en la composición de los ribosomas, cambios en la expresión de los factores de traducción, de la disponibilidad diferencial de ARNts entre otros.

En resumen, pensamos que variaciones de la maquinaria de traducción (en función del tipo celular o de un proceso patológico), y las mutaciones sinónimas en la secuencia codificante del ER α podrían conducir a variaciones de la conformación y de la actividad funcional y explicar en parte las diferentes respuestas tejido-específicas observadas a los SERMs.

Objetivos específicos

Este proyecto propone investigar la generación de posibles variantes de estructura y conformación que puede presentar el ER α en la célula donde se sintetiza y establecer si en el caso de esta proteína, la cinética de traducción y determinadas mutaciones sinónimas pueden afectar el plegamiento, la actividad biológica y la respuesta a distintos ligandos. Por otra parte, este proyecto propone investigar diferencias en el contexto celular y en la maquinaria de traducción entre células que puedan explicar la actividad tipo celular específica del ER α endógeno.

Específicamente este trabajo propone:

- 1) Comparar la funcionalidad del ER α codificado por la secuencia silvestre (wt) y por mutantes sinónimos. En particular se propone caracterizar la variante sinónima ER α A87, polimorfismo presente en 5-10% de la población.
- 2) Estudiar diferencias en las propiedades funcionales del receptor en las líneas MCF7, MCF7 MKL1 Δ N200 y MCF7 MKL1 Δ C301 y su vínculo con los distintos tipos tumorales.
- 3) Estudiar diferencias en el contexto celular entre las líneas MCF7, MCF7 MKL1 Δ N200 y MCF7 MKL1 Δ C301. En particular caracterizar cambios en la expresión de componentes de la maquinaria de traducción en estas células.

RESULTADOS

Capítulo 1. Estudio de la funcionalidad de un polimorfismo sinónimo del receptor de estrógenos, ER α Ala87

1.1 Introducción

1.1.1 Polimorfismos sinónimos ¿variabilidad genómica sin consecuencias?

Los polimorfismos sinónimos son variantes que ocurren en la secuencia codificante de un gen pero que no cambian la secuencia aminoacídica de la proteína resultante. Estas variantes, para ser consideradas polimorfismos deben encontrarse presentes en al menos un 1% de la población (Karki et al., 2015).

En general, los polimorfismos sinónimos fueron considerados variantes alélicas que no tienen consecuencias y por lo tanto han sido absolutamente desestimadas. Sin embargo, en los últimos años algunos grupos han centrado su atención en entender si estos polimorfismos pueden tener alguna implicancia para la salud humana. Como se comentó anteriormente, el codón utilizado para la codificación de un aminoácido podría afectar la conformación y funcionalidad de la proteína resultante. En forma resumida, la sustitución de un codón sinónimo para codificar un aminoácido de una proteína puede modificar: el set de ARNts que es capaz de decodificarlo, la estabilidad y/o la estructura del ARNm, los sitios de reconocimiento de proteínas o microARNs, el splicing alternativo y las interacciones de la secuencia codificante con la maquinaria traduccional. Todos estos factores pueden influir en la cinética de traducción de la proteína y por consiguiente, en su estructura y función (ver detalles en la introducción). Esto podría implicar, potencialmente, que entre dos individuos que presentan polimorfismos sinónimos para un gen existan diferencias en la conformación y/o funcionalidad de la proteína codificada por dichos polimorfismos.

Por otra parte, la variación de la concentración de ARNt entre distintos tipos celulares (Gingold et al., 2014), entre órganos (Dittmar et al., 2006), e inclusive en regiones definidas de un órgano (Ishimura et al., 2014) puede tener como consecuencia variaciones en la velocidad de traducción de algunos codones entre diferentes células y tejidos a pesar del uso uniforme de codones a nivel genómico. Por lo tanto, los efectos de los polimorfismos sinónimos podrían estar restringidos a tejidos específicos y no ser predecibles a partir del uso de codones (Kirchner et al., 2017). En consecuencia, es probable que algunos de estos efectos, como aquellos sobre la función de la proteína, podrían haber escapado hasta ahora de la detección, con posibles implicancias para la salud humana (Kirchner et al., 2017).

Los polimorfismos sinónimos ocurren en el genoma humano con una frecuencia mucho mayor que la esperada y se han asociado a alrededor de 50 enfermedades (Kirchner et al., 2017). Sin embargo, su asociación con alteraciones en la conformación y funcionalidad de las proteínas sigue siendo difícil de alcanzar. Existen muy pocos estudios que vinculan los polimorfismos sinónimos a variantes proteicas estructurales y/o funcionales. Recién en 2007 se publicó el primer estudio que mostró el efecto de un polimorfismo sinónimo sobre la funcionalidad de la proteína resultante. Kimchi-Sarfaty y colaboradores reportaron que un polimorfismo sinónimo del gen MDR1 que codifica a la glicoproteína de permeabilidad P-gp, resulta en una proteína con su interacción a drogas e inhibidores alterada. Este

polimorfismo había sido previamente relacionado a un haplotipo que presenta una alteración en la función de P-gp. Los investigadores mostraron que entre el polimorfismo y la secuencia referencia, los niveles de expresión de ARNm y proteínas eran similares pero no así las conformaciones proteicas (Kimchi-Sarfaty et al., 2007). Mostraron que aunque las alteraciones de P-gp relacionadas con el polimorfismo sinónimo parecen ser sutiles, los resultados biológicos son significativos ya que su presencia permite predecir una farmacocinética alterada. Por lo tanto, este enfoque ayudaría a diseñar estudios clínicos y tratamientos con criterios de inclusión-exclusión más estrictos que incluyan perfiles genéticos. Es probable que dichos estudios tengan más éxito que los realizados con los enfoques actuales de base más amplia (Sauna et al., 2007).

El gen CFTR codifica al regulador de la conductancia transmembrana que se encuentra involucrado en la fibrosis quística. En 2010 Bartoszewski y colaboradores estudiaron el efecto de la presencia de un polimorfismo sinónimo en la secuencia codificante de la proteína mutante CFTR $\Delta F508$. La mutación $\Delta F508$ es una delección de tres nucleótidos (CTT) y es la causa más frecuente de fibrosis quística. Las consecuencias de la delección son: la pérdida de la fenilalanina en la posición 508 de la proteína, un cambio de codón sinónimo para la isoleucina 507 (Ile507ATC a Ile507ATT), y la alteración en el plegamiento de la proteína. Los investigadores mostraron que la mutación $\Delta F508$ modifica la estructura secundaria del ARNm del CFTR y que como consecuencia su velocidad de traducción se ve disminuida. Una variante sinónima del $\Delta F508$ CFTR (Ile507ATC), que podría existir naturalmente si Phe-508 fuera codificado por TTC, presenta la estructura de ARNm de tipo salvaje, y niveles de expresión mejorados en comparación con el CFTR $\Delta F508$ nativo. Al ser una proteína transmembrana el plegamiento del CFTR es predominantemente cotraduccional, por lo que los investigadores proponen que la modificación en la estructura secundaria del ARNm contribuye al plegamiento de la proteína CFTR $\Delta F508$ y, en consecuencia, a la gravedad de su fenotipo. Los estudios realizados por los investigadores sugieren, además, que los polimorfismos sinónimos contribuyen a las diferencias observadas en los síntomas de varios pacientes homocigotos con $\Delta F508$ (Bartoszewski et al., 2010).

En 2017 Kirchner y colaboradores vincularon directamente por primera vez un polimorfismo sinónimo con consecuencias sobre la proteína resultante a cambios en la cinética de traducción. Los investigadores estudiaron un polimorfismo sinónimo del gen CFTR. A pesar de que este polimorfismo, por sí solo, no causa fibrosis quística, es frecuente en pacientes con trastornos relacionados con CFTR. Los investigadores mostraron que la velocidad local de traducción en el codón sinónimo se ve modificada en comparación con la secuencia considerada como referencia. El codón presente en la secuencia sinónima es reconocido por un ARNt que es poco abundante únicamente en el epitelio bronquial lo cual sugiere efectos tipo celular específicos del polimorfismo. Debido a que el plegamiento CFTR es predominantemente cotraduccional, los cambios en la dinámica de traducción podrían promover cambios en su plegamiento. Los investigadores mostraron que la sobreexpresión de dicho ARNt revierte los defectos de estabilidad y conductividad de la proteína resultante (Kirchner et al., 2017).

A pesar de que han sido pocos los estudios que se han centrado en analizar los efectos de

polimorfismos sinónimos, los resultados muestran la gran relevancia que pueden tener sobre la salud humana. El conjunto de resultados expuestos muestra que estos polimorfismos introducen variabilidad en la composición genómica de los individuos que puede influir en el riesgo de enfermedades, el espectro de los síntomas de la enfermedad y en la respuesta a las terapias aplicadas (Kirchner et al., 2017).

1.1.2 ER α Ala87 elección del polimorfismo sinónimo de estudio

Con el fin de profundizar en las posibles consecuencias de los polimorfismos sinónimos y de entender si pueden afectar la estructura y funcionalidad de las proteínas, y además, motivados por explorar si la actividad tejido específica de los SERM pueden estar asociadas a variantes conformacionales tejido específicas del ER α , se analizó la funcionalidad del ER α -Ala87, un polimorfismo sinónimo que conserva el residuo Alanina en posición 87. El Ala87 corresponde al cambio sinónimo GCG a GCC (rs746432). La frecuencia media del alelo GCC se estima en aproximadamente un 5%, siendo casi del 0% para la población asiática a aproximadamente el 10% para la población europea (“rs746432 RefSNP Report - dbSNP - NCBI,” n.d.). Este polimorfismo ha sido pobremente caracterizado y no se ha descrito ninguna asociación del mismo con trastornos de salud o patologías (Chae et al., 2009; Mill et al., 2008; Wang et al., 2007).

El interés en este polimorfismo proviene de que el residuo Ala87 es la alanina central de un grupo de tres alaninas consecutivas. En la secuencia del ER α considerado como referencia (ER α wt), los tres codones son GCT GCG GCG; en la secuencia del ERAla87, se convierten en GCT GCC GCG. De acuerdo con el uso de codones humanos reportado en la base de datos genómica de tRNAs (Chan and Lowe, 2009), estos tres codones se usan de la siguiente manera: GCT: 1.84%, GCG: 0.74% y GCC: 2.77%. Esto implica que en el ER α wt se produce una repetición de los codones menos utilizados (Ala87 y Ala88), mientras que en el ER α Ala87, uno de los codones menos utilizados se sustituye por el más utilizado, eliminando también la repetición de codones. Este cambio no tiene consecuencias aparentes en la predicción (realizada utilizando programas especializados) de motivos de unión a proteínas, señales de reconocimiento, señales de splicing alternativo y la estructura del ARNm entre las dos secuencias. No se puede descartar que el cambio en la secuencia genere cambios en la interacción de las mismas con el ribosoma u otras proteínas o factores que no son considerados por los programas utilizados o cambios en interacciones inespecíficas. Sin embargo, un cambio mayor introducido por el cambio de secuencia es el set de ARNts que reconoce a los codones intercambiados. Este set no es compartido por ambos codones. Esto puede tener consecuencias directas en la velocidad con que son reconocidos los codones y por tanto en la cinética de traducción con las que son traducidos estas variantes del ER α .

Para evaluar las posibles consecuencias de la variante sinónima ER α -Ala87 en la funcionalidad del ER α se analizó la actividad “genómica” directa del ER α , la actividad “genómica indirecta” a través de interacciones proteína-proteína sobre el ADN, y los efectos “no genómicos”, rápidos del ER α así como su localización subcelular. Para ello se realizaron transfecciones transitorias con plásmidos conteniendo las secuencias codificantes del ER α wt y el ER α Ala87 en dos líneas celulares que no expresan al ER α y que

tienen distintos estados de diferenciación. De esta manera se puede evaluar si el cambio tiene consecuencias además tipo celular específicas. Por una parte se transfectaron células de la línea HepG2 que son células epiteliales, diferenciadas y en las cuales la función de transactivación AF1 del receptor es dominante. Por otra parte se utilizaron células la línea Hela que tienen un fenotipo poco diferenciado y en las cuales se encuentra habilitada casi exclusivamente la función de transactivación AF2 del receptor.

Los resultados permitieron la publicación de un primer trabajo titulado “The transcriptional activities and cellular localization of the human estrogen receptor alpha are affected by the synonymous Ala87 mutation” en The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. Derivado de este trabajo publicamos el artículo “Silent Polymorphisms: Can the tRNA Population Explain Changes in Protein Properties?” en el cual revisamos los argumentos que respaldan la idea de que las diferencias en la población de ARNt podrían producir cambios sutiles en la conformación del ER α -Ala87 y, por lo tanto, podrían explicar las variaciones funcionales observadas. Por otra parte el trabajo permitió publicar el capítulo metodológico “The Synonymous Ala87 Mutation of Estrogen Receptor Alpha Modifies Transcriptional Activation Through Both ERE and AP1 Sites” en la edición Estrogen Receptors de la serie Methods in molecular biology. Los tres artículos se adjuntan a continuación. Una breve exposición de los resultados se presenta en la siguiente sección. En este caso tuve participación directa en la generación de todos los resultados, con la excepción de la toma de imágenes de microscopía.

1.2 Resultados

1.2.1 Actividad genómica directa

Los efectos genómicos directos del ER α sobre la inducción de la transcripción se evaluaron cotransfectando junto al receptor una construcción plasmídica denominada ER α -tk-LUC que contiene el elemento de respuesta a estrógenos ERE unido al gen reportero Luciferasa. Los resultados muestran que el polimorfismo sinónimo ER α -Ala87 reduce significativamente la actividad de transactivación del ER α cuando este es inducido por E2, en los dos tipos celulares, por lo que la reducción parece ser independiente de qué dominio de AF está involucrado. Para entender si la disminución observada se debe a una reducción en la abundancia del receptor se evaluó mediante western blot y RT-qPCR la cantidad de proteína y ARNm respectivamente. No se detectaron cambios en la concentración de ARNm o proteína entre ambas variantes del receptor en ninguna de las líneas celulares, sugiriendo que una disminución en la disponibilidad del receptor no es responsable por la disminución de la actividad. Se evaluó también la respuesta del ER α a un aumento gradual de la concentración de E2 como forma indirecta de determinar la existencia de diferencias en la unión del ER α al E2. La ausencia de diferencias claras en la forma de la curva de respuesta a E2 sugiere que no hay diferencias en la unión del receptor al E2.

Se evaluaron también cambios en la capacidad de modulación de la actividad genómica directa del receptor por parte de unos de los moduladores selectivos más ampliamente utilizados, el tamoxifeno (OHT). Para ello se utilizó una construcción plasmídica que

contiene el promotor C3 unido al gen reportero Luciferasa. No se observaron cambios significativos en eficiencia de transactivación entre el ER α wt y el ER α -Ala87 en presencia de OHT, mientras que el antagonista ICI fue ineficiente sobre este gen reportero.

1.2.2 Actividad genómica indirecta

La actividad genómica indirecta que resulta de la interacción proteína-proteína del receptor con otros factores de transcripción se evaluó en células HepG2 utilizando una construcción plasmídica que contiene el promotor AP1 unido a Luciferasa. El receptor es capaz de interactuar como cofactor con c-Jun y, por lo tanto, modula genes bajo el control de AP-1. Como se esperaba (Mérot et al., 2004), los resultados mostraron una inducción de casi el doble del gen reportero AP1-LUC por ER α wt en presencia de 4-OHT e ICI que cuando se realiza la inducción con E2. Sorprendentemente, la respuesta del gen reportero a 4-OHT, y en menor medida a ICI, se incrementó significativamente por la actividad de ER α -Ala87. Por lo tanto, el cambio sinónimo Ala87 aumenta la actividad transcripcional del receptor sobre el reportero bajo el control de AP1.

1.2.3 Actividad no genómica

Para evaluar cambios en los efectos “no genómicos” introducidos por la codificación del ER α por la secuencia sinónima Ala87, se determinó el nivel de ERK fosforilado. En las células transfectadas con el ERwt se constató un aumento de la fosforilación de ERK después de 3 minutos de tratamiento con E2 que posteriormente regresó al nivel basal. Esta inducción se redujo ligeramente para ER α -Ala87 pero de todas formas se conservó este efecto “no genómico” mediado por E2.

1.2.4 Localización subcelular

La localización subcelular del receptor fue evaluada por inmunofluorescencia en los dos tipos celulares transfectadas con plásmidos conteniendo cada una de las dos secuencias sinónimas del receptor. La distribución del ERwt en células HeLa fue principalmente nuclear en ausencia de E2: más del 80% de las células exhibieron una localización nuclear exclusiva del receptor. El tratamiento con E2 indujo en el 30% de las células, una exportación hacia afuera del núcleo del ERwt. Sin embargo, en el caso de las HeLa transfectadas con la secuencia codificante del ER α -Ala87 se encontró una mayor proporción de localización citoplasmática del receptor sin diferencias inducidas por el tratamiento con E2. Por otra parte, en las células HepG2 el receptor mostró mayor localización citoplasmática del ERwt. Una distribución similar se observó para ER α -Ala87 en esta línea celular.

Por lo tanto, se mostró que la presencia del codón sinónimo en la secuencia que codifica para ER α -Ala87 modifica la localización subcelular del receptor de forma dependiente del tipo celular.

1.3. Discusión

En este trabajo comparamos la funcionalidad del ER α codificado por la secuencia silvestre (wt) y por la variante ER α -Ala87 como aproximación para evaluar la generación de posibles variantes de estructura y conformación. Buscamos establecer si en el caso del ER α , la cinética de traducción, modificada por la presencia de una variante sinónima, puede afectar la actividad biológica y la respuesta a distintos ligandos, que usamos como aproximación para evaluar posibles diferencias de conformación al descartar otras posibilidades.

Utilizando células HepG2 y HeLa transfectadas transitoriamente, pudimos demostrar que la actividad funcional de ER α -Ala87 difiere de la de ER α de tipo salvaje. Específicamente, la actividad genómica directa del ER α -Ala87 sobre motivos EREs inducida por E2 disminuye en ambas líneas celulares mientras que la actividad genómica directa sobre motivos C3 inducida por ICI no cambia. Sorprendentemente la actividad genómica indirecta del ER α -Ala87 en células HepG2 sobre el gen reportero AP1 aumenta cuando es inducida por OHT e ICI, mientras que, no se observaron cambios en la actividad no genómica entre ambos receptores.

La evidencia sugiere que es la conformación del receptor la que subyace a los cambios observados entre los dos receptores en una línea celular particular. Por un lado, son las mismas células crecidas en exactamente las mismas condiciones, lo único que cambia es una única base que resulta en un codón sinónimo, por lo que resulta difícil pensar que cambios en las concentraciones de cofactores u otras moléculas que interfieren con la actividad del receptor a cualquier nivel, sean responsables de estas diferencias. La cantidad de receptor producido tanto a nivel de mensajero como de proteína son similares por lo que la abundancia del receptor para interactuar con otras moléculas (en lo que refiere a su abundancia) tampoco parece estar por detrás de los cambios observados. Por lo tanto, a nuestro entender, la hipótesis más plausible es que diferencias sutiles en la conformación sean las responsables de los cambios observados entre ambos receptores. Nuestra hipótesis se apoya en que la conformación del ER α se ha propuesto como un importante regulador de su propia actividad (McDonnell et al., 2002) y, además, que nuestro grupo fue capaz de detectar variantes conformacionales producidas por la secuencia codificante del ER α wt cuando se sintetizó en diferentes sistemas de traducción *in vitro* mediante proteólisis limitada por quimotripsina (Horjales et al., 2007).

Sin lugar a dudas, sería importante realizar ensayos que confirmaran o apoyaran esta hipótesis. Una de las principales dificultades a la que nos enfrentamos para la realización de este tipo de ensayos es la baja cantidad de receptor recuperada de los cultivos. Esto se debe al bajo porcentaje de células transfectadas que obtenemos. Este es el caso de los ensayos de proteólisis limitada y principalmente el caso de ensayos que requieren purificación de la proteína como puede ser el ensayo de unión al ADN o al estradiol. Una alternativa para estudiar la unión al ADN, si bien no se podría distinguir entre unión directa e indirecta, son los ensayos de EMSA (del inglés Electrophoretic mobility shift assay) con extractos nucleares no purificados de estas células que permitirían comparar la unión al ADN de ambos receptores. Otra alternativa que abriría la puerta a ensayos que requieran mayor cantidad de proteína sería el establecimiento de una línea celular diferenciada con

cada uno de los receptores. Esto permitiría recuperar un poco más de proteína a partir de los cultivos. En el modelo de estudio que se llevó a cabo el análisis se podría hacer ensayos PLA (del inglés Proximity Ligation Assay) que permite evaluar variaciones en su capacidad de dimerizar y las interacciones del receptor con otras proteínas.

Por otra parte, en lo que respecta a las diferencias en la actividad del receptor wt expresado en distintos contextos celulares nuestros resultados son compatibles con lo previamente publicado por otros grupos de investigación. De acuerdo a estos últimos, las células Hela, que presentan un fenotipo pobremente diferenciado, presentan un contexto celular estrictamente permisivo para la función de transactivación AF2 del ER α . En cambio, en células HepG2, más diferenciadas, AF1 es la función de transactivación dominante implicada en su actividad transcripcional (Berry et al., 1990; Mérot et al., 2004). Esto se ve reflejado en nuestros resultados en el incremento en la actividad del receptor inducido con estradiol respecto a la actividad basal. En las células HepG2 los valores son significativamente mayores que en Hela (10 veces mayores) lo cual evidencia la actividad AF2 en HepG2. Cabe destacar que la misma diferencia se observa para el ER α -Ala87.

¿Podría estar vinculada la diferencia de actividad entre los distintos tipos celulares a su conformación? Esta es nuestra principal hipótesis y mostrarlo es nuestro objetivo de trabajo a futuro, pero la aproximación y el modelo utilizado en este caso no permite profundizar en este aspecto. Por un lado, el contexto celular es diferente por lo que las concentraciones de cofactores, correpresores y de otras moléculas que interactúan con el receptor y que pueden definir su actividad y localización son diferentes. De la misma manera, el contexto de la maquinaria traduccional no es el mismo por lo que podrían existir cambios sutiles de conformación. Nuestra hipótesis es que las diferencias observadas son una combinación de ambas cosas. De todas formas, para realizar ensayos que permitan observar “de cerca” al receptor en nuestras condiciones experimentales nos encontramos con las mismas dificultades mencionadas anteriormente.

En resumen, la actividad de ER α Ala87 depende del mecanismo de activación, pero también de la vía específica involucrada dentro de este mecanismo. La actividad de ER α Ala87 puede aumentar, disminuir o permanecer sin cambios en comparación con ER α wt. Además, la variante afecta la localización subcelular del ER α en forma tipo celular específica. ¿Cómo se pueden explicar las diferencias en las propiedades funcionales de ER α Ala87? ¿Podría generar el cambio de base un cambio en la cinética de traducción que se pudiera atribuir a un cambio de conformación entre ambos receptores? Como se discutió anteriormente, al comparar la actividad y localización entre ambos receptores expresados en la misma línea celular en las mismas condiciones, es altamente probable que el contexto de síntesis sea el mismo. A priori, no existen motivos para creer que existan variaciones en la expresión de los componentes de la maquinaria traduccional, aunque sería importante confirmarlo. Por otra parte, este cambio no tiene consecuencias aparentes en la predicción (realizada utilizando programas especializados) de motivos de unión a proteínas, señales de reconocimiento, señales de splicing alternativo y en la estructura del ARNm entre las dos secuencias. De todas maneras, no se puede descartar que el cambio en la secuencia genere cambios en la interacción de las mismas con el ribosoma u otras proteínas o factores que no son considerados por los programas utilizados o cambios en interacciones

inespecíficas. Un cambio mayor introducido por el cambio de secuencia es el set de ARNts que reconoce a los codones intercambiados. Este set no es compartido por ambos codones.

¿Podría el cambio conformacional en el ER α (que conduciría a los cambios funcionales descritos) ser provocado por un posible cambio en la identidad de la decodificación de tRNA Ala87? Considerando el uso de codones en el genoma humano, el cambio del codón Ala87 implica la sustitución de un codón poco frecuente (GCG con un uso del 0.74% en el genoma humano, presente en ER α wt) por uno frecuente (GCC con un uso del 2.77% en el genoma humano presente, presente en el ER α Ala87). Además, este cambio suprime una repetición de codones (en el ER α wt) dejando en su lugar tres codones decodificadores de Alanina diferentes consecutivos. Es interesante observar que entre los ARNt isodecodificadores involucrados, el ARNt Ala que lleva inosina (ARNt Ala-IGC) y el ARNt Ala-GGC solo pueden decodificar el codón Ala87 (GCC). Además, estos isodecodificadores podían leer dos codones consecutivos en el polimorfismo silencioso, aunque solo uno en el wt. Por otro lado, las poblaciones de ARNt Ala-CGC y ARNt Ala-UGC contribuirían principalmente a decodificar el wt (GCG). Según estas observaciones, parece posible que cuando ERwt y ER α Ala87 se expresan en las mismas líneas celulares, el cambio del codón de alanina podría conducir a una modificación de la dinámica de traducción local y a un cambio en la conformación de la proteína.

¿Podrían los ARNts explicar las diferencias tipo celulares específicas observadas entre el ER α y el ER α Ala87? Se ha descrito que la población de ARNt puede variar de acuerdo al estado de diferenciación celular (Gingold et al., 2014). A partir de la semicuantificación de grupos de ARNt en diferentes células humanas, Gingold y colaboradores propusieron la existencia de dos programas de traducción distintos que operan durante la proliferación y diferenciación. Además mostraron que los cambios en la concentración de ARNts entre los dos programas corresponden a preferencias de uso de codones de genes regulados por proliferación o diferenciación. Esto sugiere que las modificaciones en los niveles de ARNt específicos se coordinan con cambios en el transcriptoma, con el fin de optimizar el uso de codones de los genes que se expresan. Esto apoya la hipótesis de que las diferencias tipo celulares específicas entre el ERwt y el ER α Ala87 puedan estar orquestadas por las variaciones de las poblaciones de los ARNts. Entre otros trabajos que apoyan este punto de vista, vale la pena mencionar que se han encontrado diferencias significativas en la composición del ARNt entre las células de cáncer de mama y el tejido no transformado, lo que sugiere un ajuste de los grupos de ARNt en las células cancerosas adaptadas para traducir ARNm asociados con la progresión tumoral (Pavon-Eternod et al., 2009).

Las variantes descritas en las poblaciones de ARNts abren la puerta a muchas preguntas y consideraciones en lo que respecta a sus posibles consecuencias sobre la cinética de traducción y plegamiento proteico. ¿Qué tan dinámicos son los cambios en la población de ARNts? ¿Se puede hablar de patrones generales de concentración como proliferación y diferenciación? ¿O los cambios son inclusive más específicos y pueden estar vinculados además al momento del ciclo celular en que se encuentra la célula? ¿Las concentraciones pueden variar de un instante a otro? La falta de información sobre la concentración real de cada ARNt en diferentes condiciones fisiológicas dificulta la evaluación de la cinética de traducción y, por lo tanto, el análisis debe considerarse con precaución. Resulta

imprescindible el desarrollo de nuevos métodos de secuenciación, que permitan la identificación de bases modificadas en los ARNt, para una comprensión más profunda de las funciones de los ARNt en la célula y la disponibilidad real de ARNt para la traducción de proteínas en cada tejido, cada condición celular y para cada compartimiento subcelular. Esta información será crucial para determinar verdaderamente si nuestra hipótesis sobre el papel de los ARNts en la conformación y las propiedades funcionales de las variantes sinónimas de ER α es correcta. Es importante considerar que no todos los cambios en las concentraciones de ARNt pueden tener necesariamente un impacto sobre la cinética de traducción y/o el plegamiento de proteínas, esto seguramente dependerá de múltiples factores. Alternativamente, existe la posibilidad de que cambios en las poblaciones de ARNts, ya sean cambios instantáneos o a causa de la compartimentalización subcelular de los mismos, podrían generar una combinación de conformaciones coexistentes.

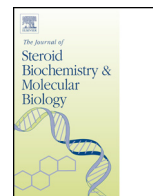
¿Qué efecto podría tener el cambio en la conformación del receptor? El codón que codifica para la Alanina 87 se encuentra en la región N-terminal que se ha descrito como intrínsecamente desestructurada pero que es capaz de estructurarse al establecer ciertas interacciones. Esta región aloja la función de transactivación AF1. Variaciones en la cinética de síntesis en esta región podrían por ejemplo generar variaciones sutiles que podrían alterar localmente el orden relativo en la región desestructurada y cambien la estructura adquirida al interactuar con otras moléculas.

Este resultado contribuye a la noción de que es necesario que los polimorfismos sinónimos tomen relevancia. Hasta el momento de la publicación de nuestros resultados existían, hasta donde pudimos relevar, únicamente 2 artículos que describen los efectos de este tipo de variantes. Este trabajo abre la puerta a varias interrogantes. Por ejemplo, como se explicó anteriormente, el tamoxifeno es una de las drogas utilizadas para tratar algunos tipos de tumores que dependen del estrógeno para crecer. Según nuestros resultados en células HepG2 el ER α -Ala87 presenta un aumento en su actividad con respecto al wt al ser tratado con tamoxifeno. ¿Podría suceder algo similar *in vivo* en células diferenciadas? ¿Podría el tamoxifeno ser menos efectivo en personas que son parte de la población que presenta la variante Ala87? ¿Habría que considerar fármacos especializados de acuerdo a la componente genética del individuo?

1.4. Conclusión

En resumen, utilizando células HepG2 y HeLa transfectadas transitoriamente, pudimos demostrar que la actividad funcional de ER α Ala87 difiere de la del ER α de tipo salvaje, en una forma dependiente del tipo celular. Proponemos que una variante conformacional podría originarse en la traducción de ER α Ala87, como consecuencia de las diferencias en la cinética traduccional debido a la disponibilidad de especies de ARNt que reconocen el codón GCG o GCC. Mucho queda por recorrer antes de poder entender el alcance que pueden tener estos resultados. ¿Es posible que las poblaciones de ARNts sean determinantes en la conformación del ER α ? ¿Sería esto posible únicamente en condiciones específicas como las descritas en este trabajo o en una variedad de contextos? ¿Pueden existir conformaciones "instantáneas" o poblaciones mixtas en un momento particular? De todas formas, sin lugar a dudas, estos resultados reafirman la importancia de considerar los

polimorfismos sinónimos en el estudio del efecto de drogas y abren las puertas para el desarrollo de fármacos personalizados en un futuro.



The transcriptional activities and cellular localization of the human estrogen receptor alpha are affected by the synonymous Ala87 mutation



Tamara Fernández-Calero^{a,b,*}, Soledad Astrada^c, Álvaro Alberti^c, Sofía Horjales^{a,1}, Jean Francois Arnal^d, Carlos Rovira^e, Mariela Bollati-Fogolín^c, Gilles Flouriot^f, Mónica Marin^a

^a Biochemistry-Molecular Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^b Bioinformatics Unit, Institut Pasteur Montevideo, Mataojo 2020, 11400 Montevideo, Uruguay

^c Cell Biology Unit, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay

^d Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, University of Toulouse 3, Toulouse, France

^e Department of Oncology and CREATE Health Strategic Centre for Clinical Cancer Research, Lund University, BMC, 221 84 Lund, Sweden

^f University of Rennes 1, Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail, IRSET, INSERM U1085, Team TREC, Biosit, Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2013

Received in revised form 19 February 2014

Accepted 21 February 2014

Available online 4 March 2014

Keywords:

Synonymous mutations

Estrogen receptor alpha

Estrogen

Ala87 polymorphism

ABSTRACT

Until recently, synonymous mutations (which do not change amino acids) have been much neglected. Some evidence suggests that this kind of mutations could affect mRNA secondary structure or stability, translation kinetics and protein structure. To explore deeper the role of synonymous mutations, we studied their consequence on the functional activity of the estrogen receptor alpha (ER α). The ER α is a ligand-inducible transcription factor that orchestrates pleiotropic cellular effects, at both genomic and non-genomic levels in response to estrogens. In this work we analyzed in transient transfection experiments, the activity of ER α carrying the synonymous mutation Ala87, a polymorphism involving about 5–10% of the population. In comparison to the wild type receptor, our results show that ER α A87 mutation reduces the transactivation efficiency of ER α on an ERE reporter gene while its expression level remains similar. This mutation enhances 4-OHT-induced transactivation of ER α on an AP1 reporter gene. Finally, the mutation affects the subcellular localization of ER α in a cell type specific manner. It enhances the cytoplasmic location of ER α without significant changes in non-genomic effects of E2. The functional alteration of the ER α A87 determined in this work highlights the relevance of synonymous mutations for biomedical and pharmacological points of view.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: ER, estrogen receptor; AF, transactivation function; E2, 17 β -estradiol; ERE, estrogen response element; ERE-tk-LUC, estrogen response element-thymidine kinase promoter controlling Luciferase expression; ERK 1/2, extracellular-signal-regulated kinase; 4-OHT, 4 hydroxy tamoxifen; SERMs, selective estrogen receptors modulators; WT, wild type; ICI, ICI 182,780.

* Corresponding author at: Biochemistry-Molecular Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay. Tel.: +598 2 525 20 95; fax: +598 2 525 86 17.

E-mail addresses: tamfernandez@gmail.com, tamfer@pasteur.edu.uy (T. Fernández-Calero).

¹ Present address: Structural Biology Unit, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay.

1. Introduction

Ribosomal synthesis of polypeptide chains and their folding into functional conformations is a complex process. Four decades ago, Protzel and Morris showed that translation course is non-uniform and that its rate varies along the entire mRNA template [1]. However, the precise causes and the relevance of translational kinetics on protein biosynthesis remain poorly understood. The main features identified so far affecting translation kinetics are RNA secondary structures, synonymous codon usage and tRNA abundance (reviewed in [2]). As it was shown in some organisms that (1) the frequency of codon usage is directly proportional to the concentrations of cognate tRNAs [3–5], and (2) that highly expressed proteins are mostly encoded by frequent codons [6,7], it was generally believed that the usage of most frequent codons was always

an advantage. However, some rare codons seem to be important in protein biosynthesis. In prokaryotes, where codon bias is deeper, substitution of rare codons by frequent ones can affect protein production by modifying mRNA secondary structures and stability, protein solubility and folding [8–10]. In eukaryotes, the presence of rare codons has been related to RNA splicing accuracy, for codons involved in junctions intron–exons as well as on modulators motives, the enhancers of splicing located in exons [11]. Besides splicing, the role of synonymous codon usage in the activity of proteins in eukaryotes remains controversial. Recently, Kimchi-Sarfaty et al. reported that a synonymous polymorphism that is commonly found in ABCB1, affects substrate specificity [12]. The ABCB1 gene product is commonly associated with multidrug resistance during cancer chemotherapy. In this context, our aim is to further explore the role of synonymous codons during the biosynthesis of proteins, focused on the functional activity of the ER α as a model.

The estrogen receptors ER α and ER β , mediate the pleiotropic and tissue-specific effects of estrogens. Steroids play critical roles in the normal development and function of the reproductive system, cardiovascular activity, bone metabolism, as well as in the central nervous system [13,14]. Estrogens are also associated with osteoporosis [15] and the development and progression of breast cancer [16]. ERs are transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily and share a multidomain structure (A to F) (Fig. 1A): the A/B domain that harbors the activation function-1 (AF1), the C-domain which holds the DNA binding domain (DBD), and the E domain including the ligand binding domain (LBD), the dimerization interface and the activation function-2 (AF2) [17,18]. In the classical or “genomic” mechanism, ERs binding to ligands allow the interaction with specific cofactors and binding to specific DNA sequences [19,20], to activate or repress different

sets of genes depending on both the cell and the promoter context [16,21,22]. Transcription activation is achieved either directly through interaction with DNA elements or through protein/protein interaction with other transcriptional factors (with AP1 or Sp1) [21,23–25]. The transcriptional activity of ER α can be regulated by selective estrogen receptors modulators (SERMs) whose relative agonist/antagonist activity is determined by cell context (reviewed in [26]). Among such compounds are tamoxifen and raloxifene. The differential regulatory effect appears as tissue specific responses to a given ligand but the mechanisms involved in the modulation of the regulatory activity are still not well understood. ERs can also act via “non-genomic” mechanism, in which the receptors locate within the plasma membrane, and induce a cellular response that activates various kinases that can interfere with gene transcription [27,28].

Due to the central role of ER α in many physiological processes, the study of polymorphisms is of utmost importance for pharmacogenomics implications. Among main polymorphisms studied in ER α (reviewed in [14]) are the variations known as PvuII and XbaI located in intron 1, or the (TA) $_n$ repeats in the 5' UTR of the ER α gene. In this work we investigated the functional properties of the ER α variant assigned as Bst UI [14]. This polymorphism has been poorly characterized and no clear association of this SNP to human diseases has been reported yet [29–31]. It is located in exon 1 and corresponds to the Alanine87 (Ala87) synonymous mutation (GCG to GCC) (rs746432) (Fig. 1A). The mean GCC allele frequency was estimated about 5%, being almost 0% for Asian population to about 10% for European population [32]. In the present work, the impact of ER α A87 mutation on ER α transcriptional activity and subcellular localization was studied in HepG2 and HeLa transiently transfected cells.

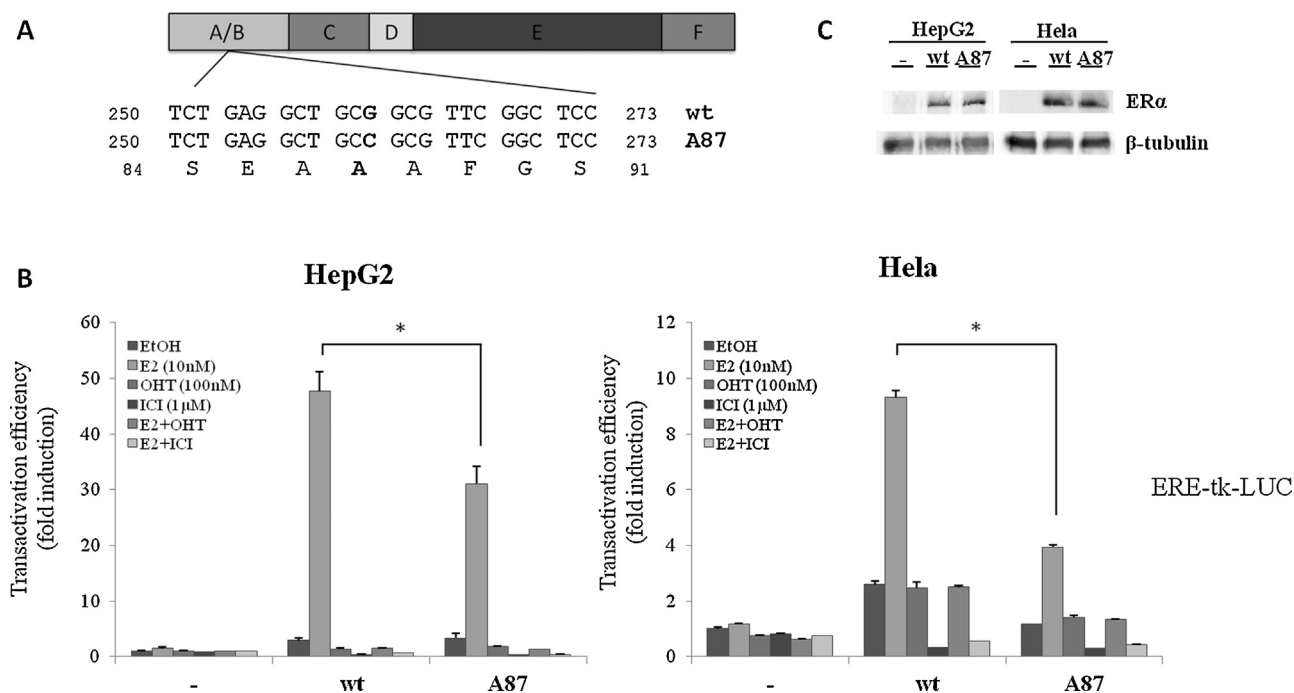


Fig. 1. Synonymous mutation Ala87 affects ER α transactivation efficiency. (A) Representation of ER α functional domains. ER α WT and synonymous Ala87 mutant coding sequences, and translated aminoacid residues are shown (below). Codon variant Ala87 is indicated in bold. (B) ER α and ER α A87 transcriptional activity was determined in transfected HepG2 and HeLa cells, on a ERE-luciferase reporter gene. Both cell lines were co-transfected with ERE-tk-LUC (100 ng), CMV- β Gal (100 ng) and empty pSG5 (50 ng), pSG5-ER α (50 ng) or pSG5-ER α A87 (A87, 50 ng). Cells were treated for 24h with EtOH as a control, 10 nM E2, 1 μ M of 4-hydroxytamoxifen (OHT), 100 nM of ICI 182,780 (ICI), E2 + OHT or E2 + ICI. Luciferase activity was normalized against β galactosidase activity and was expressed as fold increase above values measured with empty pSG5 treated with EtOH. Data corresponds to the mean \pm SE of at least three experiments. * $p < 0.001$ two-way ANOVA with Bonferroni post-test. (C) Western blot evaluating ER α and ER α A87 expression level in HepG2 and HeLa cells transiently transfected with the corresponding plasmids. β -tubulin level was used as a loading control.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids and mutant design

Plasmids ERE-tk-Luc, C3-Luc, AP1-Luc, pSG5-ER α and the CMV- β gal were described previously [33,34]. pSG5-ER α A87 containing a silent variation for alanine (rare codon GCG was replaced by frequent codon GCC) was generated using Quickchange mutagenesis kit (Stratagene).

2.2. Human cell culture and transfection

Hela (ATCC, CCL-2) and HepG2 (ATCC, HB-8065) cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO[®]) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 μ g/ml) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. One day prior to transfection, medium was replaced with phenol red-free DMEM (GIBCO[®]) containing 2.5% charcoal-stripped calf serum (Biowest). Transfections were carried out using jetPEI reagent according to manufacturer's instructions (Polyplus). Transfection was carried out with 100 ng of reporter gene, 100 ng of pCMV SPORT- β gal internal control and 50 ng of expression vectors. Plasmid mix was made up to 500 ng total DNA per well with empty vector. After 24 h incubation, cells were treated for 24 h with ligands or ethanol (vehicle control). Cells were then harvested and luciferase and β -galactosidase assays were performed as previously described [16]. Luciferase activity was normalized against β galactosidase activity and was expressed as fold increase above values measured with empty pSG5 treated with EtOH.

2.3. Immunofluorescent staining and microscopy

Cells were seeded on coverslips. After transfection and treatment, phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde was used to fix cells for 10 min. Cells were permeabilized in PBS containing 0.3% Triton X-100 during 10 min and then washed again. Cells were incubated overnight at 4 °C with the primary monoclonal antibody raised against α subunit of estrogen receptor (1:500 ER6F11, abcam[®]). Secondary antibody Alexa 488 anti-mouse IgG (1:1000, Invitrogen) was used and incubated during 2 h at room temperature. Finally, coverslips were mounted in Vestashield[®] medium with DAPI (Vector). Images were obtained with an Imager.Z1 ApoTome AxioCam (Zeiss) microscope.

2.4. Western blot analysis

Western blots were carried out on cells whole-cells extracts. Cells grown in 10 cm² dishes were directly lysed in 200 μ l Laemmli sample buffer. Proteins were resolved in 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Thermo). Blots were incubated with monoclonal antibody raised against ER α (1:2500 ER611F, abcam[®]) or with a mouse IgG monoclonal anti- β -tubulin antibody (1:5000, N357 from Amersham Life Sciences, UK) for normalization, and secondary antibodies (1:1000) from DAKO. Western blots were visualized by chemiluminescence (Chemiluminescent Peroxidase Substrate-3, Sigma).

2.5. Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from Hela and HepG2 transfected cells by the Qiagen RNeasy kit (Valencia, CA) following the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized from 600 ng of total RNA using the M-MLV Reverse transcriptase system (Invitrogen) and random primers. Real-time quantitative PCR was performed using a 1/5 dilution of the cDNA, the KAPA SYBR fast qPCR master mix (KAPABIOSYSTEMS) and the

EcoTM Real-Time PCR System (Illumina). Reactions were done in duplicates. Data was normalized to GAPDH. The ER α specific primers used were 5'-CGCAAATGCTACGAAGTGGG-3' and 5'GGTTGGCAGCTCTCATGTCT-3'. Quantification resulted from three independent assays.

3. Results and discussion

To address the functional consequences of the synonymous mutation Ala87 on ER α activity, main ER α functional activities were explored: the nuclear, genomic transcriptional activities resulting from either direct or indirect DNA binding and the non-nuclear, non-genomic rapid actions of ER α .

3.1. Synonymous mutation Ala87 affects the transactivation efficiency of ER α on an ERE reporter gene

Possible influences of mutation Ala87 in ER α cDNA were first explored by evaluating the functionality of the translated protein on an ERE-driven reporter gene. For that purpose, transactivation efficiency was analyzed by transient transfection experiments in HepG2 and Hela cells, two epithelial-like cell lines which exhibit divergent differentiation phenotypes. Indeed, it was previously shown that the relative contribution exerted by AF1 and AF2 transactivation functions in ER α transcriptional activity was dependent on the differentiation stage of the cell [16]. Originating from a cervix carcinoma, Hela cells present a poorly differentiated phenotype and exhibit a cell context strictly permissive to AF2 transactivation function of ER α . In contrast, the hepatocarcinoma HepG2 cell line appears more differentiated and AF1 is the dominant transactivation function involved in ER α transcriptional activity in these cells [16,35]. Activation of the ERE-tk-luciferase reporter gene was observed with both WT and Ala87 mutant forms of ER α in presence of E2 in the two cell lines (Fig. 1B). However, ER α A87 showed a significant reduction in transactivation efficiency compared to ER α WT. An excess of the antagonist ICI 182,780 (ICI) or 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) blocked transactivation of both forms of ER α . It is interesting to note that ligand-dependent and ligand-independent transactivation efficiency of ER α was affected in ER α A87. To assess whether differences in transactivation efficiency were due to differences in the receptor expression levels, relative mRNA and protein abundance were estimated by real time PCR and western blot, respectively. In both transfected cell lines, ER α A87 mRNA appears slightly higher than wt: Ala87/WT mRNA level was about 1.3 (sd 0.4) in HepG2, whereas the same ratio was 1.7 (sd 0.6) in Hela cells. With regard to protein concentration, as shown in Fig. 1C, expression levels of ER α WT and ER α A87 were similar in both transfected cell lines. This result strongly suggests that Ala87 mutation does not reduce mRNA or protein concentration, indicating that the observed decrease in ER α A87 transactivation efficiency is not due to a reduction in receptor availability. All together, these data indicate that Ala87 mutation decreases ER α activity on an ERE-driven reporter gene. This reduction appears to be independent of which AF domain is principally involved and doesn't seem to be produced by differences in protein expression levels.

Then, we evaluated the transactivation response of ER α WT and ER α A87 to increasing E2 concentrations in HepG2 and Hela cells. In accordance with results described above, ER α A87 showed a significant reduction in its transactivation efficiency when compared to ER α WT at saturated dose of E2 (1×10^{-8} M) in both cell types (Fig. 2). Despite this, no differences were observed in the shape of the dose response curve between ER α WT and ER α A87. For both cell lines, the transactivation response of ER α WT and ER α A87 forms of ER α starts at 1×10^{-12} M of E2. Furthermore, the

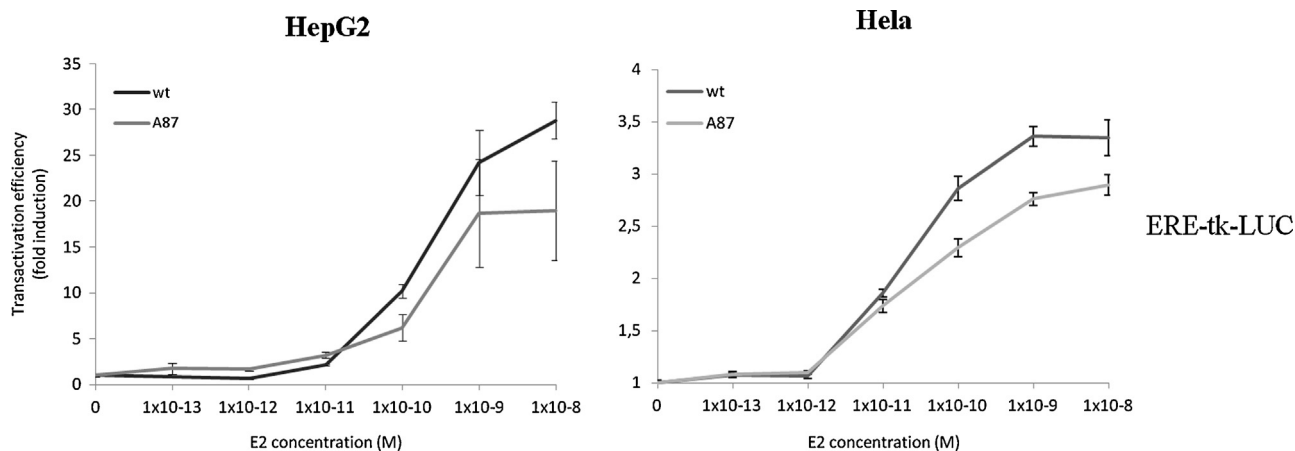


Fig. 2. Dose effect of E2 on the transactivation efficiency of ER α and ER α A87 mutant in HepG2 and HeLa cells. Both cell lines were co-transfected with ERE-tk-LUC (100 ng), pCMV SPORT- β gal (100 ng) and pSG5-ER α (50 ng) or pSG5-ER α A87 (A87, 50 ng). After 24 h transfection, cells were treated with increasing E2 concentrations (1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-9} M and 1×10^{-8} M) for 24 h. EtOH was used as a control (0). Luciferase activity was normalized against β -galactosidase activity and was expressed as fold increase above values measured with EtOH (0). Data corresponds to the mean \pm SE of at least three experiments.

highest transactivation efficiency was obtained between 1×10^{-9} and 1×10^{-8} M of E2 for both receptors, suggesting that E2 binding is not affected significantly.

3.2. Response to SERMs

To test whether Ala87 synonymous mutation affects ER α response to SERM, we analyzed the estrogenic activity of 4-OHT in HepG2 cells transiently transfected with either ER α WT or ER α A87 mutant. Estrogenic activity of 4-OHT exclusively depends upon AF1 of ER α , and is therefore observed only in cells sensitive to this activation function like the HepG2 cell line [16,35]. Transient transfection experiments in HepG2 cells were performed with the human complement C3 promoter, a well characterized 4-OHT-responsive promoter [36]. As shown in Fig. 3A, no significant differences were observed in transactivation efficiency between ER α WT and ER α A87 mutant in the presence of 4-OHT on the C3 promoter. As expected, the antagonist ICI 182,780 (ICI) was inefficient on this reporter gene.

Besides binding directly to ERE of target genes (considered as the classical pathway), ER α can also form protein–protein complexes with other transcription factors and regulates gene expression without direct binding to DNA. For instance, ER α interacts as a cofactor with c-Jun and thus modulates genes under the control of an AP-1 DNA response element [33,34]. The 4-OHT and ICI were previously described as potent agonists on this non-classical ER α pathway [23–25,37]. Therefore, to test whether AP1-mediated ER α pathway was altered by ER α A87, HepG2 cells were transfected with ER α WT and ER α A87 in the presence of an AP1-LUC reporter gene and then stimulated with 4-OHT or ICI. As previously reported [16], results show a nearly 2-fold induction of the AP1-LUC reporter gene by ER α WT in presence of 4-OHT and ICI (Fig. 3B). Interestingly, the reporter gene response to 4-OHT, and to a lesser extent to ICI, was significantly increased by ER α A87 (Fig. 3B). Thus, synonymous mutation Ala87 enhances ER α transactivation on an AP1 reporter gene.

3.3. ER α A87 variant mediates non-genomic rapid effects of E2

To study the effect of the synonymous mutation Ala87 on non-genomic rapid effects of ER α HeLa cells were transfected with empty, ER α WT or ER α A87 expression vectors and treated for 0,

3, 5, 10 and 15 min with E2. As shown in Fig. 3C, the level of phosphorylated Erk1/2 was increased after 3 min of E2 treatment in cells expressing ER α WT and ER α A87 and then returned to basal level. This induction was slightly reduced for ER α A87 but its ability to mediate non-genomic effects of E2 was preserved.

3.4. Synonymous mutation Ala87 affects the subcellular localization of ER α in a cell specific manner

To explore whether ER α A87 affects the subcellular localization of ER α , HeLa and HepG2 cells were transfected with ER α WT and ER α A87 and analyzed by *in situ* immunofluorescence (Fig. 4, Supplementary Table S1 and Supplementary Fig. S1). Distribution of ER α in HeLa cells was mainly nuclear in the absence of E2: more than 80% of the cells exhibited an exclusive nuclear localization of ER α . Nevertheless, E2 treatment induced a slight nuclear export of ER α WT in 30% of the cells. On the other hand, ER α A87 transfected cells showed a higher proportion of cytoplasmic localization. No obvious difference was observed in the presence or absence of E2. HepG2 cells showed a more pronounced cytoplasmic localization of ER α WT as it was previously reported [38]. A similar distribution was observed for ER α A87 in this cell line. Taken together, these results show a cell type-specific difference in subcellular localization between ER α WT and ER α A87.

In conclusion, our results show that synonymous ER α A87 variant has a differentiated behavior compared to ER α WT in transfected cells. Main differences involve transcriptional activity and cell type specific subcellular localization. How these findings could be explained? The employed experimental strategy discarded the consideration of the effect of synonymous mutations on the splicing pattern during mRNA processing. Another current hypothesis proposes that synonymous mutations can modify the expression level of proteins. In this work, we showed that ER α A87 mRNA availability was not reduced by the presence of the synonymous mutation. Also, the estimation of receptor expression level showed that the apparent concentration of ER α A87 was not significantly reduced. Finally, synonymous mutations were proposed to affect protein solubility and protein folding [8,12]. In this sense, it is well known that the conformation of ER α plays a crucial role in its functional activity [39]. Binding of different ligands induces specific conformations changes allowing its interaction with particular cofactors for the modulation of gene expression [40]. In addition, variations in ER α

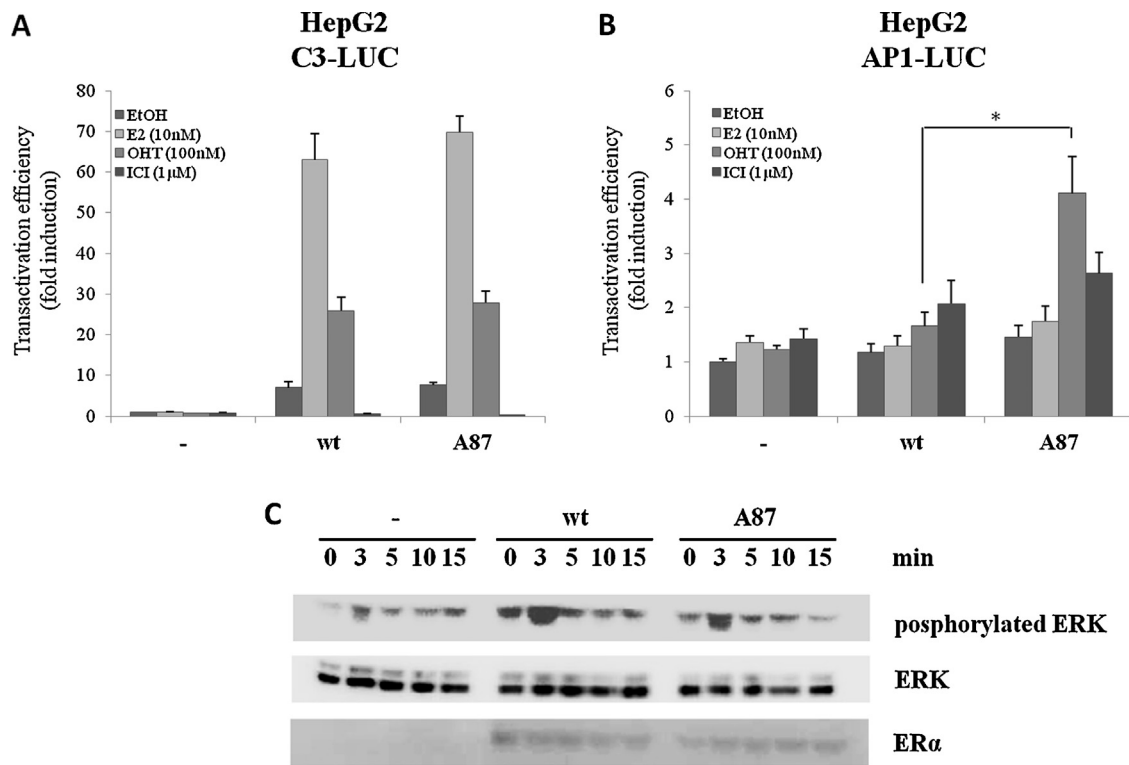


Fig. 3. Synonymous mutation Ala87 affects ER α transactivation on an AP1-mediated promoter. ER α and ER α A87 transcriptional activity was determined in HepG2 cells on the C3-luciferase and AP1-luciferase reporter genes. Cells were co-transfected with C3-LUC (200 ng) (A) or AP1-LUC (200 ng) (B), together with pCMV SPORT- β gal (100 ng) and pSG5 (50 ng), pSG5-ER α (50 ng) or pSG5-ER α A87 (A87, 50 ng). After 24 h transfection, cells were treated with EtOH as a control, 10 nM E2, 1 μ M of OHT or 100 nM of ICI. Luciferase activity was normalized against β -galactosidase activity and was expressed as fold increase above values measured with empty pSG5 treated with EtOH. Data corresponds to the mean \pm SE of at least three independent experiments. * p < 0.001 two-way ANOVA with Bonferroni post-test. (C) Synonymous mutation Ala87 does not affect ER α non-genomic pathway. Starved HeLa cells were transfected with pSG5, pSG5-ER α or pSG5-ER α A87. 48 h after transfection, cells were treated for 0 (EtOH), 3, 5, 10 and 15 min with 10 nM E2. Western blot analysis of phosphorylated ERK1/2, ERK total and ER α was performed on the whole cell extracts. Representative blots are shown.

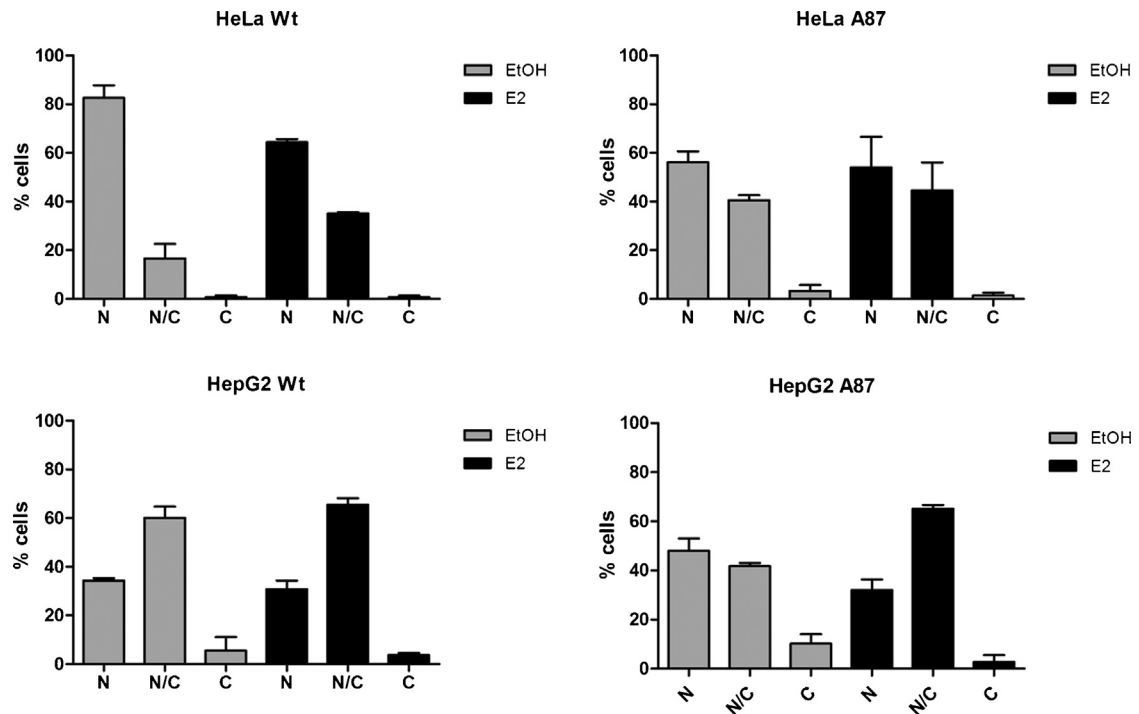


Fig. 4. Synonymous mutation Ala87 affects ER α intracellular localization. ER α and ER α A87 subcellular localization in transfected HepG2 and HeLa cells was evaluated by *in situ* immunofluorescence using an anti-ER α monoclonal antibody. Quantification of subcellular localization of ER α WT and ER α A87 in transfected cells in presence of EtOH (control) or E2 is shown as bar plots (N, nuclei; N/C, nuclei and cytoplasm; C, cytoplasm). (scale bar = 10 μ m). Data corresponds to the mean \pm SE.

conformation were associated to DNA binding to different ERE elements [41]. In a previous work we analyzed the conformation of ER α in different eukaryotic translation systems by limited proteolysis. Our previous data showed that differences in the translation machinery may result in alternative conformations of the receptor with distinct sterol binding properties [34]. Under the cellular conditions employed in this work, ER α A87 adopts a conformation which maintains a general ability for E2 binding and for ERE mediated transcription activation. Nevertheless, ER α A87 also enhanced ER α transactivation on some reporter genes, suggesting the ability to establish other interactions as well. Taken into account the localization of the DNA genomic variation involved in ER α A87, it is tempting to propose as hypothesis that a conformational variation generated in the protein ER α A87 could mainly affect the A/B domain, and as a consequence, all molecular interactions involving this functional domain could be affected as well.

Acknowledgments

We thank Dra Cora Chalar for helpful discussions and MSc Florencia Cabrera and Danilo Segovia for technical assistance. This work was partially supported by Fondo Clemente Estable, CHLCC, Uruguay, PEDECIBA. T Fernández was the recipient of fellowships from ANII (Uruguay) and Embassy of France in Uruguay.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.02.016>.

References

- [1] A. Protzel, A.J. Morris, Gel chromatographic analysis of nascent globin chains. Evidence of nonuniform size distribution, *J. Biol. Chem.* 249 (14) (1974) 4594–4600.
- [2] M. Marin, Folding at the rhythm of the rare codon beat, *Biotechnol. J.* 3 (8) (2008) 1047–1057.
- [3] T. Ikemura, Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms, *Mol. Biol. Evol.* 2 (1) (1985) 13–34.
- [4] S. Kanaya, et al., Codon usage and tRNA genes in eukaryotes: correlation of codon usage diversity with translation efficiency and with CG-dinucleotide usage as assessed by multivariate analysis, *J. Mol. Evol.* 53 (4–5) (2001) 290–298.
- [5] S. Kanaya, et al., Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis, *Gene* 238 (1) (1999) 143–155.
- [6] L. Duret, D. Mouchiroud, Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (8) (1999) 4482–4487.
- [7] R.M. Goetz, A. Fuglsang, Correlation of codon bias measures with mRNA levels: analysis of transcriptome data from *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327 (1) (2005) 4–7.
- [8] P. Cortazzo, et al., Silent mutations affect in vivo protein folding in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (1) (2002) 537–541.
- [9] A.A. Komar, T. Lesnik, C. Reiss, Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation, *FEBS Lett.* 462 (3) (1999) 387–391.
- [10] G.L. Rosano, E.A. Ceccarelli, Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain, *Microb. Cell Fact.* (8) (2009) 41.
- [11] G. Lamolle, M. Marin, F. Alvarez-Valin, Silent mutations in the gene encoding the p53 protein are preferentially located in conserved amino acid positions and splicing enhancers, *Mutat. Res.* 600 (1–2) (2006) 102–112.
- [12] C. Kimchi-Sarfaty, et al., A silent polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity, *Science* 315 (5811) (2007) 525–528.
- [13] T. Garcia, et al., A variant estrogen receptor messenger ribonucleic acid is associated with reduced levels of estrogen binding in human mammary tumors, *Mol. Endocrinol.* 2 (9) (1988) 785–791.
- [14] L. Gennari, et al., Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review, *Am. J. Epidemiol.* 161 (4) (2005) 307–320.
- [15] Y. Imai, et al., Nuclear receptors in bone physiology and diseases, *Physiol. Rev.* 93 (2) (2013) 481–523.
- [16] Y. Merot, et al., The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell, *J. Biol. Chem.* 279 (25) (2004) 26184–26191.
- [17] M.P. Kumar, L. Bhaskar, R.V. Thampan, Structural characterization of the goat uterine estrogen receptor activation factor using an endogenous calcium activated neutral protease, *Mol. Cell. Endocrinol.* 152 (1–2) (1999) 57–64.
- [18] S. Mader, P. Chambon, J.H. White, Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain, *Nucleic Acids Res.* 21 (5) (1993) 1125–1132.
- [19] J.M. Beekman, et al., Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain, *Mol. Endocrinol.* 7 (10) (1993) 1266–1274.
- [20] L.A. Paige, et al., Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER alpha and ER beta, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (7) (1999) 3999–4004.
- [21] B. Saville, et al., Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements, *J. Biol. Chem.* 275 (8) (2000) 5379–5387.
- [22] M.T. Tzukerman, et al., Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions, *Mol. Endocrinol.* 8 (1) (1994) 21–30.
- [23] M. Jakacka, et al., Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway, *J. Biol. Chem.* 276 (17) (2001) 13615–13621.
- [24] P.J. Kushner, et al., Estrogen receptor pathways to AP-1, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74 (5) (2000) 311–317.
- [25] S. Safe, K. Kim, Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways, *J. Mol. Endocrinol.* 41 (5) (2008) 263–275.
- [26] J.S. Lewis, V.C. Jordan, Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance, *Mutat. Res.* 591 (1–2) (2005) 247–263.
- [27] L. Bjornstrom, M. Sjoberg, Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes, *Mol. Endocrinol.* 19 (4) (2005) 833–842.
- [28] E.R. Levin, Cell localization: physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors, *J. Appl. Physiol.* 91 (4) (2001) 1860–1867.
- [29] J. Mill, et al., Association study of the estrogen receptor alpha gene (ESR1) and childhood-onset mood disorders, *Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet.* 147B (7) (2008) 1323–1326.
- [30] J. Wang, et al., Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women, *Breast Cancer Res. Treat.* 106 (2) (2007) 273–280.
- [31] Y. Ket al. Chae, Genetic polymorphisms of estrogen receptors alpha and beta and the risk of developing prostate cancer, *PLoS One* 4 (8) (2009) e6523.
- [32] Ensembl, in: Ensembl Release 72, June 2013, Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=6:152128808-152129808;v=rs746432;vdb=variation;vf=600617, [cited 2013 August 30].
- [33] R. Metivier, et al., Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains, *Mol. Endocrinol.* 15 (11) (2001) 1953–1970.
- [34] S. Horjales, et al., Translational machinery and protein folding: evidence of conformational variants of the estrogen receptor alpha, *Arch. Biochem. Biophys.* 467 (2) (2007) 139–143.
- [35] M. Berry, D. Metzger, P. Chambon, Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen, *EMBO J.* 9 (9) (1990) 2811–2818.
- [36] J.D. Fan, B.L. Wagner, D.P. McDonnell, Identification of the sequences within the human complement 3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity, *Mol. Endocrinol.* 10 (12) (1996) 1605–1616.
- [37] P. Webb, et al., Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens, *Mol. Endocrinol.* 9 (4) (1995) 443–456.
- [38] S. Solakidi, A.M. Psarra, C.E. Sekeris, Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ERalpha in the nucleoli and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOs-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines, *Biochim. Biophys. Acta* 1745 (3) (2005) 382–392.
- [39] D.P. McDonnell, et al., Definition of the molecular and cellular mechanisms underlying the tissue-selective agonist/antagonist activities of selective estrogen receptor modulators, *Recent Prog. Horm. Res.* 57 (2002) 295–316.
- [40] A.L. Wijayaratne, D.P. McDonnell, The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators, *J. Biol. Chem.* 276 (38) (2001) 35684–35692.
- [41] J.M. Hall, D.P. McDonnell, K.S. Korach, Allosteric regulation of estrogen receptor structure: function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements, *Mol. Endocrinol.* 16 (3) (2002) 469–486.

Review

Silent Polymorphisms: Can the tRNA Population Explain Changes in Protein Properties?

Tamara Fernández-Calero ^{1,2,*}, Florencia Cabrera-Cabrera ¹, Ricardo Ehrlich ^{1,3} and Mónica Marín ¹

¹ Biochemistry-Molecular Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay; florenciacabreracabrera@gmail.com (F.C.-C.); ehrlich@fcien.edu.uy (R.E.); marin@fcien.edu.uy (M.M.)

² Bioinformatics Unit, Institut Pasteur Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo 11400, Uruguay

³ Institut Pasteur Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo 11400, Uruguay; ehrlich@pasteur.edu.uy

* Correspondence: tamfer@pasteur.edu.uy; Tel.: +598-2-525-20-95; Fax: +598-2-525-86-17

Academic Editors: Lluís Ribas de Pouplana and Adrian Gabriel Torres

Received: 16 November 2015; Accepted: 5 February 2016; Published: 17 February 2016

Abstract: Silent mutations are being intensively studied. We previously showed that the estrogen receptor alpha Ala87's synonymous polymorphism affects its functional properties. Whereas a link has been clearly established between the effect of silent mutations, tRNA abundance and protein folding in prokaryotes, this connection remains controversial in eukaryotic systems. Although a synonymous polymorphism can affect mRNA structure or the interaction with specific ligands, it seems that the relative frequencies of isoacceptor tRNAs could play a key role in the protein-folding process, possibly through modulation of translation kinetics. Conformational changes could be subtle but enough to cause alterations in solubility, proteolysis profiles, functional parameters or intracellular targeting. Interestingly, recent advances describe dramatic changes in the tRNA population associated with proliferation, differentiation or response to chemical, physical or biological stress. In addition, several reports reveal changes in tRNAs' posttranscriptional modifications in different physiological or pathological conditions. In consequence, since changes in the cell state imply quantitative and/or qualitative changes in the tRNA pool, they could increase the likelihood of protein conformational variants, related to a particular codon usage during translation, with consequences of diverse significance. These observations emphasize the importance of genetic code flexibility in the co-translational protein-folding process.

Keywords: synonymous polymorphisms; estrogen receptor alpha; isoacceptor tRNAs; translation kinetics; protein folding

1. Introduction

Nucleotide polymorphisms are DNA sequence variations that occur frequently within a population. Silent polymorphisms (those that do not change the amino acid in the encoded protein) have only in the last decade attracted increasing attention [1]. This kind of polymorphism can produce different effects on gene expression and lead to functional differences of diverse significance. Several recent reviews summarize the effects of such mutations, in particular in relation to human diseases, personalized biomedicine and pharmacogenomics [2–6].

Silent mutations can affect gene expression acting at different levels and through different mechanisms. They can influence binding of regulatory factors on DNA, mRNA secondary structure and stability, ribosome traffic on mRNA and its interactions with specific ligands (as in riboswitches), including other RNAs and proteins. Silent mutations can also modify splicing, altering intron-exon boundaries or regulatory sites located in exons, enhancers or silencers, in all cases leading to an

incorrect processing of mRNA. Finally, silent mutations can affect translational kinetics and protein folding, by changing codons read by tRNAs of different cellular availability. Therefore, through several mechanisms, silent mutations can give rise to differences in mRNA and protein abundance and in the structure and functionality of proteins (for a review see [5]).

In this context, we have focused on the folding and biological activity of the human estrogen receptor alpha (hER α) in an attempt to understand whether silent mutations have any effect on the functional activity of this protein. Nearly 50 synonymous polymorphisms can be found in the hER α coding sequence [7]. Some of these have been further studied in order to establish an association with different human pathologies, most of them being associated with the risk of cancer development. Additionally, evidence points towards a role for some of these synonymous variants in sperm production and cognitive disorders. Two variants called PvuII and XbaI located in intron 1, or the (TA) $_n$ repeats in the 5' UTR, are among the main polymorphisms studied in hER α [8]. These variants were found to be associated with various pathological conditions, including cardiovascular disorders, venous thromboembolism, miscarriage, and severe pre-eclampsia [9].

Recently, we studied the activity of the hER α variant ERAla87. This variant, assigned as Bst UI, is located in exon 1 and corresponds to an alanine codon change from GCG to GCC (rs746432). The mean GCC allele frequency was estimated in about 5%, varying between 0% and 10% in Asian and European populations, respectively. This synonymous variant has been studied for an association with several pathologies, and has only been associated with mood disorders, particularly in females [10].

Using transiently transfected HepG2 and HeLa cells as an experimental approach, we were able to show that the functional activity of ERAla87 differs from that of the wild-type hER α , on a cell-type-dependent manner [11]. We propose that a conformational variant could be originated upon translation of ERAla87, as a consequence of differences in translational kinetics due to the availability of tRNA species that recognize either the GCG or the GCC codon. In this paper, we review arguments that support the idea that differences in the population of tRNAs could produce subtle changes in conformation of the ERAla87 and therefore explain the functional variations observed.

2. Case of Study: ER α Ala87 Synonymous Polymorphism

hER α is a transcription factor which belongs to the nuclear receptor superfamily. It mediates, together with the estrogen receptor beta (ER β), the pleiotropic and tissue-specific effects of estrogens. hER α presents a multidomain structure (Figure 1) which includes: the A/B domain containing the activation function-1 (AF1); the C-domain which holds the DNA-binding domain (DBD); a hinge region (D-domain); an E domain which harbors the ligand-binding domain (LBD), the dimerization interface and the activation function-2 (AF2); and the carboxy-terminal domain (the F-domain) [12,13].

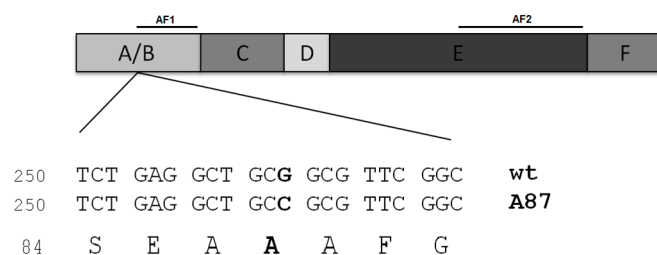


Figure 1. Representation of the human estrogen receptor alpha functional domains (A to F). The location of activation functions 1 and 2, AF1 and AF2, are shown (above). Below, Estrogen receptor alpha (ERWT) and silent polymorphism ERAla87 coding sequences and translated amino acids residues around Ala87 are indicated. The nucleotide change in Ala87 is shown in bold.

hER α can act through different mechanisms (Figure 2). In the classical pathway, it binds directly to DNA, specifically to estrogen-response elements (EREs) located in promoters of estrogen-responsive genes [14]. In the non-classical genomic pathway, hER α interacts with other transcription factors

(such as AP1 or Sp1) and regulates gene expression without directly binding to DNA [15–18]. hER α also acts via a “non-genomic” mechanism, in which it modulates the activity of kinases that can regulate gene transcription and the activity of other proteins [19,20].

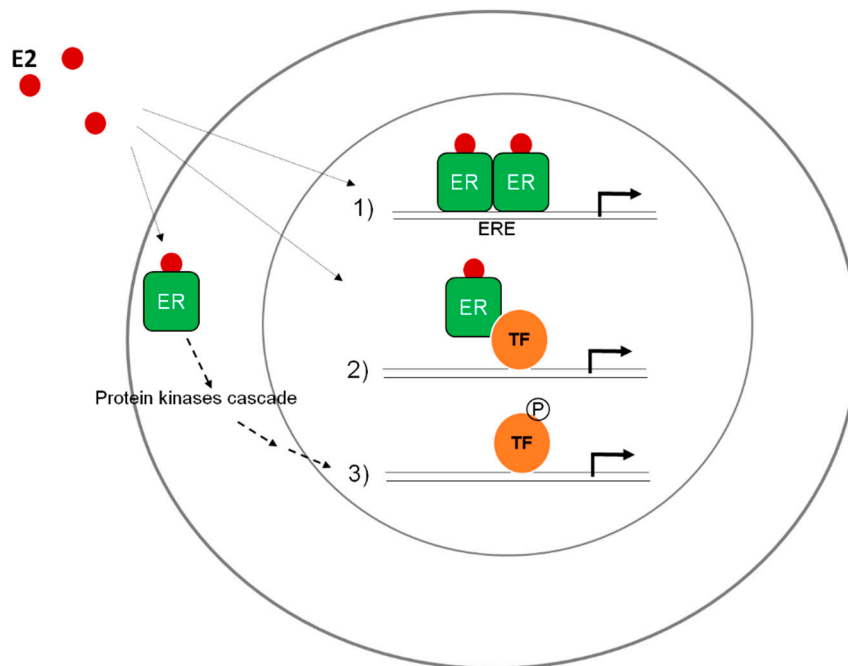


Figure 2. hER α mediates estrogen (E2) and other ligand effects through three main pathways. (1) The classical pathway, in which hER α binds directly to DNA, to estrogen-response elements (EREs); (2) The non-classical genomic pathway, where hER α interacts with other transcription factors (e.g., AP1 or Sp1) and regulates gene expression without directly binding to DNA; (3) The “non-genomic” mechanism, in which hER α modulates the activity of kinases that can regulate gene transcription and protein activity [19].

Importantly, the hER α activation mechanism, the respective contributions of AF1 and AF2 towards its activity and the agonist/antagonist effect of different ligands and promoters are all cell-specific and depend on the differentiation stage of the cell [17,18,21–23]. For instance, HeLa cells, originated from a cervix carcinoma, present a poorly differentiated phenotype with a cell context strictly permissive to the AF2 transactivation function of hER α . In contrast, the hepatocarcinoma HepG2 cell line shows a more differentiated phenotype, and AF1 is the dominant transactivation function involved in hER α transcriptional activity in these cells [21,24]. Though important efforts have been made to understand hER α cell-specific activity and relevant advances have already been accomplished, to date the mechanisms underlying the modulation of its activity remain elusive.

2.1. Differential Functional Properties of ERAla87 in HeLa and HepG2 Cells

To explore whether the ERAla87 synonymous polymorphism presents a behavior similar to that of ERWT, we analyzed its transcriptional activity and subcellular localization comparatively to ERWT, in transfected HeLa and HepG2 cell lines. For this purpose, cells were transfected with plasmids including the respective coding sequences, reporter genes, and a construct for normalization [11]. We showed that the ERAla87 transactivation activity is reduced in the classical pathway when acting through the ERE-Thymidine kinase promoter, but does not seem to be affected when acting through human complement C3 promoter (also containing ERE elements) [25]. On the other hand, ERAla87 transactivation activity is increased in the non-classical pathway when acting through AP-1 promoter and is induced by 4-OHT or ICI, which have been previously described as potent agonists on this

pathway [16–18,23]. Finally, no significant differences were observed between the receptors in their ability to mediate non-genomic rapid effects in HeLa cells. Furthermore, by *in situ* immunofluorescence, we showed differences in the subcellular distribution of ERAla87 compared to ERWT when expressed in HeLa cells. Surprisingly, no differences in the subcellular localization were observed between ERAla87 and ERWT in HepG2 cells [11]. In brief, ERAla87 activity depends on the activation mechanism but also on the specific pathway involved within this mechanism. ERAla87 activity can be increased, decreased or remain unchanged comparatively to ERWT. Additionally, the mutation affects the subcellular localization of ER in a cell-type specific manner. How can the differences of ER α A87 functional properties be explained?

As previously mentioned, there are several mechanisms by which synonymous mutations could affect protein activity. The experimental strategy employed bypassed the effects of synonymous variants on DNA-binding factors or on splicing. Moreover, there are no significant differences in the receptor expression at mRNA and protein levels [11]. Using RNAsnp software [26,27] to determine local RNA secondary structure changes induced by single nucleotide polymorphism (SNP), no significant differences were estimated between ERWT and ER α A87 mRNAs (not shown). Differences in miRNA and other non-coding hybridization sites as well as transcription factor-binding sites were assessed using RegRNA 2.0 software [28] and no differences were found either (data not shown)

2.2. Codons and tRNAs Involved in Decoding Alanine 87

Interestingly, Ala87 is the central alanine of a group of three consecutive alanines. Figure 1 shows the three consecutive alanine codons within the coding sequence. In ERWT, the three codons are GCT GCG GCG; in ERAla87, they become GCT GCC GCG. According to the human codon usage reported in the Genomic tRNA Database [29], these three codons are used as follows: GCT: 1.84%, GCG: 0.74% and GCC: 2.77%. This implies that in ERWT a local repetition of the less-used codons occurs (Ala87 and Ala88), whereas in ERAla87, one of the less-used codons is substituted by the most frequently used, also eliminating the codon repetition. (Number of genes and codon usage for alanine codons in human cells is shown in Table 1a).

Table 1. (a) Number of genes and codon usage for alanine codons in human cells. (b) Wobble pair rules reviewed in [30]. (c) Analysis of ERWT and ERAla87 codon-anticodon recognition by alanine tRNAs restricted to tRNA Ala sequences described in the literature according to Modomics [31–33]. * indicates that recognition is not frequent in cell context. ↓ indicates low affinity recognition.

a. Alanine tRNA Genes in Human Genome According to the Genomic tRNA Database [29]			
Anticodon (5' → 3')	Corresponding Codon (5' → 3')	n° of Genes	Genome Codon Usage
AGC	GCT	30	1.84
GGC	GCC	1	2.77
CGC	GCG	5	0.74
UGC	GCA	10	1.58
b. Wobble Pair Rules Reviewed in [30]			
tRNA 5' Anticodon Base	mRNA 3' Codon Base	ER Ala 87 Polymorphism Recognized by tRNA	
G	U,C	Ala87	
C	G	wt	
k ² C	A	—	
A	U,C,G>A	wt, Ala87	
U	U,A,G>C	wt, Ala87 ↓	
xm ⁵ s ² U,xm ⁵ Um,Um,xm ⁵ U	A>G	wt ↓	
xo ⁵ U	U,A,G	wt	
I	A,C,U	Ala87	

Table 1. Cont.

c. Analysis of ERWT and ERAla87 Codon-Anticodon Recognition by Alanine tRNAs Restricted to tRNA Ala Sequences Described in the Literature According to Modomics [31–33].	
tRNA-AGC:	-without modifications recognizes: wt *, Ala87 * -modified A → I recognizes: Ala87
tRNA-CGC:	-without modifications recognizes: wt *
tRNA-UGC:	-without modifications recognizes: wt, Ala87 ↓ -with modifications recognizes: wt
tRNA-UGC:	-without modifications recognizes: Ala87

Looking at the tRNAs involved in decoding alanine codons (see Table 1b,c) [30,34,35], it is interesting to note the differences in their ability to recognize the GCG codon present in ERWT or the GCC codon present in ERAla87. In fact, tRNA^{Ala}-AGC, without posttranscriptional modifications in its anticodon, is able to recognize both codons; meanwhile, when adenine in the anticodon is converted to inosine, tRNA^{Ala}-IGC is only capable of recognizing the GCC codon. Therefore, there will be at least the same or even more tRNA molecules capable of decoding the GCC than the GCG codon from the tRNA^{Ala}-I/AGC population that is available for translation. Also, in this sense, tRNA^{Ala}-GGC can only decode Ala87 (GCC). On the other hand, tRNA^{Ala}-CGC and tRNA^{Ala}-UGC only decode efficiently the GCG codon. tRNA^{Ala}-UGC could also decode the GCC codon through wobble pairing but with less affinity. Therefore, tRNA^{Ala}-CGC and tRNA^{Ala}-UGC population will contribute mostly to decoding GCG codon. Taking this information into account, could the change of tRNA^{Ala} isoacceptor required to read a GCC instead of GCG be related to differences in translational kinetics and folding between ERAla87 and ERWT? In the following sections, elements that support this hypothesis are reviewed.

3. tRNA Abundance Can Affect Translation Kinetics and Protein Conformation

To acquire a tridimensional conformation, nascent polypeptides can follow diverse folding pathways. Sometimes folding is essentially posttranslational as it is the case for proteins which are targets of Hsp60 chaperone, and their folding occurs inside the cage formed by its 14 subunits. Many times, however, polypeptides fold during translation, while still bound to ribosomes, sequentially from the N-terminal end of the protein [36]. In this context, the kinetics of translation becomes critical since differences in the kinetics may lead to differences in folding pathways and therefore in the conformation adopted by specific proteins [37]. tRNA abundance has been proposed as a major determinant in translation kinetics, but it remains to be precisely determined in most organisms. Additionally, thermodynamic parameters of anticodon-codon recognition, which depend on the specific codon sequence, the wobble alternatives and the presence of modified bases in the anticodon loop, are relevant factors in local translation rate [38,39].

3.1. Role of tRNAs in the Conformation of Proteins in Prokaryotes

Codon usage bias is thought to result from selection for efficient and accurate translation of highly expressed genes [40]. In *E. coli*, in which tRNA abundance is well known, more abundant isoacceptor tRNAs were shown to correspond to more frequently used synonymous codons, decoding highly expressed proteins [41]. In this way, the use of abundant tRNAs in the synthesis of highly expressed proteins ensures higher yield and quality, by increasing translation efficiency and reducing codon misreading or aborted products. This fact has been extensively verified by experimental approaches aiming to improve the production of recombinant proteins in bacterial systems: the overproduction of less abundant tRNAs in the expression host, or the substitution of rare codons by frequent ones in the coding sequence, can lead to a significant yield increase [42].

However, also frequently, after rare codon substitution, the increased yield of the recombinant protein in *E. coli* is accompanied by a reduction of its solubility, and its accumulation in inclusion bodies [43]. The decreased solubility suggests that a conformational change is generated by the

modification of codon usage, and this can occur following either extensive changes or just a few substitutions in specific locations within the mRNA [44,45].

Indeed, rare codons have been found preferentially located in particular regions: encoding the N-terminal end of the protein, in turns or links between secondary structured regions, in links between consecutive domains or encoding signal peptides in proteins to be secreted [46–48]. A few works serve as illustrative examples: a study performed on the expression of EgFABP, a small fatty acid-binding protein from *E. granulosus* in *E. coli*, in which rare codons were substituted by frequent ones at a turn between two alpha helices, revealed that a synonymous variant increased its insolubility, and about 30% of the protein was detected in the insoluble fraction. The expression of the same variant triggered the activity of a heat shock promoter, indicating the presence of unfolded or misfolded proteins associated with the expression of this variant [44]. More recently, the effect of discontinuous translation at specific locations within the mRNA was analyzed on the folding of the multi-domain protein Suf1 in *E. coli*. Four slow translating regions were theoretically identified in Suf1 mRNA and their effect was analyzed experimentally. Both the addition of low-abundant tRNAs in *E. coli* or the substitution of rare codons by frequent ones led to changes in the proteolysis profile, or in folding intermediates [49]. As a final example, the protein domains of epoxide hydrolases were delineated according to structural data determined for other members of the protein family. Rare codons were introduced at sites encoding links between domains, and this substitution allowed a significant increase in the solubility of the protein expressed in *E. coli* [45], indicating a role of rare codons in translation kinetics and protein conformation.

It is worth mentioning that the effect of tRNA abundance or codon usage on protein conformation has been mainly characterized for specific proteins. However, the impact of the ribosomal speed on the folding and solubility on a global, cell-wide level was addressed recently by upregulating three low-abundant tRNAs in *E. coli*. Interestingly, this upregulation led to an increased aggregation propensity of several cellular proteins and to a decreased solubility of some chaperones [50]. On the other hand, the expression of heterologous proteins in *E. coli* strains that overexpress rare tRNAs showed an increase in the insolubility of many proteins, which appears to be related to the rare codon content in the corresponding coding sequences [43].

Finally, in order to better understand the role of translation kinetics on protein folding, interesting mathematical models have been proposed, and are expected to contribute further to the knowledge of the mechanisms involved in *in vivo* protein folding [36,51,52].

Taken together, evidence so far clearly indicates that the modulation of translation dynamics in prokaryotes in relation to tRNA abundance and the choice of synonymous codons plays a critical role in a number of processes including ribosomal traffic, protein abundance, topogenesis, protein solubility and folding.

3.2. tRNAs, Codon Usage and Protein Conformation in Eukaryotes

In eukaryotes, the link between tRNAs, codon usage and the conformation of proteins is much less clear. In *Saccharomyces* and *Neurospora*, for example, different approaches evidence a relation between codon usage, RNA structures and protein activity. In *Neurospora*, a genome-wide correlation between codon choice and predicted secondary protein structures was observed, in which non-optimal codons appear to preferentially encode intrinsically disordered regions. This observation was verified experimentally, on the circadian clock gene *frequency* (*frq*), in which the change of synonymous codons affected its function *in vivo* [53].

On multicellular eukaryotes, few reports describe the effect of synonymous codon changes on protein conformation. As such variants can modify gene expression at different levels, a link with protein folding is not evident. In this sense, the study of synonymous polymorphisms in the MDR1 gene, one of the major drug transporters in human, is particularly relevant. P-glycoprotein (P-gp) encoded by MDR1 is involved in cellular expulsion of diverse compounds and in multidrug-resistance cancer cells. P-gp encoded by MDR1 carrying synonymous SNPs from a common haplotype was

expressed in stably transfected polarized epithelial cells. The P-gp synonymous variants were properly synthesized and located on the cell surface, showing drug transporter activity. Interestingly, however, two of the synonymous SNPs significantly affected the stability and overall folding of P-gp. As a result, P-gp conformational alterations affected protein activity, in particular the interaction with some ligands, therefore leading to altered cellular cytotoxicity [54]. This study on MDR1 variants strongly contributed to the notion that synonymous polymorphisms can indeed affect functional properties of proteins in mammalian cells [5] and therefore are particularly relevant in the fields of biomedicine and pharmacology [55].

In general, the relevance of synonymous mutations in higher eukaryotes is mainly recognized for their association to diseases. In this context, the first identified silent mutations were shown to affect the normal splicing pattern and, more recently, as previously mentioned, other effects have also been described [5,6].

In order to understand whether synonymous variants can be related to translation kinetics and protein folding, and in turn are associated with diseases, global genomic or transcriptomic approaches are being performed. Mainly related to cancer or other complex diseases, these approaches aim to address two main concerns: (1) in relation to translation kinetics, the identification of sites of higher ribosome permanence on coding sequences during translation; and (2) the presence of synonymous variants involved in or associated with diseases. The former refers to the ribosome profiling approach which allows the identification of sites where ribosomes stay longer, thus reflecting a real traffic chart of the translational process [56]. The second consists in massive sequencing of many thousands of exomes of specific diseases and the identification of genetic variants significantly connected to the pathology [57].

The translational discontinuity revealed by ribosome profiling is a powerful experimental approach but the interpretation of results is still controversial, and from these approaches a direct relation of codon usage and translation kinetics remains unclear [58–62]. An important work is in progress, devoted to deciphering the biological significance of translational discontinuity, through biochemical, biophysical, genetic, cellular, and *in silico* studies [59,62–64]. On the other hand, massive sequencing of tumoral exomes led to the conclusion that synonymous variants can be involved in cancer and most of them appear located in oncogenes and are related to aberrant splicing [65]. However, most silent variants found in tumor suppressor p53 do not seem to be involved in the tumoral process [65]. Additionally, sequencing of melanoma cells allowed the identification of a synonymous variant F17F in the BCL2L12 gene which affects the binding of a miRNA (hsa-miR-671-5p) and the subsequent stabilization of an oncogene. Taken together, the aforementioned approaches provide valuable information about the translation process and on the identification of (synonymous) genetic variants involved in diseases. A deeper and more detailed analysis should provide clues linking silent polymorphisms with translation kinetics and protein conformation properties.

The aforementioned observations from eukaryotes suggest that conformational changes due to modified translation kinetics could account for functional differences, such as those found in ERA1a87. Considering this, we wondered whether the change of isoacceptor tRNA^{Ala} required to read a GCC instead of GCG codon may be related to a modification of local translation kinetics of the receptor mRNA. In general, the poor knowledge on tRNA abundance in higher eukaryotes has been an obstacle for the estimation of translation kinetics based on tRNAs' relative concentration. How to evaluate the tRNA population?

4. Dynamic Populations of tRNAs

As has already been mentioned, a general fit of the translational system was highlighted through a strong correlation between the frequency of synonymous codon usage and the corresponding population of decoder tRNAs' molecules in the cell. For example, early reports on cells with extremely biased protein expression revealed high frequencies in the use of selected codons and high concentrations of the specific decoder tRNAs. This was the case for isoaccepting tRNA^{Ala} and

tRNA^{Ser} species present in the posterior gland of the silkworm *Bombyx mori*, described several decades ago [66–68].

Nevertheless, although in bacteria and yeast it was clearly shown that the abundance of tRNA isoacceptors correlates with the codon usage of abundant proteins, in metazoans this correlation appeared less strict [69]. In this case, which is the real correlation between the tRNA population and codon usage? Is it the same in unicellular organisms and metazoans? Beyond classical works reporting differential expression of tRNA genes (for instance, tRNAs present in the gland of the aforementioned *Bombyx mori*), the question remains if the tRNA population is tissue- or cell-specific. Does the tRNA population of a given cell change during cell cycle?

4.1. tRNA Genes Are Differentially Expressed in Different Cell States

Over the last few years, different lines of research based on holistic approaches, progressively converged, and began to shed more light on the biological roles of tRNA. Notably, through characterization (although partial) of the tRNA population by deep sequencing [70], microarrays [71,72] and chromatin analysis at the tRNA loci [71], it appears that tRNA genes are in fact differentially regulated. In this context, it has been described in *S. cerevisiae* that specific changes in tRNAs' copy number were associated with specific stress responses [70]. Moreover, after a semi-quantification of tRNA pools in different human cells, the existence of two distinct translation programs that operate during proliferation and differentiation was proposed [71]. Furthermore, it was shown that alterations in the tRNA repertoire of proliferating and differentiated cells correspond to codon usage preferences of proliferation- or differentiation-regulated genes as revealed by transcriptomic studies, measurement of tRNA pools, gene ontology analysis that groups functionally related genes, and the analysis of active chromatin and RNA polymerase III occupancy at the level of tRNA genes [71]. This indicates that modification of the levels of specific tRNAs is concerted with changes in the transcriptome, in order to optimize codon usage of genes that are being expressed. Among other works supporting this view, it is worth mentioning that significant differences in tRNA composition have been found between breast cancer cells and non-transformed tissue, suggesting an adjustment of tRNA pools in cancer cells adapted to translate mRNAs associated with tumor progression [73]. These changes in tRNA repertoire strongly suggest an extremely precise coordination between transcription and translation in eukaryotic cells, involving fine regulatory mechanisms that ensure the adaptation of the translation apparatus to specific cell states [74].

4.2. tRNA Post-Transcriptional Modifications: Expanding the Complexity of the tRNA Population

Concerning the link between the tRNA population and codon usage, it is also important to consider tRNA post-transcriptional modifications which have been intensively studied over several decades [38,75–77]. To date, roughly 100 modified nucleosides have been found in tRNAs from bacteria, archaea and eukaryotes. tRNA modifications involve a large set of specific enzymes (methyl-transferases, transglycosylases, transferases, adenosine desaminases, pseudouridine synthases, thiouridylases, among others) present in different cell compartments, which exhibit high specificities for tRNA species, particular target bases, and the precise location in the tRNA structure (for a review see [75,78,79]).

Modified bases are required for efficient protein synthesis, stabilizing tRNA structure, ensuring specificity and stability of codon-anticodon interaction, preventing frameshift errors and participating in the specificity of aminoacyl-tRNA synthetase [76]. Concerning their involvement in codon-anticodon interaction, the role of modified (and frequently hypermodified) bases in positions 34 of the anticodon (wobble) and 37 in the anticodon loop, has been highlighted both in prokaryotes and eukaryotes. They appeared to be critical in defining kinetic and thermodynamic parameters of codon recognition and hence of the translation process [38,76,78,80].

Nevertheless, their role is not limited to the translation process. Indeed, they are critical in tRNA quality control and turnover [81], cellular localization of tRNA molecules, and are also related to

tRNA fragments' biogenesis [82]. Furthermore, changes in the profile of tRNA modification have been described as associated with genetic diseases [83,84], microbial infections [85,86], immune response [87] and cellular stress [88]. It is worth mentioning that tRNA base modifications participate in translation regulation in response to change in cellular programs, as revealed in yeast under stress conditions [89].

Therefore, it is interesting to consider that the population of each tRNA species may be further subdivided into subspecies, characterized by different base modification profiles. If the enzymatic modification process, in addition to sequential modification events, also varies depending on cellular state, then the number of subspecies of a given tRNA could be very high. Finally, it is worth mentioning that the implication of altered tRNA base modification profiles in different phenotypes and diseases has been proposed for many years. More recently, from genome-wide association studies, an important number of human pathologies, such as alterations of metabolic pathways, mitochondrial defects, neurological disorders and increased susceptibility to cancer, have been associated with mutations in genes coding for tRNAs and tRNA-modifying enzymes (for a review see [83]).

4.3. The tRNA Pool Is Partitioned in Different Cell Compartments

After transcription, the tRNA cycle includes different steps: maturation (processing of 5' and 3' trailers, intron splicing for those tRNA carrying an intervening sequence), posttranscriptional modification, precise cellular localization, interactions with partners involved in their different roles, and, finally, quality control that includes their degradation in the cytoplasm and/or the nucleus involving complex translocation mechanisms (reviewed in [90,91]).

Mature tRNAs—free or aminoacylated—interacting with molecules and molecular complexes involved in translation, can be considered as partitioned in different cell compartments: initiation and elongation factors, aminoacyl-tRNA synthetases (either free or included in multi-synthetase complexes in eukaryotes and archaea [92]), or translating ribosomes, among others. Interestingly, a “tunneling” phenomenon has been described by which tRNAs involved in translation, cycle among elongation factor eF2, aminoacyl-tRNA synthetases and translating ribosomes [92–95]. In agreement, from studies in the yeast *S. cerevisiae*, it was proposed that once a particular codon has been used, subsequent occurrences of the same amino acid do not use codons randomly, but favor codons that use the same tRNA. The reported data suggest that tRNA diffusion away from the ribosome is slower than translation [96]. Nevertheless, this important issue is still open [97].

As more evidence becomes available, the definition of the tRNA population turns more complex and its dynamic nature becomes more evident. Which subspecies of a particular tRNA is actually involved in decoding a certain codon? Is it preferentially located in a certain compartment? What are the posttranslational modifications it requires to fulfil this role? And finally, how is this regulated in order to ensure an efficient translation process, adjusted to different cell states? These issues need to be taken into account when trying to determine the relation between tRNA availability, codon usage and ultimately protein conformation and function. In this sense, the development of new techniques for an accurate measurement of the different tRNA species (or even subspecies) will be of paramount importance.

5. General Conclusions

The Sound of Silent Substitutions: The Tale of the Princess and the Pea, and the Case of Synonymous Polymorphism Ala87Ala GCG->GCC in Human ER α

As an approach to understanding the basis of the regulation of hER α and the effect of synonymous polymorphisms on its activity, we previously showed functional differences exhibited by ERA87 comparatively to ERWT in HepG2 and HeLa transfected cells. After discarding other hypotheses, in this work our aim was to review arguments for a role of a conformational change in the ER (which would lead to the described functional changes) brought about by a possible change in the identity of the tRNA decoding Ala87. Considering human codon usage, the Ala87 codon change involves the

substitution of a rare codon (in WT) by a frequent one (in ERAla87). In addition, this change suppresses a codon repetition (in WT) leaving instead three consecutive different Ala codons. Looking at the involved isodecoder tRNAs^{Ala}, it is interesting to note that tRNA^{Ala} carrying inosine (tRNA^{Ala}-IGC) and tRNA^{Ala}-GGC can only decode Ala87 (GCC). Also, they could read two consecutive codons in the silent polymorphism, though only one in the WT. On the other hand, as analyzed previously, the tRNA^{Ala}-CGC and tRNA^{Ala}-UGC populations would contribute mostly to decoding the WT (GCG). According to these observations it seems possible that when ERWT and ERAla87 are expressed in the same cell lines, the alanine codon change could lead to a modification of the local translation dynamics and to a change in the protein conformation.

But how can the functional activity of ERAla87 differ from that of the wild-type hER α , on a cell-type-dependent manner? As reviewed, changes in the tRNA population have been associated with proliferation, differentiation or response to chemical, physical or biological stress. These findings imply quantitative and/or qualitative differences in the tRNA pool between cell lines that could increase the likelihood of protein conformational variants, related to a particular codon usage during translation.

Nonetheless, tRNA availability is still not well understood in multicellular organisms. The lack of information about the real concentration of each tRNA under different physiological conditions hampers the evaluation of translation kinetics and hence the analysis should be considered with caution. The development of new sequencing methods, allowing the identification of modified bases in tRNAs, is urgently needed for a deeper understanding of the roles of tRNAs in the cell and the real tRNA availability for protein translation in each tissue, each cellular condition and for each subcellular compartment. This information will be crucial in order to truly determine if our hypothesis regarding the role of tRNAs in the conformation and functional properties of hER α synonymous variants is correct.

The relationship between tRNAs, codon usage and the process of co-translational protein folding is currently the subject of intense work. The convergence of holistic approaches, like deep sequencing and ribosome profiling, among others, together with biochemical and cellular approaches (with particular attention paid to the posttranscriptional modifications of RNA and its regulation, global cellular adaptation, from transcription-translation concerted regulation to the adjustment of the translational apparatus to specific cell states), will certainly provide important elements in the near future. In addition, computer modeling approaches will surely lead to powerful integrative landscapes.

Clearly, multiple interdependent factors are involved in the co-translational folding, and that fact could be the basis for divergent reports, each focusing on different aspects. For instance, several reports, based on ribosome profiling studies, have reached contradictory conclusions about the correlation between high translation elongation rates and codon frequencies and/or isoacceptor tRNA abundance [56,61]. In this sense, it was recently shown in yeast that the overexpression or deletion of tRNAs, as well as swapping of anticodons, analyzed by different approaches including ribosome profiling and kinetic modeling, did not show a direct correlation between codon adaptation and translational efficiency, describing instead a correlation between strong mRNA secondary structures and a local speed reduction of translating ribosomes [62]. Such contradictory results could arise from conceptual and/or technical issues. Conceptual aspects could be connected to the diversity of the tRNA population (isoacceptors, isodecoders, different species, different modification states, possibly different compartmental distribution). Technical aspects could be related to the precision in determining ribosomal dwell sites at the codon level. In this sense, several recent papers focusing on technical considerations about translation arrest to stabilize ribosomes for measuring their positions, strongly support that translation kinetics is linked to the concentration of decoder tRNAs [58,59,98] and to their modification state [99]. Moreover, concerted global regulatory mechanisms associated with translation demands should also be considered. This was recently highlighted through the observation that the deletion of a tRNA gene in yeast breaks the translational balance, thereby causing the tRNA pool to rapidly evolve to meet the new translational demands, suggesting—even though the

evolutionary scenarios that trigger changes in the tRNA pool have yet to be thoroughly explored—that genomic duplications, deletions, and anticodon mutations could shape tRNA gene families [100].

Possibly within the large diversity of the cellular tRNA population, their complex life cycles and multiple functions, new clues will arise that will help to solve the present challenges.

In conclusion, the correlation between codon usage and tRNA population and its complexity should be subtler than a general fit, even taking into account tRNA transcription levels or their global abundance in specific cell contexts. The precise effect of tRNAs on the translation of a specific mRNA might vary depending on the cell state. It could be subtle or extensive, but in any case it could result in conformational changes which can in turn give rise to polypeptides that expose transient hydrophobic surfaces prone to aggregation, alternative proteolytic profiles, and therefore to altered functional properties. The conformation of the ER α has been proposed as a major regulator of its own activity [101] and, additionally, different conformations were detected in ERWT when synthesized in different *in vitro* translation systems by chymotrypsin-limited proteolysis [102]. All these elements lead us to consider that a subtle conformational change occurs in the synonymous variant ERA1a87 which may be involved in its differential behavior.

Acknowledgments: This work was partially supported by Fondo Clemente Estable-ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación), PEDECIBA and Universidad de la República, Uruguay. T. Fernandez-Calero was the recipient of fellowships from ANII and Embassy of France in Uruguay.

Author Contributions: Tamara Fernández-Calero, Florencia Cabrera-Cabrera, Ricardo Ehrlich and Mónica Marín contributed substantially to writing this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chaney, J.L.; Clark, P.L. Roles for synonymous codon usage in protein biogenesis. *Annu. Rev. Biophys.* **2015**, *44*, 143–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Chamary, J.V.; Parmley, J.L.; Hurst, L.D. Hearing silence: Non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 98–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sauna, Z.E.; Kimchi-Sarfaty, C.; Ambudkar, S.V.; Gottesman, M.M. Silent polymorphisms speak: How they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 9609–9612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sauna, Z.E.; Kimchi-Sarfaty, C.; Ambudkar, S.V.; Gottesman, M.M. The sounds of silence: Synonymous mutations affect function. *Pharmacogenomics* **2007**, *8*, 527–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sauna, Z.E.; Kimchi-Sarfaty, C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 683–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fahraeus, R.; Marin, M.; Olivares-Illana, V. Whisper mutations: Cryptic messages within the genetic code. *Oncogene* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cunningham, F.; Amode, M.R.; Barrell, D.; Beal, K.; Billis, K.; Brent, S.; Carvalho-Silva, D.; Clapham, P.; Coates, G.; Fitzgerald, S.; *et al.* Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D662–D669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Gennari, L.; Merlotti, D.; De Paola, V.; Calabro, A.; Becherini, L.; Martini, G.; Nuti, R. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: A huge review. *Am. J. Epidemiol.* **2005**, *161*, 307–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Araújo, K.L.; Rezende, L.C.D.d.; Souza, L.S.; Daltoé, R.D.; Madeira, K.P.; Paes, M.F.; Herkenhoff, F.L.; Rangel, L.B.A.; Silva, I.V. Prevalence of estrogen receptor alpha pvuII (c454–397t > c) and xbaI (c454a > g) polymorphisms in a population of Brazilian women. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2011**, *54*, 1151–1158.
10. Mill, J.; Kiss, E.; Bajji, I.; Kapornai, K.; Daroczy, G.; Vetro, A.; Kennedy, J.; Kovacs, M.; Barr, C. Association study of the estrogen receptor alpha gene (esr1) and childhood-onset mood disorders. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **2008**, *147*, 1323–1326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Fernandez-Calero, T.; Astrada, S.; Alberti, A.; Horjales, S.; Arnal, J.F.; Rovira, C.; Bollati-Fogolin, M.; Flouriot, G.; Marin, M. The transcriptional activities and cellular localization of the human estrogen receptor alpha are affected by the synonymous ala87 mutation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *143*, 99–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Kumar, M.P.; Bhaskar, L.; Thampan, R.V. Structural characterization of the goat uterine estrogen receptor activation factor using an endogenous calcium activated neutral protease. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1999**, *152*, 57–64. [[CrossRef](#)]
13. Mader, S.; Chambon, P.; White, J.H. Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 1125–1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nilsson, S.; Makela, S.; Treuter, E.; Tujague, M.; Thomsen, J.; Andersson, G.; Enmark, E.; Pettersson, K.; Warner, M.; Gustafsson, J.A. Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 1535–1565. [[PubMed](#)]
15. Saville, B.; Wormke, M.; Wang, F.; Nguyen, T.; Enmark, E.; Kuiper, G.; Gustafsson, J.A.; Safe, S. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (α/β)-dependent activation at gc-rich (sp1) promoter elements. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5379–5387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Jakacka, M.; Ito, M.; Weiss, J.; Chien, P.Y.; Gehm, B.D.; Jameson, J.L. Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical ap1 pathway. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13615–13621. [[PubMed](#)]
17. Kushner, P.J.; Agard, D.A.; Greene, G.L.; Scanlan, T.S.; Shiau, A.K.; Uht, R.M.; Webb, P. Estrogen receptor pathways to ap-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *74*, 311–317. [[CrossRef](#)]
18. Safe, S.; Kim, K. Non-classical genomic estrogen receptor (er)/specificity protein and er/activating protein-1 signaling pathways. *J. Mol. Endocrinol.* **2008**, *41*, 263–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Bjornstrom, L.; Sjoberg, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 833–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Levin, E.R. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J. Appl. Physiol.* **2001**, *91*, 1860–1867. [[PubMed](#)]
21. Merot, Y.; Metivier, R.; Penot, G.; Manu, D.; Saligaut, C.; Gannon, F.; Pakdel, F.; Kah, O.; Flouriot, G. The relative contribution exerted by af-1 and af-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26184–26191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Webb, P.; Lopez, G.N.; Uht, R.M.; Kushner, P.J. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/ap-1 pathway: Potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol. Endocrinol.* **1995**, *9*, 443–456. [[PubMed](#)]
23. Lewis, J.S.; Jordan, V.C. Selective estrogen receptor modulators (serms): Mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat. Res.* **2005**, *591*, 247–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Berry, M.; Metzger, D.; Chambon, P. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* **1990**, *9*, 2811–2818. [[PubMed](#)]
25. Fan, J.D.; Wagner, B.L.; McDonnell, D.P. Identification of the sequences within the human complement 3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity. *Mol. Endocrinol.* **1996**, *10*, 1605–1616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sabarinathan, R.; Tafer, H.; Seemann, S.E.; Hofacker, I.L.; Stadler, P.F.; Gorodkin, J. The rnasnp web server: Predicting snp effects on local RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W475–W479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sabarinathan, R.; Tafer, H.; Seemann, S.E.; Hofacker, I.L.; Stadler, P.F.; Gorodkin, J. Rnasnp: Efficient detection of local RNA secondary structure changes induced by snps. *Hum. Mutat.* **2013**, *34*, 546–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Chang, T.H.; Huang, H.Y.; Hsu, J.B.; Weng, S.L.; Horng, J.T.; Huang, H.D. An enhanced computational platform for investigating the roles of regulatory RNA and for identifying functional RNA motifs. *BMC Bioinform.* **2013**, *14*. [[CrossRef](#)]
29. Chan, P.P.; Lowe, T.M. Gtrnadb: A database of transfer RNA genes detected in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D93–D97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Murphy, F.V.T.; Ramakrishnan, V. Structure of a purine-purine wobble base pair in the decoding center of the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1251–1252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Czerwoniec, A.; Dunin-Horkawicz, S.; Purta, E.; Kaminska, K.H.; Kasprzak, J.M.; Bujnicki, J.M.; Grosjean, H.; Rother, K. Modomics: A database of RNA modification pathways. 2008 update. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D118–D121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Dunin-Horkawicz, S.; Czerwoniec, A.; Gajda, M.J.; Feder, M.; Grosjean, H.; Bujnicki, J.M. Modomics: A database of RNA modification pathways. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D145–D149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Machnicka, M.A.; Milanowska, K.; Osman Oglou, O.; Purta, E.; Kurkowska, M.; Olchowik, A.; Januszewski, W.; Kalinowski, S.; Dunin-Horkawicz, S.; Rother, K.M.; *et al.* Modomics: A database of RNA modification pathways—2013 update. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D262–D267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cochella, L.; Green, R. Wobble during decoding: More than third-position promiscuity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1160–1162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Agris, P.F. Bringing order to translation: The contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications. *EMBO Rep.* **2008**, *9*, 629–635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ciryam, P.; Morimoto, R.I.; Vendruscolo, M.; Dobson, C.M.; O'Brien, E.P. *In vivo* translation rates can substantially delay the cotranslational folding of the *Escherichia coli* cytosolic proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E132–E140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Komar, A.A. A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends Biochem. Sci.* **2009**, *34*, 16–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Novoa, E.M.; Ribas de Pouplana, L. Speeding with control: Codon usage, tRNAs, and ribosomes. *Trends Genet.* **2012**, *28*, 574–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Endres, L.; Dedon, P.C.; Begley, T.J. Codon-biased translation can be regulated by wobble-base tRNA modification systems during cellular stress responses. *RNA Biol.* **2015**, *12*, 603–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Ikemura, T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evol.* **1985**, *2*, 13–34. [[PubMed](#)]
41. Dong, H.; Nilsson, L.; Kurland, C.G. Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J. Mol. Biol.* **1996**, *260*, 649–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Elena, C.; Ravasi, P.; Castelli, M.E.; Peiru, S.; Menzella, H.G. Expression of codon optimized genes in microbial systems: Current industrial applications and perspectives. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Rosano, G.L.; Ceccarelli, E.A. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microb. Cell. Fact.* **2009**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Cortazzo, P.; Cervenansky, C.; Marin, M.; Reiss, C.; Ehrlich, R.; Deana, A. Silent mutations affect *in vivo* protein folding in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 537–541. [[CrossRef](#)]
45. Hess, A.K.; Saffert, P.; Liebeton, K.; Ignatova, Z. Optimization of translation profiles enhances protein expression and solubility. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Thanaraj, T.A.; Argos, P. Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1973–1983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Thanaraj, T.A.; Argos, P. Ribosome-mediated translational pause and protein domain organization. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1594–1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Zalucki, Y.M.; Beacham, I.R.; Jennings, M.P. Coupling between codon usage, translation and protein export in *Escherichia coli*. *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 660–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zhang, G.; Hubalewska, M.; Ignatova, Z. Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 274–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Fedyunin, I.; Lehnhardt, L.; Bohmer, N.; Kaufmann, P.; Zhang, G.; Ignatova, Z. tRNA concentration fine tunes protein solubility. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 3336–3340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. O'Brien, E.P.; Ciryam, P.; Vendruscolo, M.; Dobson, C.M. Understanding the influence of codon translation rates on cotranslational protein folding. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1536–1544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. O'Brien, E.P.; Vendruscolo, M.; Dobson, C.M. Kinetic modelling indicates that fast-translating codons can coordinate cotranslational protein folding by avoiding misfolded intermediates. *Nat. Commun.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Zhou, M.; Wang, T.; Fu, J.; Xiao, G.; Liu, Y. Nonoptimal codon usage influences protein structure in intrinsically disordered regions. *Mol. Microbiol.* **2015**, *97*, 974–987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kimchi-Sarfaty, C.; Oh, J.M.; Kim, I.W.; Sauna, Z.E.; Calcagno, A.M.; Ambudkar, S.V.; Gottesman, M.M. A “Silent” Polymorphism in the *mdr1* gene changes substrate specificity. *Science* **2007**, *315*, 525–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Komar, A.A. Silent snps: Impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics* **2007**, *8*, 1075–1080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ingolia, N.T. Ribosome profiling: New views of translation, from single codons to genome scale. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 205–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Gartner, J.J.; Parker, S.C.; Prickett, T.D.; Dutton-Regester, K.; Stitzel, M.L.; Lin, J.C.; Davis, S.; Simhadri, V.L.; Jha, S.; Katagiri, N.; *et al.* Whole-genome sequencing identifies a recurrent functional synonymous mutation in melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 13481–13486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Dana, A.; Tuller, T. The effect of tRNA levels on decoding times of mRNA codons. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 9171–9181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Gardin, J.; Yeasmin, R.; Yurovsky, A.; Cai, Y.; Skiena, S.; Futcher, B. Measurement of average decoding rates of the 61 sense codons *in vivo*. *Elife* **2014**, *3*, e03735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Charneski, C.A.; Hurst, L.D. Positively charged residues are the major determinants of ribosomal velocity. *PLoS Biol.* **2013**, *11*, e1001508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Qian, W.; Yang, J.R.; Pearson, N.M.; Maclean, C.; Zhang, J. Balanced codon usage optimizes eukaryotic translational efficiency. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Pop, C.; Rouskin, S.; Ingolia, N.T.; Han, L.; Phizicky, E.M.; Weissman, J.S.; Koller, D. Causal signals between codon bias, mRNA structure, and the efficiency of translation and elongation. *Mol. Syst. Biol.* **2014**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Goroehowski, T.E.; Ignatova, Z.; Bovenberg, R.A.; Roubos, J.A. Trade-offs between tRNA abundance and mRNA secondary structure support smoothing of translation elongation rate. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 3022–3032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Quax, T.E.; Claassens, N.J.; Soll, D.; van der Oost, J. Codon bias as a means to fine-tune gene expression. *Mol. Cell.* **2015**, *59*, 149–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Supek, F.; Minana, B.; Valcarcel, J.; Gabaldon, T.; Lehner, B. Synonymous mutations frequently act as driver mutations in human cancers. *Cell* **2014**, *156*, 1324–1335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Garel, J.P.; Hentzen, D.; Schlegel, M.; Dirheimer, G. Structural studies on RNA from *Bombyx mori* L. I. Nucleoside composition of enriched tRNA species from the posterior silk gland purified by countercurrent distribution. *Biochimie* **1976**, *58*, 1089–1100. [[CrossRef](#)]
67. Hentzen, D.; Chevallier, A.; Garel, J.P. Differential usage of iso-accepting tRNA species in silk glands of *bombyx mori*. *Nature* **1981**, *290*, 267–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Sprague, K.U.; Hagenbuchle, O.; Zuniga, M.C. The nucleotide sequence of two silk gland alanine tRNAs: Implications for fibroin synthesis and for initiator tRNA structure. *Cell* **1977**, *11*, 561–570. [[CrossRef](#)]
69. Kurland, C.G. Codon bias and gene expression. *FEBS Lett.* **1991**, *285*, 165–169. [[CrossRef](#)]
70. Pang, Y.L.; Abo, R.; Levine, S.S.; Dedon, P.C. Diverse cell stresses induce unique patterns of tRNA up- and down-regulation: tRNA-seq for quantifying changes in tRNA copy number. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Gingold, H.; Tehler, D.; Christoffersen, N.R.; Nielsen, M.M.; Asmar, F.; Kooistra, S.M.; Christophersen, N.S.; Christensen, L.L.; Borre, M.; Sorensen, K.D.; *et al.* A dual program for translation regulation in cellular proliferation and differentiation. *Cell* **2014**, *158*, 1281–1292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Dittmar, K.A.; Goodenbour, J.M.; Pan, T. Tissue-specific differences in human transfer RNA expression. *PLoS Genet.* **2006**, *2*, e221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Pavon-Eternod, M.; Gomes, S.; Geslain, R.; Dai, Q.; Rosner, M.R.; Pan, T. tRNA over-expression in breast cancer and functional consequences. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 7268–7280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Topisirovic, I.; Sonenberg, N. Distinctive tRNA repertoires in proliferating versus differentiating cells. *Cell* **2014**, *158*, 1238–1239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Grosjean, H.; de Crecy-Lagard, V.; Marck, C. Deciphering synonymous codons in the three domains of life: Co-evolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 252–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. El Yacoubi, B.; Bailly, M.; de Crecy-Lagard, V. Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annu. Rev. Genet.* **2012**, *46*, 69–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Machnicka, M.A.; Olchowik, A.; Grosjean, H.; Bujnicki, J.M. Distribution and frequencies of post-transcriptional modifications in tRNAs. *RNA Biol.* **2014**, *11*, 1619–1629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Helm, M.; Alfonzo, J.D. Posttranscriptional RNA modifications: Playing metabolic games in a cell's chemical legoland. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 174–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

79. Jackman, J.E.; Alfonzo, J.D. Transfer RNA modifications: Nature's combinatorial chemistry playground. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2013**, *4*, 35–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Gustilo, E.M.; Vendeix, F.A.; Agris, P.F. tRNA's modifications bring order to gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11*, 134–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Phizicky, E.M.; Alfonzo, J.D. Do all modifications benefit all tRNAs? *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 265–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Durdevic, Z.; Schaefer, M. tRNA modifications: Necessary for correct tRNA-derived fragments during the recovery from stress? *Bioessays* **2013**, *35*, 323–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Torres, A.G.; Batlle, E.; Ribas de Pouplana, L. Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends Mol. Med.* **2014**, *20*, 306–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Sarin, L.P.; Leidel, S.A. Modify or die?—RNA modification defects in metazoans. *RNA Biol.* **2014**, *11*, 1555–1567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Gehrig, S.; Eberle, M.E.; Botschen, F.; Rimbach, K.; Eberle, F.; Eigenbrod, T.; Kaiser, S.; Holmes, W.M.; Erdmann, V.A.; Sprinzl, M.; *et al.* Identification of modifications in microbial, native tRNA that suppress immunostimulatory activity. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 225–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Jockel, S.; Nees, G.; Sommer, R.; Zhao, Y.; Cherkasov, D.; Hori, H.; Ehm, G.; Schnare, M.; Nain, M.; Kaufmann, A.; *et al.* The 2'-*o*-methylation status of a single guanosine controls transfer RNA-mediated toll-like receptor 7 activation or inhibition. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 235–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Nallagatla, S.R.; Jones, C.N.; Ghosh, S.K.; Sharma, S.D.; Cameron, C.E.; Spremulli, L.L.; Bevilacqua, P.C. Native tertiary structure and nucleoside modifications suppress tRNA's intrinsic ability to activate the innate immune sensor pkr. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57905.
88. Chan, C.T.; Dyavaiah, M.; DeMott, M.S.; Taghizadeh, K.; Dedon, P.C.; Begley, T.J. A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS Genet.* **2010**, *6*, e1001247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Gu, C.; Begley, T.J.; Dedon, P.C. tRNA modifications regulate translation during cellular stress. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 4287–4296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Hopper, A.K.; Pai, D.A.; Engelke, D.R. Cellular dynamics of tRNAs and their genes. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 310–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Kirchner, S.; Ignatova, Z. Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 98–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Laporte, D.; Huot, J.L.; Bader, G.; Enkler, L.; Senger, B.; Becker, H.D. Exploring the evolutionary diversity and assembly modes of multi-aminoacyl-tRNA synthetase complexes: Lessons from unicellular organisms. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 4268–4278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Park, S.G.; Ewalt, K.L.; Kim, S. Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: New perspectives on housekeepers. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 569–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Raina, M.; Elgamal, S.; Santangelo, T.J.; Ibba, M. Association of a multi-synthetase complex with translating ribosomes in the archaeon thermococcus kodakarensis. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2232–2238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Havrylenko, S.; Mirande, M. Aminoacyl-tRNA synthetase complexes in evolution. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 6571–6594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Cannarozzi, G.; Schraudolph, N.N.; Faty, M.; von Rohr, P.; Friberg, M.T.; Roth, A.C.; Gonnet, P.; Gonnet, G.; Barral, Y. A role for codon order in translation dynamics. *Cell* **2010**, *141*, 355–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Hussmann, J.A.; Press, W.H. Local correlations in codon preferences do not support a model of tRNA recycling. *Cell. Rep.* **2014**, *8*, 1624–1629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Hussmann, J.A.; Patchett, S.; Johnson, A.; Sawyer, S.; Press, W.H. Understanding biases in ribosome profiling experiments reveals signatures of translation dynamics in yeast. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Nediakova, D.D.; Leidel, S.A. Optimization of codon translation rates via tRNA modifications maintains proteome integrity. *Cell* **2015**, *161*, 1606–1618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Yona, A.H.; Bloom-Ackermann, Z.; Frumkin, I.; Hanson-Smith, V.; Charpak-Amikam, Y.; Feng, Q.; Boeke, J.D.; Dahan, O.; Pilpel, Y. tRNA genes rapidly change in evolution to meet novel translational demands. *Elife* **2013**, *2*, e01339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

101. McDonnell, D.P.; Connor, C.E.; Wijayarathne, A.; Chang, C.Y.; Norris, J.D. Definition of the molecular and cellular mechanisms underlying the tissue-selective agonist/antagonist activities of selective estrogen receptor modulators. *Recent Prog. Horm. Res.* **2002**, *57*, 295–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Horjales, S.; Cota, G.; Senorale-Pose, M.; Rovira, C.; Roman, E.; Artagaveytia, N.; Ehrlich, R.; Marin, M. Translational machinery and protein folding: Evidence of conformational variants of the estrogen receptor alpha. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *467*, 139–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

The Synonymous Ala87 Mutation of Estrogen Receptor Alpha Modifies Transcriptional Activation Through Both ERE and AP1 Sites

Tamara Fernández-Calero, Gilles Flouriot, and Mónica Marín

Abstract

Estrogen receptor α (ER α) exerts regulatory actions through genomic mechanisms. In the classical pathway, ligand-activated ER α binds directly to DNA through estrogen response elements (ERE) located in the promoter of target genes. ER α can also exert indirect regulation of transcription via protein-protein interaction with other transcription factors such as AP-1.

Several ER α synonymous polymorphisms have been identified and efforts to understand their implications have been made. Nevertheless effects of synonymous polymorphisms are still neglected. This chapter focuses on the experimental procedure employed in order to characterize the transcriptional activity of a synonymous polymorphism of the ER α (rs746432) called Alanine 87 (Ala87). Activity of both WT and Ala87 ER α isoforms on transcriptional pathways can be analyzed in transiently transfected cells using different reporter constructs. ER α efficiency on the classical genomic pathway can be analyzed by determining its transactivation activity on an ERE-driven thymidine kinase (TK) promoter controlling the expression of the luciferase reporter gene. Transcriptional activity through the indirect genomic pathway can be analyzed by employing an AP-1 DNA response element-driven promoter also controlling the expression of luciferase reporter gene.

Key words Estrogenreceptoralpha (ER α), Estrogen transcriptional regulation, Estrogen-responsive element (ERE), Nonclassical pathway, AP-1 pathway, Estrogenreceptor alanine 87 polymorphism

1 Introduction

The estrogen receptors ER α and ER β mediate the pleiotropic and tissue-specific effects of estrogens. These transcription factors belong to the nuclear receptor superfamily and share a multidomain structure (Fig. 1). Two domains harbor activation functions (AF): the A/B domain contains AF-1 and the E domain contains AF-2 [1]. The respective contributions that AF1 and AF2 make toward the activity of the full-length ER are both promoter and cell specific, and also depend on the differentiation stage of the cell [2]. The classical mechanism of activation of ERs depends on ligand

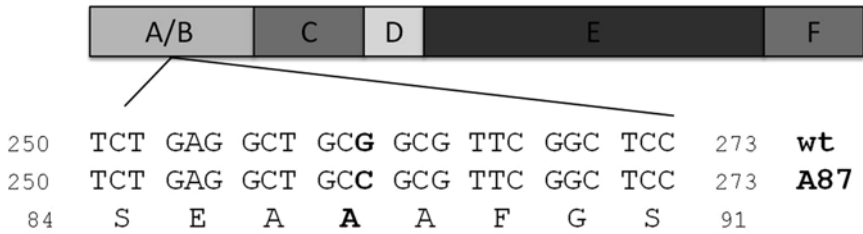


Fig. 1 Representation of ER functional domains. *A/B*: N-terminal domain (contains AF-1), *C*: DNA-binding domain, *D*: hinge, *E*: Ligand-binding domain (contains AF-2), *F*: C-terminal domain. ER wild-type (WT) and synonymous ERAla87 mutant coding sequences, and translated amino acid residues are shown (*below*). The codon variant Ala87 is indicated in *bold*. Reproduced from [14] with permission from Elsevier

binding to the receptors, after which the receptors dimerize and bind to estrogen response elements (EREs) located in the promoter of estrogen-responsive genes [3]. Ligand binding allows the interaction with specific cofactors and binding to DNA to activate or repress different sets of genes. In the nonclassical pathway of genomic activation, ER α binds indirectly to the DNA via tethering to other transcription factors such as specificity protein 1 (Sp1), activating protein 1 (AP-1), or nuclear factor-kappa B (NF-kB), and regulates estrogen transcriptional regulation in an ERE-independent manner [4]. For instance, ER α upregulates or downregulates transcription from genes that contain AP-1 sites, binding sites for the Jun/Fos complex, in a cell-type-specific manner [5].

Due to the central role of ER α in many physiological processes, the study of polymorphisms is of utmost importance for pharmacogenomics implications. In this work we investigated the functional properties of the ER variant assigned as BstUI [6]. It is a synonymous polymorphism, a single base mutation that changes the DNA sequence without changing the amino acid coded by that sequence, and the effect of this kind of variation has been much neglected until recently. This ER α polymorphism has been poorly characterized and no clear association of this SNP to human diseases has been reported yet [7]. It is located in exon 1 and corresponds to the alanine 87 (Ala87) synonymous mutation (GCG to GCC) (rs746432) (Fig. 1). The mean GCC allele frequency was estimated to be about 5 %, being almost 0 % for Asian populations to about 10 % for European populations [8].

Here we describe the experimental procedure employed to analyze the transcriptional activity of the Ala87 variant of ER α (ERAla87) comparatively to the ER α wildtype (WT), in two genomic pathways, the classical ERE pathway and the nonclassical genomic AP-1 pathway. In order to compare the transcriptional activity of ERAla87 and WT ER α , cells lines that do not express a functional receptor are transfected with constructs that encode one or the other form of ER. At the same time, cells are transfected

with a second plasmid construct which includes a reporter gene (luciferase) under the control of a sensitive promoter containing ERE elements or the AP-1 element. A third DNA construct expressing beta galactosidase is included in the transfections for normalization of the experiments.

The ER transactivation efficiency is analyzed in HepG2 and HeLa cells, two epithelial-like cell lines which exhibit divergent differentiation phenotypes. HeLa cells, derived from a cervix carcinoma, present a poorly differentiated phenotype and exhibit a cell context strictly permissive to AF2 transactivation function of ER α . In contrast, the hepatocarcinoma HepG2 cell line appears more differentiated and in these cells AF1 is the dominant transactivation function involved in ER α transcriptional activity [2].

17 β -Estradiol (E2) is a natural ligand of ER α . Other compounds that bind ER α have been synthesized such as the selective estrogen receptor degraders (SERDs) which lead to degradation of the receptor, and selective estrogen receptor modulators (SERMs) that exhibit mixed agonist and antagonist effects in a tissue-specific manner [9]. In this study, the transcriptional activity of ER α was studied in presence of E2, the SERD ICI 182,780 (ICI), and the SERM 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), in order to characterize the transactivation properties of the variant ERAla87. The estrogenic activity of 4-OHT exclusively depends upon AF-1 of ER α , and is therefore observed only in cells sensitive to this activation function such as the HepG2 cell line [2, 10]. 4-OHT is an agonist on the transcriptional activity of the human complement C3 promoter (which contains ERE elements) [11], meanwhile 4-OHT and ICI were previously described as potent agonists on the ERE-independent AP-1 ER α pathway [5, 12, 13].

The procedures described in this chapter allowed the demonstration that the synonymous ERAla87 variant has a differential behavior compared to ERWT in transfected cells (Fig. 2). In comparison to the wild type receptor, results show that the Ala87 mutation reduces the transactivation efficiency of ER α on an ERE reporter gene (Fig. 2a) while its expression level remains similar. In contrast, this mutation enhances 4-OHT-induced transactivation of ER α on an AP1 reporter gene (Fig. 2c), suggesting the ability to establish other interactions as well. Finally, the mutation affects the subcellular localization of ER α in a cell type-specific manner [14]. We showed that the mutation does not affect the abundance of the ER mRNA as evaluated by real time RT-PCR, nor the expression level of the receptor in HepG2 or HeLa cells as determined by western blotting. The observed differences of the ERAla87 could be explained by subtle differences of conformation respect to the ERWT in the assayed transfected cells. The functional alteration of the ERAla87 reported in this work highlights the relevance of synonymous mutations for protein function and hence for biomedical and pharmacological points of view.

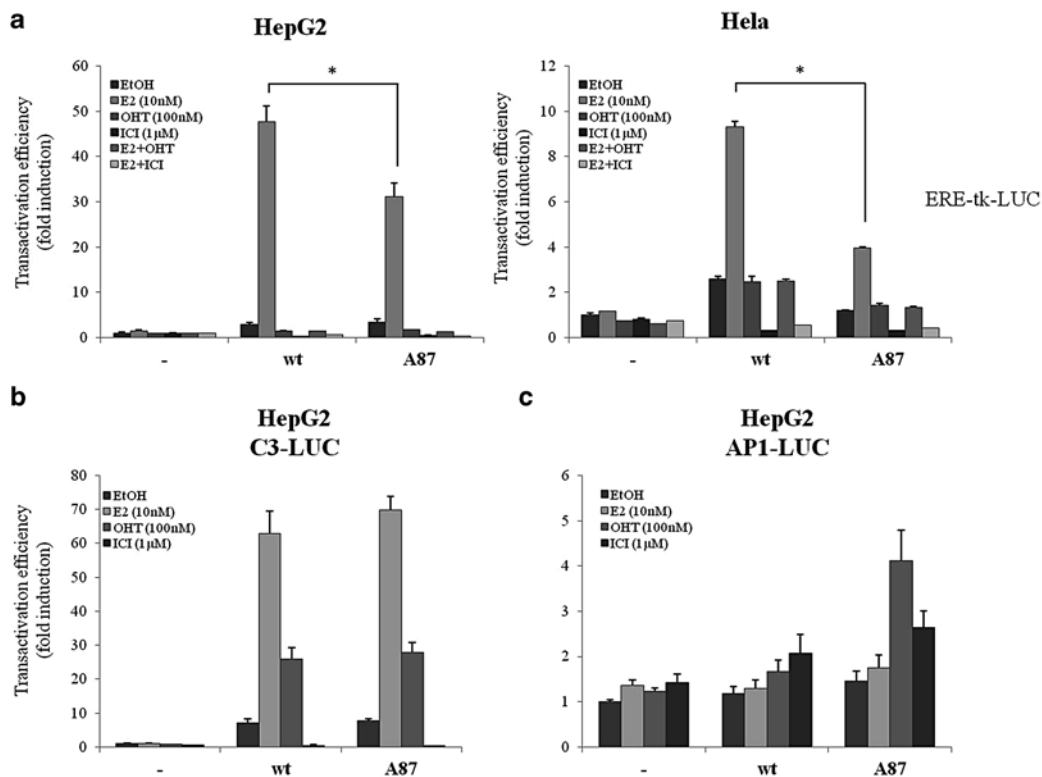


Fig. 2 Synonymous mutation Ala87 affects ER transactivation efficiency. ER α WT (wt) and ERAlaA87 (A87) transcriptional activity was determined in transfected HepG2 and HeLa cells on a ERE-luciferase reporter gene and in transfected HepG2 cells on the C3-luciferase and AP1-luciferase reporter genes. Cell lines were co-transfected with ERE-tk-LUC (100 ng) (a), C3-LUC (200 ng) (b) or AP1-LUC (200 ng) (c), together with pCMV SPORT- β gal (100 ng) and empty pSG5 (50 ng), pSG5-ER α (50 ng) or pSG5-ER α A87 (A87, 50 ng). Cells were treated for 24 h with EtOH as a control, 10 nM E2, 100 nM 4-hydroxytamoxifen (OHT), 100 nM ICI 182,780 (ICI), E2 + OHT or E2 + ICI. Luciferase activity was normalized against β -galactosidase activity and was expressed as fold increase above values measured with empty pSG5 treated with EtOH. Data corresponds to the mean \pm SE of at least three independent experiments. * $p < 0.001$ two-way ANOVA with Bonferroni posttest. Reproduced from [14] with permission from Elsevier. Notice that the range of transactivation efficiency values (expressed as fold induction) varies among cell lines for the same reporter gene. Cell context permissiveness to different transactivation functions of ER α is one of the underlying causes for this. HeLa cells exhibit a cell context strictly permissive to AF2 transactivation function of ER α while in HepG2 cells AF1 is the dominant transactivation function involved in ER α transcriptional activity

2 Materials

HPLC-grade water or water with a similar purity grade (resistivity 18.2 M Ω) is recommended to prepare all solutions and suspensions.

2.1 Components for Cell Culture and Transfection

1. HeLa and HepG2 cell lines (American Type Culture Collection).
2. Cell culture medium: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 μ g/mL).

3. Transfection medium: Phenol red-free DMEM supplemented with 2.5 % charcoal-stripped calf serum (*see Note 1*).
4. Phosphate-buffered saline (PBS).
5. Transfection reagent such as jetPEI reagent (Polyplus).
6. Plasmids: pSG5, pSG5-ERwt, pSG5-ERAla87, ERE-tk-LUC, C3-LUC, AP1-LUC, and pCMV SPORT- β gal (*see Note 2*).
7. 24-Well cell culture plates, 5 % CO₂ incubator, sterile polypropylene tubes, microfuge, pipets, sterile pipette tips.
8. 150 mM NaCl.
9. Stock solution of ligands (E2, 4-OHT and ICI). Prepare stock solutions in ethanol following the manufacturer's instructions.
10. Reporter Lysis 5 \times Buffer (Promega).

2.2 Components for β -Galactosidase Assay

1. 0.1 M Phosphate buffer: pH 7.3. Mix 5.82 g of Na₂HPO₄ and 1.24 g of NaH₂PO₄ and transfer to a 500 mL graduated cylinder. Add water to a volume of 400 mL. Mix and check that the correct pH for the buffer is reached. Adjust slightly as necessary to pH 7.3, using phosphoric acid or sodium hydroxide. Raise volume to 500 mL with water. Store at 4 °C.
2. ONPG 4 mg/mL: Add 250 mg of *o*-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside to a 500 mL graduated cylinder. Add 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, to a volume of 200 mL. Gently warm with stirring in order to completely dissolve the product. Raise volume to 250 mL with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3. Make 10 mL aliquots and store at -20 °C.
3. 100 \times β -mercaptoethanol-MgCl₂: 0.1 M MgCl₂, 4.5 M β -mercaptoethanol. To make, weigh 0.2 g MgCl₂ and add 3.19 mL β -mercaptoethanol. Raise volume to 10 mL with water. Store at 4 °C.
4. 96-Well transparent plates.
5. Microplate reader.
6. Mix for β -galactosidase assay: For 1 point mix 142 μ L of 0.1 M phosphate buffer pH 7.3, 2.5 μ L of β -mercaptoethanol-MgCl₂ 100 \times and 55 μ L of ONPG 4 mg/mL.

2.3 Components for Luciferase Assay

1. Luciferase Assay System kit (Promega).
2. 96-Well opaque plates (*see Note 3*).
3. Luminometer.

3 Methods

In order to compare the ERAla87 to the ERWT transcriptional activity, HepG2 and HeLa cells, which do not express a functional receptor, are transfected with pSG5 vector encoding one of the

two ER α proteins. The pSG5-ERWT vector encodes the ERWT protein while the pSG5-ERAla87 vector encodes the ERAla87 protein. At the same time, cells are transfected with a second construct which includes luciferase as a reporter gene, under the control of a sensitive promoter. When analyzing the ER α transcriptional activity through the classical ERE pathway the vector used is the ERE-tk-LUC or the C3-LUC whose promoters contain ERE elements. Meanwhile when analyzing the ER α transcriptional activity through the nonclassical genomic AP-1 pathway, the vector used is AP1-LUC whose promoter contains the AP-1-responsive element. For normalization of luciferase activity through the different experiments, the pCMV SPORT-gal plasmid encoding galactosidase is included in transfection. After 24 h of transfection, cells are treated for another 24 h with one of the ligands: E2, ICI, or 4-OHT. Cell lysates are prepared and luciferase and galactosidase activity are measured by light detection or color development following enzymatic reaction with their corresponding substrates. A general outline of the protocol is given in Fig. 3. All steps should be carried out at room temperature unless otherwise specified.

Notice that estrogenic activity of 4-OHT exclusively depends upon AF1 of ER α , and is therefore observed only in cells sensitive to this activation function such as the HepG2 cell line. As the 4-OHT is a potent agonist on the transcriptional activity of the human complement C3 promoter and of the AP-1 promoter, HepG2 cells are used for determining transcriptional activity of both promoters rather than HeLa cells.

Performing transfection experiments at least in triplicate is recommended to allow statistical analysis of the results.

3.1 Cell Culture and Transient Transfection

Keeping cells free from contamination is a critical factor for cell culture success. Use sterile materials and always follow an aseptic technique to reduce the probability of contamination.

1. The day before transfection trypsinize and count cells. Plate cells in cell culture medium at a density of 1×10^5 cells per well of a 24-well plate (*see Note 4*).
2. Before transfection wash cells with 0.5 mL PBS to remove all traces of cell culture medium. Add 0.5 mL of transfection medium on each well.
3. In a polypropylene tube dilute 500 ng of DNA/well in 150 mM NaCl, to a final volume of 50 μ L. As a starting point use 200 ng of reporter gene (ERE-tk-LUC, AP1-LUC, or C3-LUC), 100 ng of pCMV SPORT-gal internal control, 50 ng of expression vectors (pSG5, pSG5-ER α or pSG5-ERAla87), and 150 ng of empty vector (pSG5) to make up to 500 ng total DNA per well (*see Note 5*).
4. Dilute 2 μ L of jetPEI reagent/well into 48 μ L in a second polypropylene tube and mix. Incubate for 5 min at room temperature (*see Note 6*).

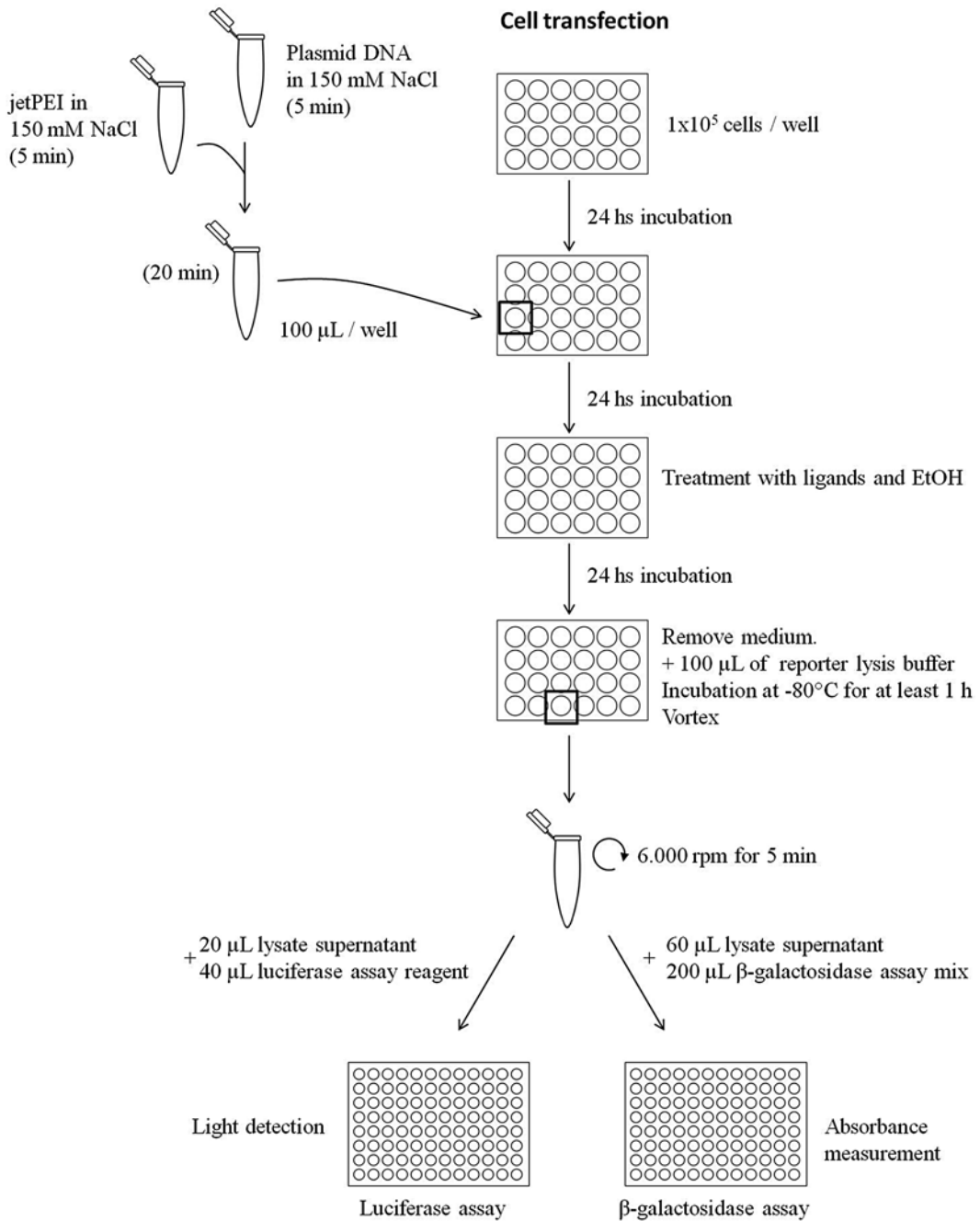


Fig. 3 Schematic representation of main protocol steps

5. Add diluted DNA into diluted jetPEI reagent, vortex, and spin down briefly. Incubate for 20 min at room temperature.
6. Add 100 μL of the jetPEI/DNA mix per well. Mix by gently swirling the plate. Incubate 24 h at 37 °C in 5 % CO₂ incubator.

7. Treat cells for 24 h with ligands or ethanol (vehicle control). Use as final concentration of ligands: 10 nM E2, 1 μ M 4-OHT and 1 μ M ICI diluted in transfection medium. Maintain 0.5 mL as final volume for each well.
8. Remove medium from the wells and add 100 μ L of reporter lysis buffer. Store at -80°C for at least 1 h (*see Note 7*).
9. Vortex the plate carefully. Transfer the cell lysate to a polypropylene tube and centrifuge at $6000 \times g$ for 5 min. Transfer cell lysate supernatant to a new polypropylene tube and save it (*see Note 8*).

3.2 β -Galactosidase Assay

1. Add 60 μ L of lysate supernatant into a well of a transparent 96-well plate. Add 200 μ L of substrate mix for β -galactosidase assay to each well. Add 200 μ L of substrate mix for β -galactosidase assay to three empty wells to use as blank samples.
2. Incubate until a faint yellow color has developed (*see Note 9*).
3. Take the plate to the microplate reader and measure absorbance at 405 nm.

3.3 Luciferase Assay

1. Add 10–20 μ L of HeLa/HepG2 lysed cells into a well of an opaque 96-well plate.
2. Add 40 μ L of Luciferase Assay Reagent per well (*see Note 10*). Immediately measure the light produced with the luminometer (*see Note 11*).

3.4 Activity

1. Compute galactosidase activity by subtracting the blank samples mean to each of the other samples.
2. Normalize luciferase activity against galactosidase activity within each sample.
3. Express normalized luciferase activity as a fold increase above the mean value measured with empty pSG5 treated with EtOH (*see Note 12*).
4. Compute average activity and the standard error within each condition.

4 Notes

1. In the charcoal stripped serum, lipid-like components including hormones, retinoids and fatty acid ligands of nuclear receptor transcription factors are depleted. Using charcoal-stripped calf serum in transfection medium is imperative so that these compounds will not interfere with the experiment.
2. DNA quality is a critical factor in transfection experiments. Plasmid quality and concentration must be thoroughly checked

before starting. A260/A280 ratio above 1.6 is recommended. DNA integrity can be verified on an agarose gel. At least 90 % of the DNA should be in the supercoiled conformation and no degradation products should be visible.

3. Do not use transparent plates. In transparent plates luminescence signals from adjacent wells can interfere with the signal that is being measured.
4. One of the most important factors to obtain reproducibility in transfection efficiency is working with a consistent number of cells. Transfection efficiency is sensitive to culture confluency; thus starting culture density should be optimized for each cell line. For an optimal transfection, jETPEI manual recommends 50–70 % of cell confluence on the day of transfection which can be achieved in a 24-well culture plate seeding 50,000–100,000 cells the day before transfection.
5. Plasmid/transfection reagent relation should be previously optimized for each transfection.
6. To account for normal loss during pipetting, all reagents should be prepared in excess.
7. Cells can be stored at -80°C up to 1 month.
8. The lysates may be assayed directly or stored at -80°C for up to 2 months.
9. Time elapsed for yellow color development may vary among cell lines. Color development in HeLa lysates is almost immediate. However HepG2 lysates should be incubated at 37°C for at least 2 h for a slight yellow color appearance.
10. Do not forget to thaw luciferase substrate before starting the assay. Substrate should be at room temperature when performing assay. Maintain substrate in the dark.
11. Read time and delay reading time between two consecutive wells should be optimized for each experiment in order to get optimal light intensity and no interference between well measures. The typical delay time is 2 s, and the typical read time is 10 s. As light intensity of the reaction decays slowly, reading luciferase activity for several samples at the same time is not encouraged. When processing many samples luciferase assay reagent should be added to a few samples to measure light intensity (one row of a 96-well plate for example). Then, after completing measures of the first set, another set of samples can be processed.
12. The range of transactivation efficiency values (expressed as fold induction) varies among cell lines for the same reporter gene. Cell context permissiveness to different transactivation functions of ER α is one of the underlying causes for this. HeLa cells exhibit a cell context strictly permissive to AF2 transactivation function of ER α while in HepG2 cell line AF1 is the dominant

transactivation function involved in ER α transcriptional activity. As an example, ranges of transactivation efficiency values expressed as fold induction for ERE-tk-LUC induction in HeLa cells are usually below 10 while in HepG2 cells are usually above 40.

Acknowledgments

This work was partially supported by Fondo Clemente Estable, ANII (Uruguay), and PEDECIBA.

References

1. Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240(4854):889–895
2. Merot Y, Metivier R, Penot G et al (2004) The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *J Biol Chem* 279(25):26184–26191
3. Nilsson S, Makela S, Treuter E et al (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81(4):1535–1565
4. Welboren WJ, Sweep FC, Span PN, Stunnenberg HG (2009) Genomic actions of estrogen receptor alpha: what are the targets and how are they regulated? *Endocr Relat Cancer* 16(4):1073–1089
5. Jakacka M, Ito M, Weiss J, Chien PY, Gehm BD, Jameson JL (2001) Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway. *J Biol Chem* 276(17):13615–13621
6. Gennari L, Merlotti D, De Paola V et al (2005) Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 161(4):307–320
7. Mill J, Kiss E, Baji I et al (2008) Association study of the estrogen receptor alpha gene (ESR1) and childhood-onset mood disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(7):1323–1326
8. Ensembl. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=6:152128808-152129808;v=rs746432;vdb=variation;vf=600617. Accessed 30 Aug 2013
9. Lewis JS, Jordan VC (2005) Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat Res* 591(1-2):247–263
10. Berry M, Metzger D, Chambon P (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 9(9):2811–2818
11. Fan JD, Wagner BL, McDonnell DP (1996) Identification of the sequences within the human complement 3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity. *Mol Endocrinol* 10(12):1605–1616
12. Safe S, Kim K (2008) Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 41(5):263–275
13. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL et al (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74(5):311–317
14. Fernandez-Calero T, Astrada S, Alberti A et al (2014) The transcriptional activities and cellular localization of the human estrogen receptor alpha are affected by the synonymous Ala87 mutation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 143C:99–104

Capítulo 2. Estudio de los efectos de la translocación nuclear de MKL1 en la funcionalidad del ER α y la resistencia hormonal

2.1 Introducción

2.1.1 *El receptor y la resistencia endocrina en tumores de mama*

El receptor de estrógenos juega un rol fundamental en los tumores de mama. Más de dos tercios de estos tumores expresan ER α permitiendo que la mayoría dependan del estrógeno para proliferar (Platet et al., 2004) lo que constituye una oportunidad para el tratamiento. El papel principal de las terapias endocrinas u hormonales es privar a los receptores de estrógenos de sus ligandos, reduciendo su disponibilidad e inhibiendo la acción estrogénica. En consecuencia, impiden la proliferación celular dirigida por el receptor (Osborne, 1998). Existen dos grupos de moléculas utilizadas con este fin: los antiestrógenos, entre ellos los SERMs, que logran este objetivo compitiendo con otros ligandos del receptor e inhibiendo su actividad al unirse y, por otra parte, los inhibidores de aromatasas que bloquean la biosíntesis de estrógenos (Clarke et al., 2015; Osborne, 1998). Los tumores que no responden a las terapias endocrinas se clasifican como tumores resistentes. La resistencia de las células tumorales de mama a diferentes drogas puede clasificarse en dos grandes grupos. Por un lado se encuentran los tumores con la denominada resistencia de novo, que son aquellos que no muestran respuesta a las terapias endocrinas desde el diagnóstico. Por otra parte se encuentran los tumores que muestran una buena respuesta inicial a las terapias endocrinas pero que con el tiempo dejan de responder al tratamiento y muestran lo que se denomina resistencia adquirida.

Dado que ER α es el blanco principal de las terapias hormonales ya sea directamente (antiestrógenos) o indirectamente (inhibidores de aromatasas), la presencia de ER α en un tumor es un indicador primario de la probabilidad de provocar una respuesta positiva con el tratamiento. En efecto, uno de los métodos más utilizados en la clínica para definir si la administración de terapias endocrinas se utiliza para el tratamiento de un tumor de mama se basa en la presencia del ER α . Los tumores con expresión abundante o ricos en ER α tienen entre un 40-60% de probabilidad de responder a las terapias endocrinas. Sin embargo, no todos los tumores ER α + son ricos en ER α . Por otra parte, la probabilidad de una respuesta exitosa aumenta si las células también expresan al PR (Brouckaert et al., 2013). Los tumores ER α + / PR+ tienen probabilidad de respuesta cercana al 75%. Se cree que la presencia del PR es un indicador del estado de actividad del ER α ya que el PR es un gen regulado por estrógenos. Aproximadamente un 40% de los tumores ER α - / PR+ responden a las terapias endocrinas por lo que la presencia del PR en estos tumores a menudo se considera como un indicador de falsos negativos en la detección del ER α (Clarke et al., 2015). A pesar del poder predictivo de la presencia de estos marcadores falta mejorar su sensibilidad. El valor predictivo más claro para la respuesta a terapias endocrinas es la ausencia de ambos receptores ER α y PR (ER α - / PR-). Tumores que no expresan ninguno de los dos receptores, o tienen niveles muy bajos de su expresión, tienen una probabilidad menor al 10% de responder a terapias endocrinas (“Tamoxifen for early breast cancer,” 1998).

Uno de los mayores problemas a los que se enfrentan los clínicos con esta estrategia es la heterogeneidad de las células tumorales. En algunos tumores, puede existir un amplio rango en los niveles de expresión del receptor en las células ER α +, inclusive parte de las células pueden ser ER α + y parte ER α -. En la actualidad se busca desarrollar métodos cuantitativos para valorar la expresión del receptor por su importancia para la predicción de la evolución de la enfermedad como para la selección del tipo de tratamiento a administrar (Brouckaert et al., 2013; Ilić et al., 2019). Además, las medidas generalmente se realizan en un solo punto de tiempo, pero la expresión puede fluctuar y algunas células que aparecen como ER α - en el momento de la tinción podrían volver a expresar niveles detectables de receptor en otro momento (Clarke et al., 2015). Por lo tanto, la heterogeneidad tiene aspectos espaciales y temporales que pueden ser más dinámicos de lo que se entiende actualmente (Aleskandarany et al., 2018; Clarke et al., 2015; Currin et al., 2016)

Desafortunadamente, gran parte de los tumores que inicialmente responden a las terapias hormonales dejan de responder y adquieren resistencia (Clarke et al., 2015; Jordan and O'Malley, 2007). ¿Cómo es posible que los tumores adquieran resistencia a las terapias endocrinas? La prevalencia de los tumores cuyas células se vuelven todas en ER α - es incierta, pero puede alcanzar solo el 10% (Broom et al., 2009; Clarke et al., 2015). Respecto a este porcentaje, se ha propuesto que el tratamiento hormonal podría contribuir a suprimir las células ER α +, y con el tiempo promover la preponderancia de las células ER α -. En relación a los tumores que conservan la expresión del ER α en sus células (la mayoría) se propone que la resistencia endocrina podría basarse en cambios en las propiedades funcionales del receptor, cuya actividad podría cambiar de actividad dependiente de ligando a independiente de ligando. Este cambio en la actividad del receptor traería como consecuencia, que las células dejen de depender de los estrógenos para impulsar su proliferación. Es decir, la presencia de ER α funcional ya no sería un requisito para la supervivencia y proliferación celular; se adaptarían al ambiente (Clarke et al., 2015).

Dado que el 40-60% de tumores de mama ER α + no responden inicialmente a las terapias endocrinas y que alrededor del 90% de los tumores ER α + que adquieren resistencia endocrina no pierden la expresión del ER α nos preguntamos. ¿Es posible que parte de los cambios en las propiedades funcionales de ER α en las cuales se podría basar la resistencia endocrina se deban a conformaciones contexto celulares específicas? Es decir, ¿Es posible que la conformación resultante del receptor sea dependiente del contexto celular y que las diferencias de conformación influyan en las interacciones que pueda establecer el receptor y por lo tanto en su funcionalidad?

2.1.2 Elección del modelo celular para el estudio de la funcionalidad del receptor

Como aproximación para intentar responder las preguntas planteadas decidimos estudiar la funcionalidad del receptor en un modelo de EMT derivado de cáncer mamario. Esta elección se basó, en parte, en que uno de los sistemas con diferencias reportadas en la actividad del receptor es entre tipos celulares diferenciados y no diferenciados (Mérot et al., 2004) y justamente, la EMT es por definición, un proceso a través del cual células epiteliales diferenciadas adquieren un fenotipo mesenquimal inmaduro.

El modelo celular elegido fue el desarrollado por el equipo de Gilles Flouriot derivado de células MCF7. La línea celular MCF7 es una de las líneas celulares derivadas de tumores mamarios más utilizadas para el estudio de drogas antitumorales dirigidas a tumores luminales (ER α +). Son células ER α + y PR+ que pertenecen al subtipo molecular luminal A. Son sensibles al E2 y dependen de él para proliferar. Expresan altos niveles de transcripción de ER α pero bajos niveles de ER β . Su crecimiento se encuentra controlado por la actividad de ER α y PR, pero además puede estar controlado por los receptores de factores de crecimiento asociados a la membrana plasmática: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y por HER2, ambos presentes en las células MCF-7. Es una línea poco agresiva y no invasiva, que normalmente se considera que tiene un bajo potencial metastásico. Las células MCF-7 presentan características de epitelio mamario diferenciado: son positivas para marcadores epiteliales, como E-cadherina, β -catenina y citoqueratina 18 (CK18), y negativas para marcadores mesenquimales, como vimentina y actina de músculo liso (ACTA2). Es decir, se encuentran en el extremo diferenciado del espectro de la EMT. Las células MCF-7 también mantienen la expresión de otros marcadores moleculares específicos de las capas epiteliales naturales, como las claudinas y la proteína 1 de la zona oculta (ZO-1), entre otras proteínas que constituyen las uniones intercelulares. Por otro lado, las células MCF-7 son deficientes en CD44 (Comşa et al., 2015).

Otro de los componentes del modelo celular desarrollado por Gilles Flouriot y su grupo son las células que sobreexpresan el mutante MKL1 Δ N200 (ver detalles en la introducción). La sobreexpresión de este mutante en las células MCF7 activa la vía MKL1/actina provocando la disminución de la expresión de los receptores hormonales ER α , PR y HER2 y de marcadores de escape hormonal como GATA3, un perfil típico de tumores de tipo basal. Además presentan un aumento de marcadores mesenquimales como la disrupción de fibras de E-cadherina y un aumento de la expresión de vimentina y de actina (Kerdivel et al., 2014). La activación de la vía MKL1 suprime el crecimiento celular dependiente de E2 y promueve la resistencia a la inhibición de las respuestas transcripcionales inducidas por tamoxifeno, sugiriendo que la activación de MKL1 podría ser un mecanismo potencial por el cual las células tumorales de mama escapan del control hormonal y se vuelven resistentes a las terapias hormonales.

Utilizando este modelo nos planteamos entonces, como objetivo, explorar si existen cambios en las propiedades funcionales del receptor que puedan estar involucrados en el desarrollo de la resistencia a terapias hormonales vinculadas a la acumulación nuclear de MKL1 mediante el sistema MCF7 MKL1 Δ N200. Para ello, primero confirmamos mediante el análisis de arrays de tejidos que la localización nuclear de MKL1 está asociada con la resistencia endocrina en una cohorte de tumores de mama. Luego, para confirmar la pérdida de respuesta a E2 evaluamos mediante microarrays los perfiles de expresión génica de las líneas MCF7 y MCF7 MKL1 Δ N200 con y sin E2. Además, para evaluar si la pérdida de respuesta hormonal podría estar asociado a cambios en la actividad transcripcional del ER α analizamos los sitios de unión del ER α al ADN mediante inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a secuenciación masiva (ChIP-Seq). Los resultados obtenidos dieron lugar a la publicación de un trabajo titulado "Nuclear accumulation of MKL1 in luminal breast cancer cells promotes endocrine resistance by impairing genomic activity of ER α " en BBA -

Gene Regulatory Mechanisms, artículo que se adjunta al final de este capítulo. En lo que respecta a este artículo, mi participación directa fue en el análisis de los resultados de microarrays de expresión.

2.2 Resultados

2.2.1 La acumulación nuclear de MKL1 favorece la invasividad y disminuye la eficiencia de transactivación de ER α

Para verificar la asociación entre la localización subcelular de MKL1 y la malignidad de las células tumorales de mama se analizó la localización subcelular de MKL1 (como indicador de su actividad) en varias líneas celulares con distintas características. En líneas celulares no tumorigénicas (MCF10A) y en líneas lumbinales ER α + (MCF7, T47D, ZR751) MKL1 se mostró principalmente citoplasmática mientras que en células basales que parecen haber transitado una EMT (MDA-MB-468, MDA-MB-231, SUM159PT) MKL1 se mostró principalmente nuclear. En la línea MCF7 AKT+, una línea ER α + que muestra resistencia endocrina, MKL1 resulta ligeramente nuclear. En todas las líneas testeadas los niveles de expresión de MKL1 medida por western blot resultaron similares.

Se analizó la capacidad de migrar e invadir de estas líneas celulares a través de ensayos de invasividad en matrigel. Los resultados mostraron una correlación entre MKL1 nuclear y la invasividad: las líneas basales (MDA-MB-231 y SUM159PT) resultaron muy invasivas mientras que las líneas ER α + resultaron no invasivas.

Mediante transfecciones transitorias con una construcción plasmídica que contiene el elemento de respuesta a estrógenos ERE unido al gen reportero Luciferasa, se evaluó la eficiencia de transactivación del ER α en estas líneas y se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de transactivación de las líneas ER+ (eficiencia muy alta) y las basales (eficiencia baja). Por otra parte, para confirmar la correlación entre la localización nuclear de MKL1, la invasividad y la eficiencia de transactivación del receptor se evaluó el efecto de forzar la localización nuclear de MKL1. Para ello se utilizaron 2 estrategias en células MCF7 y T47D: (i) transfección transitoria de las células con una construcción con la secuencia codificante MKL1 Δ N200; (ii) tratamiento de las células con jasplakinolide, un inductor de la polimerización y estabilizador de la actina filamentosa que induce la localización nuclear de MKL1. En todos los casos se observó una disminución de la eficiencia de transactivación del ER α y un aumento de la capacidad de invasión de las células en matrigel.

Estos resultados en su conjunto muestran un vínculo estrecho entre la localización nuclear de MKL1, la capacidad para invadir y la disminución de la eficiencia de transactivación del receptor.

2.2.2 La acumulación nuclear de MKL1 se asocia con resistencia endocrina en los tumores de mama.

Considerando los resultados obtenidos en líneas celulares, se exploró el vínculo entre la localización de MKL1 y la del ER α en tejidos sanos y tumorales. Mediante inmunofluorescencia se confirmó que en tejidos mamarios sanos MKL1 se localiza en el núcleo de las células basales/mioepiteliales, mientras que el ER α está presente en un pequeño número de células luminales y no se observó la co-localización nuclear de las dos proteínas. Por el contrario, en tumores malignos ER α + se detectó la co-localización nuclear de las proteínas ER α y MKL1 en algunas células ER α + que comienzan a expresar un alto nivel de MKL1.

Para profundizar en estos resultados, se analizó la expresión y localización de MKL1 mediante inmunohistoquímica en un microarray de tejidos que incluye 130 muestras de tejidos de pacientes con cáncer de mama y que comprende varios subtipos tumorales. Se cuantificó el porcentaje de células que muestran a MKL1 nuclear en cada muestra y se detectó un elevado número de células con MKL1 nuclear en el tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente no tumoral (más del doble) con la excepción del subtipo ER α + / PR+ / HER2-.

A continuación se evaluó si los tumores de mama ER α descritos clínicamente como resistentes a terapias hormonales podrían discriminarse en función de la abundancia de las células con marcaje de MKL1 nuclear. Las muestras se dividieron en dos grupos: aquellas que mostraron una señal alta de MKL1 nuclear (más del 30% de las células de la muestra presentan MKL1 nuclear) y las que mostraron una señal baja o nula (menos del 30% de las células de la muestra presentan MKL1 nuclear). Se detectó un mayor número o porcentaje de tumores resistentes a las terapias hormonales en el grupo clasificado como tumores con señal alta de MKL1 en comparación al otro grupo, lo que sugiere que la localización nuclear de MKL1 está asociada con la resistencia hormonal en la cohorte analizada.

2.2.3 La resistencia a las terapias hormonales se asocia a cambios funcionales del ER α

Con el fin de explorar el vínculo entre la resistencia a las terapias hormonales y la funcionalidad del ER α se utilizó el modelo celular desarrollado por el grupo de Gilles Flouriot con el cual se había demostrado previamente que la acumulación nuclear de MKL1 elimina la proliferación inducida por E2 (Kerdivel et al., 2014).

Para entender los procesos biológicos que podrían estar por detrás de las características presentadas por las células MCF7 MKL1 Δ N200 se analizó su perfil de expresión génica en comparación con el de las células control, utilizando microarrays. El análisis de expresión diferencial de genes mostró 1.016 genes sobreexpresados y 976 subexpresados en MCF7 MKL1 Δ N200 en relación a las células control. Un análisis ontológico utilizando estas listas de genes reveló una sobrerrepresentación de genes involucrados en la adhesión celular, interacciones entre receptores y matriz extracelular, organización y migración del citoesqueleto de actina, así como de genes involucrados en cascadas de fosforilación y transducción de señales, funciones que son consistentes con la inducción de EMT (Lamouille et al., 2014). Además, se observó una subrepresentación de genes implicados en la remodelación de la cromatina y en la metilación del ADN, procesos que también se han asociado con la EMT (Stadler and Allis, 2012; Tam and Weinberg, 2013). Considerando

que los patrones de expresión génica permiten clasificar los tumores de mama en los principales subtipos moleculares, a continuación se investigó la expresión de subconjuntos de genes que son distintivos de algunos subgrupos clínicamente relevantes. El análisis mostró una asociación significativa de las células MCF7 y las células MKL1 Δ N200 al conjunto de genes marcadores luminales y basales, respectivamente. Por lo tanto, el análisis de microarrays sugiere una transición parcial del fenotipo luminal al basal de las células MCF7 al inducir la expresión de MKL1 Δ N200 o MKL1 nuclear.

Para confirmar estos resultados se evaluó la expresión y localización de algunos marcadores basales y luminales mediante inmunohistología. Los resultados mostraron una sobreexpresión de todos los marcadores basales testeados (KRT14, CDH3, VIM, ACTA1 y HER1) así como la de FOXC1, un factor de transcripción que regula la EMT en células basales. Por otra parte, respecto a los marcadores luminales testeados se observó que: CDH1 (cadherina epitelial) estaba en forma desensamblada; los niveles de GATA3 estaban ampliamente disminuidos; no se observaron diferencias en KRT18 y se observó un aumento de FOXA1. En particular, los niveles del ER α disminuyeron en un 60%.

A continuación nos propusimos identificar aquellos genes cuya expresión podría estar regulada por E2 en ambos contextos celulares y, en particular, cuáles cambian esta regulación después de la translocación de MKL1 al núcleo. Utilizando microarrays comparamos los niveles de expresión génica en las líneas celulares MKL1 Δ N200 y MCF7 control después de un tratamiento de 4 horas con E2. En las células MCF7 control se encontraron 225 genes regulados por E2 (185 sobreexpresados y 40 subexpresados; p-value < 0.05 y fold change > \pm 1.8). Un análisis de ontologías y vías enriquecidas en estos genes reveló términos y vías que han sido previamente descritos como regulados por E2 en células MCF7. Por otra parte, solo se encontraron 2 genes regulados por E2 en las células MKL1 Δ N200. En general, el promedio de los cambios en la expresión de los 185 genes sobreexpresados en las células control disminuyó de 2.3 a 1.2 en las células MKL1 Δ N200, mientras que en los 40 genes subexpresados aumentó de 0.5 a 0.87. Estos datos sugieren que las células MKL1 Δ N200 pierden la regulación transcripcional por E2. Entre los 223 genes que pierden su capacidad de respuesta a E2 y los dos que la han conservado, 109 también presentaron cambios en su expresión entre ambas líneas celulares en ausencia de ligando. Se observó que gran parte de los genes que son subexpresados en MCF7 cuando estas son tratadas con E2, también son subexpresados cuando MKL1 se trasloca al núcleo. Esto no es así para los genes sobreexpresados por E2, por lo que podría existir una correlación entre los efectos de E2 y la translocación de MKL1 en la reducción de la expresión de genes. Los resultados fueron confirmados mediante RT-qPCR en este modelo celular y, adicionalmente, en las líneas MCF7 y T47D tratadas con jasplakinolide que induce la traslocación al núcleo de MKL1.

A continuación se buscó determinar si la pérdida de la respuesta a E2 de algunos genes podría ser una consecuencia de cambios en los sitios de unión del ER α al ADN. Para ello se trataron células MKL1 Δ N200 y MCF7 control con E2, durante 50 minutos tiempo reportado como adecuado para detectar sitios de unión directa del ER α al ADN. En esas condiciones se determinaron los sitios de unión, el cistroma, mediante ChIP-seq. Los sitios de unión conservados en las condiciones de presencia y ausencia de tratamiento con E2 en cada

línea celular, son muy pocos (menos del 5% o 1% en células control o MKL1 Δ N200, respectivamente), sugiriendo que hay una reprogramación en ambas líneas de los sitios de unión del ER α al ADN inducida por E2.

Por otra parte, los resultados muestran que la expresión de MKL1 Δ N200 reduce los sitios de unión del ER α al ADN en forma independiente del ligando. Se encontraron 1,439 y 454 sitios en ausencia de E2 en las células control y MKL1 Δ N200, respectivamente, mientras que en presencia de E2 se encontraron 6.237 y 2.658, respectivamente. Los resultados además sugieren una reprogramación de los sitios de unión del ER α al ADN inducida por la expresión de la proteína MKL1 Δ N200 ya que los sitios compartidos por ambas líneas celulares son relativamente pocos: solo 1 sitio es compartido en ausencia de ligando y 367 en presencia de E2. Algunos de estos resultados fueron confirmados por ChIP-qPCR. Los experimentos de qPCR además sugieren que hay una disminución de la unión del ER α a sus sitios de unión en los promotores de genes que pierden su regulación por E2 en las células MKL1 Δ N200 pero cuyos sitios de unión son encontrados en dicho cistroma. Así mismo, se observó una reducción total o parcial del reclutamiento de ER α en potenciadores distantes que establecen bucles de cromatina con el promotor de los 2 genes que no pierden la respuesta a E2 en MKL1 Δ N200: GPR68a e IFITM10a. Para explorar si el ER α participa en los cambios funcionales inducidos por la expresión de MKL1 Δ N200 se analizó si los genes supuestamente regulados por los sitios de unión del ER α encontrados en esta línea comparten anotaciones específicas. Como resultado se encontró una vinculación de estos genes a las vías EGF y RAS.

A continuación exploramos si hay un cambio en los motivos a los cuales el receptor se une en ambas líneas celulares. Los ERE son los primeros motivos encontrados en cada cistroma, excepto en los sitios unidos por ER α en ausencia de E2 en las células MKL1 Δ N200 MCF7. Esto sugiere que el cistroma del ER α en las células Δ N200 MCF7 tiene propiedades específicas. Por otra parte, también se observa la pérdida de unión del ER α a motivos de unión de GATA3 mientras que la unión a motivos a los cuales se une FOX1 se mantiene.

Para explorar si los cambios en la unión del ER α a distintos motivos podría estar involucrada con la pérdida de respuesta hormonal se intentó correlacionar la ganancia o pérdida de motivos a los cambios de expresión génica detectados mediante microarrays. No se encontró correlación entre los cambios de la expresión génica con la ganancia o pérdida o identidad de los motivos. Sin embargo, se encontró una disminución general de la señal obtenida por ChIP-seq en las células MKL1 Δ N200 MCF7 que sugiere menos cantidad de receptor unido al ADN, lo cual es compatible con la disminución de la cantidad de proteína.

En resumen, el análisis comparativo del cistroma del receptor en células MCF7 y MKL1 Δ N200 MCF7 indica que la unión del ER α al genoma de las células MCF7 se encuentra fuertemente afectada por la expresión de la proteína MKL1 Δ N200. La reprogramación implica una pérdida masiva de sitios de unión y un menor reclutamiento del ER α a los sitios de unión conservados que pueden explicar al menos en parte la pérdida de la regulación de la transcripción mediada por estrógenos. Esto se asocia en parte a la disminución de la

cantidad de proteína ER α en las células MKL1 Δ N200, pero también aparecen nuevos sitios en estas células, aunque su asociación con una función fisiológica particular no es clara.

2.3 Discusión

El objetivo de este trabajo es explorar si existen cambios en las propiedades funcionales del receptor que puedan estar involucrados en el desarrollo de la resistencia a terapias hormonales vinculadas a la acumulación nuclear de MKL1 mediante el sistema MCF7 MKL1 Δ N200. Como paso previo, antes de profundizar en los cambios funcionales del ER α en el sistema, nos propusimos establecer si, al menos en parte, la acumulación de MKL1 nuclear genera resistencia a terapias hormonales en tumores. La evidencia previa sugería que en las células MCF7 la acumulación nuclear de MKL1 elimina la proliferación celular inducida por E2. En este trabajo, nos pareció importante analizar lo que ocurre en tejidos tumorales. Para ello, mediante el análisis de arrays de tejidos confirmamos que la localización nuclear de MKL1 está asociada con la resistencia endocrina en una cohorte de tumores de mama en forma independiente al tipo tumoral al que pertenece. Cabe destacar que, de acuerdo a la bibliografía, 30 a 50% de los tumores recurrentes que surgen de pacientes con cáncer de mama primario ER α + no responden a la terapia endocrina [8,9]. Por lo que, comprender los mecanismos subyacentes de esta progresión es un gran desafío hacia el diseño de tratamientos eficientes.

¿Cómo se vincula la translocación nuclear de MKL1 a los tipos tumorales descritos? La cuantificación de células que presentan a MKL1 nuclear muestra un porcentaje significativamente mayor en el tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente no tumoral en los tipos tumorales analizados, con la excepción del subtipo ER α + / PR+ / HER2- (luminal A). Estos últimos son los que presentan un mejor pronóstico en lo que respecta a las terapias hormonales, por lo que sería consistente con estos resultados, en lo que respecta a la resistencia hormonal y localización nuclear de MKL1. Cabe destacar que en cada tumor, las células son heterogéneas en su expresión y localización de MKL1. Esto es lo que sucede habitualmente con la expresión de los receptores hormonales ER α , PR y HER2 en que se basa la clasificación de tumores, y de hecho, es uno de los desafíos descritos para la elección de tratamiento en base a la presencia de estos receptores (Allott et al., 2016; Chung et al., 2007; Tuasha and Petros, 2020; Turashvili and Brogi, 2017). En este sentido, MKL1 no es una excepción, y a pesar de que se observa una asociación entre la localización nuclear de MKL1, el tipo celular basal y la resistencia endocrina del tumor, no es posible generalizar.

Por otra parte, en lo que respecta al modelo celular elegido, de acuerdo a la caracterización realizada por el grupo de Gilles Flouriot, las células MCF7 MKL1 Δ N200 presentan características de células tumorales basales con una disminución de la expresión de los receptores hormonales ER α , PR y HER2 y de marcadores de escape hormonal como GATA3 (Kerdivel et al., 2014). Las células MCF7 han sido caracterizadas en la bibliografía como de tipo luminal. El análisis a partir de los datos de expresión génica por microarrays muestra que, en base a su expresión génica, las células MCF7 presentan perfiles de expresión luminales mientras que las células MKL1 Δ N200 presentan perfiles de expresión

basales, confirmando lo previamente descrito. Por lo que, este modelo podría representar el cambio transitado por tumores luminales a basales inducido por la translocación nuclear de MKL1.

Para explorar si existen diferencias en la funcionalidad del receptor nos concentramos en la actividad transcripcional del receptor en forma dependiente de ligando. Para ello primero evaluamos mediante microarrays los perfiles de expresión génica de las líneas MCF7 y MCF7 MKL1 Δ N200 con y sin E2, como indicador de la actividad funcional del receptor. Los resultados mostraron que no hay casi diferencias significativas en la expresión génica al tratar a las células MKL1 Δ N200 con E2 a diferencia de lo que sucede en las MCF7 donde el E2 cambia el perfil de expresión. A pesar de que estos resultados dependen de la elección de los criterios elegidos para definir cambios significativos (Fold change y FDR) y no significa que en MKL1 Δ N200 no haya ningún tipo de cambio en su perfil de expresión génica, sí muestran una pérdida de respuesta a E2. Para evaluar si la pérdida de respuesta hormonal podría estar asociado a cambios en la actividad transcripcional del ER α analizamos los sitios de unión del ER α al ADN mediante ChIP-seq. Los resultados muestran en términos generales, que hay una pérdida masiva de sitios de unión y un menor reclutamiento del ER α a los sitios de unión conservados, mientras que, a su vez, aparecen nuevos sitios en forma independiente de la presencia de hormona. Los resultados muestran un cambio importante en los sitios de unión del receptor entre ambas líneas celulares. En ausencia de E2 se conserva únicamente un sitio de unión, mientras que en presencia de E2 MKL1 comparte menos de un 14% de los sitios de unión del ER α con MCF7. Es interesante notar que la inducción con E2 en ambos casos aumenta ampliamente el número de sitios de unión, sugiriendo que la unión al ligando se mantiene, aunque puede ser con afinidades y cambios conformacionales inducidos en el ER α diferentes. Sin embargo, a pesar del aumento del número de los sitios de unión en las células MKL1 Δ N200 no hay cambios significativos en la expresión génica. ¿Cuál es el rol del ER α en estos sitios? ¿puede ser que actúe como factor de transcripción activo y haya degradación del mensajero? ¿puede estar "secuestrado" en estos sitios?. Sería interesante poder diferenciar entre las uniones directas y las indirectas al ADN ya que en la estrategia utilizada se detectan los complejos proteicos unidos al ADN en los cuales participa el receptor. De esta manera se tendría una mejor caracterización de aquellos casos en que el receptor actúa como factor o como cofactor de transcripción. En lo que respecta al ERE, el motivo de unión directo al ADN más representativo y estudiado del ER α , vemos que se pierde en las células MKL1 Δ N200 en estado basal, pero que se recupera cuando estas células son tratadas con E2. ¿Continúa siendo un motivo de unión directa al ADN del receptor en presencia de E2? ¿Cómo es la unión del receptor al resto de los motivos? Queda mucho por profundizar para entender los cambios específicos en el tipo de actividad y sitio a sitio. Por otra parte, en los experimentos realizados no se estudió la actividad no genómica del receptor, por lo que también sería interesante determinar a futuro si esta actividad se encuentra modificada entre ambas líneas celulares.

En definitiva, mostramos que existe un cambio en la actividad funcional del receptor como consecuencia de la translocación nuclear del MKL1, pero ¿cómo se conecta la translocación nuclear de MKL1 a cambios funciones del ER α ? ¿cómo se puede vincular la resistencia endocrina a la translocación nuclear de MKL1? En los experimentos realizados en tejidos

sanos no se ve colocalización nuclear entre ambas proteínas en ningún caso. En células normales basales MKL1 es nuclear mientras que el receptor aparece en algunas células luminales. Sin embargo, en algunas células que son parte de tumores se observa la colocalización nuclear de ambas proteínas, principalmente en aquellas células con alta expresión de MKL1. ¿Es posible que los factores de transcripción de los cuales MKL1 es cofactor interfieran con los sitios de unión del ER α en el genoma? Las diferencias encontradas en el cistroma del ER α entre las células MCF7 y MCF7 MKL1 Δ N200 sugieren que esto es una posibilidad. Cómo se mencionó anteriormente, cuando MKL1 es nuclear, sin estimulación con E2, hay una pérdida masiva de sitios de unión y un menor reclutamiento del ER α a los sitios de unión conservados, mientras que, a su vez, aparecen nuevos sitios. Una posibilidad es que de alguna manera la redistribución de MKL1 en el núcleo excluya al ER α de sus motivos de unión habituales como los EREs. Para confirmar si MKL1 puede estar actuando como cofactor o correpresor en estos sitios sería interesante realizar el cistroma de MKL1. Por otra parte, en el cistroma del ER α no aparecen motivos de unión a SRF, por lo que el ER α y MKL1 no parecen estar interactuando directamente a través de la vía clásica de SRF de quien MKL1 es cofactor. De todas formas, no se puede descartar interacciones directas sin, por ejemplo, hacer un ensayo de ligadura de proximidad o una inmunoprecipitación que permita identificar si el receptor interactúa con MKL1. Además, diferencias en la expresión de los interactores de ER α , como es el caso de GATA3, puede potencialmente afectar los sitios de unión.

Otra posibilidad es un cambio en la conformación del receptor que cambie la afinidad por sus sitios de unión. Esta hipótesis es compatible con todos los resultados observados y es en la que el grupo se propone profundizar en trabajos futuros. El cambio de conformación podría originarse tanto por cambios durante su síntesis (lo cual iría en la línea de nuestra hipótesis de trabajo), pero también por cambios en las modificaciones postraduccionales inducidas por cambios en el contexto celular en forma independiente de su síntesis. En lo que respecta al último punto, se han descrito múltiples sitios de modificaciones postraduccionales que se han vinculado a la eficiencia de transactivación del receptor, a su dimerización y a su translocación al núcleo (Anbalagan et al., 2012; Maggi, 2011; Tecalco-Cruz et al., 2017; Wang et al., 2005). En cualquier caso, son necesarios ensayos adicionales para profundizar en este aspecto. Diferentes aproximaciones podrían incluir análisis de modificaciones postraduccionales, estudios de afinidad por distintos ligandos, ensayos de proteólisis limitada que evidencien diferencias en la resistencia del receptor a la enzima y ensayos de unión al ADN.

2.4 Conclusión

Confirmamos que la localización nuclear de MKL1 está asociada con la resistencia endocrina en una serie de tejidos de cáncer de mama. Por una parte, en líneas celulares se confirmó la asociación entre la localización nuclear de MKL1 (activa), el grado de malignidad de las células, su capacidad de invasión y la disminución en la eficiencia de transactivación del receptor. Además, mediante el análisis de arrays de tejidos se mostró que en tejidos sanos no hay colocalización de MKL1 y ER α , siendo MKL1 nuclear en células basales y el ER α en luminales. En tejidos tumorales se observó una colocalización nuclear del ER α y MKL1 en células que empiezan a expresar MKL1. Se detectó un gran aumento de

MKL1 nuclear en el tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente al tumor. Por último, se evidenció una asociación entre la localización nuclear de MKL1 y la resistencia hormonal en tejidos.

¿Se puede vincular la resistencia hormonal a la funcionalidad del ER α ? Utilizando principalmente el modelo celular MCF7 control y MKL1 Δ N200 se mostró la pérdida de la inducción de expresión de genes por E2 en un contexto de resistencia a terapias hormonales asociada a la localización nuclear de MKL1. Además, se mostró que esta pérdida se puede explicar en parte a una reducción de su expresión y a cambios en los sitios de unión del ER α al ADN, indicando la vinculación de la resistencia hormonal a cambios en la funcionalidad del receptor.

En resumen, encontramos que una acumulación nuclear de MKL1 en células de cáncer de mama ER α positivas da como resultado una reprogramación de la expresión génica y cambio de fenotipo de las células desde un tipo luminal a un fenotipo mixto luminal/basal, confiriendo cambios en la actividad ER α y el desarrollo de resistencia hormonal. Estos resultados abren la puerta a muchas interrogantes y a futuros estudios tanto en lo que respecta al vínculo entre la translocación de MKL1, la funcionalidad del ER α y la resistencia hormonal y su importancia para el desarrollo de fármacos; así como también, en lo que respecta al origen de los cambios funcionales del ER α .



Nuclear accumulation of MKL1 in luminal breast cancer cells impairs genomic activity of ER α and is associated with endocrine resistance

Charly Jehanno^{a,b,1}, Tamara Fernandez-Calero^{c,d,e,1}, Denis Habauzit^a, Stephane Avner^f, Frederic Percevault^a, Emmanuelle Jullion^f, Pascale Le Goff^a, Marie May Coissieux^b, Simone Muenst^g, Monica Marin^c, Denis Michel^a, Raphaël Métivier^f, Gilles Flouriot^{a,*}

^a Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail) – UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

^b University Hospital Basel, University of Basel, Basel, Switzerland

^c Biochemistry-Molecular Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^d Bioinformatics Unit, Institut Pasteur Montevideo, Matajojo 2020, 11400 Montevideo, Uruguay

^e Departamento de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Católica del Uruguay, Montevideo, Uruguay

^f Univ Rennes, Institut de Génétique et Développement de Rennes, UMR 6290 CNRS, Rennes, France

^g Institute of Medical Genetics and Pathology, University Hospital Basel, University of Basel, Basel, Switzerland

ARTICLE INFO

Keywords:

Breast cancer
Endocrine resistance
Estrogen receptor
MKL1
Gene regulation
Cistrome

ABSTRACT

Estrogen receptor (ER α) is central in driving the development of hormone-dependent breast cancers. A major challenge in treating these cancers is to understand and overcome endocrine resistance. The Megakaryoblastic Leukemia 1 (MKL1, MRTFA) protein is a master regulator of actin dynamic and cellular motile functions, whose nuclear translocation favors epithelial-mesenchymal transition. We previously demonstrated that nuclear accumulation of MKL1 in estrogen-responsive breast cancer cell lines promotes hormonal escape. In the present study, we confirm through tissue microarray analysis that nuclear immunostaining of MKL1 is associated with endocrine resistance in a cohort of breast cancers and we decipher the underlining mechanisms using cell line models. We show through gene expression microarray analysis that the nuclear accumulation of MKL1 induces dedifferentiation leading to a mixed luminal/basal phenotype and suppresses estrogen-mediated control of gene expression. Chromatin immunoprecipitation of DNA coupled to high-throughput sequencing (ChIP-Seq) shows a profound reprogramming in ER α cistrome associated with a massive loss of ER α binding sites (ERBSs) generally associated with lower ER α -binding levels. Novel ERBSs appear to be associated with EGF and RAS signaling pathways. Collectively, these results highlight a major role of MKL1 in the loss of ER α transcriptional activity observed in certain cases of endocrine resistances, thereby contributing to breast tumor cells malignancy.

1. Introduction

Breast cancers exhibit strong heterogeneity from genetic and phenotypic features to clinical behavior [1]. Based on global gene expression profiles, at least four major molecular subtypes have been identified, including luminal A, luminal B, HER2-enriched and basal-like tumor [2,3]. Estrogen receptor-alpha (ER α) expression defines the luminal subtypes. More than two-thirds of breast cancers overexpress ER α allowing most of them to depend on estrogen to proliferate [4,5].

This specificity makes ER α an ideal target for endocrine therapies that use selective estrogen receptor modulators (SERM) such as tamoxifen and/or aromatase inhibitors to block estrogen-dependent cell proliferation [6,7]. Unfortunately, a significant number of ER α positive breast tumors fail to initially respond to endocrine therapy or stop benefiting from such treatments and acquire resistance [8,9]. Endocrine resistance often relies on changes in the functional properties of ER α , whose activity may shift from ligand-dependent to ligand-independent activity [9]. Actually, luminal A breast cancers generally express higher

Abbreviations: ChIP-Seq, chromatin immunoprecipitation of DNA coupled to high-throughput sequencing; DMEM, dulbecco's modified Eagle's medium; E2, 17 β -estradiol; ER α , estrogen receptor alpha; ERBS, ER α binding site; EMT, epithelial-mesenchymal transition; FCS, fetal calf serum; HER1, human epidermal growth factor receptor 1; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; MaSC, mammary stem cell; MKL1, megakaryoblastic leukemia 1; MRTFA, myocardin-related transcription factor A; PR, progesterone receptor; SERM, selective estrogen receptor modulators; SRF, serum response factor; TNBC, triple-negative breast cancer

* Corresponding author at: Irset, Inserm U1085, 9 rue du Prof. Léon Bernard, 35000 Rennes cedex, France.

E-mail address: gilles.flouriot@univ-rennes1.fr (G. Flouriot).

¹ Contributed equally to the work.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2020.194507>

Received 13 December 2019; Received in revised form 31 January 2020; Accepted 13 February 2020

Available online 27 February 2020

1874-9399/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

level of ER α , exhibit better response to endocrine therapy and have better prognosis than luminal B subtype [10,11]. These last years, estrogen signaling in luminal breast cancer cells was deeply explored through gene expression and genome-wide chromatin binding profiling using both cell lines and human tumors [12–14]. Data highlighted that ER α binds to several thousand of sites across the genome and that most of these sites are located far away from the promoter regions. The genomic regions bound by ER α are enriched with cis-regulatory elements bound by pioneer factors, notably FOXA1 and GATA3 whose expression is correlated with luminal subtype [15]. ER α binding to chromatin still occurs in breast cancer cell lines and tumors that are resistant to antiestrogen therapies [14]. However, these cells do present a modified cistrome of ER α , having lost a number of ER α binding sites (ERBSs) but also harboring specific ones. Interestingly, these novel ERBSs found in antiestrogen-resistant cells, are still bound by FOXA1 but are depleted in GATA3 motifs. In addition, the ER α cistrome in drug resistant cell lines and tumors is characterized by an increased average ER α binding signal intensity likely resulting from a constitutively active estrogen receptor. The transcriptomic signature of these cells remains associated with ER α -positive luminal subtype [14]. More aggressive in nature, with higher proliferation and metastasis potential than luminal subtypes, basal-like tumors often have a triple ER α /progesterone receptor (PR)/HER2 negative phenotype [2,16]. Consequently, these tumors are not amenable to conventional targeted therapies. Recent studies suggest that basal-like breast cancers originate from luminal cells rather than a mammary stem cell (MaSC) [1,17,18]. Up to 30% of initially ER α -positive tumors that have developed resistance to antiestrogen therapies lose part of ER α expression [19]. Therefore, endocrine resistance may also rely on a dedifferentiation process leading luminal cancers to switch to an ER α -negative phenotype.

MKL1, also called MRTFA, MAL or BSAC, is a member of the myocardin-related transcription factor (MRTF) family, whose members are coactivators of the serum response factor (SRF) [20,21]. Its main role is to sense the degree of actin polymerization controlled by Rho GTPases and to subsequently integrate this information at the gene expression level through a nuclear translocation [20]. As a master regulator of cellular motile and contractile functions, MKL1 exerts important roles in vascular smooth muscle cell and cardiac myocyte differentiation, and neuronal migration [21]. In mammary gland, MKL1 is essential for the basal/myoepithelial cell differentiation and function [22,23]. During tumorigenesis, MKL1 is required for tumor cell invasion and metastasis mediating the adaptive changes in cell shape, adhesion, and migration linked to the actin cytoskeleton [24]. Recent genome-wide association studies have identified MKL1 locus as a susceptible risk factor for breast cancer and especially triple-negative breast cancer (TNBC) [25–27]. We previously showed that the activation of MKL1 in estrogen sensitive breast cancer cell lines leads to hormonal resistance and reduced expression of ER α , PR and HER2, recalling the triple negative phenotype [28]. In the present study, we show that nuclear accumulation of MKL1 is associated with endocrine resistance in a cohort of breast cancers. Using genome wide analysis of gene expression and ER α chromatin binding, we demonstrate that, upon the expression of a constitutively active form of MKL1, initially ER α -positive breast cancer cells initiate a dedifferentiation process associated with a profound reprogramming in ER α cistrome leading to hormonal escape.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and transfection

Stably transfected MCF7 T-Rex sub-clones (T-Rex system, Invitrogen), MCF7-control (with empty pcDNA4/TO expression vector) and MCF7-MKL1 Δ N200 (with MKL1 Δ N200 pcDNA4/TO expression vector), were previously described [28,29]. MCF7 T-Rex sub-clones as well as MCF10A, T47D, ZR-75-1, MCF7 AKT+ [express myr-akt1

(activated) plasmid (Upstate cell signaling solutions)], MDA-MB-468, MDA-MB-231 and SUM159PT cell lines were routinely maintained in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Biowest) and antibiotics (Invitrogen) at 37 °C in 5% CO₂. Before any experiments, cells were grown in phenol red-free DMEM (Invitrogen) containing 2.5% charcoal-stripped FCS (Biowest) for at least 72 h. In order to induce the expression of the constitutively active mutant of MKL1 (MKL1 Δ N200), MCF7 cells were treated the last 48 h with 1 μ g/mL tetracycline. Tetracycline treatment was systematically performed on both MCF7-control and MCF7-MKL1 Δ N200 cells. 17 β -estradiol (E2, Sigma-Aldrich), 4-hydroxytamoxifen (OHT, Sigma-Aldrich) and ICI 182,780 (ICI, Sigma-Aldrich) were used at a final concentration of 1 or 10 nM, 1000 nM and 100 nM, respectively. Jasplakinolide (Abcam) and Erlotinib (Sigma-Aldrich) were used at the final concentration of 0.5 μ g/mL and 100 μ M, respectively. Transient transfection experiments were performed with the reporter gene C3 (complement 3)-Luc, the pCR-ER α expression vector, p3Xflag-MKL1 Δ N200 and the CMV- β gal internal control as previously described [28,30].

2.2. Matrigel invasion assay

3D spheroids of breast cancer cell lines were formed in untreated plastic petri dishes by constant gyrotory shaking at 60 r.p.m. as previously described [31]. Matrigel solution was prepared in culture medium at the final concentration of 1 mg/mL. Resuspended in Matrigel solution, spheroids were then seeded on the top of a matrigel cushion already formed in 96-well plates. To monitor cell invasion of Matrigel, images were taken every 24 h by microscopy (DMIRB-Leica) and the size of the cellular spreading zone was calculated using Image J software.

2.3. Protein extraction and western blotting

Whole-cell extracts were directly prepared in 3 \times Laemmli buffer. Following sonication, the protein extracts were denatured for 5 min at 95 °C, separated on 10% SDS polyacrylamide gels, and transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). Western blots were performed as previously described [28,29] using the primary antibodies against MKL1 (ab14984) from Abcam, ER α (sc-543) and p-ERK (sc-7383) from Santa Cruz Biotechnology, HER1 (SAB1405746) and β actin (A1978) from Sigma-Aldrich and p-Akt (4060), Akt (9272) and ERK 1/2 (4695) from Cell signaling technology.

2.4. Immunofluorescence and immunohistochemical analysis

For cell lines, cells were grown on 10 mm-diameter coverslips in 24-well plates. After treatment, cells were fixed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde (PAF) for 10 min and then permeabilized in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 10 min. Incubation with the primary antibody (1/1000) was performed overnight (ON) at 4 °C. Primary antibodies against N-cadherin (N19, sc-1502), P-cadherin (H105, sc-7893), cytokeratin 14 (LL02, sc-58,724), cytokeratin 18 (C-04, sc-51,582), ER α (C-terminal, HC-20, sc-543), GATA3 (sc-22,206) and HER1 (1005, sc-03) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies directed against E-cadherin (ab15148), alpha smooth muscle actin (ab5694), MKL1 (ab14984), FOXC1 (ab5079), FOXA1 (ab23738), P300 (ab14984) and HER2 (ab16901) were obtained from Abcam. Anti-vimentin (clone V9) antibody was purchased from Sigma-Aldrich. Primary antibody against ER α (N-terminal, 6F11) was purchased from Thermo Fisher Scientific. Dye-conjugated secondary antibodies (Abcam) were incubated 1 h at room temperature. The cover slides were mounted in Duolink II mounting medium with DAPI (Sigma-Aldrich), images were obtained with an ApoTome Axio Z1 Imager microscope (Zeiss) and processed with Axio Vision Software. Fluorescence was quantified with ImageJ software from images obtained with identical exposure times.

Immunofluorescence was scored for at least 20 cells per image on *n* images obtained from diverse experiments. The means obtained for every image were then averaged.

For MKL1 and ER α co-labeling experiments on tissue sections, paraffin-embedded tissues were cut at 4 μ m, mounted on positively charged slides and dried at 58 °C for 60 min. Immunohistology staining was performed on the Discovery XT Automated IHC stainer using the Ventana detection kit and Discovery Rhodamine and FAM kits (Ventana Medical Systems, Tucson, Ariz). Primary antibodies were anti-ER α (6F11, Thermo Fisher Scientific) and anti-MKL1 (HPA030782, Sigma-Aldrich).

For the immunohistochemical analysis, MKL1 staining on tissue microarrays (TMA) from breast cancer was performed using a Ventana Benchmark Discovery instrument (Roche Diagnostics). 4 μ m sections of the TMA blocks were pretreated with CC1 for 40 min. Then, slides were incubated with MKL1 primary antibody (ab14984, Abcam) at a dilution of 1:50 for 1 h, followed by secondary antibody incubation and detection. Hematoxylin II and bluing reagent (Ventana, Roche diagnostics) were used for counterstaining. Samples were scored as positive when the number of cells per sample displaying nuclear localization of MKL1 was superior to 30% or as low positive/negative when this number was below 30%. The blinded analysis of MKL1 expression was performed two times on two independent MKL1 staining of the TMA slides. For immunohistochemistry sections, images were captured using a Nikon Ni-e upright microscope coupled to a PRIOR slide loader. Acquisitions were performed with a 10 \times AIR objective with a DS-Fi3 camera using NIS software. Written informed consent was obtained from patients and the institutional ethics committee approved the study.

2.5. RNA extraction, gene expression array and RT-PCR assays

RNA purifications were performed immediately after a treatment of MCF7 cells with 10 nM E2 or ethanol (vehicle control) for 4 h. RNAs were extracted with the RNeasy kit (Quiagen) and the quantity and quality of RNAs were assessed using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Nanodrop technology) and an Agilent Bioanalyser. RNAs were then reverse-transcribed and the obtained cDNA were amplified and Cy3-labelled according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies). Gene expression profiling was carried out on Agilent Whole Human Genome 8x60K Microarrays (Agilent Technologies) at the Biosit Rennes facility. Four independent RNA samples per condition (*n* = 4) were randomly examined. Data analysis was performed using 'R' (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), mainly through packages included in the Bioconductor suite [32]. Probes were filtered considering saturation, signal above background and uniformity. Only those with no replicate flagged in at least one condition were taken into account for data analysis. Samples were normalized using 75-percentile shift normalization. Gene expression values were computed as the median intensity values of all filtered probes design for each particular gene. Differential expression was assayed using the limma software package [33]. When we compared MCF7-MKL1 Δ N200 and MCF7-control cells, genes were considered differentially expressed when the multiple testing adjusted P-value was < 0.01 and the absolute value of fold change > 4. When we analyzed E2 transcriptional regulation, genes were considered differentially expressed when the multiple testing adjusted P-value was < 0.05 and the absolute value of fold change > 1.8. Gene Ontology analysis and Kegg pathways enrichment analysis were conducted with clusterProfiler [34]. Up-regulated and down-regulated genes were used independently in these analyses. Quantitative RT-PCRs were performed as previously described [28]. Primers for RT-PCR are provided in Supplementary Materials (Table S1).

2.6. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

MCF7 cells were treated with 10 nM E2 or ethanol (vehicle control) during 50 min, washed twice with PBS and cross-linked for 10 min with 1.5% formaldehyde (Sigma). The cross-link reaction was stopped with 0.125 M glycine for 1 min and cells were washed twice with PBS, scraped into 500 μ L PBS with protease inhibitors (Complete Inhibitors, Roche), spun 2 min at 3000 g and snap frozen to -80 °C. After cell lysis in 300 μ L of lysis buffer [10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% SDS, 0.5% Empigen BB detergent], ChIP was performed as previously described [35,36]. Antibodies against ER α (HC-20, sc-543, Santa Cruz Biotechnology), H3K27ac (ab4729, Abcam) and H3K4me2 (07-030, Merk Millipore) were used in this assay. DNA was purified on NucleoSpin columns (Macherey-Nagel) using NTB buffer. ChIP experiments were performed from at least five biological independent replicates. Primers used for real-time PCR are provided in Supplementary Materials (Table S1).

2.7. ChIP-sequencing (ChIP-Seq) and ChIP-Seq data analysis

We pooled DNA originating from at least 18 different ChIP experiments conducted as described above. The ChIP DNA was prepared into libraries and sequenced using an Illumina HiSeq apparatus at the GenomEast platform (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire; Strasbourg, France). Pooled control inputs DNA were processed in parallel. Reads were aligned onto the indexed chromosomes of the human hg19 (GRCh37) genome using bowtie 0.12.7 [37], allowing at most two mismatches (parameters -n 2; -l 28; -m 1 with -best and -strata options). Sequencing statistics are given in Table S2. Samtools 0.1.12a [38] implemented under galaxy (<https://usegalaxy.org/>) were used to generate signal files. Duplicate reads were removed using the rmDupBam tool, and GCbias were subsequently corrected by the compute/correct GC bias algorithms included in the DeepTools package. MACS 2.1.1.2016 [39] was then used for converting signal into .wig files and peak calling using low/up mfold bound adjusted to 5 and 50 respectively and at different P-values cutoff, as previously performed [35]. Input control file was used as reference for these peak-calling. The obtained .bed files corresponding to the genomic coordinates of identified ER α BSs were subsequently filtered against the lists of repetitive sequences obtained from the UCSC (blacklist; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin>). Regions exhibiting high background signal generated by a poor normalization to input due to excessive sequences overrepresentation (consecutive of the highly rearranged genome of MCF7 cells) were also removed. ER-bound identified genomic regions are provided in the Table S3. For alignment and calculations of mean signals at precise subset of genomic regions, we corrected the bias of diverging sequencing depths between different samples by normalizing the signal intensities of a given .wig to the one with the highest sequencing depth. Motifs analyses were performed using the CentDist (<http://biogpu.ddns.comp.nus.edu.sg/~chipseq/webseqtools2>) and SeqPos (<http://cistrome.org/ap/> [40]) algorithms. All other integrative analyses of the ChIP-Seq data were performed using home-made scripts and algorithms from the cistrome web-platform (<http://cistrome.org/ap/>).

2.8. Availability of data

The microarray and ChIP-Seq data generated in this study have been submitted to the NCBI Gene Expression Omnibus website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) [41] under accession No. GSE 107924 and GSE 107476, respectively.

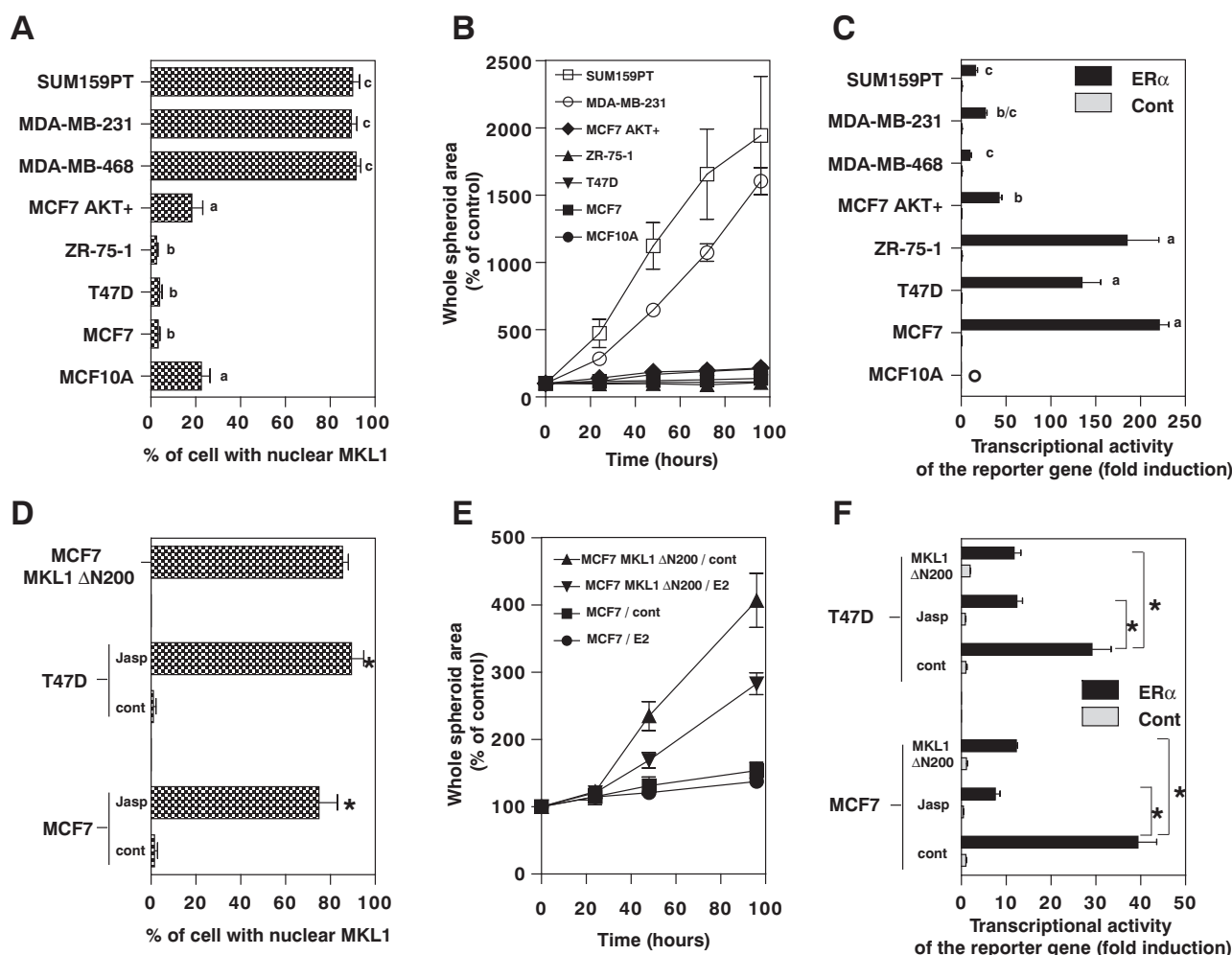


Fig. 1. Nuclear accumulation of MKL1 favors invasiveness and impairs the transactivation efficiency of ER α . We analyzed the non-tumorigenic epithelial cell line MCF10A, the ER α -positive breast cancer cell lines MCF7, T47D and ZR-75-1 (luminal A subtype), the ER α -positive breast cancer cell line MCF7 expressing a constitutively active form of AKT (endocrine resistant cell line) and the triple negative breast cancer cell lines MDA-MB-468, MDA-MB-231 and SUM159PT (basal-like subtype). (A) MKL1 expression and localization were analyzed by immunofluorescence in the different cell lines and the percentage of cells with nuclear MKL1 staining was then quantified (mean values from at least 30 images \pm SEM). Columns with different superscripts differ significantly ($p < 0.01$, student's t -test). (B) A 3D spheroid cell invasion assay in Matrigel was performed on the different cell lines. Images were taken every 24 h by microscopy and the diameter of the spreading spheroid was measured using Image J software. Data corresponds to the mean \pm SEM from at least 10 different experiments and are expressed in percentage referring to the diameter measured at day 0. (C) Cells were transiently transfected with the C3-LUC reporter gene (100 ng), the ER α expression vector (50 ng) and the internal control CMV- β gal (100 ng). Cells were then treated for 24 h with E2 and the luciferase activities were measured and normalized to β -galactosidase activities. Data corresponds to the mean values from at least triplicate experiments \pm SEM and are expressed as fold change from the control. Columns with different superscripts differ significantly ($p < 0.01$, student's t -test). \circ Transfection was ineffective in MCF10A. (D) Percentage of cells with nuclear MKL1 staining in MKL1 Δ N200 MCF7 cells treated 48 h with tetracycline (1 μ g/mL) or in MCF7 and T47D cells treated or not with jasplakinolide (0.5 μ g/mL) (mean values from at least 10 images \pm SEM) ($p < 0.05$). (E) 3D spheroid cell invasion assay in Matrigel of tetracycline-treated control and MKL1 Δ N200 MCF7 cells with or without E2 (10 nM). (F) MCF7 and T47D cells were transfected as in panel C in the presence or the absence of MKL1 Δ N200 expression vector and then treated or not with jasplakinolide in the presence of E2. Data are the mean values from triplicate \pm SD and are expressed in fold change compared to the control ($p < 0.05$, student's t -test).

3. Results

3.1. Nuclear accumulation of MKL1 favors invasiveness and impairs transactivation efficiency of ER α

We previously showed that breast cancer cell lines exhibit different MKL1 activity [28]. As shown in Fig. 1A and Fig. S1A, MKL1 is almost cytoplasmic and inactive in luminal ER α -positive breast cancer cell lines such as MCF7, T47D or ZR-75-1, which exhibit a well-differentiated epithelial phenotype. In the non-tumorigenic epithelial cell line MCF10A, the vast majority of cells exhibit a cytoplasmic localization of MKL1. Only cells on islet periphery present a nuclear translocation of MKL1. Similarly, a slight onset of nuclear accumulation of MKL1 is observed in the endocrine resistant ER α -positive breast cancer

cell line expressing a constitutively active form of AKT (MCF7 AKT+). Finally, all cell lines having an epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotype such as MDA-MB-468, MDA-MB-231 or SUM159PT display MKL1 nuclear localization (Fig. 1A). While MKL1 has a different localization in these different cell lines, its expression level measured by Western blot remains similar (Fig. S1B). The invasive capability of the different cell lines was then tested on 3D cell culture using a Matrigel Invasion assay (Fig. 1B). Results clearly show a positive correlation between the nuclear localization of MKL1 and invasiveness. As expected, the basal-like cell lines MDA-MB-231 and SUM159PT strongly invade the Matrigel while ER α -positive breast cancer cell lines are noninvasive. Although we were unable to measure the invasive capability of the MDA-MB-468 due to their inability to form spheroids, this cell line is known to be highly invasive in the literature. Transactivation

efficiency of the estrogen receptor on an ERE-driven reporter gene was evaluated in parallel through transient transfection experiments in these different cell lines. Importantly, we observed that the transactivation activity of ER α was the strongest in the ER α -positive breast cancer cell lines and dramatically lower in the nuclear MKL1-positive invasive cell lines MDA-MB-468, MDA-MB-231 or SUM159PT (Fig. 1C). These correlative data suggest a close link between MKL1 nuclear translocation, invasiveness and impaired ER α transactivation efficiency. To shift from correlation to causality, we investigated whether nuclear accumulation of MKL1 in ER α -positive breast cancer cell lines, using a MKL1 mutant or a drug inducing MKL1 translocation, could impact invasiveness and ER α transactivation efficiency. We previously established a MCF7 cell line expressing a N-terminal deleted mutant of MKL1 (MKL1 Δ N200) devoid of the RPEL motifs (actin binding sites), allowing permanent translocation and constitutive activity of MKL1 into the nucleus [28,29] (Fig. 1D). As shown in Fig. 1E and Fig. S1C, the expression of this MKL1 Δ N200 mutant triggered Matrigel invasion by MCF7 cells. This invasion was partly slowed down in presence of E2. Finally, transactivation efficiency of ER α was measured in MCF7 and T47D after either transiently expressing of MKL1 Δ N200 mutant or treating cells with jasplakinolide, a commonly used actin filament polymerization and stabilizing drug, which induces MKL1 nuclear translocation (Fig. 1D). As shown in Fig. 1F, both approaches provoke a significant decrease in ER α transactivation efficiency of the reporter gene, reaching levels similar to those observed in naturally nuclear MKL1-positive invasive cell lines. Altogether, these results obtained using complementary approaches show that the nuclear translocation of MKL1 favors invasiveness and impairs transactivation efficiency of ER α .

3.2. Nuclear accumulation of MKL1 is associated with endocrine resistance in breast cancers

Above results associate the nuclear localization of MKL1 in breast cell lines with de-differentiation and invasive processes. To evaluate the physiopathological relevance of this finding, we next extended our study to healthy and cancerous human breast tissues. As illustrated in Fig. 2A, immunofluorescence experiments confirm that the transcriptional coactivator MKL1 is active and expressed in the nucleus of basal/myoepithelial cells while ER α is present in a small number of luminal cells in healthy breast tissues [4,22,23]. Nuclear co-localization of the two proteins was not observed in healthy human mammary gland. In contrast, a nuclear co-localization of ER α and MKL1 proteins was detected in ER α -positive malignant tumors where some ER α -positive cells begin to express high level of nuclear MKL1 (Fig. 2A). In light of these results, we performed an immunohistochemical analysis of MKL1 protein expression on a tissue microarray encompassing 130 breast cancer patient samples and covering every breast tumor subtypes (Fig. 2B and Table S4). We quantified the percentage of cells displaying nuclear localization of MKL1 in each sample. We first detected a significant increase in the number of MKL1 nuclear positive (NP) cells in tumor tissue compared to adjacent non-tumor tissue, except for the ER+ /PR+ /HER2- subtype (Fig. 2C). Then we aimed to evaluate whether ER α positive breast tumors clinically described as hormone therapy refractory could be discriminated based on the their abundance in cells showing nuclear MKL1. Samples were split in two groups, MKL1 high or MKL1 weak/negative. In the 41 cases for which the status hormone therapy status was available, we detected a significant increase of MKL1-high tumors (Fig. 2D), indicating that the nuclear localization of MKL1 is associated with hormone resistance in our cohort.

3.3. Nuclear accumulation of MKL1 in MCF7 cells induces a mixed luminal/basal phenotype

In order to better understand how MKL1 could promote endocrine resistance, we aimed at studying the consequences of MKL1 activation

in ER α -positive breast cancer cells using unbiased approaches. We previously showed that actin-cytoskeleton remodeling and nuclear accumulation of MKL1 using the MKL1 Δ N200 mutant, abolishes the E2-dependent proliferation of MCF7 cells and impairs estrogen mediated regulation of few ER-target genes [28]. To further explore the changes in gene signature induced by the MKL1 mutant, we analyzed the gene expression profiles of MCF7 MKL1 Δ N200 and MCF7 control cells through microarray experiments. We defined a set of differentially expressed genes setting an arbitrary cut-off of adjusted P-value < 0.01 and a fold change > \pm 4 (Table S5). This threshold resulted in a set of 1016 up-regulated and 976 down-regulated genes in MCF7 MKL1 Δ N200 as compared to MCF7 control cells. Functional analysis revealed an overrepresentation of genes involved in cell adhesion, ECM-receptor interactions, actin cytoskeleton organization and migration as well as genes involved in kinase cascades and signal transduction upon MKL1 Δ N200 signaling (Fig. 3A and Table S6), functions that are consistent with the induction of EMT [42]. Furthermore, we found an underrepresentation of genes involved in epigenetic modulations such as chromatin remodeling or DNA methylation, processes that have been also associated with EMT [43,44].

Because patterns of gene expression allow classifying breast tumors according to major molecular subtypes, we next investigated the expression of subsets of genes that are distinctive of clinically relevant breast cancer subgroups. We selected 48, 37 and 11 genes which have been associated to basal-like, luminal and HER2-overexpressing tumors, respectively [3,45,46] (Table S7), and performed a gene set enrichment analysis. The analysis revealed a significant association of MCF7 control and MKL1 Δ N200 cells to the luminal and to the basal markers gene set, respectively (Fig. S2A). No significant association was observed to the HER2 markers gene set.

Hence, the microarray analysis described above evokes a partial transition of MCF7 MKL1 Δ N200 cells from a luminal to a basal-like phenotype. To further strengthen this observation, we performed immunocytology staining of certain basal-like biomarkers such as cytokeratin 14, P-cadherin, N-cadherin, vimentin, alpha actin and the human epidermal growth factor 1 (HER1), and confirmed their up-regulation in MKL1 Δ N200 cells (Fig. 3B and Fig. S2B). Moreover, FOXC1, the main transcription factor regulating EMT in basal-like breast cancers [47], was also strongly up-regulated in these cells. Among luminal biomarkers, cytokeratin 18 staining was not affected, E-cadherin exhibited a disrupted network and the luminal pioneer factor GATA3 was drastically repressed. The expression level of ER α dropped by 60%, reaching a level comparable to the one observed in control MCF7 cells treated with E2. Interestingly, the pioneer transcription factor FOXA1 exhibited a different pattern with a clear increase of its expression in MCF7 MKL1 Δ N200 cells. Finally, the expression level of HER2 was inhibited by the constitutively active form of MKL1.

Altogether, these results clearly show that an increased nuclear-translocation and activity of MKL1 shift the phenotypical features of MCF7 cells from a luminal to luminal/basal hybrid phenotype.

3.4. MCF7 cells with a nuclear translocation of MKL1 lose E2 transcriptional regulation

In order to monitor estrogen signaling changes after MKL1 nuclear translocation, we used a microarray-based transcriptome analysis to identify E2-regulated genes in MCF7 MKL1 Δ N200 versus control cells treated for 4 h with E2 or ethanol as vehicle control. We performed a differential gene expression (DE) analysis and selected an arbitrary cutoff of adjusted P-value < 0.05 and fold change > \pm 1.8 to define DE genes (Table S8). Differential gene expression analysis evidenced 225 estrogen-regulated genes in control cells when treated with E2 (Fig. 4A; 185 up-regulated and 40 down-regulated). Ontology and pathway enrichment analysis of these genes revealed some terms and pathways previously described as E2-regulated in MCF7 cells, such as localization, cell communication and pathways in cancer [48] (Table

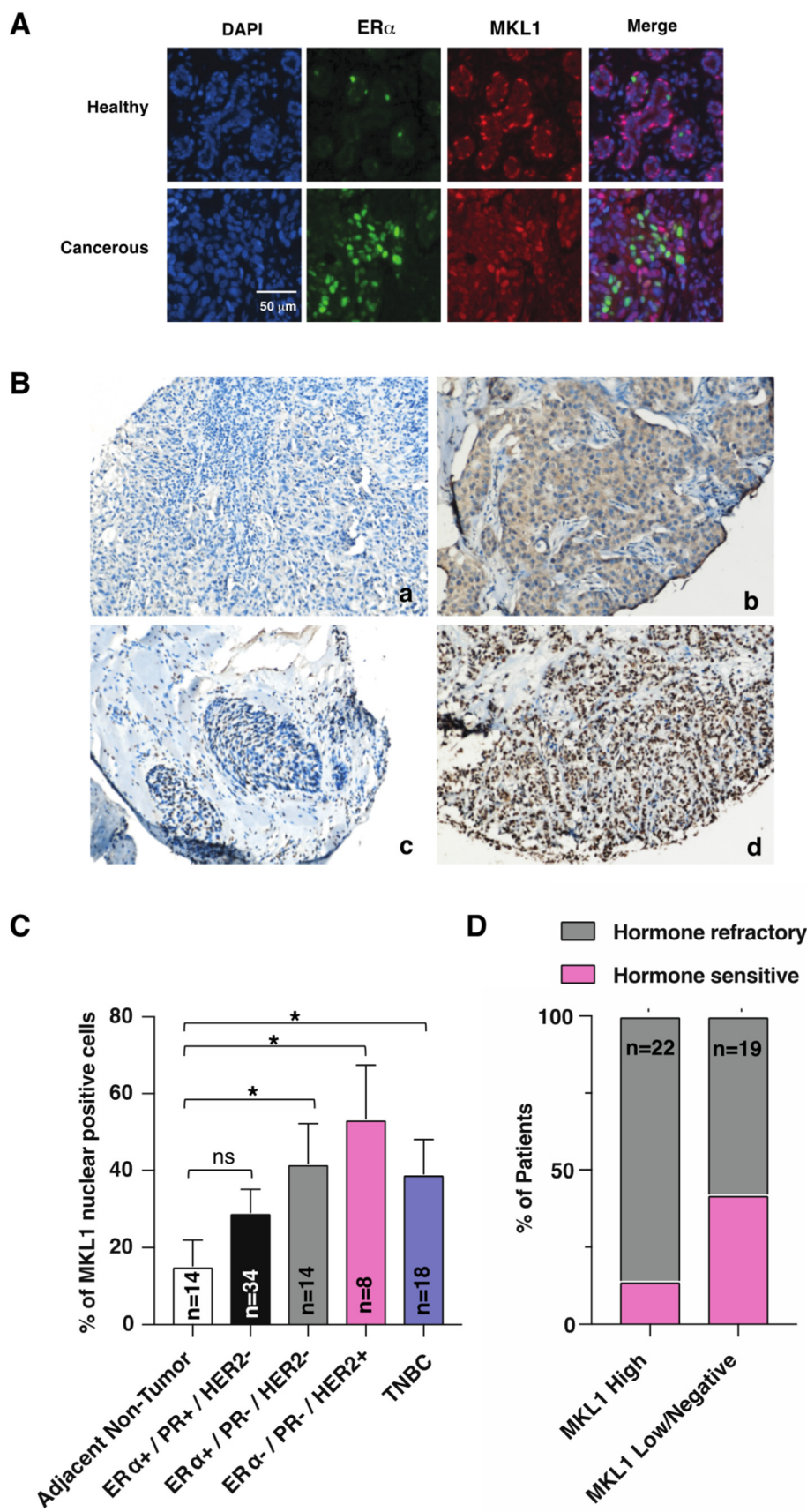


Fig. 2. Nuclear accumulation of MKL1 is associated with endocrine resistance in breast cancers. (A) Detection of ER α and MKL1 proteins by immunofluorescence in healthy and ER-positive grade III breast cancer cells. In healthy tissue, ER α is expressed in few luminal cells while MKL1 is located in myoepithelial cells. In the tumor, some breast cancer cells co-expressed ER α and MKL1 proteins. Nuclei were stained with DAPI. (B) Representatives images of MKL1 immunohistochemical staining across different human tumor samples. (a) refers to as a MKL1 negative sample, (b) shows a cytoplasmic localization of MKL1, therefore considered as MKL1 nuclear negative staining (c) shows a weakly fraction of MKL1 nuclear positive (NP) cells, therefore also considered as MKL1 negative, (d) shows a MKL1 nuclear positive staining. (C) Quantification of MKL1 NP cells per breast cancer subtype, compared to adjacent non tumor tissue. *p-value < 0.05, with a student *t*-test compared to the control, ns: non-significant. (D) MKL1 nuclear staining according to hormone therapy responsiveness status. ER α + PR +/- (HER2 -) tumor samples were subdivided into two categories according to MKL1 staining. Samples harboring > 30% of MKL1 NP cells were considered as MKL1 high whereas samples harboring < 30% of MKL1 NP cells were considered as low or negative. Hormone refractory status comprises both innate and acquired lack of responsiveness to hormone therapy. *p-value < 0.05, with a Chi-square test.

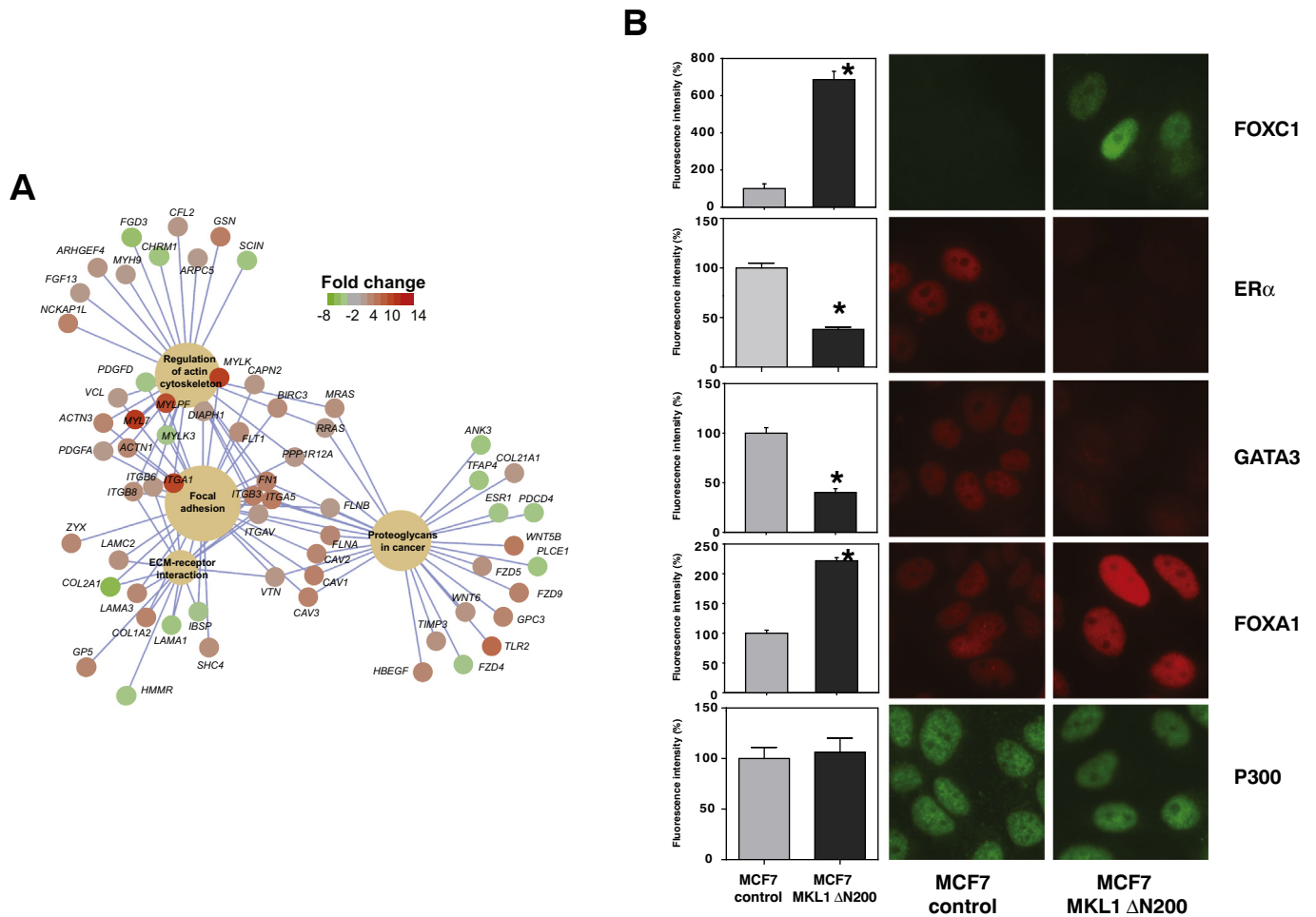


Fig. 3. Nuclear accumulation of MKL1 in MCF7 cells induces a mixed luminal/basal phenotype. The transcriptional profiles of control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells were compared through microarray analysis. (A) Enriched Kegg pathways in our dataset are shown alongside the differentially expressed genes [showing $P < 0.01$ and $\text{abs}(\text{FC}) > 4$] involved. Genes are colored according to their log₂FC expression values. (B) Immunofluorescence pictures of FOXC1, ERα, GATA3, FOXA1 and P300 after 48 h of tetracycline treatment of control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells. Densitometry quantification of the immunofluorescence expressed as percentage of the intensity measured in control MCF7 cells is shown on the left side of the panel. Error bars represent SEM (n ranges from 10 to 20; $P < 0.01$, Student's *t*-test).

S9). Strikingly, only 2 up-regulated genes were found in E2-treated MCF7 MKL1 ΔN200 and none were repressed by E2 (Fig. 4A). In general, the average of the fold-changes of the 185 up-regulated genes in control cells dropped from 2.3 to 1.2 in MCF7 MKL1 ΔN200 cells, while the one of the 40 down-regulated genes increased from 0.5 to 0.87. These data indicate that MCF7 MKL1 ΔN200 almost lose E2 transcriptional regulation.

We next addressed among the 225 E2-regulated genes whether some of them have modified basal expression due to MKL1 ΔN200 nuclear translocation and whether this could be correlated to the loss of their estrogenic response. Among these genes, 109 presented changes in their expression in the absence of ligand, including approximately half of the E2 up-regulated and E2 down-regulated genes. We categorized these 109 mRNAs in 4 categories depending upon the fold changes of their basal expression and of their response to E2 in control MCF7 cells. As shown within Fig. 4B and C, the E2 up-regulated genes in control cells were distributed equally between those whose basal expression is down-regulated and those whose basal expression is up-regulated in MCF7 MKL1 ΔN200 cells (C2 and C4 categories in Fig. 4B and C). In contrast, the basal expression of the majority of the E2 down-regulated genes in control cells (C1 and C3) were also down-regulated in the presence of MKL1 ΔN200, which might indicate a correlation between E2 and MKL1 effects for the E2 down-regulated genes only.

The expression profile of some E2-regulated genes from the clusters

C1, C2 and C4 in MCF7 MKL1 ΔN200 and control cells was confirmed by quantitative RT-PCR (Fig. S3). Furthermore, these experiments show that MKL1 ΔN200-induced changes in basal expression of the genes were insensitive to antiestrogen treatments (Fig. S3). It should be noted that both antiestrogens used, the 4-hydroxytamoxifen (OHT) and ICI 182,780 (ICI), inhibit residual E2-induced activity of *GREB1* gene in MCF7 MKL1 ΔN200 cells, demonstrating the preservation of their antiestrogenic activity in these cells. Similar results were obtained on an ERE-driven reporter gene in transient transfection experiments (Fig. S3C). To confirm the link between MKL1 localization and these change in the expression of E2-regulated genes in different ERα-positive breast cancer cell lines, we used a complementary approach, in which MCF7 and T47D cells were treated with jasplakinolide drug leading to a nuclear translocation of MKL1 (Fig. 1 and S1). Results clearly show similar expressions between the two cell lines and reproducible regulations regardless of how MKL1 nuclear translocation is induced. However, the amplitude of the effects was less marked after jasplakinolide treatment than after MKL1 ΔN200 expression (Fig. S4).

Finally, gene ontology and pathway enrichment analysis of the categories of genes could not be achieved due to the limited number of genes included in each subgroup. However, it should be noted that some genes generally considered as hallmarks of hormone-resistant breast cancer cells exhibited changes in expression, which could be expected to lead to such a cell phenotype. This is for instance the case of

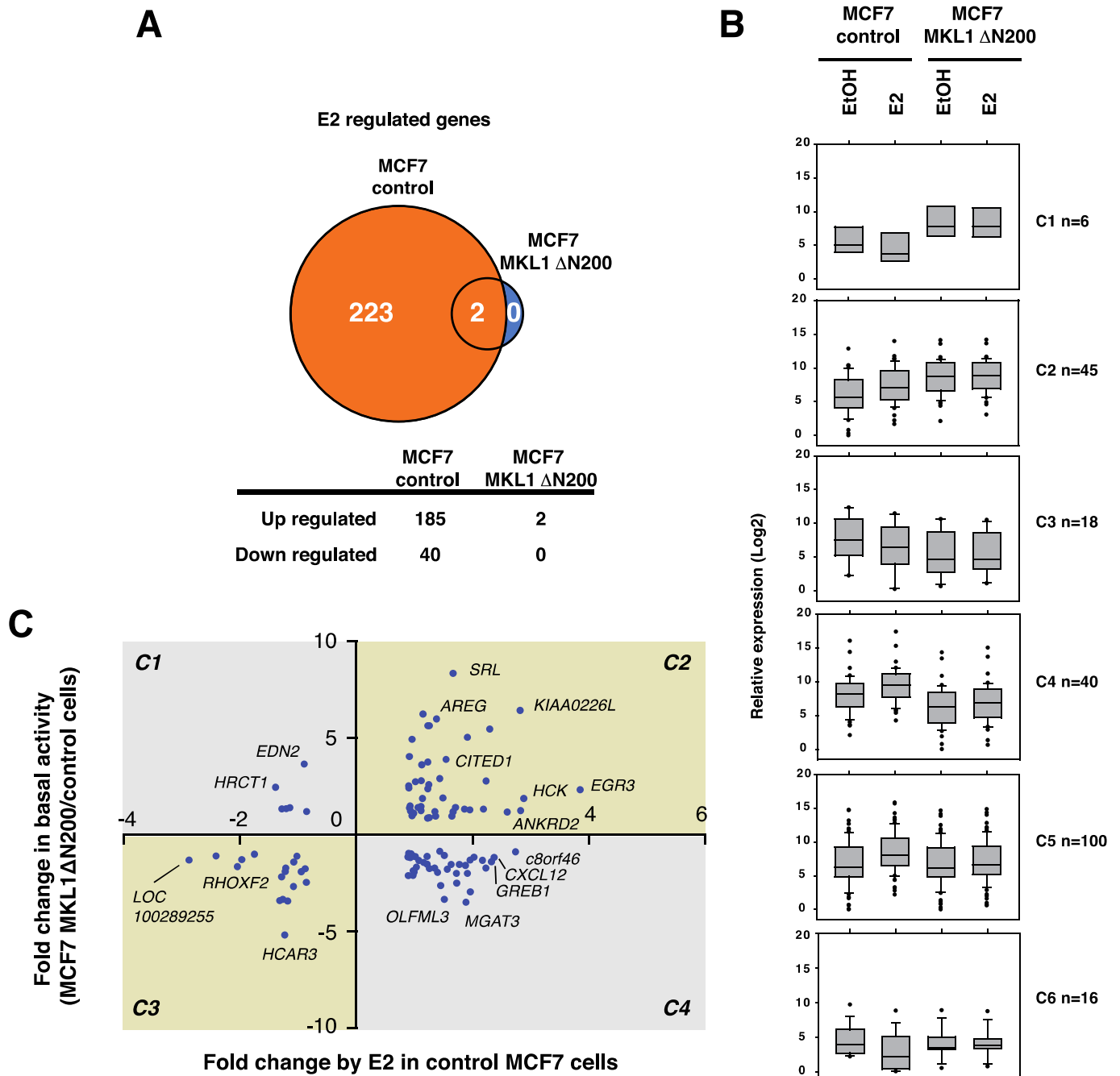


Fig. 4. E2 modulation of transcription is abrogated in MKL1 ΔN200 MCF7 cells. E2-regulated genes were identified in control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells through microarray analysis. Cells were treated for 4 h with 10 nM E2 or EtOH as a control. (A) Venn diagram of E2-regulated genes [showing $P < 0.05$ and $\text{abs}(\text{FC}) > 1.8$] in control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells. (B) The 225 E2-regulated genes [$P < 0.05$ and $\text{abs}(\text{FC}) > 1.8$] were classified into 6 clusters (C1 to C6) according to the variations in their basal activity in MKL1 ΔN200 MCF7 cells [$P < 0.01$ and $\text{abs}(\text{FC}) > 4$]. Box plots represent the average expression level of the genes for each category in control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells, treated or not with E2. (C) For the 109 genes that lose their response to E2 and presented significant variations in their basal activity in MKL1 ΔN200 MCF7 cells, we represented their changes in expression against their fold change in expression by E2 in control cells (C1-C4).

genes encoding the transcription factor FOXC1 and the growth factor AREG (amphiregulin) included in the C2 category of genes whose expression is up-regulated both by E2 and MKL1 ΔN200 and the chemokine CXCL12 in the category of genes (C4) in which MKL1 ΔN200 strongly counteracts the stimulating effect of E2.

3.5. Nuclear accumulation of MKL1 in MCF7 cells impacts ERα cistrome

We next sought to determine whether the abrogation of gene responses to E2 observed in MCF7 cells expressing the MKL1 ΔN200

protein was correlated to an altered mobilization of ERα to its binding-sites. To this purpose, we treated control and MKL1 ΔN200 expressing cells with E2 or ethanol vehicle for 50 min, a time point adequate for determining representative direct sites of ERα binding to chromatin genome-wide [49], and subjected the prepared chromatin to ChIP-Seq as previously [36]. Bioinformatic treatment of these data included a filtration of the identified ERBSs against regions referenced as repetitive and sources of ChIP-Seq biases as well as against regions heavily duplicated/remodeled within MCF7 cells genome (see the Materials and Methods section as well as Fig. S5). The number of ERBSs retained

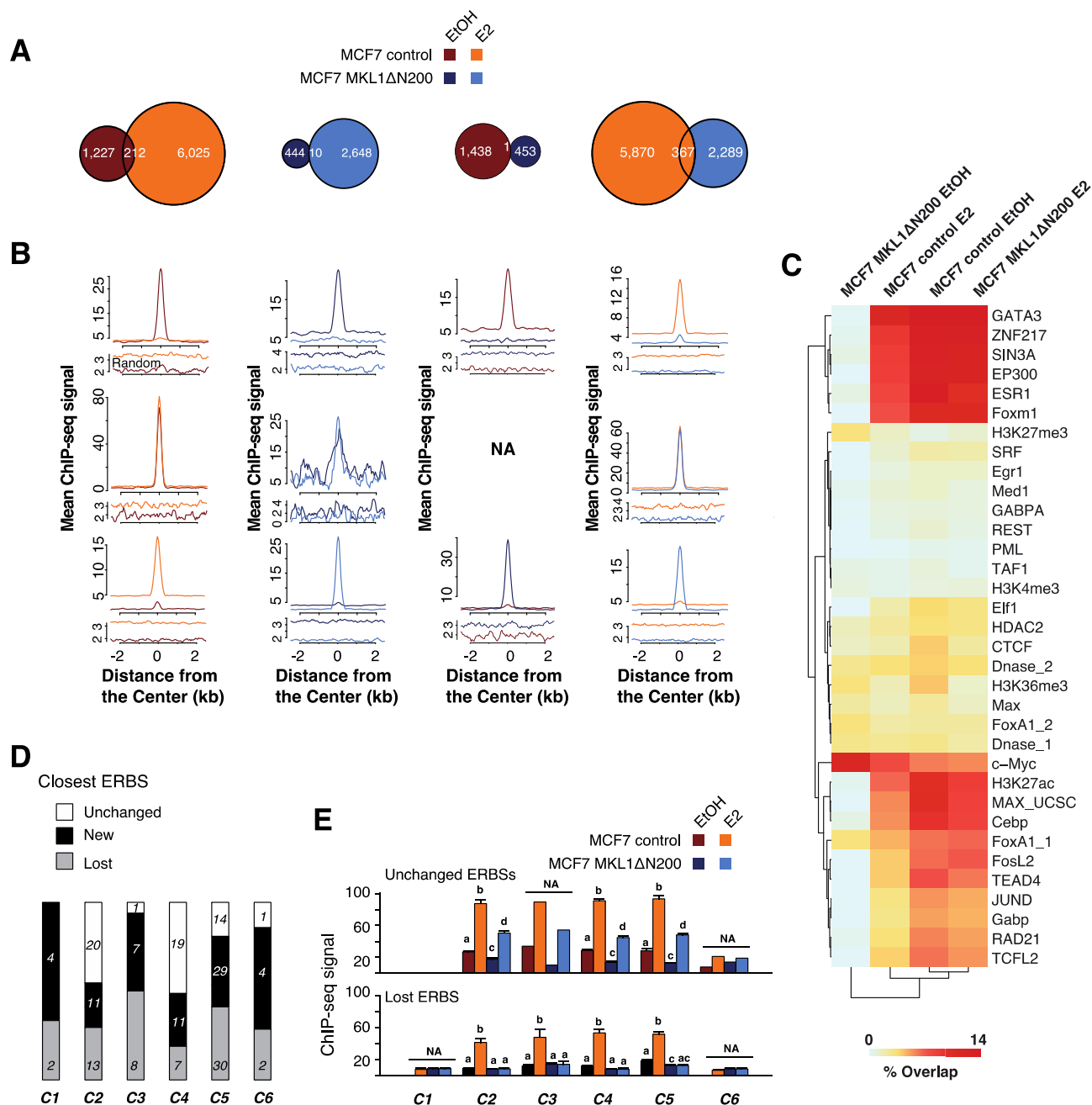


Fig. 5. ERα cistrome is affected by the expression of MKL1 ΔN200 protein in MCF7 cells. (A) Venn diagrams summarizing the overlaps of genomic regions bound by ERα in control MCF7 cells or MCF7 cells expressing the MKL1 ΔN200 following a 50 min treatment with either E2 or ethanol (EtOH) as vehicle control, as determined from ChIP-Seq experiments. (B) The ERα ChIP-Seq signals were aligned and averaged within a $-2.5/+2.5$ kbp window centered on ERBSs belonging to categories illustrated in the Venns on the upper panel (A). Upper and lower panels correspond to specific ERBSs to each of the two populations analyzed on the Venn diagrams while the middle panel corresponds to overlap genomic regions of ERα binding. NA stands for non-applicable, since only one ERBS is common between the ERα cistromes determined in the two cell lines in the absence of E2. (C) Hierarchical clustering of the % of overlap of ERα cistromes in control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells with the binding sites of other transcription factors or enriched region of histone marks previously determined in MCF-7 cells (see references in Table S11). (D) To correlate this change of ERα cistrome and our transcriptome analysis, we first identified the closest ERBSs from the TSSs of the 223 genes that were not anymore regulated by E2 in MKL1 ΔN200 MCF7, present in either control or MKL1 ΔN200 MCF7 cells. We used the categories defined previously in Fig. 4. The stacked histogram shown illustrates the % of overlap between these ERBSs. (E) Graphs representing the mean ChIP-Seq signal obtained at the center of the ERBSs located at the vicinity of the TSSs of categorized genes in the different cells and conditions. The graph on the top represents values obtained on ERBSs which are common in control and or MKL1 ΔN200 MCF7 cells. The histogram at the bottom is shown as a control, illustrating the mean values on the ERBSs that disappeared upon expression of the MKL1 ΔN200 protein. Columns with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$, Student's *t*-test). NA: n too low.

before and after these filtering steps is given within Table S10. To ascertain the elimination of a maximum of false-positive regions, we measured the mean enrichment of ERα ChIP-Seq signal at ERBSs determined at different P-values, and subsequently selected those for which the signal/noise exceeded a 2-fold ratio (see Fig. S5). The Venn

diagrams presented within Fig. 5A illustrate the overlap between the different set of ERBSs identified in each cell lines in the presence of absence of E2 at these optimal P-values. Mean ChIP-Seq signals measured on each specific subset of ERBSs are illustrated on the bottom of each Venn and confirm their selectivity (Fig. 5B).

In both cell lines, the number of common ERBSs found in EtOH and E2 conditions was relatively low (< 5% or 1% of the ERBSs bound by ER α in the presence of E2 in control or MKL1 Δ N200 MCF7 cells, respectively). Interestingly, ER α cistromes included 6237 or 2658 ERBSs in E2-treated and 1439 and 454 ERBSs in absence of hormone in control or MKL1 Δ N200 MCF7 cells, respectively. These observations indicate that the expression of the constitutive MKL1 Δ N200 protein alters ER α cistrome and induces a massive drop in the number of ERBSs, regardless of the presence of ligand. In addition, the overlaps between the cistromes of ER α in each cell line are relatively poor (Fig. 5A): only 1 ERBS in the absence of ligand and 367 in the presence of E2. This indicates that some reprogramming of ER binding on the genome had further occurred following the expression of the MKL1 Δ N200 protein. Importantly, using cistromes determined at less or more stringent P-values raised similar conclusions towards these overlaps (see Fig. S6). Hence, a maximum of 2% of the ERBSs identified in EtOH-treated control cells were common with those identified in similarly treated MKL1 Δ N200 MCF7 cells. The overlap reached 32% at low-stringency for E2 treated cells (see Fig. S6). To stress the robustness of our analysis, we performed ChIP-qPCR experiments on subsets of categorized ERBSs. Results obtained from these experiments are summarized in part of Fig. 6, and confirm that 100% of the 4 lost and 4 gained tested ERBS recapitulate the expected profiles of enrichment. Interestingly, we also observed that the mobilization of ER α on common ERBSs located at the vicinity of E2 regulated genes such as *GREB1* was also strongly reduced in MKL1 Δ N200 MCF7 cells. Similarly, these ChIP-qPCR experiments evidenced a reduced or absent recruitment of ER α on distant enhancers establishing chromatin loops (as extracted from the ChiA-PET data from Fullwood et al., 2009 [50]) with the promoter of the two genes which are still regulated by ER α in MCF7 cells expressing the constitutive version of MKL1: *GPR68a* and *IFTM10a*.

To assess whether this reprogramming of ER α binding has a direct functional influence on MCF7 cell biology, we checked whether genes putatively regulated by these ERBSs share specific or similar annotations. We therefore applied GREAT on our data (<http://great.stanford.edu/>) [51], and found a number of associations of the ER α cistrome in MKL1 Δ N200 MCF7 cells with genes involved in EGF and RAS pathways. This was especially striking in absence of hormone (see Fig. S7) and congruent with our previous observations that MAP kinase signaling pathway is boosted in MKL1 Δ N200 MCF7 cells [28] (Fig. S1B). Therefore, in regard of these results, we analyzed by quantitative RT-PCR the expression profile of some E2-regulated genes from the clusters C1, C2 and C4 in MCF7 MKL1 Δ N200 and control cells after inhibition of HER1 pathway by the erlotinib drug. As shown in Fig. S8, the expression of the tested genes of cluster C2 (*EGR3* and *AREG*) was clearly inhibited in both cell lines after erlotinib treatment. However, it should be noted that erlotinib does not restore E2-dependent gene regulation and sensitivity to antiestrogen in MKL1 Δ N200 MCF7 cells.

We next investigated whether these specific cistromes could reflect the engagement of ER α on different type of DNA sequences. As visible from the motifs analysis summarized within Table S11, EREs are the first motifs found in each cistromes except within sites bound by ER α in the absence of E2 in MKL1 Δ N200 MCF7 cells. This again points to the conclusion that the very limited cistrome of ER α in this condition has probably specific properties. Accordingly, while the overlap of our ER α cistromes with the binding sites of other transcription factors determined in MCF7 cells (references in Table S12) did not evidence the existence of a preferential cofactor for the specific ERBSs from MKL1 Δ N200 MCF7 cells. Motifs recognized by proteins allowing an indirect recruitment of ER α such as AP1 (JUN/FOS) were also identified in these cells. However, the ER α cistrome in these cells in the absence of E2 was found particular as it did not cluster with the others (Fig. 5C). It can be noted that the ERBSs of these untreated cells present a depletion of GATA3 binding sites and the maintenance of enrichment in FOXA1. We further evaluated the overlap of the ERBSs specifically lost or created in MKL1 Δ N200 MCF7 cells with the cistromes of other

transcription factors and some chromatin marks determined by others in MCF7 cells. Interestingly, these analyses summarized within the Fig. S9 indicated that the novel ERBSs may exhibit a relative open chromatin conformation as revealed by a little accessibility to DNase I digestion in MCF7 cells. However, these sites may not be fully functional since they are not overlapping with FOXA1 or GATA3 cistromes (Fig. S9). Since MKL1 is a coactivator of SRF, we envisioned that the specific ERBSs from MKL1 Δ N200 MCF7 cells could be enriched in SRF binding sites. However, our motif analysis and search using known PSSM matrices (data not shown) showed that it is not the case.

These conclusions led us to hypothesize that the loss of any estrogenic regulation in the MKL1 Δ N200 cells could be a consequence of the impacted mobilization of ER α onto chromatin in the absence of ligand. We therefore interrogated the ER α cistromes characterized in control and MKL1 Δ N200 MCF7 cells to determine whether they may correlate with specific variations of gene basal activities preventing their estrogenic response. To do so, we first identified the closest ERBS from the TSS of the genes included in the 6 categories previously defined (Fig. 4B and C). As shown within Fig. 5D, there was no obvious correlation between the variations in the basal transcriptional activity of a given gene category and either the conservation/gain or loss of their most proximal ERBS. For instance, genes with increased (C1 and C2) or decreased (C3 and C4) basal activity did not present coordinated changes in ERBS proximity significantly different from control genes with no changes in basal activity (C5 and C6). On the other hand, genes from the C2 and C4 categories of genes up-regulated by E2 in control cells seemed to conserve their more proximal ERBS in MKL1 Δ N200 MCF7 cells more frequently than the other categories. In the opposite, down-regulated genes (C1, C3 and C6) have a tendency to gain an ERBS at their vicinity. These observations led us to check whether the levels of mobilization of ER α rather than the existence of the ERBS in itself could correlate better with the transcriptional activity. We therefore retrieved the mean ChIP-Seq signal from the conserved proximal ERBSs of the categorized genes, as well as the lost ones as a control. These analyses, summarized within Fig. 5E indicate that the mobilization of ER α on all conserved ERBSs from all categories is significantly reduced in the presence of E2 in MKL1 Δ N200 MCF7 cells. This is also the case in the absence of E2, except in the C6 category.

In summary our comparative analysis of ER α cistrome in MCF7 and MCF7 MKL1 Δ N200 cells indicates that ER α binding on the MCF7 cell's genome is strongly impaired by the cellular context imposed by the expression of the mutant MKL1 protein. This reprogramming involves a massive loss of ERBSs and a diminished recruitment of ER α on conserved ERBSs that may explain at least partly the loss of estrogenic transcriptional regulations. This is certainly partly associated with the loss of ER α protein amounts in MKL1 Δ N200 cells, but novel ERBSs also appear in these cells although their association with a particular physiological function remains unclear except for the EGF and RAS pathways.

3.6. ERBSs enrichment in H3K27ac is altered in MCF7 MKL1 Δ N200 cells

We reasoned that the novel ERBSs identified in MCF7 MKL1 Δ N200 might not be functional in terms of chromatin remodeling required for transcriptional modulations. We therefore determined whether these ERBSs and variations in ER α mobilization on ERBSs in MCF7 MKL1 Δ N200 cells were associated with changes in chromatin structure around enhancers. We investigated the enrichment of ERBSs in dimethylated H3K4 (H3K4me2) and acetylated H3K27 acetylation (H3K27ac) in response to estrogenic treatment. Both chromatin marks are present at active enhancers and promoters, and H3K27ac is a major histone modification deposited at nucleosomes flanking enhancer elements by coactivators with histone acetyl activity (HAT) recruited by ER α and other transcription factors [52]. ChIP-qPCR experiments were performed on the same subsets of categorized ERBSs and with the same chromatin samples previously used to confirm ER α recruitment. As

insensitive to E2 in tested lost and gained ERBSs, 6 of the 7 common tested ERBSs showed an increased enrichment in H3K27ac in MCF7 MKL1 ΔN200 cells following E2 treatment, leading to a partial rescue of the levels of its enrichment when compared to control MCF7 cells (Fig. 6A and B).

Altogether, these data indicate that gained ERBSs are, for the ones tested, already in a poised/prepared state and that the nuclear accumulation of the constitutively active form of MKL1 disturbs the H3K27 acetylation of ERBSs in a close association with the provoked changes in ERα mobilization.

4. Discussion

Thirty to 50% of recurrent tumors that arise from ERα-positive primary breast cancer patients fail to respond to endocrine therapy [8,9]. While the majority of these breast tumors retain ERα expression, high reduction or loss of ERα expression represents a non-negligible step in the progression from endocrine sensitive to resistance [19]. Notably, luminal B breast cancers, which generally express lower level of ERα, exhibit worse response to endocrine therapy. Understanding the underlying mechanisms of this progression is a major challenge towards the design of efficient hormone therapy-based treatments of breast cancers with reduced or ideally no relapses. We previously examined the processes controlling the tissue specific activity of ERα and identified the Rho/actin/MKL1 signaling pathway as a main actor, able to strongly inhibit the transcriptional capability of the receptor [30]. MKL1 is a master regulator of actin dynamic and cellular motile functions in many processes [20,21]. In breast tissue, MKL1 is vital in sustaining differentiation and function of mammary myoepithelial cells, accountable for ejection of the milk during lactation [22,23]. During tumor development, MKL1 can also promote malignancy by enhancing tumor cell invasion and metastatic dissemination [24]. We demonstrate in the present study that while MKL1 remains mainly cytoplasmic in estrogen-responsive, ERα-positive breast cancer cell lines, its nuclear localization is associated with basal-like phenotype in breast cancer cell lines and with endocrine resistance in a cohort of breast cancers. We further show that a provoked nuclear accumulation of MKL1 in ERα-positive breast cancer cells results in a genetic and phenotypic reprogramming of luminal cancer cells to a mixed luminal/basal phenotype, conferring changes in ERα activity and the development of hormonal resistance.

As expected, the expression of a constitutively active form of MKL1 in MCF7 cells modulated the expression of numerous genes whose ontologies are associated with pathways involved in the regulation of actin cytoskeleton, focal adhesion, ECM-receptor interaction and cell migration. Importantly, the evaluation of the expression of subset of genes associated with specific breast cancer subgroup gene signature showed that the MKL1 ΔN200 expression triggered a partial shift from a luminal to a basal-like gene expression profile. Notably, the expression of the pioneer factor GATA3 and ERα were down-regulated while that of the transcription factor FOXC1, a pivotal diagnostic marker for basal-like breast cancer [47], was induced. Of interest, FOXC1 is localized to the basal/myoepithelium in normal breast tissue and is particularly enriched in the luminal progenitor cell population, which is thought to be at the origin of basal-like tumors [53]. Markedly, the ectopic expression of FOXC1 was shown to induce a progenitor-like phenotype in differentiated mammary epithelial cells. Likewise, FOXC1 expression was associated with decreased or undetectable ERα expression in recurrent tumors from ERα-positive primary breast cancers, which were treated with endocrine therapy [54]. Among the possible mechanisms involved in this silencing of ERα expression, FOXC1 was shown to counteract GATA3 binding on ERα promoter region [54]. The switch between GATA3 and FOXC1 hence appears to be a good indicator of breast cancer luminal to basal-like reprogramming [54,55]. Unlike GATA3 and ERα, FOXA1 not only remained expressed but even increased in MKL1 ΔN200 MCF7 cells. This may appear paradoxical

because FOXA1 is generally associated, as GATA3 and ERα, with the luminal subtype [15]. However, recent studies evidenced an over-expression of FOXA1 in breast cancer metastases that are resistant to endocrine therapy, suggesting an altered role of FOXA1 in disease progression [14]. The presence of FOXA1 might also be related to the fact that the transition of MKL1 ΔN200 MCF7 cells from a luminal to a basal-like phenotype is not complete. Accordingly, we observed that MKL1 ΔN200 MCF7 cells still express some luminal markers such as cytokeratin 18. Interestingly, recent studies show that some luminal cell populations in normal human breast express myoepithelial/basal-like markers, which makes classification even more difficult [56].

Our microarray data further showed that the expression of MKL1 ΔN200 in MCF7 cells almost abolishes all E2-mediated transcriptional modulations. Of the 225 E2-regulated genes identified in MCF7 control cells, only two retained an E2-regulation in MKL1 ΔN200 MCF7 cells. The loss of E2-regulation was concomitant with a major overhaul in the basal expression of genes. For 28% of these genes, the change in their basal activity was in the same direction as the E2-response. Among these genes, we found *AREG* (*amphiregulin*), the main growth factor mediating E2-driven epithelial proliferation in a paracrine fashion [57]. *AREG* was also shown to be involved in breast cancer progression, contributing to cell motility and invasion. The sharp increase of its expression in MKL1 ΔN200 MCF7 cells in a constitutive and E2-independent manner, associated with a higher expression of HER1 obviously contributes to the hormonal escape of these cells. For other E2-responsive genes such as the chemokine CXCL12, the changes in their basal expression were opposite to their normal E2-regulation. Here again, a shutdown of CXCL12 expression associated with a high expression of its receptor CXCR4, as observed in MKL1 ΔN200 MCF7 cells, is known to favor metastasis, cancer cells migrating *in vivo* to organs that express high level of CXCL12 [58]. Importantly, we did not observe any obvious correlation between the directions of changes of basal gene expression and the directions of E2-responses (up vs. down) for 72% of the genes that lose their responsiveness to the hormone. This point allows us to almost exclude the hypothesis that an increased ligand-independent activity of ERα on these genes might be the cause for a loss of their regulation by the hormone. Furthermore, we showed that changes in the basal expression of E2 target genes in MKL1 ΔN200 MCF7 cells were also insensitive to tamoxifen and ICI treatments, demonstrating unambiguously that the presence of a constantly active MKL1 in MCF7 induces ER-independent endocrine resistance.

ChIP-Seq experiments performed on endocrine resistant breast cancers and cell lines that retained ERα expression showed a clear increase in both number of ERBSs and the intensity of ER binding to these genomic regions [14]. Notably, the highest ERα chromatin binding signal intensities were observed in metastatic samples, suggesting a correlation with disease progression [14]. The estrogen responsive element (ERE) was the main DNA motif enriched in the ERBSs. It should be noticed that ligand-free constitutively activated mutant forms of ERα are often reported in endocrine resistant breast cancer metastases [59]. Because of the high ERα expression, these endocrine resistant cancer cells still remain in luminal breast cancer subtypes. Our data show that endocrine resistant breast cancer cells, which result from a massive MKL1 nuclear translocation, exhibit in contrary a reduced number of ERBSs generally associated with lower ERα-binding intensity. Besides a reduced overlap between the ERα cistromes identified in control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells, we also identified novel ERBSs in cells expressing the MKL1 ΔN200 protein. This was particularly true in untreated cells for which the overlap was very weak. Interestingly, a number of genes located in the vicinity of these new ERBSs were associated with growth factor pathways, notably in untreated MKL1 ΔN200 MCF7 cells. This could be related to the sharp increase of expression of members of the EGF family (*AREG* as mentioned above, but also *TGFα* and *HB-EGF*) and their receptor in these cells. Interestingly, we show that the HER1 inhibitor erlotinib down regulates *AREG* expression suggesting the existence of a positive self-regulation loop in

MCF7 between HER1 and its ligand, which becomes constitutive and E2-unregulated after nuclear translocation of MKL1 in the cells. Ross-Innes et al. [14] previously showed that ER α positive breast cancer cell lines treated with a mitogenic cocktail present novel ERBSs at chromatin sites already bound by FOXA1 or to which FOXA1 was recruited in response to mitogenic stimulus. This phenomenon was also observed in ER α positive cancers associated with poor prognosis or in ER α positive metastases. This supports the hypothesis that FOXA1 might mediate ER α -binding reprogramming in advanced diseases. Partially corroborating the hypothesis, the comparison of the new ERBSs identified in untreated MKL1 Δ N200 MCF7 cells with FOXA1 binding sites determined by ChIP-Seq in MCF7 show maintenance of FOXA1 enrichment. These gained ERBSs were also found to be contained within genomic regions exhibiting histone marks of chromatin poised for functionality. In contrast, depletion in GATA3 binding to chromatin was observed at these sites. Importantly, the reprogramming of ERBSs in untreated MKL1 Δ N200 MCF7 cells is therefore closely associated with the changes observed in the expression level of the two pioneer factors in these cells: down-regulation of GATA3 and up-regulation of FOXA1. E2 treatment allows MKL1 Δ N200 MCF7 cells to regain enrichment profiles closer to those observed in control cells. The exact functional consequence of ERBS reprogramming in cells expressing the constitutively active form of MKL1 remains however poorly understood due to the lack of E2 transcriptional regulation in these cells.

Collectively, our study offers new mechanistic insights into ER α functional changes engaged during breast cancer progression particularly involving a nuclear accumulation of MKL1. Our work also implicates the targeting of the nuclear location of MKL1 as a potential therapeutic strategy for the treatment of endocrine-resistant and recurrent breast cancer.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194507>.

Author contributions

G.F. conceived the project. C.J., T.F.-C., F.P., E.J., P.G. and G.F. conducted the experiments. T.F.-C., D.H., S.A. and R.M. analyzed the microarray and ChIP-Seq data. C.J., M.M.C., and S.J. performed tissue microarrays. M.M. and D.M. contributed to the data analysis. T.F.-C., C.J., R.M. and G.F. wrote the manuscript with input from all authors.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We thank the biosit Health genomics and H2P2-Histo pathology High precision core facilities of biogenouest and the IGBMC Microarray and Sequencing platform at Illkirch. This work was supported by the University of Rennes 1, Inserm, CNRS, and the Ligue Contre le Cancer.

References

- [1] A. Skibinski, C. Kuperwasser, The origin of breast tumor heterogeneity, *Oncogene* 34 (2015) 5309–5316, <https://doi.org/10.1038/ncr.2014.475>.
- [2] C.M. Perou, T. Sørli, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lønning, A.L. Børresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature* 406 (2000) 747–752, <https://doi.org/10.1038/35021093>.
- [3] T. Sørli, C.M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J.C. Matese, P.O. Brown, D. Botstein, P.E. Lønning, A.L. Børresen-Dale, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 10869–10874, <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>.
- [4] N. Platet, A.M. Cathiard, M. Gleizes, M. Garcia, Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 51 (2004) 55–67, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.02.001>.
- [5] K. Dahlman-Wright, V. Cavailles, S.A. Fuqua, V.C. Jordan, J.A. Katzenellenbogen, K.S. Korach, A. Maggi, M. Muramatsu, M.G. Parker, J.-A. Gustafsson, International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 773–781, <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.8>.
- [6] C.K. Osborne, Steroid hormone receptors in breast cancer management, *Breast Cancer Res. Treat.* 51 (1998) 227–238.
- [7] D.L. Wickerham, J.P. Costantino, V.G. Vogel, W.M. Cronin, R.S. Cecchini, L.G. Ford, N. Wolmark, The use of tamoxifen and raloxifene for the prevention of breast cancer, *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer.* 181 (2009) 113–119.
- [8] V.C. Jordan, B.W. O'Malley, Selective estrogen-receptor modulators and anti-hormonal resistance in breast cancer, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25 (2007) 5815–5824, <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.3886>.
- [9] R. Clarke, J.J. Tyson, J.M. Dixon, Endocrine resistance in breast cancer—an overview and update, *Mol. Cell. Endocrinol.* 418 (Pt 3) (2015) 220–234, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.035>.
- [10] E.A. Musgrove, R.L. Sutherland, Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer, *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009) 631–643, <https://doi.org/10.1038/nrc2713>.
- [11] V.N.R. Gajulapalli, V.L. Malisetty, S.K. Chitta, B. Manavathi, Oestrogen receptor negativity in breast cancer: a cause or consequence? *Biosci. Rep.* 36 (2016), <https://doi.org/10.1042/BSR20160228>.
- [12] J.S. Carroll, C.A. Meyer, J. Song, W. Li, T.R. Geistlinger, J. Eeckhoutte, A.S. Brodsky, E.K. Keeton, K.C. Fertuck, G.F. Hall, Q. Wang, S. Bekiranov, V. Sementchenko, E.A. Fox, P.A. Silver, T.R. Gingeras, X.S. Liu, M. Brown, Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites, *Nat. Genet.* 38 (2006) 1289–1297, <https://doi.org/10.1038/ng1901>.
- [13] W.-J. Welboren, M.A. van Driel, E.M. Janssen-Megens, S.J. van Heeringen, F.C. Sweep, P.N. Span, H.G. Stunnenberg, ChIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands, *EMBO J.* 28 (2009) 1418–1428, <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.88>.
- [14] C.S. Ross-Innes, R. Stark, A.E. Teschendorff, K.A. Holmes, H.R. Ali, M.J. Dunning, G.D. Brown, O. Gojis, I.O. Ellis, A.R. Green, S. Ali, S.-F. Chin, C. Palmieri, C. Caldas, J.S. Carroll, Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer, *Nature* 481 (2012) 389–393, <https://doi.org/10.1038/nature10730>.
- [15] K.M. Jozwik, J.S. Carroll, Pioneer factors in hormone-dependent cancers, *Nat. Rev. Cancer* 12 (2012) 381–385, <https://doi.org/10.1038/nrc3263>.
- [16] S. Badve, D.J. Dabbs, S.J. Schnitt, F.L. Baehner, T. Decker, V. Eusebi, S.B. Fox, S. Ichihara, J. Jacquemier, S.R. Lakhani, J. Palacios, E.A. Rakha, A.L. Richardson, F.C. Schmitt, P.-H. Tan, G.M. Tse, B. Weigelt, I.O. Ellis, J.S. Reis-Filho, Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists, *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 24 (2011) 157–167, <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.200>.
- [17] E. Lim, F. Vaillant, D. Wu, N.C. Forrest, B. Pal, A.H. Hart, M.-L. Asselin-Labat, D.E. Gyorki, T. Ward, A. Partanen, F. Feleppa, L.I. Huschtscha, H.J. Thorne, kConFab, S.B. Fox, M. Yan, J.D. French, M.A. Brown, G.K. Smyth, J.E. Visvader, G.J. Lindeman, Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers, *Nat. Med.* 15 (2009) 907–913, <https://doi.org/10.1038/nm.2000>.
- [18] G. Molyneux, F.C. Geyer, F.-A. Magnay, A. McCarthy, H. Kendrick, R. Natrajan, A. Mackay, A. Grigoriadis, A. Tutt, A. Ashworth, J.S. Reis-Filho, M.J. Smalley, BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells, *Cell Stem Cell* 7 (2010) 403–417, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.010>.
- [19] T. Kuukasjärvi, J. Kononen, H. Helin, K. Holli, J. Isola, Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 14 (1996) 2584–2589, <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.9.2584>.
- [20] F. Miralles, G. Posern, A.-I. Zaromytidou, R. Treisman, Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL, *Cell* 113 (2003) 329–342.
- [21] G.C.T. Pipes, E.E. Creemers, E.N. Olson, The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis, *Genes Dev.* 20 (2006) 1545–1556, <https://doi.org/10.1101/gad.1428006>.
- [22] S. Li, S. Chang, X. Qi, J.A. Richardson, E.N. Olson, Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 5797–5808, <https://doi.org/10.1128/MCB.00211-06>.
- [23] Y. Sun, K. Boyd, W. Xu, J. Ma, C.W. Jackson, A. Fu, J.M. Shillingford, G.W. Robinson, L. Hennighausen, J.K. Hitzler, Z. Ma, S.W. Morris, Acute myeloid leukemia-associated Mkl1 (Mrtf-a) is a key regulator of mammary gland function, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 5809–5826, <https://doi.org/10.1128/MCB.00024-06>.
- [24] S. Medjkane, C. Perez-Sanchez, C. Gaggioli, E. Sahai, R. Treisman, Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis, *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 257–268, <https://doi.org/10.1038/ncb1833>.
- [25] K.S. Purrington, S. Slager, D. Eccles, D. Yannoukakis, P.A. Fasching, P. Miron, J. Carpenter, J. Chang-Claude, N.G. Martin, G.W. Montgomery, V. Kristensen, H. Anton-Culver, P. Goodfellow, W.J. Tapper, S. Raffiq, S.M. Gerty, L. Durcan, I. Konstantopoulou, F. Fostira, A. Vratimos, P. Apostolou, I. Kostanta, V. Kotoula, S. Lakis, M.A. Dimopoulos, D. Skarlos, D. Pectasides, G. Fountzilas,

- M.W. Beckmann, A. Hein, M. Ruebner, A.B. Ekici, A. Hartmann, R. Schulz-Wendland, S.P. Renner, W. Janni, B. Rack, C. Scholz, J. Neugebauer, U. Andergassen, M.P. Lux, L. Haerberle, C. Clarke, N. Pathmanathan, A. Rudolph, D. Flesch-Janyts, S. Nickels, J.E. Olson, J.N. Ingle, C. Olsword, S. Slettedahl, J.E. Eckel-Passow, S.K. Anderson, D.W. Visscher, V.L. Cafourek, H. Sicotte, N. Prodduturi, E. Weiderpass, L. Bernstein, A. Ziogas, J. Ivanovich, G.G. Giles, L. Baglietto, M. Southey, V.-M. Kosma, H.-P. Fischer, GENICA Network, M.W.R. Reed, S.S. Cross, S. Deming-Halverson, M. Shrubsole, Q. Cai, X.-O. Shu, M. Daly, J. Weaver, E. Ross, J. Klemp, P. Sharma, D. Torres, T. Rüdiger, H. Wölfling, H.-U. Ulmer, A. Försti, T. Khoury, S. Kumar, R. Pilarski, C.L. Shapiro, D. Greco, P. Heikkilä, K. Aittomäki, C. Blomqvist, A. Irwanto, J. Liu, V.S. Pankratz, X. Wang, G. Severi, A. Mannermaa, D. Easton, P. Hall, H. Brauch, A. Cox, W. Zheng, A.K. Godwin, U. Hamann, C. Ambrosone, A.E. Toland, H. Nevanlinna, C.M. Vachon, F.J. Couch, Genome-wide association study identifies 25 known breast cancer susceptibility loci as risk factors for triple-negative breast cancer, *Carcinogenesis* 35 (2014) 1012–1019, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt404>.
- [26] I. Gurbuz, J. Ferralli, T. Roloff, R. Chiquet-Ehrismann, M.B. Asparuhova, SAP domain-dependent Mkl1 signaling stimulates proliferation and cell migration by induction of a distinct gene set indicative of poor prognosis in breast cancer patients, *Mol. Cancer* 13 (2014) 22, <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-22>.
- [27] S. Lindström, D.J. Thompson, A.D. Paterson, J. Li, G.L. Gierach, C. Scott, J. Stone, J.A. Douglas, I. dos-Santos-Silva, P. Fernandez-Navarro, J. Verghese, P. Smith, J. Brown, R. Luben, N.J. Wareham, R.J.F. Loos, J.A. Heit, V.S. Pankratz, A. Norman, E.L. Goode, J.M. Cunningham, M. deAndrade, R.A. Vierkant, K. Czene, P.A. Fasching, L. Baglietto, M.C. Southey, G.G. Giles, K.P. Shah, H.-P. Chan, M.A. Helvie, A.H. Beck, N.W. Knoblauch, A. Hazra, D.J. Hunter, P. Kraft, M. Pollan, J.D. Figueroa, F.J. Couch, J.L. Hopper, P. Hall, D.F. Easton, N.F. Boyd, C.M. Vachon, R.M. Tamimi, Genome-wide association study identifies multiple loci associated with both mammographic density and breast cancer risk, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5303, <https://doi.org/10.1038/ncomms6303>.
- [28] G. Kerdivel, A. Boudot, D. Habauzit, F. Percevault, F. Demay, F. Pakdel, G. Flouriot, Activation of the MKL1/actin signaling pathway induces hormonal escape in estrogen-responsive breast cancer cell lines, *Mol. Cell. Endocrinol.* 390 (2014) 34–44, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.03.009>.
- [29] G. Flouriot, G. Huet, F. Demay, F. Pakdel, N. Boujrad, D. Michel, The actin/MKL1 signalling pathway influences cell growth and gene expression through large-scale chromatin reorganization and histone post-translational modifications, *Biochem. J.* 461 (2014) 257–268, <https://doi.org/10.1042/BJ20131240>.
- [30] G. Huet, Y. Mérot, F. Percevault, C. Tiffoche, J.-F. Arnal, N. Boujrad, F. Pakdel, R. Métivier, G. Flouriot, Repression of the estrogen receptor- α transcriptional activity by the rho/megakaryoblastic leukemia 1 signaling pathway, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 33729–33739, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.045534>.
- [31] G. Flouriot, C. Vaillant, G. Salbert, C. Pelissero, J.M. Guiraud, Y. Valotaire, Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long-term and stable liver-specific expression in aggregates, *J. Cell Sci.* 105 (Pt 2) (1993) 407–416.
- [32] R.C. Gentleman, V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Detting, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y.H. Yang, J. Zhang, Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics, *Genome Biol.* 5 (2004) R80, <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r80>.
- [33] J.M. Wettenhall, G.K. Smyth, limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data, *Bioinformatics*. *Oxf. Engl.* 20 (2004) 3705–3706, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth449>.
- [34] G. Yu, L.-G. Wang, Y. Han, Q.-Y. He, clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters, *Omic J. Integr. Biol.* 16 (2012) 284–287, <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>.
- [35] J. Quintin, C. Le Péron, G. Palierne, M. Bizot, S. Cunha, A.A. Sérandour, S. Avner, C. Henry, F. Percevault, M.-A. Belaud-Rotureau, S. Huet, E. Watrin, J. Eeckhoutte, V. Legagneux, G. Salbert, R. Métivier, Dynamic estrogen receptor interactomes control estrogen-responsive trefoil factor (TFF) locus cell-specific activities, *Mol. Cell. Biol.* 34 (2014) 2418–2436, <https://doi.org/10.1128/MCB.00918-13>.
- [36] G. Palierne, A. Fabre, R. Solinhac, C. Le Péron, S. Avner, F. Lenfant, C. Fontaine, G. Salbert, G. Flouriot, J.-F. Arnal, R. Métivier, Changes in gene expression and estrogen receptor cistrome in mouse liver upon acute E2 treatment, *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 30 (2016) 709–732, <https://doi.org/10.1210/me.2015-1311>.
- [37] B. Langmead, C. Trapnell, M. Pop, S.L. Salzberg, Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome, *Genome Biol.* 10 (2009) R25, <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>.
- [38] H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin, 1000 genome project data processing subgroup, the sequence alignment/map format and SAMtools, *Bioinformatics*. *Oxf. Engl.* 25 (2009) 2078–2079, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- [39] J. Feng, T. Liu, B. Qin, Y. Zhang, X.S. Liu, Identifying ChIP-seq enrichment using MACS, *Nat. Protoc.* 7 (2012) 1728–1740, <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.101>.
- [40] T. Liu, J.A. Ortiz, L. Taing, C.A. Meyer, B. Lee, Y. Zhang, H. Shin, S.S. Wong, J. Ma, Y. Lei, U.J. Pape, M. Poidinger, Y. Chen, K. Yeung, M. Brown, Y. Turpaz, X.S. Liu, Cistrome: an integrative platform for transcriptional regulation studies, *Genome Biol.* 12 (2011) R83, <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-8-r83>.
- [41] T. Barrett, D.B. Troup, S.E. Wilhite, P. Ledoux, D. Rudnev, C. Evangelista, I.F. Kim, A. Soboleva, M. Tomashevsky, K.A. Marshall, K.H. Phillippy, P.M. Sherman, R.N. Muertritt, R. Edgar, NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) D885–D890, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn764>.
- [42] S. Lamouille, J. Xu, R. Derynck, Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 178–196, <https://doi.org/10.1038/nrm3758>.
- [43] S.C. Stadler, C.D. Allis, Linking epithelial-to-mesenchymal-transition and epigenetic modifications, *Semin. Cancer Biol.* 22 (2012) 404–410, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.06.007>.
- [44] W.L. Tam, R.A. Weinberg, The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer, *Nat. Med.* 19 (2013) 1438–1449, <https://doi.org/10.1038/nm.3336>.
- [45] T. Sorlie, R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J.S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C.M. Perou, P.E. Lønning, P.O. Brown, A.-L. Børresen-Dale, D. Botstein, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 8418–8423, <https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>.
- [46] G.M. Bernardo, G. Bebek, C.L. Ginther, S.T. Sizemore, K.L. Lozada, J.D. Miedler, L.A. Anderson, A.K. Godwin, F.W. Abdul-Karim, D.J. Slamon, R.A. Keri, FOXA1 represses the molecular phenotype of basal breast cancer cells, *Oncogene* 32 (2013) 554–563, <https://doi.org/10.1038/ncr.2012.62>.
- [47] P.S. Ray, J. Wang, Y. Qu, M.-S. Sim, J. Shamonki, S.P. Bagaria, X. Ye, B. Liu, D. Elashoff, D.S. Hoon, M.A. Walter, J.W. Martens, A.L. Richardson, A.E. Giuliano, X. Cui, FOXC1 is a potential prognostic biomarker with functional significance in basal-like breast cancer, *Cancer Res.* 70 (2010) 3870–3876, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4120>.
- [48] J. Frasor, J.M. Danes, B. Komm, K.C.N. Chang, C.R. Lyttle, B.S. Katzenellenbogen, Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype, *Endocrinology* 144 (2003) 4562–4574, <https://doi.org/10.1210/en.2003-0567>.
- [49] K. Ovaska, F. Matarese, K. Grote, I. Charapitsa, A. Cervera, C. Liu, G. Reid, M. Seifert, H.G. Stunnenberg, S. Hautaniemi, Integrative analysis of deep sequencing data identifies estrogen receptor early response genes and links ATAD3B to poor survival in breast cancer, *PLoS Comput. Biol.* 9 (2013) e1003100, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003100>.
- [50] M.J. Fullwood, M.H. Liu, Y.F. Pan, J. Liu, H. Xu, Y.B. Mohamed, Y.L. Orlov, S. Velkov, A. Ho, P.H. Mei, E.G.Y. Chew, P.Y.H. Huang, W.-J. Welboren, Y. Han, H.S. Ooi, P.N. Ariyaratne, V.B. Vega, Y. Luo, P.Y. Tan, P.Y. Choy, K.D.S.A. Wansa, B. Zhao, K.S. Lim, S.C. Leow, J.S. Yow, R. Joseph, H. Li, K.V. Desai, J.S. Thomsen, Y.K. Lee, R.K.M. Karuturi, T. Herve, G. Bourque, H.G. Stunnenberg, X. Ruan, V. Cacheux-Rataboul, W.-K. Sung, E.T. Liu, C.-L. Wei, E. Cheung, Y. Ruan, An oestrogen-receptor- α -bound human chromatin interactome, *Nature* 462 (2009) 58–64, <https://doi.org/10.1038/nature08497>.
- [51] C.Y. McLean, D. Bristor, M. Hiller, S.L. Clarke, B.T. Schaar, C.B. Lowe, A.M. Wenger, G. Bejerano, GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 495–501, <https://doi.org/10.1038/nbt.1630>.
- [52] E. Calo, J. Wysocka, Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol. Cell* 49 (2013) 825–837, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.038>.
- [53] G.M. Sizemore, S.T. Sizemore, B. Pal, C.N. Booth, D.D. Seachrist, F.W. Abdul-Karim, T. Kume, R.A. Keri, FOXC1 is enriched in the mammary luminal progenitor population, but is not necessary for mouse mammary ductal morphogenesis, *Biol. Reprod.* 89 (2013) 10, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.108001>.
- [54] Y. Yu-Rice, Y. Jin, B. Han, Y. Qu, J. Johnson, T. Watanabe, L. Cheng, N. Deng, H. Tanaka, B. Gao, Z. Liu, Z. Sun, S. Bose, A.E. Giuliano, X. Cui, FOXC1 is involved in ER α silencing by counteracting GATA3 binding and is implicated in endocrine resistance, *Oncogene* 35 (2016) 5400–5411, <https://doi.org/10.1038/ncr.2016.78>.
- [55] D. Tkocz, N.T. Crawford, N.E. Buckley, F.B. Berry, R.D. Kennedy, J.J. Gorski, D.P. Harkin, P.B. Mullan, BRCA1 and GATA3 corepress FOXC1 to inhibit the pathogenesis of basal-like breast cancers, *Oncogene* 31 (2012) 3667–3678, <https://doi.org/10.1038/ncr.2011.531>.
- [56] S. Santagata, A. Thakkar, A. Ergonul, B. Wang, T. Woo, R. Hu, J.C. Harrell, G. McNamara, M. Schwede, A.C. Culhane, D. Kindelberger, S. Rodig, A. Richardson, S.J. Schnitt, R.M. Tamimi, T.A. Ince, Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 859–870, <https://doi.org/10.1172/JCI70941>.
- [57] J. McBryan, J. Howlin, S. Napolitano, F. Martin, Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13 (2008) 159–169, <https://doi.org/10.1007/s10911-008-9075-7>.
- [58] K.E. Luker, G.D. Luker, Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer, *Cancer Lett.* 238 (2006) 30–41, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.06.021>.
- [59] V.C. Jordan, R. Curpan, P.Y. Maximov, Estrogen receptor mutations found in breast cancer metastases integrated with the molecular pharmacology of selective ER modulators, *J. Natl. Cancer Inst.* 107 (2015) djv075, <https://doi.org/10.1093/jnci/djv075>.

Capítulo 3. Estudio de la adaptación celular inducida por la translocación nuclear de MKL1

3.1 Introducción

La asociación entre la resistencia hormonal y cambios funcionales del receptor abren la pregunta de si la conformación del receptor podría ser, en parte, responsable de estos cambios. Considerando que (i) resultados preliminares de ensayos de proteólisis limitada de nuestro grupo de investigación sugieren que existen cambios en la conformación del ER α durante la expresión nuclear de MKL1 en células MCF7 y (ii) nuestra hipótesis de trabajo se basa en que el plegamiento de una proteína particular depende del contexto celular, nos propusimos caracterizar el contexto celular en el que se da la síntesis del receptor cuando MKL1 es nuclear y cuando no lo es. Es de nuestro particular interés el análisis de los componentes de la maquinaria de traducción debido al potencial impacto que puede tener sobre el plegamiento de proteínas.

3.1.1 La maquinaria de traducción y el cáncer

“Cáncer” es un término genérico para designar cientos de enfermedades con rasgos distintivos, adquiridos progresivamente a lo largo del desarrollo del tumor: proliferación sostenida, evasión de los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, angiogénesis inducida, evasión inmunitaria y activación de la invasión y metástasis (Bastide and David, 2018; “What Is Cancer?,” 2007). Puede desarrollarse en casi cualquier órgano, tejido o tipo celular por lo que la variabilidad de las características de las células cancerosas es enorme. En el caso de tumores, además de la heterogeneidad debido a diferencias en su origen, puede existir heterogeneidad celular dentro del propio tumor y variabilidad en las características de cada célula a lo largo del tiempo. Las características pueden variar según la disposición espacial de la célula dentro del tumor. En ese sentido, las células que se encuentren en la periferia están expuestas a un microambiente diferente que las células más internas del tumor que van a estar rodeadas por otras células tumorales. Por otra parte, las células tumorales pueden presentar diferente estadio de diferenciación y/o sufrir transformaciones como en el caso de la EMT.

El conjunto de mecanismos por los cuales la maquinaria de traducción y en particular los ribosomas están involucrados en la carcinogénesis es amplio. Por ejemplo se ha descrito el secuestro de ribosomas por factores oncogénicos, cambios en la regulación de la traducción, hasta efectos de mutaciones en componentes de la maquinaria sobre el metabolismo celular (Bastide and David, 2018). El vínculo entre alteraciones en el control de la traducción y la etiología del cáncer constituye un foco de la investigación sobre el cáncer. Recientemente se ha establecido que alteraciones genéticas en varios componentes del aparato traduccional subyacen a algunos tumores “espontáneos”, así como a toda una clase de síndromes hereditarios conocidos como "ribosomopatías" que se encuentran vinculados a una mayor susceptibilidad al cáncer (Ruggero, 2013; Sulima et al., 2019). Además, existe cada vez más evidencia que apoya la hipótesis de que la desregulación de la traducción es un mecanismo común a través del cual diversas vías oncogénicas promueven la

transformación celular y el desarrollo de tumores. De hecho, la activación de estas vías oncogénicas clave induce una reprogramación traduccional rápida y espectacular que aumenta la síntesis de proteínas en forma general pero también es capaz de modular la expresión de ARNm específicos. Estos cambios traduccionales promueven la transformación celular, impactando en casi todas las fases del desarrollo del tumor (Ruggero, 2013). En los últimos años, los componentes de la maquinaria traduccional identificados como involucrados en el desarrollo del cáncer han sido utilizados como potenciales moléculas blanco para el desarrollo de fármacos así como biomarcadores con un potencial diagnóstico, pronóstico o significado predictivo (Vaklavas et al., 2017). En esta línea, el descubrimiento de la heterogeneidad de los ribosomas inter e incluso intracelular y la existencia de ribosomas especializados, ha hecho que algunos investigadores se planteen la posibilidad de la existencia de un ribosoma "oncogénico". Este ribosoma podría promover la progresión tumoral, desempeñando un papel fundamental en la adquisición y el mantenimiento del fenotipo de células madre cancerosas (Bastide and David, 2018).

Los tumores de mama no son la excepción. Se han descrito varios componentes de la maquinaria de traducción que aparecen alterados en tumores de mama y células derivadas de los mismos. En muchos casos, se ha encontrado un vínculo entre la expresión de estos componentes y el pronóstico del paciente. Este es el caso del factor de iniciación de la traducción EIF4EBP1 cuya sobreexpresión se asoció al grado de diferenciación y tamaño del tumor como a la presencia de metástasis (Rojo et al., 2007). En tumores ER α negativos por ejemplo, la sobreexpresión de los factores de iniciación de la traducción eIF4A1, eIF4B y eIF4E son marcadores de un mal pronóstico, mientras que, por otra parte, la sobreexpresión del inhibidor del factor eIF4A1, PDCD4, se vincula a buen pronóstico en tumores ER α positivos (Modelska et al., 2015). También se han reportado vínculos entre la expresión de proteínas ribosomales y la agresividad del tumor. Este es el caso de la proteína ribosomal RPL15, que codifica un componente de la subunidad ribosómica mayor. Su sobreexpresión en células tumorales circulantes aisladas de pacientes con cáncer de mama que fueron inoculadas en ratones aumentó el crecimiento metastásico en múltiples órganos y aumentó selectivamente la traducción de otras proteínas ribosomales y reguladores del ciclo celular (Ebright et al., 2020).

La proliferación y el crecimiento descontrolado son frecuentemente vinculados al desarrollo tumoral y estrechamente asociados al aumento de la síntesis de proteínas y a la biogénesis de ribosomas (Bastide and David, 2018). ¿Qué sucede con la biogénesis de ribosomas y los niveles de traducción en células tumorales? Los patólogos han utilizado el nucleolo, región del núcleo implicada en la biogénesis de los ribosomas, como parámetro para el diagnóstico de malignidad tumoral desde finales del siglo XIX. Los nucleolos hipertrofiados se consideraban un sello distintivo de las células cancerosas (Penzo et al., 2019). En este sentido, se han desarrollado numerosas drogas dirigidas a controlar la síntesis de ribosomas o su actividad para el tratamiento de tumores (Bhat et al., 2015).

Sin embargo, dado que los tumores son genéticamente heterogéneos, la síntesis de proteínas puede variar de una célula tumoral a otra. El estado de diferenciación parece ser una de las características determinantes en los niveles de síntesis proteica. La biosíntesis de ribosomas en células tumorales diferenciadas parece estar aumentada en comparación a

sus contrapartes no diferenciadas en forma general y es el caso de algunas células tumorales circulantes (CTCs) (Blanco et al., 2016; Sanchez et al., 2016; Signer et al., 2014). Se ha descrito que las condiciones de estrés vinculadas por ejemplo al microambiente celular como hipoxia y falta de nutrientes favorece una disminución en la síntesis de proteínas y mantiene el fenotipo de células madre. Una excepción parecen ser las CTCs derivadas de tumores de mama (Bastide and David, 2018).

¿Qué ventajas puede presentar mantener bajos los niveles de síntesis de proteínas? Una de las razones puede estar vinculada al metabolismo energético. La traducción es uno de los procesos de mayor demanda energética en la célula, y por lo tanto las células con altos niveles de traducción requieren una gran producción de ATP (Topisirovic and Sonenberg, 2011). La mayor parte de las células tumorales diferenciadas se basan en la glucólisis en lugar de la fosforilación oxidativa para la producción de ATP y la proliferación celular, aún cuando se encuentran en presencia de oxígeno, mecanismo conocido como efecto Warburg (DeBerardinis and Chandel, 2020). Sin embargo, no ha surgido un patrón metabólico consensuado en las células madre cancerosas desdiferenciadas (Bastide and David, 2018; Peiris-Pagès et al., 2016; Sancho et al., 2015).

La baja tasa de traducción también puede ser esencial para mantener la actividad del proteasoma reducida, otro sello distintivo de las células madre cancerosas desdiferenciadas (Bastide and David, 2018; Lagadec et al., 2014; Vlashi et al., 2009). De hecho, el proceso de traducción y plegamiento de la cadena polipeptídica naciente es intrínsecamente propenso a errores y hasta un tercio de las proteínas recién sintetizadas no alcanzan una conformación estable, sino que son degradadas inmediatamente por el sistema ubiquitina-proteasoma. Cualquier desequilibrio entre las tasas de síntesis y degradación de proteínas puede romper la homeostasis celular y desencadenar la acumulación citotóxica de proteínas mal plegadas (Bastide and David, 2018). Finalmente, una baja actividad de los ribosomas puede ser esencial para promover la traducción de un subconjunto de ARNm, que es esencial para el mantenimiento del estado desdiferenciado. Cualquier aumento de la síntesis de proteínas podría desencadenar una reprogramación traduccional y provocar la diferenciación celular (Sanchez et al., 2016). A pesar de estas generalidades, el vínculo entre baja tasa de traducción y propiedades de células desdiferenciadas podría depender del tejido. (Lamb et al., 2015).

3.1.2 El contexto celular a través del perfil de expresión transcripcional y traduccional

Entre las estrategias que se pueden utilizar como aproximación al estudio del contexto celular se encuentran las metodologías de RNA-seq y Ribosome Profiling. Ambas se basan en técnicas de secuenciación masiva o NGS (del inglés Next Generation Sequencing) que permiten la secuenciación de millones de fragmentos de ácidos nucleicos en simultáneo. Por un lado, la técnica de RNA-seq permite la identificación y cuantificación relativa de las moléculas de ARN presentes en una célula en un momento dado, mientras que Ribosome Profiling permite la detección y cuantificación relativa de las moléculas de ARN que están unidas a ribosomas. Es por esto que se puede considerar al RNA-seq como una representación de los niveles de transcripción génica o de los niveles de ARNm que hay en la célula (Mortazavi et al., 2008) mientras que el Ribo-seq se puede considerar como una

representación de los mensajeros que se está traduciendo (Ingolia, 2014). La comparación entre datos de RNA-seq, Ribo-seq y datos cuantitativos generados por espectrometría de masas ha mostrado que la abundancia relativa de proteínas se predice mejor a partir de datos de Ribo-seq que por los niveles de expresión de transcripción o RNA-seq (Liu et al., 2017, p.), convirtiéndose en una aproximación más precisa de los cambios del contexto celular.

Por otra parte, la regulación de la traducción proporciona respuestas adaptativas de la expresión génica más rápidas frente a las señales del ambiente (Bhat et al., 2015). De hecho, el control de la traducción tiene un papel importante en la regulación de la expresión génica, particularmente durante las transiciones dinámicas como el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, las respuestas a los estímulos y el estrés (Genuth and Barna, 2018b; Jovanovic et al., 2015). Por tanto los datos de Ribo-seq además de ser una aproximación más precisa para describir el contexto celular que el RNA-seq, analizados en conjunto pueden brindar información complementaria para entender dicho contexto, permitiendo mostrar a qué niveles se da la regulación de la expresión de genes específicos.

Dada la asociación entre la resistencia hormonal y cambios funcionales del receptor que ocurren como consecuencia de la translocación nuclear de MKL1 en el contexto de nuestra hipótesis de trabajo, nos propusimos explorar los cambios en el contexto celular utilizando RNA-seq y Ribo-seq. Para ello seleccionamos las líneas celulares MCF7 y MCF7 MKL1 Δ N200, y agregamos como control la línea MCF7 MKL1 Δ C301. Esta última sirve como control de la actividad transcripcional de MKL1 ya que en esta línea MKL1 carece de parte del dominio C-terminal que contiene la función de transactivación (ver detalles en la introducción). Además, constituye un control de cambios vinculados a la sobreexpresión de proteínas que no son abarcados por la línea MCF7. Este punto es particularmente importante ya que, como se comentó anteriormente, la traducción es uno de los procesos más demandantes de las células y por lo tanto la sobreexpresión de proteínas puede generar una gran adaptación celular.

Los resultados resultaron en la publicación de un trabajo que se adjunta a continuación titulado “Fine-tuning the metabolic rewiring and adaptation of translational machinery during an epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells” en *Cancer & Metabolism*. Una breve exposición de los resultados se presenta en la siguiente sección. En lo que respecta a este artículo mi participación fue directa en la generación y análisis de los datos de secuenciación, así como en la integración y discusión del resto de los resultados.

3.2 Resultados

3.2.1 Patrones generales de expresión

Para estudiar los principales cambios adaptativos que tienen lugar en las líneas derivadas de MCF7 durante la EMT inducida por MKL1, primero evaluamos los cambios en la expresión génica tanto a nivel transcripcional (datos de RNA-seq) como traduccional (datos de Ribo-seq). Los resultados mostraron que las tres líneas celulares comparten patrones de

expresión generales a pesar de presentar características específicas a cada una de ellas. En todas las líneas celulares se encontró una correlación moderada entre los niveles de expresión de ARN y los niveles de fragmentos protegidos por ribosomas (RPFs del inglés Ribosome Protected Fragments), lo que sugiere una correlación entre los programas transcripcionales y traduccionales. En todas las líneas, los genes de proteínas ribosomales y factores de elongación de la traducción mostraron una alta expresión. Además, MKL1 Δ N200 fue la línea celular más divergente de las 3, mostrando un repertorio ligeramente reducido de genes activos pero con una mayor eficiencia de traducción.

3.2.2. Los genes expresados diferencialmente validan la inducción de una EMT en células MKL1 Δ N200

Para caracterizar la transición EMT realizamos un análisis de la expresión génica diferencial entre las tres líneas celulares para ambos sets de datos (RNA-seq y Ribo-seq). Encontramos más de 3.000 genes diferencialmente expresados entre MKL1 Δ N200 y cada uno de los controles mientras que entre ambos controles se encontraron menos de 500 genes diferencialmente expresados (FDR <0.01 y FC > \pm 2). El análisis de ontologías de estos genes reveló un enriquecimiento de aquellos involucrados en la regulación de la adhesión, la organización del citoesqueleto de actina y la migración celular en las células MKL1 Δ N200. También encontramos una subrepresentación de genes implicados en la remodelación de la cromatina y la metilación del ADN, lo que sugiere la detención del ciclo celular. Estas observaciones son consistentes con la inducción de una EMT. Además, un análisis de GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) reveló una asociación significativa de las células control con un conjunto de genes marcadores de células luminales, mientras que las células MKL1 Δ N200 se asociaron con un conjunto de genes marcadores de células basales.

Con el fin de confirmar algunos de estos hallazgos, primero analizamos mediante Western blot la expresión de marcadores específicos. Los resultados obtenidos se alinearon, en forma general a lo esperado, aunque no para todos los marcadores testeados. La capacidad de invasividad de las células MCF7 MKL1 Δ N200 sugeridas por el análisis GO se ensayó mediante experimentos con esferas 3D de Matrigel. Solo las células MCF7 que expresan la variante MKL1 Δ N200 mostraron capacidad invasiva del Matrigel. Curiosamente, estas células también aumentaron su tamaño pero disminuyeron su viabilidad después de la expresión de MKL1 Δ N200 con tetraciclina. Después de 48 h de inducción, las células MKL1 Δ N200 alcanzaron alrededor del 60% de viabilidad, mientras que para las líneas celulares control permaneció relativamente constante.

En resumen, nuestros resultados confirmaron que el fenotipo MKL1 Δ N200 se asemeja a un estado EMT en el que la expresión de factores que promueven la transición está aumentada en contraste con la reducción de la expresión de varios marcadores epiteliales.

3.2.3 Regulación transcripcional y traduccional durante la EMT

Para evaluar si los genes diferencialmente expresados están regulados principalmente a nivel de la transcripción o de la traducción, comparamos los niveles de ARN y RPFs entre

las tres líneas celulares. Si la regulación de la expresión génica se da principalmente a nivel transcripcional, un aumento o reducción en los niveles de ARN debe ir acompañado por un aumento o reducción de los niveles de RPFs. Alternativamente, si la regulación de la expresión génica se da durante la traducción, los cambios en los niveles de RPFs no deberían ir acompañados por cambios en los niveles de ARN en la misma medida. Es decir, al comparar los niveles de ARN y RPFs representando los cambios en los niveles de RPFs en función de los cambios en los niveles de ARN entre dos líneas celulares, cualquier punto significativamente fuera de la diagonal representa un gen con regulación desacoplada entre la transcripción y la traducción.

Para identificar las vías específicamente reguladas a nivel transcripcional o traduccional se realizó un análisis de ontologías con grupos de genes específicos. El análisis de los genes diferencialmente transcritos entre las células MKL1 Δ N200 y las dos líneas control, cuya expresión reveló una alta representación de genes involucrados en la EMT, tal como se esperaba. Por otra parte, un tercio de los genes diferencialmente expresados mostró una regulación desacoplada entre la transcripción y la traducción. Resulta muy llamativo que el análisis de los genes que tienen un aumento significativamente mayor en los niveles de RPFs que en los de ARN (mayor eficiencia de traducción), muestra una sobrerrepresentación de genes relacionados con la maquinaria de traducción. Entre ellos, se incrementó la traducción de genes involucrados en la biogénesis de ribosomas, ensamblaje de ribosomas, factores de iniciación y otros factores generales de traducción citoplasmática.

Buscamos motivos de unión a microRNA y motivos UTR de 5' o 3' comunes a los genes con regulación traduccional, para explorar si proteínas de unión al ARN o miRNA podrían estar involucradas en algunos de los mecanismos postranscripcionales de regulación. Encontramos, por ejemplo, que la familia miR-520 parece desempeñar un papel en la regulación de este grupo de genes.

En suma, el análisis de los datos de RNA-seq combinados con Ribo-seq sugiere que las células emplean diferentes estrategias para regular su expresión génica. Además los datos evidencian la presencia de diferentes programas que podrían contribuir con la EMT.

3.2.4. Caracterización de la expresión de la maquinaria traduccional

Con el propósito de comprender los cambios en la síntesis de la maquinaria traduccional durante la EMT, analizamos la expresión de las proteínas ribosomales. Entre las tres líneas celulares se observa un patrón de expresión similar para las 88 proteínas ribosomales citoplasmáticas, es decir, las proteínas más expresadas son las mismas en las tres líneas y sucede lo mismo con las menos expresadas. Sin embargo, la comparación de las células MKL1 Δ N200 con las control revela un aumento generalizado en los RPFs en las células MKL1 Δ N200. El análisis de expresión diferencial muestra que en las células MKL1 Δ N200, las 88 proteínas ribosomales citoplasmáticas exhiben un aumento significativo de los RPFs sin cambios significativos en su expresión de ARNm. Esto sugiere un aumento en la traducción de estas proteínas regulado a nivel de la traducción en las células MKL1 Δ N200.

En contraste, las proteínas ribosomales mitocondriales permanecieron sin cambios entre las tres líneas celulares.

A diferencia de las proteínas ribosomales citoplasmáticas, la expresión de los factores de iniciación de la traducción y otros factores vinculados al inicio de la traducción, parece estar regulada a distintos niveles. Por ejemplo, para algunos factores los cambios de expresión parecen estar regulados a nivel transcripcional ya que se observa un aumento o una disminución de los niveles de ARN coordinado con los niveles de RPFs. Para otros, sin embargo, los cambios en los niveles de ARN y RPFs presentan tendencias diferentes. El cambio en la expresión génica específica a cada uno de los factores de iniciación sugieren una regulación selectiva de la expresión génica dirigida por el inicio de la traducción. Por ejemplo, el aumento en la expresión de un factor de iniciación determinado afectará únicamente al inicio de la traducción de aquellos genes que tiene por blanco. Por otra parte, en MKL1 Δ N200 se observó un aumento de los RPFs de todos los factores de elongación citoplasmáticos lo que sugiere un aumento de su traducción. Esto podría contribuir al aumento general de la traducción en estas células.

Para explorar si en la regulación de la expresión de proteínas ribosomales y factores de elongación podrían estar involucradas secuencias ricas en pirimidinas de las regiones 5'UTRs denominadas TOP (del inglés terminal oligopyrimidine) realizamos un GSEA con genes con eficiencia de traducción diferencial. Nuestros resultados revelaron un enriquecimiento significativo en las células MKL1 Δ N200 de los genes que contienen 5'TOP. Este resultado sugiere que las secuencias 5'TOP probablemente se encuentran involucradas en la regulación de la traducción de los componentes de la maquinaria de traducción en las células MKL1 Δ N200. Sin embargo, a partir de nuestros datos, no podemos proponer un mecanismo a través del cual esto pueda estar sucediendo.

El aumento de expresión de proteínas ribosomales, factores de elongación y otros factores asociados con la biogénesis de ribosomas sugiere un aumento general de la traducción en las células MKL1 Δ N200. Esto fue respaldado por los resultados de perfiles polisomales. El perfil polisomal de las células MKL1 Δ N200 se desplaza hacia fracciones más densas en comparación con las células de control, lo que indica que hay, en promedio, más ribosomas por ARNm, sugiriendo un aumento en la eficiencia de la traducción. De manera complementaria, como forma de validación de los datos y de los cambios en la expresión génica encontrados, seleccionamos cuatro genes con diferente comportamiento en sus niveles de RNA y RPFs y realizamos RT-qPCR de cada fracción individual del perfil polisomal. En todos los casos confirmamos los resultados esperados y además verificamos un aumento en la eficiencia de su traducción.

En conjunto, nuestros resultados sugieren un aumento en la síntesis de proteínas ribosomales, que se regula principalmente a nivel de traducción durante la EMT inducida por la translocación nuclear de MKL1. Encontramos también un aumento en la traducción de los factores relacionados con la traducción. Estos resultados, junto con los del análisis de fracciones polisomales, sugieren un aumento generalizado de la traducción y de su eficiencia.

3.2.5. Cambios en el metabolismo celular

Tanto los resultados del análisis de expresión diferencial como el de ontologías descritos previamente sugieren una adaptación del metabolismo en las células MKL1 Δ N200 durante la EMT. Dado que la biosíntesis de proteínas y la biogénesis de ribosomas se encuentran entre los procesos que consumen más energía de la célula, nos planteamos analizar el metabolismo celular en más detalle. Para la mayoría de las enzimas del metabolismo energético, a diferencia de lo observado para la maquinaria de traducción, se encontraron cambios relativamente similares en los niveles de ARN y RPFs sugiriendo que los cambios de la expresión génica son dirigidos mediante la reprogramación de la transcripción.

Los resultados del análisis sugieren que en MKL1 Δ N200 la glucólisis está completamente activa, con un marcado aumento en la captación de glucosa y producción de lactato. La vía que conduce a la producción de lactato mostró un aumento general en la expresión de la mayoría de las enzimas, con un aumento en la expresión de todas las isoformas de LDH responsables de la producción de lactato a partir de piruvato. Esto se confirmó experimentalmente al detectar un cambio significativo en el consumo de glucosa / tasa de producción de lactato y mediante mediciones metabolómicas globales que mostraron un aumento intracelular de glucosa y Fructosa-1,6-bisfosfato. El análisis de expresión génica también reveló cambios en la expresión de isoformas críticas responsables de la absorción de la glucosa y la regulación de la vía. También detectamos una disminución en la expresión de las enzimas responsables de dirigir el flujo de la vía hacia otras vías metabólicas. Nuestros resultados sugieren fuertemente que el paso que conduce de piruvato a acetil-CoA se vio gravemente afectado en las células MKL1 Δ N200. La alimentación al ciclo de TCA, por lo tanto, se reduciría, así como la desviación hacia la biosíntesis de lípidos y el metabolismo de la serina.

Por otra parte, se encontró un fuerte cambio en la expresión de las enzimas involucradas en el ciclo de TCA en las células MKL1 Δ N200 en comparación con ambas células control, datos que resultaron consistentes con las mediciones metabolómicas. Sin embargo, a partir de los datos obtenidos no se puede sugerir un cambio claro en el sentido o el volumen del flujo del ciclo.

En lo que respecta al ciclo de las pentosas, la fase oxidativa presentó una disminución de la expresión de algunas enzimas en MKL1 Δ N200 en comparación con las células control, mientras que la fase no oxidativa mostró un aumento en la expresión de otras. Estos datos pueden sugerir que el flujo del ciclo de las pentosas está orientado a mantener el estado redox a través de la producción de NADPH sin síntesis de ribonucleótidos y hacia el reciclaje y suministro de metabolitos.

HIF-1 es un importante regulador transcripcional involucrado en el efecto Warburg. En las células MKL1 Δ N200, la expresión de HIF-1 α y HIF-2 α se incrementó significativamente, mientras que la expresión de la E3-ligasa VHL (factor de Von Hippel-Lindau), implicada en la ubiquitinación de HIF-1 α para su degradación proteasomal en condiciones normales de oxígeno, se redujo. Recientemente, se ha descrito un nivel adicional de control de la actividad de HIF-1 α que implica dos ARN no codificantes largos. La transcripción de ambos

ARN antisentido aumentó claramente en las células MKL1 Δ N200. El aumento significativo de la expresión de HIF-1 α en las células MKL1 Δ N200 es consistente con la ubicación nuclear aumentada revelada por inmunofluorescencia *in situ*. Estos resultados sugieren que HIF1 podría ser uno de los mecanismos involucrados en la reprogramación del metabolismo en las células MKL1 Δ N200.

3.3 Discusión

Durante la translocación nuclear de MKL1 en las células MCF7 las células pierden su capacidad de respuesta frente a estímulos hormonales y pierden parte de sus características luminales adquiriendo características de células basales. Las características basales generales adquiridas, cómo la pérdida de respuesta hormonal así como la disminución de la expresión del ER α , del PR y del HER2 que habían sido previamente encontradas por nosotros, fueron apoyados por los datos de expresión génica. Los perfiles de expresión génica muestran que las células MCF7 y las MCF7 Δ C301 tienen un perfil de expresión característico de células luminales mientras que las MCF7 Δ N200 presentan un perfil característico de células basales.

El cambio de células luminales a basales se podría interpretar como un corrimiento parcial desde improntas epiteliales hacia mesenquimales en el espectro de la EMT (Wahl and Spike, 2017). ¿Podemos considerar las transformaciones que sufren las células tras la translocación nuclear de MKL1 como una EMT? Los marcadores clásicos utilizados para la identificación de células mesenquimales y epiteliales muestran cambios variables pero, en líneas generales, consistentes con lo esperado. En otras palabras, algunos marcadores presentan cambios descritos en la literatura mientras que otros no presentan cambios. ¿Es esto compatible con una EMT? Desde nuestra perspectiva no todos los marcadores deben cambiar al mismo tiempo, sino que, al ser una transición, algunos marcadores serán preponderantes en algunas etapas específicas de la misma. Lo que nos impulsa a concluir que estas células están comenzando una transición epitelio-mesenquimal son los resultados en su conjunto, en los cuales la presencia de marcadores se encuentra acompañada de la aparición de otras características clásicas de células que se están transformando. Entre estas características cabe especialmente señalar la adquisición de la capacidad de migrar acompañada de la sobreexpresión de proteínas que forman estructuras para adhesiones focales vinculadas a la migración celular (como la ITGA5) y la reorganización de componentes del citoesqueleto. En particular cabe destacar el desensamblaje de E-cadherina en las células MKL1 Δ N200 (Kerdivel et al., 2014) y la observación de cambios morfológicos entre los cuales se encuentra un aumento de estructuras tipo lamelipodios (datos no publicados).

Los cambios celulares producidos por la translocación nuclear de MKL1 son acompañados, como se describió en el capítulo anterior, por cambios funcionales del ER α : el receptor disminuye su capacidad de transactivación y su unión al genoma se encuentra fuertemente afectada con una pérdida masiva de sitios de unión, la ganancia de otros así como un menor reclutamiento del ER α a los sitios de unión conservados que pueden explicar al menos en parte la pérdida de la regulación de la transcripción mediada por estrógenos. La

actividad tipo celular específica del ER α junto con resultados preliminares del grupo que sugieren que la base de esta actividad podría ser la conformación del receptor y las características celulares del modelo descritas anteriormente, nos impulsaron a investigar el contexto celular en que se da la síntesis y el plegamiento del receptor.

El primer foco de atención fue la maquinaria traduccional. Nuestros resultados sugieren un aumento generalizado de la traducción en las células MKL1 Δ N200. Esto parecería ser posible por un aumento en la biogénesis de ribosomas, sugerido por el aumento de la proteínas ribosomales y de la cantidad relativa de polisomas, acompañado por el aumento de los factores de elongación. Además, los resultados sugieren para estos componentes una eficiencia de traducción aumentada, por lo que las células MKL1 Δ N200 parecen necesitar ribosomas. A pesar de una traducción activa generalizada, la expresión de los factores de iniciación sugieren algún tipo de control sobre la selección de mensajeros que se están traduciendo. ¿Cómo impacta el cambio en la expresión de factores de iniciación? y ¿qué mensajeros pueden ser seleccionados o desestimados para su traducción a través de este mecanismo? Estos son elementos a explorar en el futuro.

En este escenario, la regulación traduccional de la traducción muestra jugar un rol muy importante. Los cambios en la expresión de los componentes de la maquinaria de traducción parecen estar regulados por la propia traducción dado que el aumento de su expresión se evidencia únicamente en sus niveles de RPFs y no en los niveles de ARN. La regulación a nivel de la traducción permite responder de forma más rápida a cambios en las señales celulares que a través de mecanismos que involucren cambios en los niveles de mRNA por lo que mantener una regulación traduccional de la traducción puede ser estratégico para la velocidad de respuesta celular. ¿A través de qué mecanismos se puede estar dando la regulación traduccional? La diferencia en los cambios de la expresión de los factores de traducción descritos en el párrafo anterior pueden ser un mecanismo, pero además otros mecanismos podrían estar involucrados. El enriquecimiento de motivos de unión a microRNAs y motivos de unión a proteínas en los mensajeros regulados traduccionalmente sugieren a estos mecanismos como partícipes en esta red regulatoria. Algunos de los microRNAs y de las proteínas de unión al ARN sugeridas por los análisis como participantes en la regulación traduccional han sido previamente vinculados a procesos tumorales de mama y/o a EMT por lo que es interesante profundizar su participación en la regulación de los cambios en este modelo (Keklikoglou et al., 2012; O'Day and Lal, 2010; Singh and Mo, 2013). Este es el caso de la familia, por ejemplo, de la familia miR-520.

¿Para qué pueden necesitar aumentar la síntesis de proteínas estas células? Las curvas que describen el crecimiento celular sumado a la represión de la expresión de los genes vinculados a vías de proliferación celular y a datos no publicados sobre el ciclo celular de las mismas sugieren que las células MKL1 Δ N200 no están proliferando. Por lo tanto el aumento en la síntesis de proteínas no estaría vinculada a su proliferación. Por otra parte, el aumento de la producción de proteínas queda evidenciado en el aumento de su tamaño. Experimentos no publicados mostraron que, si las células MKL1 Δ N200 se cultivan el tiempo suficiente, un tiempo mayor que el de las condiciones establecidas de trabajo,

continúan creciendo hasta explotar. Esto no se observa cuando se cultivan en matrigel y tienen un contexto en el cual pueden migrar.

De hecho, nuestra hipótesis principal es que las células MKL1 Δ N200 se están preparando para migrar. La hipótesis surge en parte por los resultados que sugieren un cambio en el tipo de unión célula-célula, con un aumento de estructuras tipo lamelipodios acompañado de aumento de adhesiones focales y la adquisición de la capacidad de migración y por otra parte por un aumento en la síntesis y exportación de proteínas de la matriz extracelular (ECM), principalmente colágeno, sugerida por los datos de la expresión génica. Cambios activos del microambiente tumoral por parte de células tumorales han sido descritos previamente en la literatura. Estas células tumorales pueden contribuir a definir y modificar la composición de la ECM durante la progresión del cáncer (Naba et al., 2014, 2012) y de esta manera, mediante la generación de diferencias en la composición de la matriz pueden facilitar la migración celular y la progresión del tumor (Karagiannis et al., 2012; Lee et al., 2011).

Si nuestra hipótesis es correcta, el aumento en la biosíntesis de proteínas y en particular de la maquinaria de traducción, además de facilitar el cambio en la composición de la matriz extracelular, permitiría a las células estar preparadas para proliferar inmediatamente una vez hayan colonizado algún sitio secundario al sitio de origen del tumor.

En esta línea de pensamiento es razonable pensar en una viabilidad celular disminuida de las células MKL1 Δ N200 ya que sólo un pequeño porcentaje de células sería realmente capaz de migrar y a su vez, sólo algunas de estas células serían capaces de colonizar un sitio secundario. A su vez, nuestra hipótesis respecto a que las células MKL1 Δ N200 aumentan la biosíntesis de proteínas para prepararse para su migración y posterior colonización de sitios secundarios es compatible con la descripción de CTCs derivadas de tumores de mama que sobreexpresan proteínas ribosomales (Ebright et al., 2020). Esto último parece ser particular de CTCs derivadas de tumores de mama, ya que en células derivadas de otros tumores, por el contrario, se ha descrito que las condiciones de estrés vinculadas por ejemplo al microambiente celular como hipoxia y falta de nutrientes favorece una disminución en la síntesis de proteínas y mantiene el fenotipo de células madre (Bastide and David, 2018).

Somos conscientes de que algunos de los cambios pueden ser compatibles con un proceso de senescencia celular así como también con un proceso de diferenciación a miofibroblastos. En este sentido, nuestro trabajo futuro debe explorar también esta alternativa.

Los cambios en las características celulares y la síntesis de proteínas se encuentran acompañados de cambios en el metabolismo donde encontramos un efecto Warburg acentuado. El efecto Warburg se compone de tres factores que deben darse en conjunto: altas tasas de absorción de glucosa y altas tasas de secreción de lactato en presencia de oxígeno (glucólisis aeróbica) (DeBerardinis and Chandel, 2020). Un aumento en el consumo de la glucosa y su rápido metabolismo permite que las células alimenten a varias vías no mitocondriales que contribuyen a la síntesis macromolecular. Estos incluyen la vía de las

pentosas-fosfato, que produce ribosa para nucleótidos y NADPH para la biosíntesis reductora; la vía de la hexosamina, necesaria para la glicosilación de proteínas; metabolismo de serina y glicina, que alimenta la síntesis de glutatión, nucleótidos y reacciones de metilación; y la síntesis de glicerol para la producción de lípidos complejos (DeBerardinis and Chandel, 2020). Por lo tanto, el efecto Warburg puede permitir que las células mantengan grandes grupos de intermediarios glicolíticos. Tener estos metabolitos favorecería potencialmente a estas vías biosintéticas que se ramifican desde la glucólisis. Esta ventaja se mantendría incluso si gran parte del flujo glicolítico termina en la secreción de lactato (DeBerardinis and Chandel, 2020). Cabe señalar que la translocación nuclear de MKL1 no produce cambios en la expresión génica de todas las vías derivadas de la glucosa señaladas y para entender el alcance de los cambios observados es necesario profundizar los ensayos de metabolómica por ejemplo.

La translocación nuclear de MKL1 produce en las células MCF7 un aumento del consumo de glucosa acompañado de un aumento de la síntesis de lactato. El aumento del consumo de glucosa es mayor que el aumento de la producción de lactato, por lo que la tasa de glucosa/lactato aumenta. Esto es consistente con la necesidad de un aumento en los metabolitos intermedios derivados de la glucólisis necesarios para la biosíntesis de proteínas. En cultivo, la glucosa es abundante y por tanto la tasa glicolítica puede exceder con mucho la tasa máxima de oxidación del piruvato mitocondrial, lo que hace que la secreción de lactato sea inevitable. Sería importante determinar si la translocación nuclear de MKL1 en tumores *in vivo* produce un aumento en el consumo de glucosa al igual que en cultivo.

Entre las vías alimentadas por la glucólisis la vía de las pentosas fosfato parece estar contribuyendo al cambio en el estado celular de las células MKL1 Δ N200. Los cambios observados sugieren que el flujo de la vía se encuentra orientado a mantener el estado redox a través de la producción de NADPH sin síntesis de ribonucleótidos y hacia el reciclaje y suministro de metabolitos. Esto es consistente con un aumento general de la traducción sin un aumento sustancial de la transcripción ni proliferación celular.

En gran parte de los tejidos tumorales que presentan un efecto Warburg, a pesar del aumento en la glucólisis se mantiene el consumo de oxígeno. Es cierto que la tasa respiratoria baja en relación con lo que se podría predecir por la alta tasa de absorción de glucosa, pero la respiración en sí continúa y juega un papel importante en el crecimiento de tumores y células cancerosas (DeBerardinis and Chandel, 2020). La respiración permite la proliferación celular al permitir que las células produzcan intermedios del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) que son necesarios para el anabolismo. La respiración está ligada al ciclo del TCA, porque los portadores de electrones reducidos generados a medida que el ciclo gira son re-oxidados por la cadena de transporte de electrones. En las células MKL1 Δ N200 los cambios en la expresión de las enzimas del TCA sugieren la activación de un estado de "pseudo hipoxia". Este estado podría estar vinculado a los cambios en la biosíntesis, estabilidad y localización nuclear de HIF1- α . HIF1- α es un factor de transcripción que se expresa en respuesta a la ausencia de oxígeno. En este caso, su sobreexpresión y localización celular podría estar ayudando a inducir a estas células a comportarse como si estuvieran en ausencia de oxígeno. Sería interesante medir las tasas

de respiración celular y nuevos estudios de metabolómica para evaluar si la respiración celular se encuentra afectada.

Los principales cambios en las enzimas del TCA sugieren un aumento del α -cetoglutarato α -cetoglutarato lo cual fue confirmado por metabolómica. Este punto del ciclo puede ser un punto de interconexión entre algunos de los procesos que subyacen a los cambios inducidos por la translocación nuclear de MKL1. El α -cetoglutarato se encuentra vinculado a la estabilidad de HIF-1 α , a la biosíntesis de colágeno (juega un rol importante en la síntesis de prolina excretado a la matriz extracelular), así como a la regulación de la biosíntesis de lípidos (fundamental para el aumento del tamaño celular y para el tránsito hacia la matriz extracelular) y del estado redox. El cambio de isoforma de IDH3 a IDH2 en las células MKL1 Δ N200 posibilita la reversión del ciclo convirtiéndose el α -cetoglutarato en un punto clave para el control.

Dicho esto, resta mucho por entender en los vínculos causa/consecuencia en esta transformación. ¿Cómo es que la translocación nuclear de MKL1 es capaz de desencadenar todos estos cambios? ¿Qué cambios pueden funcionar como una llave de la transformación?

Dos puntos a tener en especial consideración en el análisis, además de la realizada previamente sobre las condiciones de cultivo, es que trabajamos con células heterogéneas que crecen en monocapa. Es importante tener en cuenta que los datos de Ribosome Profiling y de RNA-seq representan la expresión promedio de todas las células en el cultivo, por lo que las señales provenientes de subpoblaciones celulares diferentes pueden quedar representadas por los cambios predominantes de las poblaciones más abundantes. Sería importante identificar la presencia de subpoblaciones y analizar su expresión en forma independiente para entender si todas podrían tener el mismo destino final. Es sensato pensar que en tumores *in vivo* existe una gran heterogeneidad celular y que, en base a sus diferencias, no todas las células pueden ser igual de exitosas al migrar hacia otros destinos. Tiene sentido pensar que la heterogeneidad celular en tumores puede encontrarse también a nivel espacial ya que los estímulos y las condiciones ambientales a los cuales son sometidos las células de la periferia no son los mismos que sufren las células interiores al tumor. Como aproximación se podría intentar tener un modelo tridimensional para el estudio de la translocación nuclear de MKL1 y/o realizar transcriptómica *single cell* a partir de células tumorales.

En resumen, pudimos cumplir con el tercer objetivo específico del trabajo que era estudiar diferencias entre los contextos celulares de las líneas MCF7, MCF7 MKL1 Δ N200 y MCF7 MKL1 Δ C301 y en particular, caracterizar cambios en la expresión de componentes de la maquinaria de traducción en estas células. Además, consideramos que el modelo celular aquí descrito es un buen modelo para el estudio del efecto del contexto celular en el plegamiento del ER α . Somos conscientes que es un modelo particular donde la transición es inducida por la translocación nuclear de MKL1 y tenemos claro que este modelo se restringe a este contexto y no necesariamente es así para la inducción de la EMT por otros mecanismos o para otros cambios tumorales de tipo luminal a basal. A su vez, los cambios observados no son necesariamente así en otras condiciones nutricionales o en

microambientes tumorales. A futuro es interesante explorar si algunos cambios de los observados son generalizables o son específicos a la transición inducida por la translocación nuclear de MKL1 combinado con el contexto nutricional.

Dicho esto, consideramos que el modelo celular aquí descrito es un buen modelo para el estudio del impacto de la maquinaria de traducción en el plegamiento y estructura del ER α . Este modelo permite a su vez explorar otros aspectos del vínculo entre el contexto celular y el plegamiento y estructura de proteínas. Entre ellas, ¿cómo impacta un aumento generalizado de la traducción en las síntesis y plegamiento de otras proteínas además del ER? ¿Se encuentra la expresión particular de algunas proteínas ribosomales involucradas en su plegamiento? ¿o podría ser un efecto en el cambio de la eficiencia de traducción? ¿Existen efectos estocásticos pueden cambiar la cinética de traducción y también tener un impacto en la conformación final del ER? Queda mucho por recorrer antes de entender cuáles son los factores que juegan un rol en el vínculo entre la características funcionales de ER α y la características del contexto celular.

Por último, cabe señalar que este trabajo destacó el enorme potencial que tiene combinar el análisis de RNA-seq con el de Ribosome Profiling para exponer diferentes estrategias de regulación celular.

3.4 Conclusión

En este trabajo pudimos caracterizar las generalidades en el cambio del contexto celular que resulta de la translocación nuclear de MKL1. Confirmamos la pérdida de las características luminales y la adquisición de características basales consistentes con una EMT. Los resultados sugieren un aumento generalizado de la traducción de proteínas y en particular de la traducción de las proteínas ribosomales y factores de elongación, que se encuentra regulado a nivel de la traducción. Este aumento de la traducción no parece estar vinculado a una proliferación celular activa sino que, por el contrario, los resultados sugieren una represión de la proliferación. El aumento en la traducción parece responder a un aumento del tamaño, al cambio de la morfología celular, a un aumento de la secreción de proteínas y a cambios a nivel de la unión de la matriz extracelular. Todos estos cambios vienen acompañados de una adaptación metabólica donde parece haber un efecto Warburg acentuado que colaboraría con la disponibilidad de metabolitos intermediarios para la producción de proteínas y lípidos. En esta caracterización la combinación de RNA-seq con Ribo-seq mostró ser una herramienta extremadamente valiosa. A pesar de sus limitaciones, este modelo resulta una excelente plataforma para el estudio del plegamiento y funcionalidad del ER α en un tipo de transición EMT y considerando el cambio de contexto celular. El trabajo abre la puerta a múltiples preguntas y futuros ensayos tanto en lo que respecta a EMT inducidas por la translocación nuclear de MKL1 como también en lo que respecta a la estructura y funcionalidad del receptor en este contexto.

RESEARCH

Open Access



Fine-tuning the metabolic rewiring and adaptation of translational machinery during an epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells

Tamara Fernández-Calero^{1,2,3†}, Marcos Davyt^{1†}, Karen Perelmuter⁴, Cora Chalar¹, Giovana Bampi⁵, Helena Persson⁶, Juan Pablo Tosar^{7,8}, Völundur Hafstað⁶, Hugo Naya², Carlos Rovira⁶, Mariela Bollati-Fogolín⁴, Ricardo Ehrlich^{1,9}, Gilles Flouriot¹⁰, Zoya Ignatova⁵ and Mónica Marín^{1*}

Abstract: Background: During breast cancer progression, the epithelial to mesenchymal transition has been associated with metastasis and endocrine therapy resistance; however, the underlying mechanisms remain elusive. To gain insight into this process, we studied the transition undergone by MCF7-derived cells, which is driven by the constitutive nuclear expression of a MKL1 variant devoid of the actin-binding domain (MKL1 Δ N200). We characterized the adaptive changes that occur during the MKL1-induced cellular model and focused on regulation of translation machinery and metabolic adaptation.

Methods: We performed a genome-wide analysis at the transcriptional and translational level using ribosome profiling complemented with RNA-Seq and analyzed the expression of components of the translation machinery and enzymes involved in energy metabolism. NGS data were correlated with metabolomic measurements and quantification of specific mRNAs extracted from polysomes and western blots.

Results: Our results reveal the expression profiles of a luminal to basal-like state in accordance with an epithelial to mesenchymal transition. During the transition, the synthesis of ribosomal proteins and that of many translational factors was upregulated. This overexpression of the translational machinery appears to be regulated at the translational level. Our results indicate an increase of ribosome biogenesis and translation activity. We detected an extensive metabolic rewiring occurring in an already “Warburg-like” context, in which enzyme isoform switches and metabolic shunts indicate a crucial role of HIF-1 α along with other master regulatory factors. Furthermore, we detected a decrease in the expression of enzymes involved in ribonucleotide synthesis from the pentose phosphate pathway. During this transition, cells increase in size, downregulate genes associated with proliferation, and strongly upregulate expression of cytoskeletal and extracellular matrix genes.

(Continued on next page)

* Correspondence: marin@fcien.edu.uy

[†]Tamara Fernández-Calero and Marcos Davyt contributed equally to this work.

¹Biochemistry-Molecular Biology Section, Faculty of Sciences, Universidad de la República, Iguá 4225, CP 11400 Montevideo, Uruguay

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(Continued from previous page)

Conclusions: Our study reveals multiple regulatory events associated with metabolic and translational machinery adaptation during an epithelial mesenchymal-like transition process. During this major cellular transition, cells achieve a new homeostatic state ensuring their survival. This work shows that ribosome profiling complemented with RNA-Seq is a powerful approach to unveil in-depth global adaptive cellular responses and the interconnection among regulatory circuits, which will be helpful for identification of new therapeutic targets.

Keywords: Breast cancer, EMT, Luminal to basal transition, MKL1/actin signaling pathway, Metabolism adaptation, Translation machinery, Ribosome profiling, Breast cancer stem cells

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide and the second most common cause of cancer mortality. More than 90% of breast cancer-related mortalities are caused by its metastases at distant sites [1]. During cancer progression, cells acquire new abilities and switch from a well-differentiated epithelial phenotype to a metastatic one [2].

The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is an essential biological process during normal development, which is also observed in cancer and other pathologies [3]. During this transition, epithelial cells lose differentiated characteristics such as cell adhesion and polarity and acquire immature features, including high cellular plasticity, motility, invasiveness, and resistance to apoptosis [4]. Cells undergoing an EMT downregulate epithelial markers, such as E-cadherin, claudins, occludins, and cytokeratins, and upregulate mesenchymal markers, such as S100A4 (also called FSP1, for Fibroblast-Specific Protein 1), vimentin, and N-cadherin [5]. In tumorigenic processes, EMTs have been found to contribute to invasion, metastatic dissemination, and the acquisition of therapeutic resistance [3]. The EMT may be incomplete and the cell population heterogeneous; hence, only part of the EMT markers may be expressed in small sets of cancer cells [5]. Among breast cancer subtypes, luminal tumors appear to have cells solely on the epithelial edge of the EMT spectrum while basal-like tumors are more heterogeneous with cells spanning the spectrum from potential progenitors to mesenchymal-oriented variants [6].

Different pathways can drive an EMT. The primary mediators of the EMT include signaling through TGF- β , Notch, and Wnt, but the transition is also influenced by the tumor microenvironment, such as hypoxia and differential expression of microRNAs, e.g., miR-200 [7, 8]. The differential expression of the transcriptional factors SNAI (Snail), Zeb, and Twist, which are common to several pathways, or silencing of the ER, may also lead to the EMT [7]. In breast cancer cells, the MKL1/actin signaling pathway drives an EM transition. The MKL1 pathway is active in breast cancer cells with a basal-like phenotype and silenced in luminal ER-positive cell lines.

This member of the myocardin-related transcription factor family is a coactivator of serum response factor (SRF). MKL1 (also known as MRTFA) is a master regulator of actin dynamics and cellular motility functions. In the cytoplasm, MKL1 binds free actin monomers. Upon actin polymerization, MKL1 dissociates and translocates into the nucleus where it binds SRF and promotes the induction of SRF target genes that are involved in motile cell functions. Indeed, MKL1 and SRF are required for tumor cell invasion and metastasis. Kerdivel et al. [9] showed that the nuclear localization of ER and MKL1 in breast cancer cells is mutually exclusive. Activation of the MKL1/actin pathway in estrogen-sensitive breast cancer cells leads to hormonal resistance associated with a severe decrease in the expression of ER, PR, and HER2 [9].

Using a tetracycline-inducible expression vector system, Flouriot et al. [10] developed MCF7 subclones expressing truncated forms of MKL1. In MKL1 Δ N200 cells, the expression of the MKL1 variant with N-terminal deletion—devoid of the actin-binding sites (RPEL motifs)—leads to a constitutive activity and permanent translocation into the nucleus of this cofactor [9, 10]. The control cell line corresponds to MCF7 cells stably transfected with the empty vector. In addition, so-called MKL1 Δ C301 cells expressing MKL1 that are devoid of 301 residues from the C-terminal transactivation domain is also taken as a control cell line. Therefore, the MKL1 Δ N200 cell line appears to be a promising cellular model to address the adaptive changes that occur during breast cancer progression in an EM-like transition.

To gain detailed insights into breast cancer progression, here, we characterized the adaptive changes that occur during the MKL1-induced EM-like transition. We employed the MKL1-inducible cellular model (MCF7 control, MKL1 Δ N200, MKL1 Δ C301) and focused on regulation of translation machinery and metabolic adaptation. Leveraging the depth of NGS-based approaches, we performed a genome-wide analysis at the transcriptional and translational level using ribosome profiling complemented with RNA-Seq and analyzed the expression of components of the translation machinery and enzymes involved in energy metabolism. These data were

correlated with metabolomic measurements, western blot, and quantification of specific mRNAs extracted from polysomes. This approach revealed that MKL1 Δ N200 cells exhibit features corresponding to a transition state from a luminal to a basal-like phenotype, with stem cell-like traits.

Materials and methods

Cell culture, glucose consumption, lactate production, and differences between cell sizes

Stably transfected MCF7 T-Rex subclones (T-Rex system, Invitrogen), MCF7-control, MCF7-MKL1 Δ N200, and MCF7-MKL1 Δ C301 were previously described by [9–11]. The cells were routinely maintained in DMEM Gibco™ GlutaMAX™, containing 4.5 g/L glucose and phenol red, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco™), zeocin (100 μ g/mL), and blasticidin (5 μ g/mL), at 37 °C in 5% CO₂. Before any experiments, MCF7 cells were maintained in phenol red-free DMEM (Thermo) supplemented with 2.5% charcoal-stripped FCS (Capricorn), 1% pyruvate (Invitrogen), and 1% L-glutamine (Invitrogen) for 48 h. To induce expression of MKL1 protein variants (MKL1 Δ N200 and MKL1 Δ C301), MCF7 subclone cultures were treated with 1 μ g/mL tetracycline for 48 h. To evaluate glucose consumption and lactate production in MCF7 subclones, cell growth curves were performed and maintained for 120 h. Cell viability was determined every 24 h by trypan blue dye exclusion method by counting viable cells using Neubauer chambers. Glucose and lactate concentrations were measured every 24 h in the supernatant using the glucose/lactate analyzer BioProfile Basic 2 (Nova Biomedical, USA). To evaluate differences in cell size during growth, the cells were analyzed using an Accuri C6 (BD, USA) flow cytometer equipped with 488 nm and 633 nm lasers. The BD Accuri C6 software was used for data acquisition and analysis. For each sample, 5000 counts gated on a Forward Scatter (FSC) versus Side Scatter (SSC) dot plot, excluding doublets, were recorded. The median of the FSC channel (FSC-A) was compared between cell lines.

Polysome profiling

Approximately 2.2×10^6 cells were seeded in 10-cm diameter plates and cultured for 24 h in DMEM and 10% FBS. Media were then changed to DMEM/F-12 (Gibco 11039-021), 2.5% charcoal-stripped FBS, and tetracycline at a final concentration of 1 μ g/mL. Cells were incubated for 48 h before being subjected to polysome fractionation. Polysomal fractionation was done as described [11] with some modifications. For each sample, 190 μ l was layered directly onto the sucrose gradient. These were centrifuged for 2.5 h at 37,000 rpm at 4 °C. RNA was extracted using Direct-Zol RNA

Miniprep (Zymo Research). Before RNA extraction was performed, 100 pg of linearized pGEMEX-1 plasmid RNA (Promega) was added to each fraction to be used as a standard measure.

qRT-PCR

For qRT-PCRs, polysomal fractions 7–14 for all samples were used individually for gene expression analysis. RNA was resuspended in 15 μ l RNase-free H₂O and 7.5 μ l from each fraction was used as a template for cDNA synthesis using M-MuLV reverse transcriptase (NEB) following recommended conditions in 10 μ l final volume. After first-strand synthesis, the cDNA was diluted with 30 μ l H₂O, and 2 μ l of diluted cDNA were used as a template for real-time qRT-PCR using Ssofast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) following the manufacturer's protocol.

Library preparation and sequencing

Ribosome profiling was performed using the TruSeq Ribo Profile (Mammalian) Library Prep Kit (Illumina #RPHMR12126) according to the manufacturer's protocol. The Illumina Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit (H/M/R) (Illumina #MRZG12324) was employed to deplete ribosomal RNA samples. The library quality was verified using a Bioanalyzer. Libraries were sequenced using the NextSeq™ 500 High Output Kit (FC-404-1005) on a NextSeq 500 platform (Illumina) in a 75-bp single read run.

Data preprocessing and sequence alignment

For 3' adapter removal, we used the FastX toolkit from the Hannon Lab (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). To remove reads originating from rRNA and tRNAs, we aligned the sequences to rRNA and tRNA sequences downloaded from the UCSC genome browser using Bowtie [12] with the following settings: -n 2 -l 20 --best allowing up to 2 mismatches for rRNA and -v 3 -l 20 for tRNAs. The remaining sequences were aligned to the human genome assembly GRCh38/hg38 using Tophat [13] with --bowtie1 option.

Differential expression and differential translation efficiency analysis

Data analysis was performed using 'R' (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), mainly through packages in the Bioconductor suite [14, 15] or in-house-developed scripts. Counts for exons and cds by gene were performed through the GenomicFeatures [16] and the systemPipeR [17] packages using the summarizeOverlaps function with Union mode. Differential expression analysis was performed with edgeR [18, 19]. Only genes with at least 1 count per million total counts in the three biological replicates were considered for the

analysis. Differential translation efficiency analysis was performed following the protocol detailed in [20].

Pathway and gene ontology enrichment analysis

Pathway and Gene Ontology analysis was performed using the clusterProfiler [21], pathview [22], and org.Hs.eg.db packages.

Motif search and microRNA signatures

To identify conserved motifs in the sequences, we used MEME online suit [23] version 4.12.0. The parameters were set as motif with a minimal width of 6, motif with a maximal width of 20, maximal number of motifs of 10, and 'zero or one per sequence'. MicroRNA signatures were analyzed using the miREM web analysis tool [24] with default parameters and selecting the following options: species Human, option 2 intersecting two or more databases dynamically, and including non-conserved miRNAs.

Data set availability

Deep sequencing data from RNA-Seq and ribosome profiling were deposited in the SRA database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) under accession number PRJNA499096.

Metabolomics

Metabolites were analyzed by liquid chromatography (LC)-mass spectrometry (MS) (LC-MS/MS) as described [25, 26].

Western blots

Western blots were performed as previously described [9, 10] using the primary antibodies against MKL1 (ab14984) from Abcam, ER α (sc-543), and p-ERK (sc-7383) from Santa Cruz Biotechnology, ERK 1/2 (4695) from Cell signaling technology, and p-mTOR (5536) from Cell Signaling Technology.

Immunofluorescence

Cells were grown on 10-mm diameter coverslips in 24-well plates. Cells were fixed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde (PAF) for 10 min and then permeabilized in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 10 min. Incubation with the primary antibody (1/1000) was performed overnight (ON) at 4 °C. Primary antibodies against ER α (HC-20, sc-543) and HIF1 α (clone 54/HIF1 α , 610958) were purchased from Santa Cruz Biotechnology and BD Bioscience respectively. Dye-conjugated secondary antibodies (Abcam) were incubated 1 h at room temperature. The cover slides were mounted in Duolink II mounting medium with DAPI (Sigma-Aldrich), and images were

obtained with an ApoTome Axio Z1 Imager microscope (Zeiss).

3D matrigel assays

Five thousand cells were plated in medium in a well of a 96-well plate with round bottom previously coated with Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (Sigma) and incubated for 4 days to allow spheroid formation. Matrigel solution was prepared in culture medium at a final concentration of 1 mg/ml. Taken up in Matrigel solution, spheroids were then seeded on the top of a matrigel cushion already formed in 96-well plates. Images were taken by microscopy (DMIRB-Leica).

Results

Gene expression patterns and translational efficiency

To understand the main adaptive changes that take place in MCF7-derived cells during the MKL1-induced EM-like transition, we first assessed changes in gene expression at both transcriptional and translational levels. For this purpose, we analyzed the three cell lines (MKL1 Δ N200, MKL1 Δ C301, and MCF7 control cell) after 48 h incubation with tetracycline. We performed deep sequencing of the total RNA as representative of transcriptional gene expression [22]. For the analysis of translation, ribosome profiling was carried out on ribosome-protected fragments (RPFs); these fragments were sequenced and their cumulative values per mRNA are informative of translational expression levels [27]. After quality assessment, tRNAs and rRNAs-originating reads were removed. Reads were next aligned to the genome (Supplementary Table T1). As expected, most of the RPF reads mapped to coding sequences (CDSs), while most of the total RNA reads mapped to both UTRs and CDSs (Supplementary Figure S1). Reads were normalized using the TMM (trimmed mean of M values) normalization method which is a simple and effective method for estimating relative RNA production levels from RNA-seq data [28]. As a cutoff, we set one count per million as a minimum value for an expressed gene and further analyzed only those genes detected over this threshold in three independent biological replicates (Supplementary Table T2 and Supplementary Figures S2 and S3). At the transcriptional level, MKL1 Δ C301 and MCF7 controls expressed a similar number of transcripts, whereas MKL1 Δ N200 cells presented a smaller expression set (86% compared with the MCF7 control). For all three cell lines, the most highly transcribed genes were noncoding, including the signal recognition particle RNA genes (RN7), the RNA component of the RNase P ribonucleoprotein (H1RNA), and several small nuclear RNA genes.

MKL1 Δ C301 and MCF7 control cells seemed to be the most alike, whereas MKL1 Δ N200 cells were the

most divergent (Fig. 1a). Among the three cell lines, we observed a moderate general correlation between transcriptional and translational programs (Fig. 1b-d). Thereby, genes with high total RNA counts also had a high number of RPFs, suggesting a general expression coordination. Compared with MKL1 Δ C301 and MCF7 control cells, MKL1 Δ N200 cells exhibited a higher translational efficiency (95% confidence intervals for the slopes [1.337, 1.383], [1.434, 1.486], and [1.370, 1.415] for MCF7 control, MKL1 Δ N200 and MKL1 Δ C301, respectively).

The expression profiles were separated into three distinct groups (Supplementary File S1). Most genes with high total RNA and RPF counts (Fig. 1b-d, green dots) corresponded to ribosomal proteins and translation elongation factors. Genes with high total RNA and very high RPF counts (Fig. 1b-d, blue dots) included keratins and genes associated with the cytoskeleton. Additionally, a number of histone-coding genes were detected in this group in the control

cells. The subset of genes with high total RNA and very low RPFs counts were present mainly in MKL1 Δ N200 (Fig. 1b-d, red dots), and they seemed to be associated with unrelated functions.

In summary, the three cell lines shared expression patterns with cell-type-specific features. All cell lines showed a moderate correlation between total RNA and RPFs counts suggesting a correlation between transcriptional and translational programs. Genes corresponding to ribosomal proteins and elongation factors exhibited high expression at both levels. In addition, MKL1 Δ N200 was the most divergent cell type, showing a slightly decreased repertoire of active genes with higher translation efficiency.

Differentially expressed genes validate the induction of an EM-like transition in MKL1 Δ N200 cells

To characterize the transition undertaken by MKL1 Δ N200 compared with MKL1 Δ C301 and MCF7 control

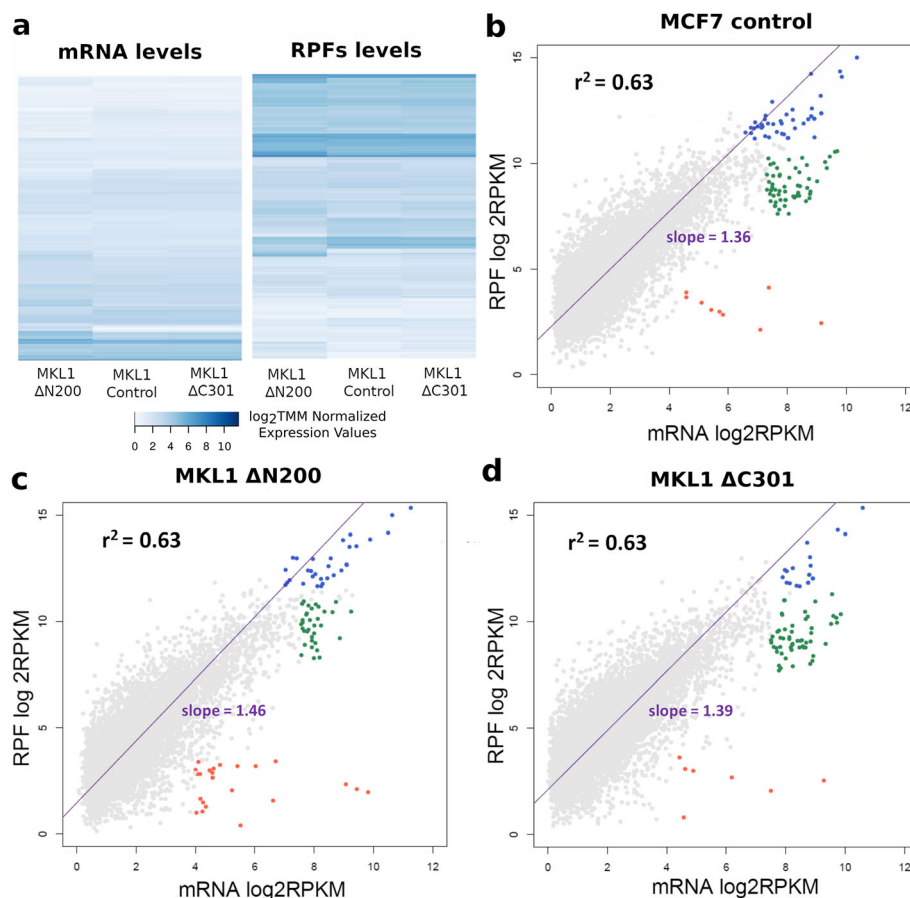


Fig. 1 Genes expressed in the cell lines. **a** Heatmaps show global expression patterns. Left: heatmap representing mRNA levels. Right: heatmap representing RPF levels. Each column represents a cell line and each row an expressed gene. log₂TMM-normalized values are plotted. The color code represents expression data levels: light shades of blue indicate low expression levels, while strong shades indicate high expression levels. **b** The biplot shows the log₂ RPKM of RPFs (y-axis) and mRNA (x-axis) of genes expressed in MCF7 control, **c** MCF7 MKL1 Δ N200, and **d** MCF7 MKL1 Δ C301. The coefficient of determination is shown in black while the linear regression slopes are shown in violet. Gene groups are depicted in different colors: in red, genes with high transcription and low translation; in blue, genes with high transcription and very high translation; in green, genes with high transcription and translation. TMM, trimmed mean of M values; RPKM, reads per kilobase million

cells, we performed a differential gene expression analysis among the three cell lines. For both RNA and RPF sets, we defined a list of differentially expressed genes setting an arbitrary cutoff of a Benjamini FDR adjusted p value < 0.01 and a fold change $> \pm 2$ (Fig. 2a–b and Supplementary Files S2 and S3). With these criteria, we found more than 3,000 differentially expressed genes between MKL1 Δ N200 and either MKL1 Δ C301 or MCF7 control in both total RNA and RPF analysis. Notably, MKL1 Δ C301 and MCF7 control cells showed less than 500 differentially expressed genes (Supplementary Files S2 and S3). To test data consistency, we compared \log_2 fold changes from total RNA differential expression analysis to \log_2 fold changes from microarray data recently published [29]. We found a significant correlation between both data sets (correlation coefficient 0.84, $p < 2.2 \times 10^{-16}$).

The ontology analysis of gene expression between MKL1 Δ N200 and control cells revealed an enrichment of those involved in the regulation of cell adhesion, actin cytoskeleton organization, and migration (Supplementary Files S5, S6 and S7). Indeed, all six family members of the actin genes (ACTN) and FLNA, which is an actin-binding protein that crosslinks actin filaments, are overexpressed. Similarly, a number of genes involved in kinase cascades and signal transduction are upregulated, consistent with the induction of an EM-like transition [30]. We also found an underrepresentation of genes involved in epigenetic marks such as chromatin remodeling and DNA methylation, which indicates cell cycle arrest, consistent with the induction of an EM-like transition (reviewed in [29, 30]).

We then analyzed changes in total mRNA and RPF levels of some EMT markers (Supplementary Files S2 and S3). As expected, for several epithelial markers like EPCAM, KRT8, KRT18, TJP3, and GATA3, expression levels were reduced in the MKL1 Δ N200 cells compared to control cell lines. Similarly, gene expression changes associated with breast EMT and cancer progression were detected, as the reduction of ERa and ERBB2 [29] and the increase of NOTCH1 and WNT5B [31, 32]. In contrast, no decrease in E-cadherin levels was observed in MKL1 Δ N200. This is consistent with previous observations that show the disassembly of E-cadherin fibers [9]. The expression of mesenchymal markers associated with cancer progression [30], such as FN1, VTN, and ITGA5, was markedly increased (between 20- and 50-fold). We then checked if the expression profile of the EM-like transition also presents traits of a luminal to basal change as previously reported [9]. Gene set enrichment analysis revealed a significant association of MCF7 control and MKL1 Δ N200 cells to the luminal (Fig. 2c) and to the basal (Fig. 2d) markers gene set, respectively. As a SRF cofactor we wondered how a constitutively active

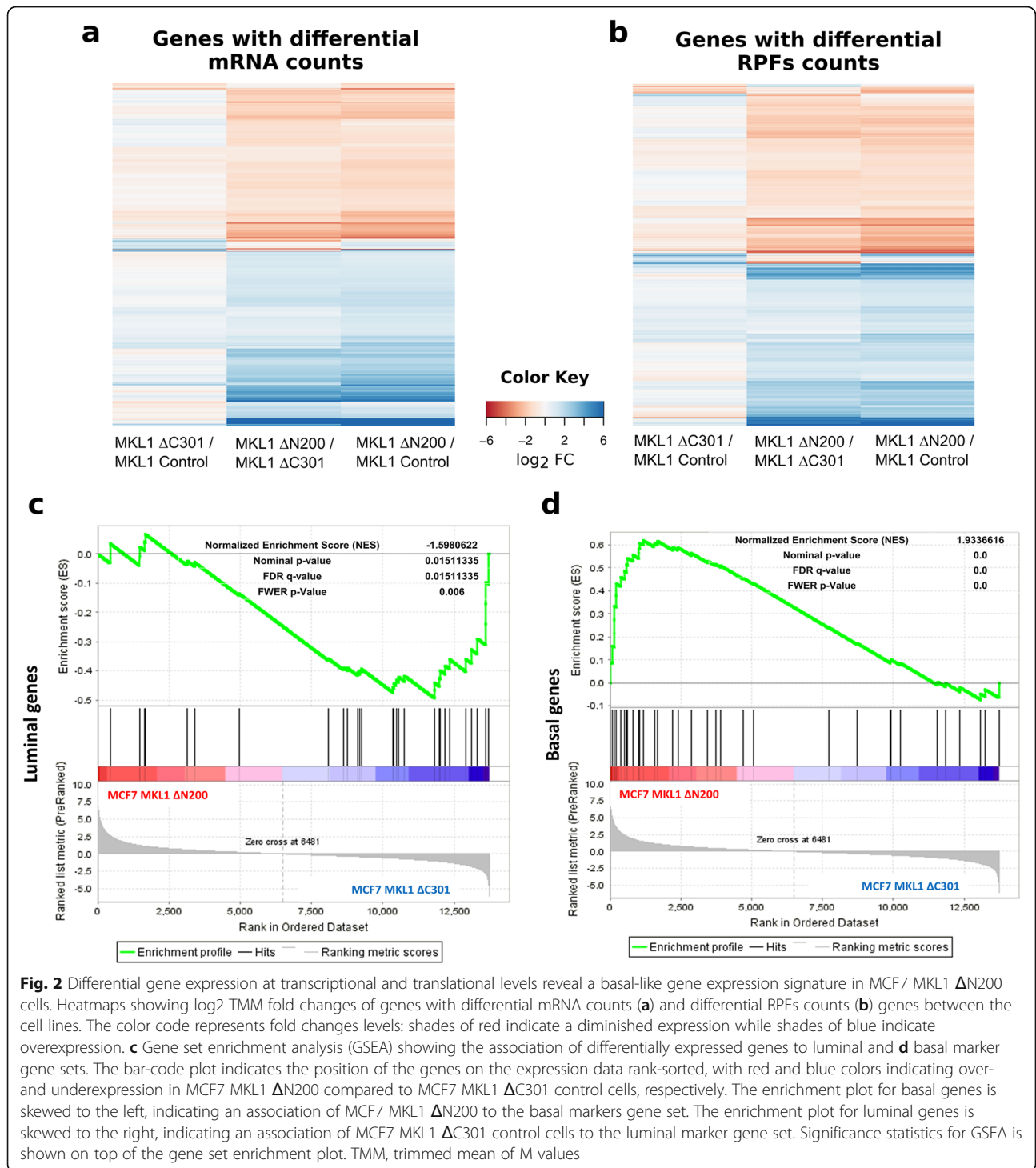
variant of MKL1 could affect SRF and its targets. Results showed that SRF was overexpressed as well as several SRF target genes with some of them being more than 100-fold overexpressed (TAGLN and several myosin light chains).

To confirm some of these findings, we first analyzed by western blots the expression of specific markers after tetracycline-induced production of MKL1 Δ N200 and MKL1 Δ C301 mutants in MCF7 cells. The expression of the tagged-MKL1 variants appeared 24 h after tetracycline treatment. As expected [9], expression of MKL1 Δ N200 variant clearly induced the expression of alpha actin and downregulated ERa expression, indicating the implementation of a dedifferentiation process of the luminal cells (Supplementary Figure S4). Increase in ERK phosphorylation status in these cells further confirmed an activation of the MAPK/ERK signaling pathway as suggested by GO analysis (Supplementary File S5 and S7). Furthermore, the motile invasion properties of MCF7 MKL1 Δ N200 cells suggested by GO analysis (Supplementary File S5 and S7), were illustrated by a 3D spheroid invasion assay on Matrigel. Only MCF7 cells expressing MKL1 Δ N200 variant showed invasive capability of the Matrigel (Supplementary Figure S5) which was previously quantified [29]. Interestingly, these cells also increased their size but decreased their viability after MKL1 Δ N200 expression with tetracycline. After 48 h of induction, MKL1 Δ N200 cells reached around 60% viability, whereas the control cell lines remained mostly constant (Supplementary Figure S6).

In sum, our results confirmed that after 48 h incubation with tetracycline, MKL1 Δ N200 and MKL1 Δ C301 truncated proteins are highly expressed in the corresponding cell lines (Supplementary Figure S4). Moreover, in these experimental conditions, we verified that MKL1 Δ N200 phenotype resembles an EMT state in which the expression of factors that promote mesenchymal transition is upregulated in contrast to the reduced expression of several epithelial markers.

During the EM-like transition, various pathways are specifically regulated at the transcriptional or translational level

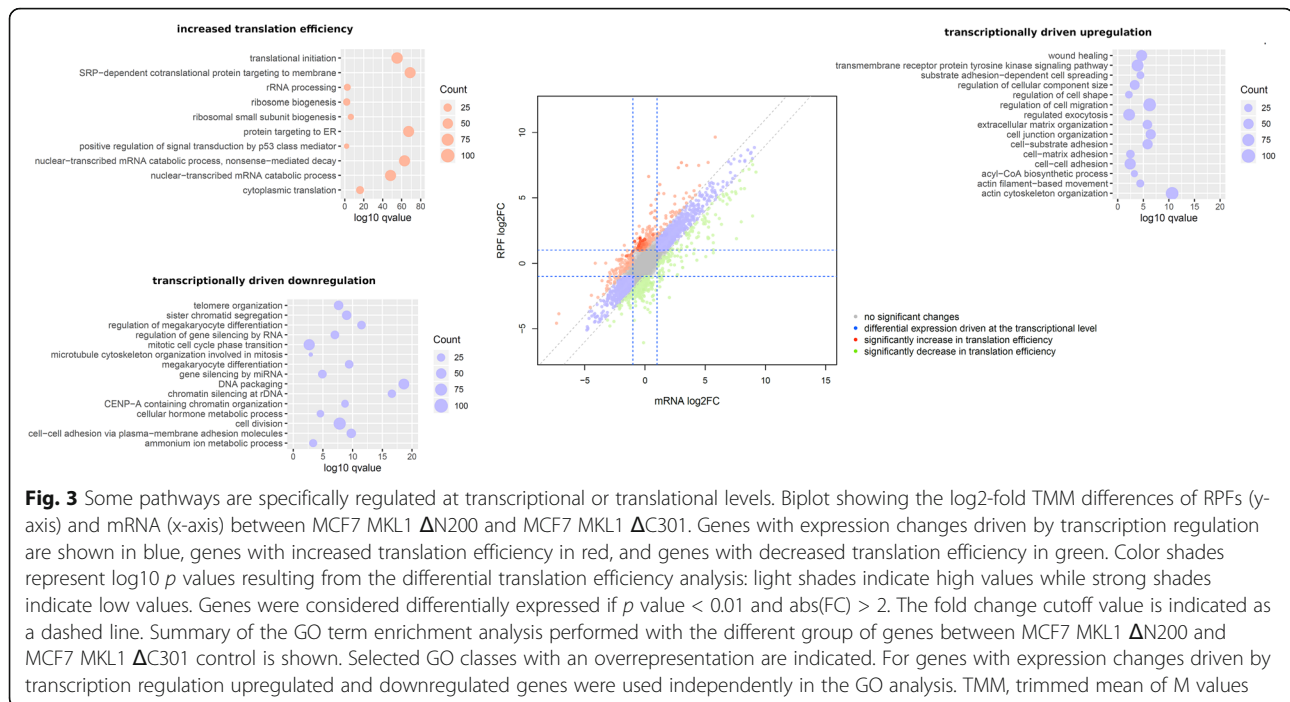
To assess whether differentially expressed genes are mainly regulated transcriptionally or translationally, we compared total RNA and RPFs counts per transcript between cell lines (Fig. 3). We reasoned that if the regulation of gene expression is mostly driven at the transcriptional level, an increase or reduction in the RNA reads should be paralleled by the gain or loss of the RPF reads. Alternatively, if the regulation of gene expression is executed at the translational level, changes in the RPF reads should not be accompanied by changes in the RNA reads to the same extent. That is, any



significantly off-diagonal point when comparing RNA to RPFs represents a gene with decoupled regulation between transcription and translation.

One-third of the genes presented decoupled regulation of transcription and translation. To explore which pathways were specifically regulated at the transcriptional or translational level, we defined three groups of genes as

inputs for ontology analysis: (i) genes with significant changes in both mRNA and RPFs counts but with mRNA log₂ FC equal to RPFs log₂ FC ± 1 (Fig. 3 and Supplementary Figures S7 and S8, blue dots); (ii) genes with RPF log₂ FC > mRNA log₂ FC ± 1 which represent genes with increased translation per mRNA or increased translation efficiency (Fig. 3 and Supplementary Figures



S7 and S8, red dots), and (iii) genes with RPF log₂ FC < mRNA log₂ FC ± 1 which represent genes with decreased translation efficiency (Fig. 3 and Supplementary Figures S7 and S8, green dots). Group (i) represents genes which are transcriptionally regulated, while groups (ii) and (iii) represent genes with decoupled regulation between transcription and translation. In addition, we performed a differential translation efficiency analysis which was consistent with the defined groups (Supplementary File S4). Figure 3 summarizes the enriched GO terms in MKL1 ΔN200 cells compared with the MKL1 ΔC301 control cells (the complete list is in Supplementary File S5). Between MKL1 ΔN200 and MKL1 ΔC301 control cells, the ontology analysis of group (i) revealed, as expected, a high representation of genes involved in an EM-like transition state. Strikingly, the GO terms of the genes from group (ii) showed an overrepresentation of genes related to translation machinery. Among them, translation was increased for genes involved in ribosome biogenesis, ribosome assembly, initiation factors, and other general cytoplasmic translation factors. Comparisons between MKL1 ΔN200 and MCF7 control cells and between MKL1 ΔC301 and MCF7 control cells are presented in Supplementary Files S6 and S7 and Supplementary Figures S7 and S8, respectively.

To explore if particular miRNA or ribosome-binding proteins could be involved in some of the post-transcriptional regulatory mechanisms, we searched for common microRNA signatures and 5' or 3' UTR motifs in groups (ii) and (iii). We found that miR-520 family appears to play a role in the regulation of these groups

of genes (Supplementary Figure S9). Among the 664 genes, 269 were targets of hsa-mir-520d-3p. Meanwhile when analyzing those with decreased translation efficiency only (group (iii)) other microRNA appear to be relevant as well (Supplementary Figure S10). For instance, 190 of the 338 downregulated genes were targets of hsa-mir-661. On the other hand, motif analysis showed that subsets of these genes shared sequence motifs on their UTRs. One of these motifs is an ELAVL1 binding site, a ribosome-binding protein previously involved in translational regulation of EMT [33–35]. Hence, the combination of ribosome profiling with RNA-Seq suggests that cells employ different strategies for regulating gene expression and expose different regulatory programs in the induced EM-like transition.

In MKL1 ΔN200, the higher expression of translational machinery components is regulated at the translational level

The general increase in translation of transcripts associated with the translation machinery encouraged us to further characterize their expression. A similar global expression pattern of all 88 cytosolic ribosomal proteins was observed for the three cell lines (Fig. 4a–c). However, comparison with the MCF7 control and MKL1 ΔC301 cells revealed an increase in RPFs in MKL1 ΔN200 cells (Fig. 4a; shift to the top of the blue spots). Differential expression analysis showed that in MKL1 ΔN200 cells, the 88 cytosolic ribosomal proteins exhibited significantly higher RPF reads without significant changes in their mRNA expression compared to control

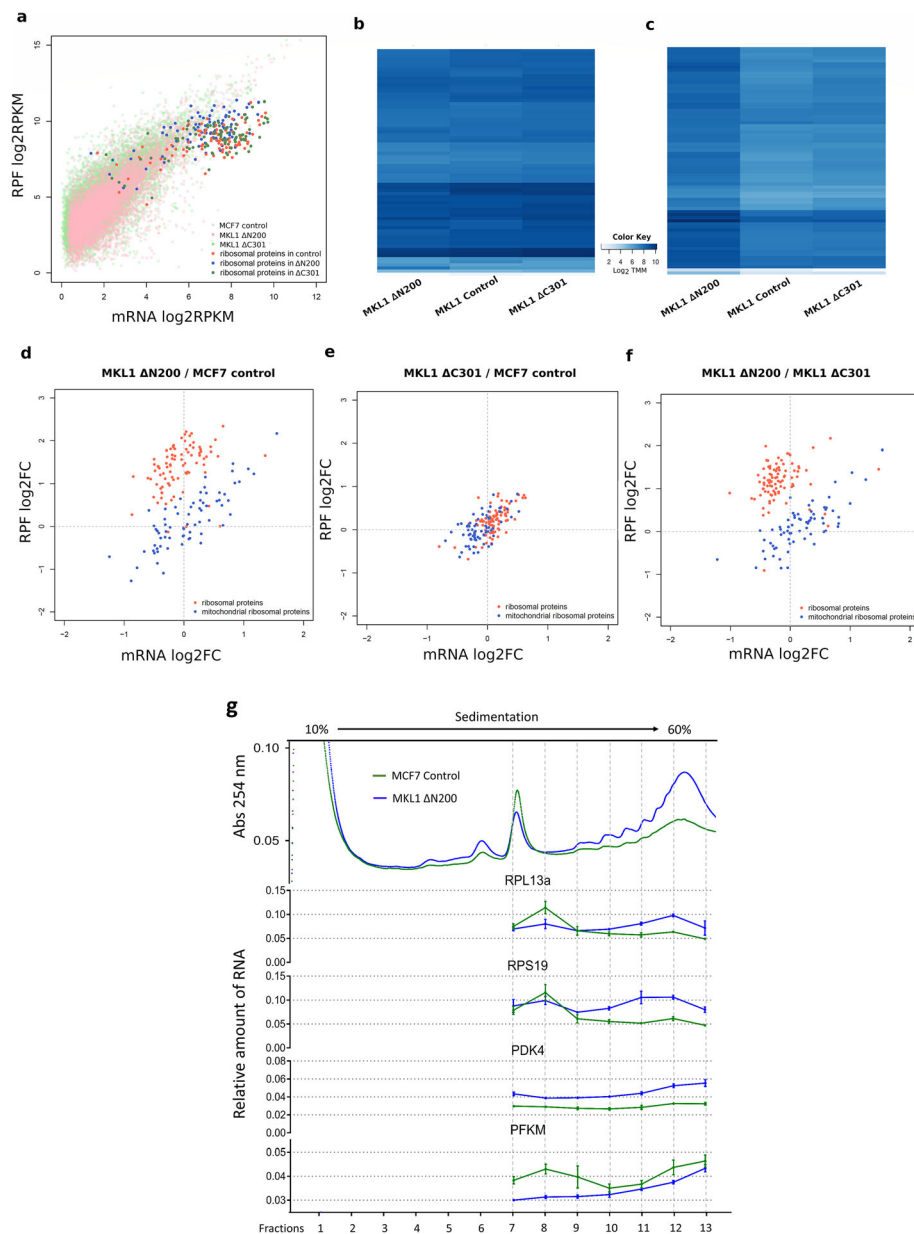


Fig. 4 Characterization of ribosomal proteins expression. **a** Biplot showing the log₂ RPKM of RPFs (y-axis) and mRNA (x-axis) of genes. The expression of ribosomal proteins is highlighted in bright colors. Heatmaps of the log₂ TMM of mRNA (**b**) and RPFs (**c**) of ribosomal protein genes, respectively. The color code represents expression data levels: light shades of blue indicate low expression levels (low log₂ TMM values) while strong shades indicate high expression levels (high log₂ TMM values). Biplots showing the log₂-fold RPKM differences in RPFs (y-axis) and mRNA (x-axis) in ribosomal protein expression between MKL1 Δ N200 and MCF7 control (**d**), MKL1 Δ C301 and MCF7 control (**e**), and MKL1 Δ N200 and MKL1 Δ C301 (**f**) respectively. **g** Polysome profiles of MCF7 control and MKL1 Δ N200. Polysomal fractionation was done as described [15] with some modifications. Relative amount of RNA values refers to the inverse of the corrected Cq values (corrected Cq⁻¹) from qRT-PCRs experiments. Error bars represent standard deviation from experimental triplicate measurements. RPKM, reads per kilobase million; TMM, trimmed mean of M values

cells (Supplementary File S8, Fig. 4d, f). In contrast, the mitochondrial ribosomal proteins remained unchanged among all three cell lines. Most cytosolic ribosomal proteins in MKL1 Δ N200 cells were upregulated solely at the translational level (69 and 62 out of 88 compared with the MCF7 control and MKL1 Δ C301 cells,

respectively). Only RPS26 was upregulated at both levels (Supplementary File S8). RPS27A and RPL9 exhibited the highest expression in MKL1 Δ N200 cells (5-fold).

Unlike the uniform translational regulation of cytosolic ribosomal proteins, the expression of initiation translation factors and associated molecules seems to be

regulated by diverse mechanisms. For some factors, transcription and translation decrease (EIF4A3 and EIF2AK1) or increase (EIF2AK2, EIF1, EIF5, EIF6), whereas, for others, translational and transcriptional changes obey opposite trends (eIF3 family, EIF4B, and EIF4A2). This particular regulation of translation initiation factors suggests a selective regulation of gene expression at the translational level. In MKL1 Δ N200, the translation of all cytosolic elongation factors was upregulated, which seemed to contribute to the general increase in translation in these cells. It has been reported that the expression of ribosomal proteins and elongation factors can be regulated translationally through TOP sequence in the 5' UTR of their mRNAs [36, 37]. To explore if this could be the case in MKL1 Δ N200 cells, we used genes with differential translation efficiency (Supplementary File S4) to perform a gene set enrichment analysis. Our results revealed a significant association of MKL1 Δ N200 cells with the translation efficiency of the 5'TOP containing genes (Supplementary Figure S11). This result suggests that 5'TOP sequences likely regulate translation of the translation machinery components in MKL1 Δ N200 cells. However, we cannot propose a mechanism. mTORC pathways were involved in regulation of 5'TOP-containing genes [38, 39]. In MKL1 Δ N200 cells, the expression of several molecules associated with mTORC-linked pathways, as well as some components of the two mTOR multiprotein complexes, are affected differently, while TOR expression levels themselves do not change significantly. In addition, Lar-related protein 1 (LARP1), a key player in ribosomal protein synthesis that controls the stability of the 5'TOP mRNAs [40, 41], shows no significant changes in MKL1 Δ N200 cells compared to control cells.

The expression increase of ribosomal proteins, elongation factors, and others associated with ribosome biogenesis suggested a general translation increase. This was supported by polysome profiles (Fig. 4g, upper panel) which also suggested an increase in translation efficiency. The profile is shifted towards higher fractions in MKL1 Δ N200 compared to control cells indicating there are, on average, more ribosomes per mRNA. To test changes in gene expression, we selected four genes with different transcription and translation behavior and performed RT-qPCRs from each individual fraction of the polysome profile. Genes selected were PDK4 which is upregulated both at transcription and translation, RPS19 which is upregulated only at translation, PFKM downregulated both at transcription and translation, and RPL13A which is downregulated at transcription but upregulated at translation. RT-qPCRs results confirmed the expected changes (Fig. 4g, Supplementary Table T3 and Supplementary Figure S12). Moreover, a right shift of mRNA signal into the higher polysome fractions can be

observed for the 4 genes indicating an increase in translational efficiency in all of them (Fig. 4g down panel and Supplementary Table T4).

Taken together, our results showed a clear increase in the synthesis of ribosomal proteins, which was mainly regulated at the translational level during the EM-like transition. We also detected an upregulation of factors related to translation. These results, together with those from polysome fraction analysis, indicate an increased and more efficient translation activity.

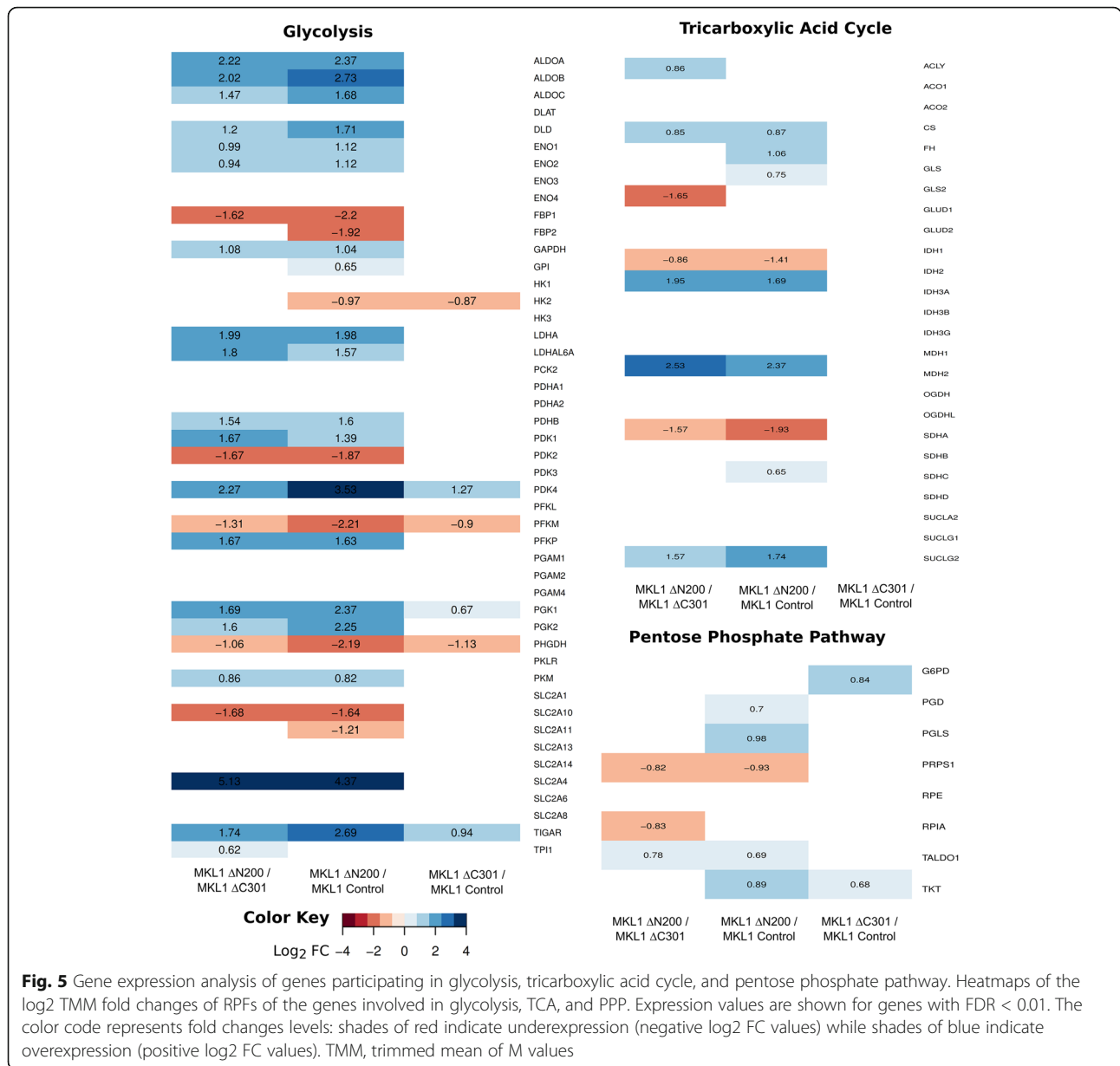
Adaptive changes in cellular metabolism

Protein biosynthesis and ribosome biogenesis are among the most energy-consuming processes in the cell [42, 43], raising the question as to how cellular metabolism in MKL1 Δ N200 cells adapts during the EM-like transition. The differential expression analysis revealed some metabolic pathways as enriched GO terms (Supplementary Files S5 and S7). Therefore, we next examined closely the expression changes in the enzymes involved in energy metabolism (Fig. 5 and 6). For most enzymes, we detected roughly similar changes in both mRNA and RPFs levels (Supplementary Files S2 and S3). RPFs changes, assembled into the corresponding pathways, are summarized in Fig. 6.

Glycolysis

In MKL1 Δ N200 cells, the pathway leading to lactate production showed a general increase in the expression of most enzymes (Figs. 5 and 6). Interestingly, when comparing MKL1 Δ N200 with MKL1 Δ C301 control cells, several steps of the pathway presented marked changes. The expression of glucose transporter SLC2A4 strongly increased (more than 30-fold), whereas that of SLC2A10 and SLC2A11 decreased. PFK-1, the main regulatory enzyme of glycolysis, showed lower expression of its isoform PFKM while that of the low-affinity PFKP isoform significantly increased. The expression levels of FBP1 which is involved in the reverse reaction from fructose-1,6 bisphosphate to fructose-6 phosphate associated with the PFK step, markedly decreased. Finally, the expression of ALDO A, B, and C and both PGK isoforms increased several folds.

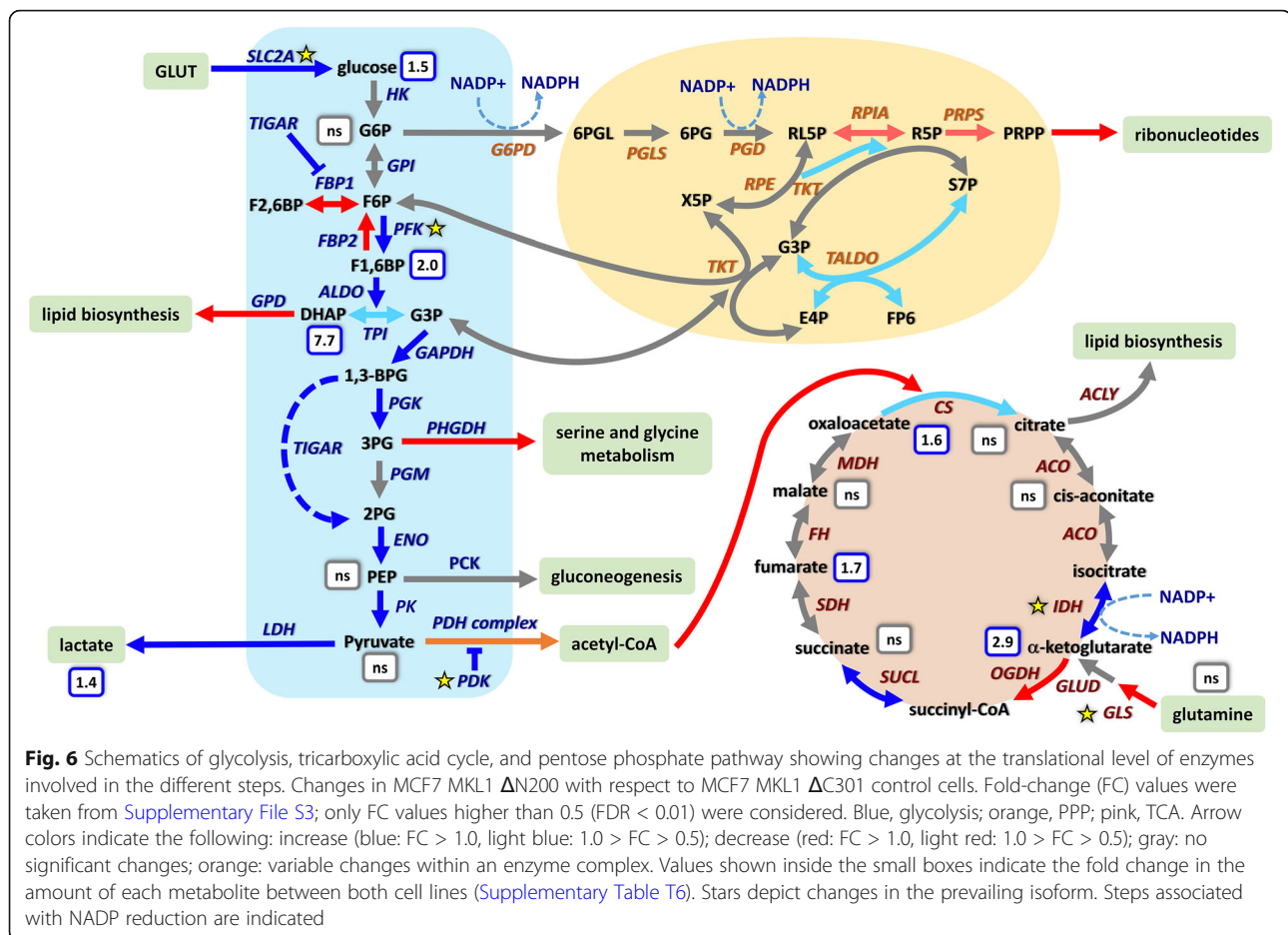
Regarding the pathway flow, we observed an increase in the expression of all LDH isoforms responsible for lactate production from pyruvate. This was experimentally validated by both metabolomic analysis (Fig. 6 and Supplementary Table T6) and post-induction lactate measurements in the cell-conditioned media (Supplementary Figure S6b and Supplementary Table T5). We also detected a decrease in the expression of the enzymes responsible for directing the pathway flow towards other metabolic pathways. Our data strongly suggest that the step leading from pyruvate to acetyl-



CoA was severely impaired in MKL1 ΔN200 cells. The expression levels of PDH complex components varied. Concomitantly, the expression of their inhibitor (PDK) markedly augmented. Indeed, the expression of the isoforms PDK1 and PDK4 increased, PDK3 remained unchanged while PDK2 decreased compared with control cells. Notably, PDK4 increased 4.8- and 12-fold compared to MKL1 ΔC301 and MCF7 control cells respectively. Additionally, a reduction of the expression of GPD1 and PHGDH was observed, suggesting that the flow towards lipid synthesis from dihydroxyacetone phosphate and diversion towards serine biosynthesis from 3-phosphoglycerate would decrease. Concerning the flow towards gluconeogenesis, no significant changes

were detected for cytosolic and mitochondrial PCK. A further change in MKL1 ΔN200 cells linked to glycolysis pathway should be mentioned: the expression of the p53-dependent TIGAR, which increased 6-fold and 3-fold compared with that in MCF7 and MKL1 ΔC301 cells (Figs. 5 and 6).

Comparisons between MKL1 ΔC301 and MCF7 control cells (Supplementary Figure S13a) revealed only few changes in the expression of the enzymes involved in glycolysis. Similar to MKL1 ΔN200 cells, MKL1 ΔC301 cells exhibited an increase in the expression of PDK4, albeit to a much lesser extent than MKL1 ΔN200 cells (2.4-fold). Finally, the expression of enzymes that redirect the metabolic flux towards serine metabolism also decreased.



In summary, gene expression analysis suggested that in MKL1 Δ N200, glycolysis was fully active, with a marked increase in glucose uptake and lactate production. This was confirmed experimentally by detecting a significant change in the glucose consumption/lactate production rate ([Supplementary Table T5](#) and [Supplementary Figure S6b](#)) and by global metabolomic measurements that showed an intracellular increase of glucose and F1,6BP (Fig. 6 and [Supplementary Table T6](#)). Gene expression analysis also revealed changes in the expression of critical isoforms responsible for substrate uptake and pathway regulation. The subsequent feeding into the TCA cycle would be decreased as well as the diversion towards lipid biosynthesis and serine metabolism.

Tricarboxylic acid cycle

As shown in Figs. 5 and 6, the expression of enzymes involved in the TCA cycle was strongly altered in MKL1 Δ N200 cells compared with that in the MKL1 Δ C301 cells, whereas it was similar between MKL1 Δ C301 and MCF7 control cells (Fig. 5 and [Supplementary Figure S13a](#)). The main expression changes in MKL1 Δ N200

cells were as follows: a significant increase in PDK, the PDH complex inhibitor, an increase in CS and IDH2, and a decrease in the decarboxylating component of OGDH. Concerning the cycle feeding from glutamine, a decrease of GLS2 isoform expression was observed. Furthermore, expression of the cytoplasmic MDH1, involved in the malate-aspartate shuttle, increased roughly 6-fold. In summary, gene expression analysis suggested an alteration of the TCA cycle in MKL1 Δ N200 cells which is consistent with the metabolomic measurements (Fig. 6).

Pentose phosphate pathway (PPP)

In MKL1 Δ N200 compared with MKL1 Δ C301 control cells, the oxidative phase presented a decreased expression of RPIA and PRPS enzymes (Figs. 5 and 6), and the nonoxidative phase showed an increased TALDO expression. In MKL1 Δ C301 compared with MCF7 control cells (Fig. 5 and [Supplementary Figure S13a](#)), only G6PD and TKT increased. In summary, our results suggest that PPP flow is oriented towards maintaining the redox status through NADPH production without ribonucleotide synthesis and towards metabolite recycling and supply.

HIF-1 α control

HIF-1 α is a major transcriptional regulator involved in the Warburg effect. In MKL1 Δ N200 cells, the expression of HIF-1 α and HIF-2 α (EPAS1 gene) was significantly increased, whereas the expression of E3-ligase VHL (Von Hippel-Lindau factor), implicated in HIF- α ubiquitination for proteasomal degradation under normoxic conditions, was decreased. A further level of HIF-1 α control recently described involves two long noncoding RNAs, HIF1A antisense RNA1 (HIF1A-AS1) and HIF1A antisense RNA2 (HIF1A-AS2), in a yet unclear mechanism [51]. Notably, the transcription of both antisense RNAs was clearly increased in MKL1 Δ N200 cells. The significant HIF-1 α expression increase in MKL1 Δ N200 cells, indicated by mRNA and RPFs levels, is consistent with the augmented nuclear location revealed by in situ immunofluorescence (Supplementary Figure S14).

In summary, our results provide strong evidence for a deep metabolic adaptation of MKL1 Δ N200 cells, which involves fully active glycolysis, severely perturbed TCA cycle and an active PPP with decreased ribonucleotide production. This metabolic rewiring is likely driven by HIF-1 α that presents increased level and nuclear location

Discussion

During breast cancer progression, the underlying mechanisms of metastasis and hormonal therapy resistance are still elusive; however, they have been associated with cellular changes that occur in EMT. To gain detailed insights into breast cancer progression, here, we characterized the adaptive changes that occur during the MKL1-induced EM-like transition employing a MCF7-derived cellular model. To analyze our results, we cannot skip mentioning some aspects of the cellular model: (i) the viability decrease of EMT-undergoing cells after long culture periods, (ii) the intrinsic heterogeneity of cellular models that makes the results actually averages. (iii) Our work analyzed just the final state after 48 h of the induction of MKL1 variants expression. However, the results we present here supported by the use of two different control cells, together with the studies reported in Jehanno and Fernández-Calero et al. [29], allow us to validate the current cell model to deepen studies on EMT processes.

Unlike MKL1 Δ C301 and MCF7 control cells, in MKL1 Δ N200 cells, actins and FLNA are overexpressed. Interestingly, FLNA has been proposed to be a regulator of nuclear actin polymerization and, hence, of SRF target gene expression. Indeed, the effect of MKL1 Δ N200 seems to be mediated by SRF, at least in part, since SRF is overexpressed as well as several SRF target genes (actin, TGLN, CCN1, CCN2, and several myosins). Of

note, CSRP2, which is an invadopodia actin-bundling protein that is upregulated by hypoxia (HIF-1 α) in various breast cancer cell lines and tumors, is also upregulated in MKL1 Δ N200 cells. Together, the expression of MKL1 Δ N200 led to upregulation of beta actin and related proteins involved in actin dynamics, cytoskeleton, intercellular signaling, cell shape, and locomotion.

Among breast cancer subtypes, luminal tumors appear to have cells solely on the epithelial edge of the EMT spectrum while basal-like tumors are more heterogeneous with cells spanning the spectrum from potential progenitors to mesenchymal-oriented variants [6]. Accordingly, MKL1 Δ N200 cells have been previously described to have a typical profile of triple-negative breast cancer or basal-like tumors [9]. Our results confirmed that MKL1 Δ N200 cells have a basal-like expression profile while both control cells have a luminal one. With respect to EMT markers, although translation of the epithelial markers CDH1 and CLDN1 is increased in MKL1 Δ N200, others such as EPCAM, KRT8, KRT18, TJP3 and GATA3 are reduced. In contrast, expression of the mesenchymal markers VIM and CDH2 is not altered, but other markers such as FN1, VTN, and ITGA5 are highly increased. Moreover, the expression of the EMT mediators Notch1 and Wnt5B is increased, both of which are associated with breast EMT and cancer progression [44–46]. Furthermore, in association with endocrine therapy resistance, the expression of two hormonal receptors, ESR1 and ERBB2, is strongly reduced in MKL1 Δ N200 cells.

SRF is involved in cellular reprogramming and is activated by a variety of extracellular signals and, in different cell types, can destabilize cell identity in response to diverse signals [47]. The overexpression of SRF in MKL1 Δ N200 cells may contribute to MCF7 dedifferentiation, leading to more immature cellular traits, which is consistent with an EM-like transition and the adoption of cancer stem cell features. In fact, MKL1 Δ N200 cells show an increase in the expression of CD44 and a decrease in CD24 compared with the control. CD44 is overexpressed in breast tumor cells [48], and the ratio of CD44 to CD24 has been used as a marker for stem cells in breast cancer. This ratio increases in MKL1 Δ N200 cells. Notably, ALDH1 expression, another marker of cancer stem cells [49], is not differentially expressed. Taken together, these results suggest that the MKL1 Δ N200 phenotype corresponds to an EMT state with immature cellular traits, in which the expression of several epithelial markers together with two endocrine receptors involved in the hormonal response is reduced, whereas that of several mesenchymal markers is increased. This interpretation is consistent with a recent study indicating a high flexibility in this transitional process, in which cells no longer oscillate between full

epithelial and defined mesenchymal states but rather sample a spectrum of intermediary states [50].

Our results exposed different regulatory programs in the induced EM-like transition process. On one hand, changes in the expression of widely known EMT-related pathways are mostly transcriptionally regulated while, on the other hand, expression changes of other pathways are translationally regulated. Gene expression regulation through translation has been previously described to play a critical role in EMT induction, including a switch from cap-dependent to cap-independent translation [51–53]. However, some of the genes that play key roles in the induction of EMT can be translationally controlled by RNA-binding proteins like ELAVL1, LARP1, and PCBP1 suggesting far more complex regulation of the EM-like transitions. In our model, regulation is not solely dependent on the switch between cap-dependent and cap-independent translation. In fact, our results suggest an interplay of different regulatory strategies (including miRNA, ribosome-binding proteins as well as the expression of particular initiation factors) working together to shape the translation landscape in the induced EM-like transition. Our results also suggest that miRNA-520 family could play a role in defining this landscape, elements previously described as involved in post-transcriptional regulation in breast tumors [54, 55].

Interestingly, the synthesis of the translation apparatus itself is regulated at the translational level in MKL1 Δ N200 cells. Ribosomal protein expression in higher eukaryotes is regulated translationally through a TOP sequence in the 5' UTR of their mRNAs [36, 37] by a mechanism that involves the mTORC pathway [38, 39]. Our results show a significant increase in translation efficiency of all the genes which have been confirmed to be regulated through 5'TOP sequences. The observed increase in translation of ribosomal proteins and elongation factors, together with the previously described 2-fold augmentation in RNA [10], point towards an increased ribosome biogenesis, consistent with a recent report [56], suggesting that ribosome biogenesis is a general feature of the EM-like transition programs. Furthermore, the significant increase in the translation efficiency and protein biosynthesis in MKL1 Δ N200 cells correlates with their larger cell size (Supplementary Figure S6c) and total protein content [10].

In MKL1 Δ N200 cells, the expression of enzymes related to the TCA, glycolysis, pentose phosphate pathways, and connected metabolic processes broadly agree with previous descriptions for metastatic cells and the EMT [57–59]. The general scheme appears to be consistent with a Warburg-like effect, where HIF-1 α should play a master regulatory role in the metabolic changes [60, 61]. These changes include impairment of TCA, increased glucose consumption and glycolysis, and

expression changes in enzymes/isozymes involved in energy metabolism. It should be emphasized that changes in MKL1 Δ N200 cells occur in a pseudohypoxia context, and a Warburg-like effect in which the expression of HIF-1 α is already enhanced. In this regard, it is important to highlight changes in MKL1 Δ N200 linked to HIF-1 α biosynthesis, stability, and nuclear localization; on the other hand, changes in its metabolic targets.

Alterations in the expression of TCA enzymes suggest interesting clues related to triggering an “enhanced pseudohypoxia state”. In MKL1 Δ N200, the main changes in TCA enzymes are on α -ketoglutarate (α -KG) and succinate. Studies carried on MCF7 cells revealed a general decrease respective to control MCF10 cells in the biosynthesis of TCA enzymes (except for MHD2, reported as roughly constant), a marked increase in IDH3, and a decrease in IDH2 expression [68]. In MKL1 Δ N200, a critical isoform switch from mitochondrial IDH3 to IDH2 is apparent. Cytosolic IDH1 and mitochondrial IDH2 are homodimers that reversibly catalyze the decarboxylation of isocitrate to α -KG, whereas IDH3 is a heterotetramer that only oxidizes isocitrate [46]. This phenomenon strongly suggests that α -KG should play a critical role in the induced cellular transition. Indeed, while the decrease in OGDH expression suggests an accumulation of α -KG (confirmed by metabolomic analysis), the reductive carboxylation allowed by IDH2 raises the possibility of reversing the cycle. Our data indicate that this point of the cycle is an actual crossroad, considering the links of α -KG with HIF-1 α stability [62], the possible derivation to lipid biosynthesis from cycle reversion, and its role in collagen biosynthesis and in the redox state through NADP to NADPH conversion. The levels of other selected metabolites measured by metabolomics confirm the significance of the metabolic reconstruction made from transcriptomic and ribosome profiling data (Figs. 5 and 6, Supplementary Figure S13 and Supplementary Table T6). Furthermore, it was described that IDH2 could acquire a neomorphic activity leading to the synthesis of D2-HG, an inhibitor of the PHDs involved in HIF-1 α degradation [63]. The significant increase of fumarate (a competitive inhibitor of PDHs) and α -KG levels, together with the IDH2 switch, could be associated to triggering, maintaining, or enhancing the pseudohypoxia state.

Within quantitative and/or isozyme changes related to HIF-1 α induction [60, 63–65], MKL1 Δ N200 cells showed enhanced expression of ENO1, PKM2, ALDOA, ALDOB, ALDOC, LDHA, and PDK1 in glycolysis, while no changes were detected in other HIF-1 α targets. It is interesting to highlight that there are three switches in isozyme expression, which are not directly related to HIF-1 α : (a) in glucose transporters; (b) in glycolysis, PFKM and PFKL to PFKP; and (c) in PDK isoform

expression. These changes strongly suggest the involvement of other global metabolic regulatory factors that complement, modulate, or compensate for the action of HIF-1 α .

We also wish to emphasize the notable increase in the expression of SLC2A4 glucose transporter. In most reported studies on cancer or metastatic cells, as well as in cells undergoing EM-like transition processes, an increase in glucose uptake has frequently been associated with changes in the expression of different transporters [59, 66–69]. SLC2A4 activation is dependent on insulin secretion and occurs mainly through activation of the PI3K/AKT pathway [70]. Its inhibition has recently been shown to block glucose uptake and inhibit AKT, critically affecting the viability of breast cancer cells [71].

The PFK-1 isoform switch appears to be a significant event since the PFK-1 step is a crucial control of glycolysis flux. The PFKP isoform, which was induced in MKL1 Δ N200 cells, frequently prevails over PFKM or PFKL in human cancer cells and in the EMT [72, 73]. PFKP has a lower affinity for the substrate; it is less sensitive to feedback inhibition by ATP and more sensitive to activation by fructose 2,6-bisphosphate (F2,6BP), which is the most potent allosteric activator of PFK-1 [74]. TIGAR (the expression of which is increased in MKL1 Δ N200 cells) lowers F2,6BP, resulting in the inhibition of PFK-1 and glycolytic activity. Furthermore, in response to hypoxia, posttranslational modification of PFK-1 results in inhibition of the kinase activity and redirected glycolysis flux towards PPP [72]. Then, the PFK-1 isoform switch appears as a critical step in glycolysis that diverts the metabolic flux towards the pentose phosphate pathway. It should be noted that TIGAR also contributes to 2-PG formation, which is associated with the parallel conversion of 1,3-BPG in 2,3-BPG. This finding is in agreement with the suggested role of TIGAR as a glycolytic shunt [75].

The other remarkable change corresponds to PDK isoforms, which are the key enzymes involved in the regulation of TCA feeding by pyruvate, through inhibition by phosphorylation of the catalytic subunit of the PDH complex. Great body of literature has been focused on the PDK family in recent years due to its role in crucial metabolic decisions and relation to cell proliferation, metabolic pathologies, and cancer [76, 77]. PDK1 and PDK3 play key roles in hypoxia adaptation, with both genes being induced by HIF-1 α and cMyc [65, 73, 78–80, 87–89]. The enhanced expression of PDK4 in MKL1 Δ N200 cells constitutes an interesting finding. PDK4 has been described as a critical mediator of EMT [81] and associated with antiestrogen resistance in human breast cancer [82]. PDK4 transcription is regulated by numerous global metabolic regulators [83, 84]. In particular, ERR γ activates PDK4 transcription [85]. In MKL1 Δ N200 cells, ERR γ (ESRRG

gene) expression is increased approximately 10-fold. Furthermore, untransformed human mammary MCF10 cells exhibit upregulated PDK4 upon matrix detachment, despite the action of ERR γ [76, 86].

The above considerations strongly suggest that multiple regulatory events should be considered to understand the metabolic transitions that occur in MKL1 Δ N200 cells: (a) enhancement of a pseudohypoxia context in which HIF-1 α plays a pivotal role; (b) an effect associated with actual or pseudo matrix detachment, in which PDK4 would play a critical role; (c) the participation of different master regulatory factors that could function in a synergistic or balanced manner (particularly, the observed expression changes indicate the involvement of cMyc and p53 [87–90]). Taken together, the results show that changes in energy metabolism in MKL1 Δ N200 cells are compatible with what was described for cells undergoing an EMT. The metabolic rewiring includes enzymatic switches and pathway shunts, intervening on a previous well-established Warburg-like metabolic strategy, privileging glycolysis over OXPHOS. The impairment of the OXPHOS pathway and the redirection to PPP without increasing ribonucleotide synthesis, together with the allowed metabolic shunts associated with the altered TCA, are consistent with the strategies described for EMTs to escape anoikis, the apoptotic process triggered by matrix detachment [86, 91].

How can the adaptive process induced in MKL1 Δ N200 cells be explained? Decreases in cell numbers as well as the downregulation of genes involved in cell division, cell cycle phase transition and chromatin remodeling point towards a non-proliferative state. On the other hand, cell culture analysis showed an increase in cell size and in the glucose consumption/lactate production rate. This suggests that the high increase in glucose consumption is not only being used for energy purposes. Is it possible that the high glucose consumption is used as a source of intermediates for the generation of building blocks that allows cell size increase and remodeling? Gene expression patterns suggest an increase in protein biosynthesis. These findings, together with the overexpression of genes involved in the reorganization of actin cytoskeleton and secretory pathways, raise the question as to whether there is also a redirection of cell energy towards the formation of motile structures and the secretion of proteins besides cell size increase. Such is the case, for example, for quiescent fibroblasts that maintain high metabolic activity and direct it in part towards breakdown and synthesis of proteins and lipids, and in part towards secretion of extracellular matrix proteins [92]. The cellular microenvironment, which is mainly composed of extracellular matrix, can be essential in the determination of cell fate [93–95]. Differences in EMC composition can facilitate tumor progression and cell

migration [96, 97]. Tumor cells contribute to defining and modifying the ECM composition during cancer progression [98, 99]. The ECM composition is sensed by several membrane receptors, including integrins and focal adhesion structures [100], in which MKL1 Δ N200 cells are enriched.

Conclusion

This study reveals multiple regulatory events associated with a metabolic and translational machinery adaptation to achieve a new homeostasis state and favor cell survival. The expression profile is consistent with an epithelial to mesenchymal transition. During the transition, the synthesis of ribosomal proteins and that of many translational factors are upregulated and this appears to be regulated at the translational level. Moreover, the results indicate an increase in ribosome biogenesis and translation activity during the cellular EM-like transition. We also detected an extensive metabolic rewiring occurring in an already “Warburg-like” context, in which enzyme isoform switches and metabolic shunts merge to HIF-1 α orchestrate regulation, thus suggesting its crucial role along with other master regulatory factors. Furthermore, the flux towards the pentose phosphate pathway is fully active without increasing ribonucleotide synthesis. Major concerted isoform switches involve glucose transporters, phosphoglucokinase, pyruvate dehydrogenase kinase, and mitochondrial isocitrate dehydrogenase. During this transition, cells arrest proliferation, increase in size, and strongly upregulate cytoskeletal and extracellular matrix proteins. The present work shows that ribosome profiling with RNA-Seq complemented with biochemical measurements is a powerful approach to unveil in-depth global adaptive cellular responses and the interconnection of regulatory circuits, which will be helpful for the identification of new therapeutic targets.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s40170-020-00216-7>.

Additional file 1: Supplementary Figure S1. Read alignments. Boxplots showing the percentages of aligned reads to different features from the ribosome profiling (RPF) and RNA-Seq (total RNA).

Additional file 2: Supplementary Figure S2. Correlation of the mRNA read counts. Only genes over the detection limit of 1 rpkm are included. r , Pearson correlation coefficient.

Additional file 3: Supplementary Figure S3. Correlation of the RPF read counts. Only genes over the detection limit 1 rpkm are included. r , Pearson correlation coefficient.

Additional file 4: Supplementary Figure S4. Western blots. Western blots were performed as previously described (9,10) using the primary antibodies against MKL1 (ab14984) from Abcam, ER α (sc-543) and p-ERK (sc-7383) from Santa Cruz Biotechnology, ERK 1/2 (4695) from Cell signaling technology and p-mTOR (5536) from Cell Signaling Technology.

Additional file 5: Supplementary Figure S5. Invasion assay. Cells were subjected to 3D spheroid invasion assay on Matrigel. The cells were seeded (5000/well) in 96-well plate with round bottom previously coated with matrigel and incubated for 4 days to allow spheroid formation. Taken up in Matrigel solution, spheroids were then seeded on the top of a matrigel cushion already formed in 96-well plates. Images were taken by microscopy (DMIRB-Leica). Scale bar: 50 μ m.

Additional file 6: Supplementary Figure S6. Cell growth, glucose consumption, lactate production and cell size. a) Viable cell number (filled symbols) and viability (empty symbols) for MCF7 control cells (green), MKL1 Δ N200 (blue), and MKL1 Δ C301 (red) cells. b) Glucose (filled symbols) and lactate (empty symbols) concentration. c) Cell size expressed in arbitrary units determined as light refracted in the FSC channel determined by flow cytometry. Cells were induced with tetracycline at time 0. Error bars represent standard deviation from experimental triplicate measurements.

Additional file 7: Supplementary Figure S7. GO term enrichment analysis. Biplot showing the log₂-fold TMM differences of RPFs (y-axis) and mRNA (x-axis) between MCF7 MKL1 Δ N200 and MCF7 control cells. Genes with expression changes driven by transcription regulation are shown in blue, genes with increased translation efficiency in red and genes with decreased translation efficiency in green. Color shades represent log₁₀ p-values resulting from the differential translation efficiency analysis: light shades indicate high values while strong shades indicate low values. Genes were considered differentially expressed if p -value < 0.01 and abs(FC) > 2. The fold change cutoff value is indicated as a line. Summary of the GO term enrichment analysis performed with the different group of genes between MCF7 MKL1 Δ N200 and MCF7 control is shown. Selected GO classes with an overrepresentation are indicated. For genes with expression changes driven by transcription regulation upregulated and downregulated genes were used independently in the GO analysis. TMM: trimmed mean of M values.

Additional file 8: Supplementary Figure S8. GO term enrichment analysis. Biplot showing the log₂-fold TMM differences of RPFs (y-axis) and mRNA (x-axis) between MCF7 MKL1 Δ C301 and MCF7 control cells. Genes with expression changes driven by transcription regulation are shown in blue, genes with increased translation efficiency in red and genes with decreased translation efficiency in green. Color shades represent log₁₀ p-values resulting from the differential translation efficiency analysis: light shades indicate high values while strong shades indicate low values. Genes were considered differentially expressed if p -value < 0.01 and abs(FC) > 2. The fold change cutoff value is indicated as a line. Summary of the GO term enrichment analysis performed with the different group of genes between MCF7 MKL1 Δ C301 and MCF7 control is shown. Selected GO classes with an overrepresentation are indicated. For genes with expression changes driven by transcription regulation upregulated and downregulated genes were used independently in the GO analysis. TMM: trimmed mean of M values.

Additional file 9: Supplementary Figure S9. microRNA signature analysis of genes with differential translation efficiency. miREM software results using genes with decoupled regulation between transcription and translation (groups (ii) and (iii) of genes).

Additional file 10: Supplementary Figure S10. microRNA signature analysis of genes with decreased translation efficiency. miREM software results using genes with decreased translation efficiency (group (iii)).

Additional file 11: Supplementary Figure S11. Translation efficiency of 5'TOP containing genes is significantly increased in MCF7 MKL1 Δ N200 cells. Gene set enrichment analysis (GSEA) showing the association of the differential translation efficiency to 5'TOP genes. The bar-code plot indicates the position of the genes on the efficiency data rank-sorted, with red and blue colors indicating over- and undertranslation efficiency in MCF7 MKL1 Δ N200 compared to MCF7 control cells, respectively. The enrichment plot for 5'TOP genes shows skewing to the left, indicating an increase of the 5'TOP translation efficiency in the MCF7 MKL1 Δ N200 cells. Significance statistics for GSEA is shown on top of the gene set enrichment plot.

Additional file 12: Supplementary Figure S12. qPCR of selected genes. For qRT-PCRs, 3 replicates per sample were used. Polysomal fractions

were not pooled but instead fractions 7-14 for all samples were used individually for gene expression analysis (24 points per sample). Expression was normalized to the pGEMEX-1 RNA spike-in control. Values were calculated from the quantitation cycle (Cq) using the formula relative quantity = $2^{Cq(\text{min})-Cq(\text{sample})}$. Boxplots of corrected Cq values, acquired by subtracting the difference of the Cq of the corresponding RNA spike Cq are shown.

Additional file 13: Supplementary Figure S13. Schematic of glycolysis, TCA and PPP showing expression changes at the translational level of enzymes involved in the different steps. Changes in MCF7 MKL1 Δ N200 (a) and MKL1 Δ C301 (b) compared to MCF7 control cells. Fold-change (FC) values were taken from [Supplementary File S3](#); only FC values higher than 0.5 (FDR < 0.01) were considered as significant. Blue: glycolysis; orange: PPP; pink: TCA. Arrow colors indicate the following: increase (blue: FC>1.0, light blue: 1.0>FC>0.5); decrease (red: FC>1.0, light red: 1.0>FC>0.5); grey: no significant changes; orange: variable changes within an enzyme complex. Values shown inside the small boxes indicate the fold change in the amount of each metabolite between both cell lines ([Supplementary Table T6](#)). Stars depict changes in the prevailing isoform. Steps associated with NADP reduction are indicated.

Additional file 14: Supplementary Figure S14. Immunofluorescence detection of HIF1- α In situ immunofluorescence staining of HIF1- α in MCF7-control, MCF7- Δ N200 and MCF7 MKL1 Δ C301 cells. ER expression analysis is presented as a control.

Additional file 15: Supplementary Table T1. Quality and alignment statistics. Each row represents one biological replicate. Under the quality statistics section, columns list the numbers and percentages of reads that do not pass the quality filters (i.e., reads that are too short, adaptor only reads or reads without adaptor) and the filtered ones used for subsequent steps of the analysis. Under the alignment statistics section, columns list the numbers and percentages of reads that align to the different kinds of features to which the read alignment was performed.

Additional file 16: Supplementary Table T2. Summary of the expressed genes. Each row represents one biological sample. Columns list the number of genes expressed at the transcription level (in total RNA samples), at the translation level (in RPF samples) and at both levels. A gene is considered present in a sample if rpkm > 1. A gene is considered expressed in one condition if rpkm > 1 in the 3 replicates simultaneously.

Additional file 17: Supplementary Table T3. Comparison of expression fold changes between RNAseq and microarray data for selected genes. Microarray data was obtained from [Jehanno and Fernandez-Calero et al. \(29\)](#).

Additional file 18: Supplementary Table T4. Translation efficiencies. Polysomal fractionation was done as described (15) with some modifications. Polysomal fractions were not pooled but instead fractions 7-14 for all samples were used individually for study gene expression analysis by qRT-PCRs (3 replicates per fraction, 24 points per sample). Expression was normalized to the pGEMEX-1 RNA spike-in control. Values were calculated from the quantitation cycle (Cq) using the formula relative quantity = $2^{Cq(\text{min})-Cq(\text{sample})}$. The inverse of corrected Cq values (corrected Cq⁻¹) for specific monosomes and polysomes fractions are shown on the left. Translation efficiencies with different criterias were determined as the fold change of the polysomes fractions vs the monosomes fractions.

Additional file 19: Supplementary Table T5. Specific rates of glucose consumption and lactate production. Data are mean \pm SD from three biological replicates. *, $p < 0,05$.

Additional file 20: Supplementary Table T6. Metabolomic measurements of various metabolites. Metabolites were analyzed by liquid chromatography (LC)- mass spectrometry (MS) (LC-MS/MS) as described [\[29, 30\]](#). Only significant average fold change values ($p < 0,05$) from seven technical replicates of three biological replicates are shown. NS: not significant. (2) Only two biological replicates were measured for Glucose 6-P and Oxaloacetate. (1) Only one biological replicate was measured for DHAP and α -Ketoglutarate.

Additional file 21: Supplementary File S1. Lists of genes with particular expression. Genes with high transcription and low translation comprise

the group of red genes; genes with high transcription and high translation are designated blue; genes with high transcription and high but saturated translation are shown in green. In each list, genes that fulfill the condition in a particular sample are identified in gray. ND: not detected in the particular sample.

Additional file 22: Supplementary File S2. Differential mRNA expression analysis.

Additional file 23: Supplementary File S3. Differential RPF expression analysis.

Additional file 24: Supplementary File S4. Differential translation efficiency analysis.

Additional file 25: Supplementary File S5. GO term enrichment analysis between MKL1 Δ N200 and MKL1 Δ C301. The GO analysis was performed with differentially transcribed, differentially translated and differentially transcribed and translated genes separately. Selected GO terms used in the figures are highlighted in gray.

Additional file 26: Supplementary File S6. GO term enrichment analysis between MKL1 Δ C301 and MCF7 control cells. The GO analysis was performed with differentially transcribed, differentially translated and differentially transcribed and translated genes separately. Selected GO terms used in the figures are highlighted in gray.

Additional file 27: Supplementary File S7. GO term enrichment analysis between MKL1 Δ N200 and MCF7 control cells. The GO analysis was performed with differentially transcribed, differentially translated and differentially transcribed and translated genes separately. Selected GO terms used in the figures are highlighted in gray.

Additional file 28: Supplementary File S8. Results of both total RNA and RPF of the differential expression analysis for the genes encoding components of the translation machinery. Genes that are significantly regulated are shown in red.

Abbreviations

1,3BPG: 1,3-Bisphosphoglycerate; 2,3BPG: 2,3-Bisphosphoglycerate; 2PG: 2-Phosphoglycerate; 3PG: 3-Phosphoglycerate; 5'TOP: RNA 5' terminal oligopyrimidine motif; 6PGL: 6-Phosphogluconate; 6PG: 6-Phosphogluconate; ACO: Aconitase; ACLY: ATP-citrate lyase; Acta2: Actin (α 2); ACTN: Actinin; α -KG: α -ketoglutarate; ALDO: Aldolase; ALDOA, ALDOB, ALDOC: ALDO isoforms; CCN: Cyclins; CD: Cluster of differentiation; CDS: Coding sequences; CML cells: Chronic myelogenous leukemia cells; CS: Citrate synthase; CSRP2: Cysteine and glycine-rich protein; CTGF: Connective tissue growth factor; D2-HG: D-2-hydroxyglutarate; DHAP: Dihydroxyacetone phosphate; DLAT: Dihydroliipoamide acetyltransferase (PDH component E2); DLD: Dihydroliipoamide dehydrogenase (PDH component E3); E2: 17- β -estradiol; E4P: Erithrose-4-phosphate; ECM: Extracellular matrix; EGLN: HIF prolylhydroxylase (PDH); EIF: Eukaryotic initiation factor; EMT: Epithelial to mesenchymal transition; ENO: Enolase; EPCAM: Epithelial cell adhesion molecule; ER: Estrogen receptor α ; ERBB2: Receptor tyrosine-protein kinase ERBB2; ERR: Estrogen-related receptor; F1,6BP: Fructose-1,6-bisphosphate; FBP1: Fructose-1,6-bisphosphatase 1; FBP2: Fructose-2,6-bisphosphatase 2; FCS: Fetal calf serum; FDR: False discovery rate; FH: Fumarate hydratase; FIH: Factor inhibiting HIF1; FLNA: Filamin A; FN1: Fibronectin 1; F6P: Fructose-6-phosphate; FSC: Forward scatter; FSP1: Fibroblast-specific protein 1; G3P: Glyceraldehyde-3-phosphate; G6P: Glucose-6-phosphate; G6PD: Glucose-6-phosphate dehydrogenase; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GATA3: GATA binding protein 3; GLS: Glutaminase; GLUD: Glutamate dehydrogenase; GO: Gene ontology; GPD: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase; GPI: Glucose-6-phosphate isomerase; HER2: Human epithelial growth factor receptor2; HIF1A-AS: HIF1A antisense RNA; HIF-1: hypoxia-inducible factor-1 α ; HK: Hexokinase; IDH: Isocitrate dehydrogenase; ITGA5: Integrin α -5 (fibronectin receptor subunit); KRT8: Keratin-8; LARP1: La-related protein 1; LDH: Lactate dehydrogenase; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; MCT: Monocarboxylate transporter; MDH: Malate dehydrogenase; MKL1: Myocardin-like protein 1; mTORC1: Mammalian target of rapamycin complex 1; NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide; NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NGS: Next generation sequencing; OGDH: Ketoglutarate dehydrogenase complex; OXPHOS: Oxidative phosphorylation; P53: Tumor protein p53; PCK: Phosphoenolpyruvate

carboxykinase; PDH: Pyruvate dehydrogenase complex; PDH: Pyruvate dehydrogenase component E1; PDK: Pyruvate dehydrogenase kinase; PEP: Phosphoenolpyruvate; PFK: Phosphofructokinase; PFKM, PFKL, PFKP: PFK isoforms; PGD: Phosphogluconate dehydrogenase; PGLS: 6-Phosphogluconolactonase; PGK: Phosphoglycerate kinase; PGAM: Phosphoglycerate mutase; PHD: Prolyl hydroxylases; PHGDH: Phosphoglycerate dehydrogenase; PI3K/AKT: PI3K/AKT signaling pathway; PK: Pyruvate kinase; RPE: Ribulose-5-phosphate 3- epimerase; PPP: Pentose Phosphate Pathway; PR: Progesterone receptor; PRKN: Parkin; PRPP: Ribosylpyrophosphate; R5P: Ribose-5-phosphate; RLSP: Ribulose-5-phosphate; PRPS: Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase; RP: Ribosomal proteins; RPFs: Ribosome protected fragments; RPIA: Ribose-5-phosphate isomerase A; RPS: Small subunit ribosomal protein; RPL: Large subunit ribosomal protein; S7P: Sedoheptulose-7-phosphate; SDH: Succinate dehydrogenase complex; SLC2A: Solute carrier family 2; snoRNAs: Small nucleolar RNAs; SRF: Serum response factor; SSC: Side scatter; SUCL: Succinate-coenzyme A ligase; TALDO: Transaldolase; TAGLN: Transgelin; TCA cycle: Tricarboxylic acid cycle; TIGAR: TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator; TJP: Tight junction proteins; TKT: Transketolase; TPI: Triose phosphate isomerase; TMM: Trimmed mean of M values; Ub: Ubiquitin; VHL: Von Hippel-Lindau factor; VTN: Vitronectin; Wnt5b: Wnt family member 5B; X5P: Xylulose-5-phosphate

Acknowledgements

We are grateful to Drs Ulrike Rolle-Kampczyk and Martin von Bergen (Helmholz for Environmental Research, Leipzig, Germany) for the metabolomics measurements.

This work was partially supported by Fondo Clemente Estable, ANII, Uruguay, PEDECIBA. T. Fernández-Calero was the recipient of fellowships from CAP, Universidad de la República, ANII (Uruguay) and Embassy of France in Uruguay. M Davyt was a recipient of a fellowship from CSIC (Uruguay).

Authors' contributions

TF-C, MD, KP, HP, GB, JPT, VH, MBF, CR, and MM performed and/or supervised experiments. HN helped with computational data analysis. TF-C, RE, CC, and MM wrote the manuscript. HN, ZI, JPT, HP, CR, and MBF contributed to the editing of the manuscript. TF-C and MM approved for the publication of the final manuscript. The authors read and approved the final manuscript.

Funding

The project was partially funded by Fondo Clemente Estable, ANII, Uruguay and PEDECIBA.

Availability of data and materials

The data sets supporting the results of this article are included within the article and its additional files. Raw data is available in the SRA database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) under accession number [PRJNA499096](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA499096).

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Biochemistry-Molecular Biology Section, Faculty of Sciences, Universidad de la República, Iguá 4225, CP 11400 Montevideo, Uruguay. ²Bioinformatics Unit, Institut Pasteur Montevideo, Mataojo, 2020 Montevideo, Uruguay. ³Departamento de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Católica del Uruguay, Av. 8 de Octubre, 2738 Montevideo, Uruguay. ⁴Cell Biology Unit, Institut Pasteur Montevideo, Mataojo, 2020 Montevideo, Uruguay. ⁵Institute for Biochemistry and Molecular Biology, Department of Chemistry, University of Hamburg, Hamburg, Germany. ⁶Department of Clinical Sciences Lund, Oncology and Pathology, Lund University Cancer Center, Lund University, SE-223 63 Lund, Sweden. ⁷Functional Genomics Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo, 2020 Montevideo, Uruguay. ⁸Analytical Biochemistry Unit, Nuclear Research Center, Faculty of Science, Universidad de la

República, Montevideo, Uruguay. ⁹Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. ¹⁰Université de Rennes 1-IRSET, Campus Santé de Villejean, 35000 Rennes, France.

Received: 13 September 2019 Accepted: 26 March 2020

Published online: 19 July 2020

References

- Liu F, Gu L-N, Shan B-E, Geng C-Z, Sang M-X. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: an update. *Oncol Lett*. 2016;12(6):4869–76.
- Rau K-M, Kang H-Y, Cha T-L, Miller SA, Hung M-C. The mechanisms and managements of hormone-therapy resistance in breast and prostate cancers. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(3):511–32.
- Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):265–73.
- Gugnoni M, Sancisi V, Manzotti G, Gandolfi G, Ciarrocchi A. Autophagy and epithelial-mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Cell Death Dis*. 2016;08(7):e2520.
- Voutsadakis IA. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and regulation of EMT factors by steroid nuclear receptors in breast cancer: a review and in silico investigation. *J Clin Med*. 2016;19:5(1).
- Wahl GM, Spike BT. Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intra-tumoral heterogeneity. *NPJ Breast Cancer*. 2017;3:14.
- Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, Bartlett JMS. EMT in breast carcinoma—a review. *J Clin Med* 2016;14:5(7).
- Haraguchi T, Kondo M, Uchikawa R, Kobayashi K, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. Dynamics and plasticity of the epithelial to mesenchymal transition induced by miR-200 family inhibition. *Sci Rep*. 2016;6:21117.
- Kerdivel G, Boudot A, Habauzit D, Percevault F, Demay F, Pakdel F, et al. Activation of the MKL1/actin signaling pathway induces hormonal escape in estrogen-responsive breast cancer cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;390(1–2):34–44.
- Flouriot G, Huet G, Demay F, Pakdel F, Boujrad N, Michel D. The actin/MKL1 signalling pathway influences cell growth and gene expression through large-scale chromatin reorganization and histone post-translational modifications. *Biochem J*. 2014;461(2):257–68.
- Guzzi N, Cieśla M, Ngoc PCT, Lang S, Arora S, Dimitriou M, et al. Pseudouridylation of tRNA-derived fragments steers translational control in stem cells. *Cell*. 2018;173(5):1204–1216.e26.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10(3):R25.
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009;25(9):1105–11.
- Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods*. 2015;12(2):115–21.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5(10):R80.
- Lawrence M, Huber W, Pagès H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, et al. Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(8):e1003118.
- TWH Backman, Girke T. systemPipeR: NGS workflow and report generation environment. *BMC Bioinformatics* 2016;17:388.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2010;26(1):139–40.
- McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(10):4288–97.
- Chothani S, Adami E, Ouyang JF, Viswanathan S, Hubner N, Cook SA, et al. deltaTE: detection of translationally regulated genes by integrative analysis of Ribo-seq and RNA-seq data. *Curr Protoc Mol Biol*. 2019;129(1):e108.
- Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics J Integr Biol*. 2012;16(5):284–7.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 2008;5(7):621–8.

23. Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, et al. MEME Suite: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jul 1; 37(suppl_2):W202–8.
24. Abdul Hadi LH, Xuan Lin QX, Minh TT, Loh M, Ng HK, Salim A, et al. miREM: an expectation-maximization approach for prioritizing miRNAs associated with gene-set. *BMC Bioinformatics.* 2018 10;19(1):299.
25. Engel KM, Baumann S, Rolle-Kampczyk U, Schiller J, von Bergen M, Grunewald S. Metabolomic profiling reveals correlations between spermogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. *PLoS ONE [Internet].* 2019 20 [cited 2019 Aug 15];14(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6382115/>.
26. Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and isotope tracing. *Cell.* 2018 03;173(4):822–837.
27. Ingolia NT. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nat Rev Genet.* 2014;15(3):205–13.
28. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 2010;11(3):R25.
29. Jehanno C, Fernandez-Calero T, Habauzit D, Avner S, Percevault F, Jullion E, et al. Nuclear accumulation of MKL1 in luminal breast cancer cells impairs genomic activity of ERα and is associated with endocrine resistance. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech.* 2020;27:194507.
30. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178–96.
31. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med.* 2013;19(11):1438–49.
32. Stadler SC, Allis CD. Linking epithelial-to-mesenchymal-transition and epigenetic modifications. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(5–6):404–10.
33. Zhou Y, Chang R, Ji W, Wang N, Qi M, Xu Y, et al. Loss of scribble promotes snail translation through translocation of HuR and enhances cancer drug resistance. *J Biol Chem.* 2016;291(1):291–302.
34. Sun J, Gu X, Wu N, Zhang P, Liu Y, Jiang S. Human antigen R enhances the epithelial-mesenchymal transition via regulation of ZEB-1 in the human airway epithelium. *Respir Res.* 2018 04;19(1):109.
35. Yu C, Xin W, Zhen J, Liu Y, Javed A, Wang R, et al. Human antigen R mediated post-transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition related genes in diabetic nephropathy. *J Diabetes.* 2015;7(4):562–72.
36. Avni D, Biberman Y, Meyuhos O. The 5' terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type- and sequence context-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(5):995–1001.
37. Yamashita R, Suzuki Y, Takeuchi N, Wakaguri H, Ueda T, Sugano S, et al. Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(11):3707–15.
38. Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature.* 2012;485(7396):109–13.
39. Patursky-Polischuk I, Stolovich-Rain M, Hausner-Hanochi M, Kasir J, Cybulski N, Avruch J, et al. The TSC-mTOR pathway mediates translational activation of TOP mRNAs by insulin largely in a raptor- or rictor-independent manner. *Mol Cell Biol.* 2009;29(3):640–9.
40. Philippe L, Vasseur J-J, Debart F, Thoreen CC. La-related protein 1 (LARP1) repression of TOP mRNA translation is mediated through its cap-binding domain and controlled by an adjacent regulatory region. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(3):1457–69.
41. Fonseca BD, Jia J-J, Hollensen AK, Pointet R, Hoang H-D, Niklaus MR, et al. LARP1 is a major phosphorylation substrate of mTORC1. *bioRxiv.* 2018 8; 491274.
42. Wieser W, Krumschnabel G. Hierarchies of ATP-consuming processes: direct compared with indirect measurements, and comparative aspects. *Biochem J.* 2001;355(Pt 2):389–95.
43. Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature.* 2010; 467(7318):929–34.
44. Yang L, Perez AA, Fujie S, Warden C, Li J, Wang Y, et al. Wnt modulates MCL1 to control cell survival in triple negative breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:124.
45. Kleer CG. Dual roles of CCN proteins in breast cancer progression. *J Cell Commun Signal.* 2016;10(3):217–22.
46. Kato S, Hayakawa Y, Sakurai H, Saiki I, Yokoyama S. Mesenchymal-transitioned cancer cells instigate the invasion of epithelial cancer cells through secretion of WNT3 and WNT5B. *Cancer Sci.* 2014;105(3):281–9.
47. Ikeda T, Hikichi T, Miura H, Shibata H, Mitsunaga K, Yamada Y, et al. Srf destabilizes cellular identity by suppressing cell-type-specific gene expression programs. *Nat Commun.* 2018;9(1):1387.
48. Müller I, Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter- and cell-specific epigenetic regulation of CD44, Cyclin D2, GLIPR1 and PTEN by methyl-CpG binding proteins and histone modifications. *BMC Cancer.* 2010; 10:297.
49. Shao J, Fan W, Ma B, Wu Y. Breast cancer stem cells expressing different stem cell markers exhibit distinct biological characteristics. *Mol Med Rep.* 2016;14(6):4991–8.
50. Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166(1): 21–45.
51. Walters B, Thompson SR. Cap-independent translational control of carcinogenesis. *Front Oncol.* 2016;6:128.
52. Lacerda R, Menezes J, Romão L. More than just scanning: the importance of cap-independent mRNA translation initiation for cellular stress response and cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2017;74(9):1659–80.
53. Evdokimova V, Tognon CE, Sorensen PHB. On translational regulation and EMT. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(5–6):437–45.
54. Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya A, et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF-κB and TGF-β signaling pathways. *Oncogene.* 2012;31(37):4150–63.
55. Ren Z, Yang T, Ding J, Liu W, Meng X, Zhang P, et al. MiR-520d-3p antitumor activity in human breast cancer via post-transcriptional regulation of spindle and kinetochore associated 2 expression. *Am J Transl Res.* 2018; 10(4):1097–108.
56. Prakash V, Carson BB, Feenstra JM, Dass RA, Sekyrova P, Hoshino A, et al. Ribosome biogenesis during cell cycle arrest fuels EMT in development and disease. *Nat Commun.* 2019;10(1):2110.
57. Huang R, Zong X. Aberrant cancer metabolism in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis: mechanisms in cancer progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;115:13–22.
58. Sciacovelli M, Frezza C. Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *FEBS J.* 2017;284(19):3132–44.
59. Morandi A, Taddei ML, Chiarugi P, Giannoni E. Targeting the metabolic reprogramming that controls epithelial-to-mesenchymal transition in aggressive tumors. *Front Oncol.* 2017;7:40.
60. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *EMBO J.* 2017;36(3):252–9.
61. Samanta D, Semenza GL. Maintenance of redox homeostasis by hypoxia-inducible factors. *Redox Biol.* 2017;13:331–5.
62. Laurenti G, Tennant DA. Isocitrate dehydrogenase (IDH), succinate dehydrogenase (SDH), fumarate hydratase (FH): three players for one phenotype in cancer? *Biochem Soc Trans.* 2016;44(4):1111–6.
63. Jose C, Bellance N, Rossignol R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim Biophys Acta.* 2011;1807(6): 552–61.
64. Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem.* 2009;9(9):1084–101.
65. Yeung SJ, Pan J, Lee M-H. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2008; 65(24):3981–99.
66. Adekola K, Rosen ST, Shanmugam M. Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr Opin Oncol.* 2012;24(6):650–4.
67. Masin M, Vazquez J, Rossi S, Groeneveld S, Samson N, Schwalie PC, et al. GLUT3 is induced during epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Cancer Metab.* 2014;2: 11.
68. Barron CC, Bilan PJ, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism.* 2016;65(2):124–39.
69. Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-κappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):611–8.
70. Grillo CA, Piroli GG, Hendry RM, Reagan LP. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res.* 2009;1296:35–45.

71. Garrido P, Osorio FG, Morán J, Cabello E, Alonso A, Freije JMP, et al. Loss of GLUT4 induces metabolic reprogramming and impairs viability of breast cancer cells. *J Cell Physiol.* 2015;230(1):191–8.
72. Kim NH, Cha YH, Lee J, Lee S-H, Yang JH, Yun JS, et al. Snail reprograms glucose metabolism by repressing phosphofructokinase PFKP allowing cancer cell survival under metabolic stress. *Nat Commun.* 2017;8:14374.
73. Chen G, Liu H, Zhang Y, Liang J, Zhu Y, Zhang M, et al. Silencing PFKP inhibits starvation-induced autophagy, glycolysis, and epithelial mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res.* 2018; 370(1):46–57.
74. Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov.* 2012;2(10):881–98.
75. Gerin I, Noël G, Bolsée J, Haumont O, Van Schaftingen E, Bommer GT. Identification of TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) as the phosphoglycolate-independent 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase. *Biochem J.* 2014;458(3):439–48.
76. Grassian AR, Metallo CM, Coloff JL, Stephanopoulos G, Brugge JS. Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation. *Genes Dev.* 2011;25(16):1716–33.
77. Jeoung NH. Pyruvate dehydrogenase kinases: therapeutic targets for diabetes and cancers. *Diabetes Metab J.* 2015;39(3):188–97.
78. Kim J, Gao P, Liu Y-C, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol.* 2007;27(21):7381–93.
79. Kim J, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006;3(3):177–85.
80. Prigione A, Rohwer N, Hoffmann S, Mlody B, Drews K, Bukowiecki R, et al. HIF1 α modulates cell fate reprogramming through early glycolytic shift and upregulation of PDK1-3 and PKM2. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2014;32(2):364–76.
81. Sun Y, Daemen A, Hatzivassiliou G, Arnott D, Wilson C, Zhuang G, et al. Metabolic and transcriptional profiling reveals pyruvate dehydrogenase kinase 4 as a mediator of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumor cells. *Cancer Metab.* 2014;2(1):20.
82. Walter W, Thomalla J, Bruhn J, Fagan DH, Zehowski C, Yee D, et al. Altered regulation of PDK4 expression promotes antiestrogen resistance in human breast cancer cells. *SpringerPlus.* 2015;4:689.
83. Jeong JY, Jeoung NH, Park K-G, Lee I-K. Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Diabetes Metab J.* 2012;36(5):328–35.
84. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett.* 2015 Jan 28;356(2 Pt A):156–64.
85. Lee JH, Kim E-J, Kim D-K, Lee J-M, Park SB, Lee H-K, et al. Hypoxia induces PDK4 gene expression through induction of the orphan nuclear receptor ERR γ . *PLoS One.* 2012;7(9):e46324.
86. Kamarajugadda S, Stemborski L, Cai Q, Simpson NE, Nayak S, Tan M, et al. Glucose oxidation modulates anoikis and tumor metastasis. *Mol Cell Biol.* 2012;32(10):1893–907.
87. He T-L, Zhang Y-J, Jiang H, Li X-H, Zhu H, Zheng K-L. The c-Myc-LDHA axis positively regulates aerobic glycolysis and promotes tumor progression in pancreatic cancer. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* 2015;32(7):187.
88. Puzio-Kuter AM. The role of p53 in metabolic regulation. *Genes Cancer.* 2011;2(4):385–91.
89. Kung C-P, Murphy ME. The role of the p53 tumor suppressor in metabolism and diabetes. *J Endocrinol.* 2016;231(2):R61–75.
90. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MNC, Nakano K, Bartrons R, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell.* 2006; 126(1):107–20.
91. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3481–98.
92. Lemons JMS, Feng X-J, Bennett BD, Legesse-Miller A, Johnson EL, Raitman I, et al. Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity. *PLoS Biol.* 2010; 8(10):e1000514.
93. Watt FM, Huck WTS. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(8):467–73.
94. Bruno RD, Fleming JM, George AL, Boulanger CA, Schedin P, Smith GH. Mammary extracellular matrix directs differentiation of testicular and embryonic stem cells to form functional mammary glands in vivo. *Sci Rep.* 2017;7:40196.
95. Zhu J, Xiong G, Trinkle C, Xu R. Integrated extracellular matrix signaling in mammary gland development and breast cancer progression. *Histol Histopathol.* 2014;29(9):1083–92.
96. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res.* 2012;10(11):1403–18.
97. Lee H-O, Mullins SR, Franco-Barraza J, Valianou M, Cukierman E, Cheng JD. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer.* 2011;11:245.
98. Naba A, Clauser KR, Hoersch S, Liu H, Carr SA, Hynes RO. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(4):M111.014647.
99. Naba A, Clauser KR, Lamar JM, Carr SA, Hynes RO. Extracellular matrix signatures of human mammary carcinoma identify novel metastasis promoters. *eLife.* 2014 11;3:e01308.
100. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1692(2–3):103–19.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



DISCUSSION

El objetivo general de nuestro trabajo es establecer la contribución del contexto celular y, en particular, de la cinética de traducción a la estructura, plegamiento y funcionalidad *in vivo* de proteínas.

Para ello, elegimos al ER α como proteína modelo y dividimos el trabajo en 3 grandes etapas. En la primera etapa buscamos entender si era posible que cambios en la cinética de traducción pudieran afectar la funcionalidad y posiblemente la conformación del ER α . Como aproximación utilizamos dos variantes sinónimas del ER α (ER α wt y ER α Ala87), ambas presentes como polimorfismos en poblaciones. Al cambiar un codón poco frecuente (en el ER α wt) por uno frecuente (en el ER α Ala87) es esperable cambiar la cinética de traducción, ya que, aparentemente y hasta donde podemos relevar, no cambiamos otras propiedades del ARNm como su estructura secundaria o unión a proteínas conocidas. Los dos receptores presentaron diferencias en su actividad transcripcional así como en su localización subcelular de forma dependiente del tipo celular y/o del grado de diferenciación. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que la cinética de traducción podría afectar la funcionalidad del ER α , y además sugieren que lo afectaría en forma tipo celular específica. Dentro de las hipótesis exploradas para explicar el resultado, una de la más plausibles es que los receptores puedan presentar una variante de conformación. Los resultados permitieron la publicación de dos trabajos. El primero titulado “The transcriptional activities and cellular localization of the human estrogen receptor alpha are affected by the synonymous Ala87 mutation” en *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. El segundo, titulado “Silent Polymorphisms: Can the tRNA Population Explain Changes in Protein Properties?” publicado en *Life* en el cual revisamos los argumentos que respaldan la idea de que las diferencias en la población de ARNt podrían producir cambios sutiles en la conformación del ER α -Ala87 y, por lo tanto, podrían explicar las variaciones funcionales observadas.

En una segunda etapa buscamos establecer si sería posible que el receptor expresado en una línea celular pero en dos estados distintos pudiera presentar propiedades funcionales diferentes. Nuevamente, esta posibilidad abriría la puerta al estudio de diferencias en las propiedades conformacionales del receptor en estos contextos. Para esta etapa elegimos el sistema compuesto por las células MCF7 y MCF7 MKL1 Δ N200. La translocación nuclear de MKL1 en las células MCF7 MKL1 Δ N200 genera cambios que hacen que las células pierdan características de células luminales y se asemejen a células de tipo basal, por lo que constituyen un modelo adecuado para estudiar los efectos de diferencias en el contexto celular. Además, el cambio de las características celulares de luminales a basales, sugieren que la activación de MKL1 podría ser un mecanismo potencial por el cual las células tumorales de mama escapan del control hormonal y se vuelven resistentes a las terapias hormonales (Kerdivel et al., 2014). Por lo tanto, la elección del sistema se basó en (i) la translocación de MKL1 al núcleo en las MCF7 provoca la pérdida de respuesta hormonal, (ii) el vínculo entre la respuesta hormonal y el ER α , (iii) la importancia de la estructura en la función del ER α . En otras palabras, hipotetizamos que dado que la translocación nuclear de MKL1 provoca la pérdida de respuesta a estrógenos y el efecto de los estrógenos es mediado por el ER α , un posible cambio en la estructura del receptor entre estas células podría provocar un cambio en su funcionalidad que tuviera como consecuencia la pérdida de respuesta frente a hormonas. Además de la reducción de expresión del receptor

efectivamente, encontramos diferencias en la actividad de transactivación y en la asociación con la cromatina del receptor, apoyando la hipótesis de que el contexto celular podría afectar la funcionalidad del receptor. Los resultados dieron lugar a la publicación de un trabajo titulado “Nuclear accumulation of MKL1 in luminal breast cancer cells promotes endocrine resistance by impairing genomic activity of ER α ” en BBA - Gene Regulatory Mechanisms.

Estos resultados abrieron la puerta a la tercera etapa del trabajo en la cual nos propusimos caracterizar el contexto celular en el que se da la síntesis del receptor en las dos líneas celulares. En particular, nos propusimos caracterizar los cambios en la síntesis de la maquinaria de traducción. Los resultados sugieren una adaptación de la maquinaria traduccional así como del metabolismo celular en las células MCF7 MKL1 Δ N200 producto de la translocación nuclear de MKL1. El conjunto de la maquinaria de traducción, presenta un aumento generalizado de su síntesis a nivel de la traducción así como de la eficiencia de traducción y un cambio en los factores de iniciación. Los resultados fueron publicados en el trabajo titulado “Fine-tuning the metabolic rewiring and adaptation of translational machinery during an epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells” en Cancer & Metabolism. Las diferencias encontradas en la maquinaria de traducción entre las dos líneas celulares nos impulsan, en un futuro cercano y por fuera del alcance de este trabajo, a embarcarnos en el análisis de las propiedades estructurales y conformacionales del receptor que pudieran ser consecuencia de cambios en las propiedades de la maquinaria de traducción,

Una de las preguntas que nos planteamos a partir de los resultados es ¿cuáles son las variaciones del contexto celular que podrían potencialmente impactar en la traducción? Es importante recordar que la traducción se da en un ambiente celular abarrotado de moléculas. A modo de ejemplo, se estima que en una célula humana puede haber entre 2 y 10x10⁹ proteínas lo que da una concentración aproximada de 1x10⁶ proteínas/ μ m³ (Philips, n.d.), a lo que hay que sumar nucleótidos, iones inorgánicos y lípidos entre otros. Esto hace pensar que la traducción se da en un ambiente que podríamos considerar como una “densa sopa” molecular donde existen altas probabilidades de que se den interacciones entre el péptido nascente y otras moléculas que potencialmente podrían afectar la cinética de la traducción y el plegamiento proteico. Si pensamos en la heterogeneidad celular que existe habitualmente tanto *in vivo* como *in vitro*, gana particular relevancia la pregunta sobre cuáles son las diferencias que permitirían identificar dos contextos celulares diferentes que tuvieran potencial impacto en la cinética de traducción.

En este sentido, es importante tener en consideración que el contexto celular puede ser ampliamente variable. Por ejemplo, existen variaciones considerables en la expresión génica de célula a célula dentro de un solo tipo celular que reflejan el microambiente celular cambiante, varios estados celulares (mitóticos, migratorios, etc.) y la expresión génica estocástica. Esto introduce el concepto de estado celular (“What Is Your Conceptual Definition of ‘Cell Type’ in the Context of a Mature Organism?,” 2017). ¿Cabe caracterizar el contexto celular de diferentes “estados celulares”? En esta línea desde hace ya algunos años y acompañando el desarrollo de las tecnologías *single cell*, está tomando fuerza la teoría conocida como *Variation is function* que argumenta que la variación molecular unicelular *per se* podría ser crucial para la función a nivel de población. Bajo esta hipótesis,

la variación molecular indica una diversidad de capacidades funcionales ocultas dentro de un conjunto de células "idénticas", y esta diversidad funcional facilita un comportamiento colectivo que sería inaccesible para una población homogénea (Dueck et al., 2016). Si tomamos todos estos factores en consideración, se complejiza exponencialmente la caracterización del contexto y se puede hacer difícil delimitar un contexto celular particular.

De todas formas, al igual que al definir tipos celulares, sería posible intentar entender a esta "sopa" según algunas características generales. Por ejemplo, sería posible intentar entender el contexto celular vinculado a tipos o características celulares previamente establecidas. Se han descrito algunas características clave de tipos celulares "definidos" que podrían utilizarse, entre las cuales se pueden encontrar la expresión de marcadores particulares, patrones generales de expresión génica o la regulación de actividades específicas, transitorias y/o localizadas que pueden determinar el comportamiento celular y las estructuras que las producen.

En el sistema MCF7 / MCF7 MKL1 Δ N200 consideramos que las células MCF7 presentan características de células luminales mientras que las MCF7 MKL1 Δ N200 se asemejan a células de tipo basal en base a sus perfiles de expresión génica, morfología y capacidad de migración. De todas formas existen al menos dos puntos a tener en cuenta en el análisis de los resultados: (i) la ya mencionada heterogeneidad celular y (ii) el cambio de un estado al otro es un proceso continuo y dinámico. En lo que respecta a la heterogeneidad, existen múltiples fuentes de la misma. Son células que crecen en monocapa y que no se encuentran en un 100% de confluencia por lo que algunas se encuentran rodeadas por completo e interaccionando con otras células mientras que otras lo hacen parcialmente. Además no se encuentran sincronizadas por lo que pueden estar en distintos momentos del ciclo celular. En resumen existen múltiples estados celulares coexistiendo al mismo tiempo. Esto implica que en general los resultados obtenidos representan promedios de lo que sucede en todas las células en el cultivo, por lo que las señales provenientes de subpoblaciones celulares diferentes pueden quedar representadas por los cambios predominantes de las poblaciones más abundantes. Por otra parte, las condiciones en las que realizamos los ensayos nos permiten comparar dos "fotos": previa y posterior a la localización nuclear de MKL1. Al mismo tiempo, las características celulares sugieren que se está observando un momento particular dentro de la transición de células luminales a basales, ya que las células MKL1 Δ N200 presentan características mixtas de ambos tipos. Es decir, estaríamos observando un punto particular dentro de la transición luminal/basal posterior a la translocación nuclear de MKL1. En este punto es importante considerar que en los tumores existe una gran heterogeneidad celular y el vínculo de estas células con otras con diferentes características puede cambiar el destino celular.

¿Cuál puede ser el impacto del contexto celular en la traducción? Múltiples factores del contexto celular han sido estudiados y vinculados a cambios de la cinética de traducción. Entre ellos ARNt, secuencias específicas del mensajero, uso de codones sinónimos, componentes específicos de la maquinaria de traducción como proteínas ribosomales o chaperonas, entre otros (ver detalles en la introducción). Sin embargo, una limitación fundamental de casi todos los estudios que analizan los efectos de estos factores que influyen en la velocidad de traducción es que se consideran de forma aislada, descuidando

la posibilidad de que múltiples factores actúen de manera coordinada (Gorochowski et al., 2015). Sin embargo, hace muchos años que ha ganado relevancia el hecho que todos los procesos celulares se encuentran interconectados y tanto la genética como la epigenética dirigen los procesos metabólicos y actúan como una unidad para definir el destino celular. Por lo que, a la importancia del estudio de mecanismos o procesos individuales, sería importante sumar el entendimiento del contexto en el que se dan. Por ejemplo, esto puede ser particularmente importante en farmacología. Cuando se quiere tratar con un medicamento un blanco específico (por ejemplo en el caso del cáncer de mama) existen reacciones que van más allá del efecto deseado.

Desde esta perspectiva fue que intentamos caracterizar en el modelo MCF7/ MCF7 MKL1 Δ N200 la maquinaria traduccional como una unidad pero además intentamos relevar otros aspectos del contexto celular que pudieran acompañar los cambios de la misma entre ambas líneas celulares. En particular, además de la maquinaria de traducción definimos profundizar sobre el metabolismo energético de las células. La traducción es de los procesos de mayor demanda energética en la célula, y por lo tanto las células con altos niveles de traducción requieren una gran producción de ATP (Topisirovic and Sonenberg, 2011). Los cambios metabólicos observados entre ambas líneas celulares acompañando al aumento de la traducción en las células MCF7 MKL1 Δ N200 ponen de manifiesto la importancia de ver a la célula como una unidad. Somos conscientes que dejamos muchos elementos como las interacciones con el medio, la metilación del ADN, la caracterización del estado de la cromatina, el ciclo celular, el estadio de diferenciación, entre otros sin explorar. Estos elementos podrían estar fuertemente vinculados a la maquinaria traduccional y sin lugar a dudas hacen parte del contexto celular. Por otra parte, mediante la combinación de RNA-seq con Ribosome Profiling pudimos evidenciar dos estrategias de regulación de la actividad celular (transcripción y traducción). Esto nos permitió ver cambios en la síntesis de la maquinaria traduccional entre ambas líneas celulares, que utilizando únicamente una aproximación que evaluara los niveles de ARNm, hubieran pasado desapercibidos. Una vez más, se evidencia la importancia de una mirada global sobre los procesos celulares. En este sentido incorporar otras metodologías como proteómica, metabolómica y espectrometría de masas, sería fundamental para explorar otros aspectos regulatorios como las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales o la actividad de las vías proteolíticas y tener un panorama más completo. Por ejemplo, muchas de las actividades celulares son reguladas por modificaciones postraduccionales de las enzimas que participan en ellas, incluida la traducción. Por lo que para ganar profundidad en el conocimiento del estado de actividad de las mismas es importante explorar este aspecto.

Como se comentó anteriormente, existen múltiples trabajos que evidencian la influencia de elementos particulares de la maquinaria traduccional en la cinética de traducción. Sin embargo, a pesar del creciente interés en el tema, son menos los trabajos que vinculan estos elementos al plegamiento o a las propiedades estructurales de las proteínas y muy pocos los que muestran los efectos *in vivo*. Esto se puede deber, en parte, a las dificultades que pueden presentar el estudio de la estructura de proteínas, el seguimiento del plegamiento *in vivo* y el estudio de la cinética de traducción. Una de las formas clásicas para el estudio de la estructura de proteínas es a través de la cristalografía. Sin embargo, sólo algunas proteínas o fragmentos de proteínas muy estructuradas son cristalizables.

Además, en general lo son en condiciones específicas como puede ser unidas a moléculas particulares. En proteínas pequeñas tradicionalmente también se ha usado la Resonancia Magnética Nuclear para el estudio de su estructura. El avance de la tecnología en los últimos años ha permitido el incremento del tamaño de las proteínas que se pueden estudiar con esta técnica, por el costo y disponibilidad de equipos capaces de llevar a cabo tales experimentos han limitado su aplicación. Por otro lado, se han desarrollado algunas estrategias que utilizan anticuerpos conformacionales para seguir la cinética del plegamiento pero todavía presentan varias dificultades para su aplicación. En lo que respecta al estudio de la cinética de traducción el desarrollo de la estrategia de Ribosome Profiling ha permitido un gran avance, ya que permiten estimar, en forma indirecta, el tiempo de residencia del ribosoma en un codón relativo al resto de los codones. Sin embargo aún faltan estrategias que permitan seguir la cinética traducción en tiempo real *in vivo* a gran escala. Por otra parte, como aproximación a lo que sucede *in vivo*, las líneas celulares han mostrado ser una herramienta excelente en nuestro estudio. Sin embargo, no hay que perder la perspectiva de que las líneas celulares presentan extensas mutaciones. Por ejemplo, la línea MCF7 tiene más de 80 cromosomas por lo que los resultados a pesar de sentar bases para profundizar en condiciones *in vivo* deben ser tomados en el contexto en el que son encontrados.

A pesar de las dificultades, consideramos que es necesario redoblar los esfuerzos para entender el efecto del contexto celular y la cinética de traducción en el plegamiento de proteínas debido a su potencial impacto. Por una parte, si el contexto celular presenta diferencias entre distintos tipos celulares o tejidos, podría ser posible que para algunas proteínas existieran conformaciones tipo celulares específicas. Esto, por ejemplo, podría cambiar las estrategias de diseño para el desarrollo de fármacos dirigidos a tejidos particulares o de aplicación local. En el caso del receptor por ejemplo, se ha visto que algunas drogas pueden actuar como agonistas o como antagonistas de forma dependiente del tejido en el que actúa y esto ha sido considerado para la elección del tratamiento de diferentes patologías. Las diferencias en las propiedades funcionales encontradas utilizando el modelo MCF7 / MCF7 MKL1 Δ N200 sientan bases para continuar explorando las propiedades estructurales del receptor en células tumorales de mama de origen luminal y basal que pudieran tener impacto en el desarrollo de fármacos. El estudio de las propiedades estructurales del receptor de las líneas en las que el grupo está comenzando a incursionar y pretende continuar a futuro.

Por otra parte, otro de los potenciales impactos del contexto celular y la cinética de traducción en el plegamiento de proteínas podría ser la variabilidad estructural de proteínas entre individuos. Existe una variabilidad intrínseca en los contextos celulares entre individuos que tiene base en las diferencias genéticas y epigenéticas, pero queda mucho por explorar para entender cuál es su alcance sobre la conformación de distintas proteínas. Las consecuencias de las variantes no sinónimas en los genes son incesantemente exploradas. Muchas de estas variantes en genes que codifican proteínas particulares han sido vinculadas a cambios funcionales o estructurales de las proteínas. Esto es utilizado, por ejemplo, en el desarrollo de la medicina personalizada que cada vez gana más adeptos. Se utiliza también en la elección de algunos tratamientos contra tumores que tienen base en mutaciones génicas. Los estudios que describen los cambios de funcionalidad de proteínas

cuando son codificadas por variantes sinónimas abre la puerta a ampliar las aplicaciones que se utilizan para polimorfismos no sinónimos a polimorfismos sinónimos. Los resultados encontrados para el ER α Ala87 refuerzan la relevancia de los polimorfismos sinónimos y más aún ponen en evidencia la importancia del contexto celular ya que las diferencias encontradas entre el receptor salvaje y el Ala87 son dependientes del tipo celular.

CONCLUSION

A través de este trabajo avanzamos en el entendimiento de la contribución del contexto celular a la funcionalidad del ERα. Pudimos mostrar que un cambio sinónimo en la secuencia del receptor (un polimorfismo) tiene consecuencias en la funcionalidad del receptor. Esto sugiere que cambios en la cinética de traducción podrían afectar la funcionalidad en forma tipo celular específica y posiblemente la conformación del ERα. Describimos también cambios en las propiedades funcionales del receptor al ser expresado en dos contextos celulares diferentes. Todos los cambios funcionales encontrados son compatibles con cambios en las propiedades estructurales del receptor. Pudimos mostrar que los cambios de funcionalidad del receptor son acompañados por cambios en las características y propiedades de la maquinaria de traducción entre estos dos contextos. A pesar de no poder descartar otras hipótesis, los resultados nos impulsan, en un futuro cercano, a embarcarnos en el análisis de las propiedades estructurales y conformacionales del receptor que pudieran ser consecuencia de cambios en las propiedades de la maquinaria de traducción y que expliquen los cambios funcionales encontrados. Por otra parte, acompañando los cambios de la maquinaria de traducción encontramos cambios en otros procesos celulares como el metabolismo energético que pueden estar potencialmente vinculados a las características observadas en la maquinaria de traducción y probablemente contribuyendo a definir el destino celular. Según nuestra perspectiva, esto pone en evidencia la relevancia de considerar a los procesos celulares como un todo, principalmente cuando se trata de caracterizar el contexto celular. El trabajo abre múltiples preguntas para continuar con la búsqueda del entendimiento del potencial impacto del contexto celular en la síntesis, plegamiento y funcionalidad de proteínas.

BIBLIOGRAFIA

- Al Saleh, S., Al Mulla, F., Luqmani, Y.A., 2011. Estrogen Receptor Silencing Induces Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020610>
- Aleskandarany, M.A., Vandenberghe, M.E., Marchiò, C., Ellis, I.O., Sapino, A., Rakha, E.A., 2018. Tumour Heterogeneity of Breast Cancer: From Morphology to Personalised Medicine. *Pathobiology* 85, 23–34. <https://doi.org/10.1159/000477851>
- Allegretto, E.A., 2002. Ligand-Induced Conformational Changes in Estrogen Receptors- α and - β . https://doi.org/10.1007/978-1-59259-157-2_2
- Allott, E.H., Geradts, J., Sun, X., Cohen, S.M., Zirpoli, G.R., Khoury, T., Bshara, W., Chen, M., Sherman, M.E., Palmer, J.R., Ambrosone, C.B., Olshan, A.F., Troester, M.A., 2016. Intratumoral heterogeneity as a source of discordance in breast cancer biomarker classification. *Breast Cancer Res.* 18, 68. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0725-1>
- Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., Rowan, B.G., 2012. Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl. Recept. Signal.* 10. <https://doi.org/10.1621/nrs.10001>
- Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., White, F.H., 1961. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 47, 1309–1314. <https://doi.org/10.1073/pnas.47.9.1309>
- Arpino, G., Wiechmann, L., Osborne, C.K., Schiff, R., 2008. Crosstalk between the Estrogen Receptor and the HER Tyrosine Kinase Receptor Family: Molecular Mechanism and Clinical Implications for Endocrine Therapy Resistance. *Endocr. Rev.* 29, 217–233. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0045>
- Bado, I., Gugala, Z., Fuqua, S.A.W., Zhang, X.H.-F., 2017. Estrogen Receptors in Breast and Bone: from Virtue of Remodeling to Vileness of Metastasis. *Oncogene* 36, 4527–4537. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.94>
- Bagaria, S.P., Ray, P.S., Sim, M.-S., Ye, X., Shamonki, J.M., Cui, X., Giuliano, A.E., 2014. Personalizing breast cancer staging by the inclusion of ER, PR, and HER2. *JAMA Surg.* 149, 125–129. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2013.3181>
- Bartoszewski, R.A., Jablonsky, M., Bartoszewska, S., Stevenson, L., Dai, Q., Kappes, J., Collawn, J.F., Bebok, Z., 2010. A Synonymous Single Nucleotide Polymorphism in $\Delta F508$ CFTR Alters the Secondary Structure of the mRNA and the Expression of the Mutant Protein. *J. Biol. Chem.* 285, 28741–28748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154575>
- Bastide, A., David, A., 2018. The ribosome, (slow) beating heart of cancer (stem) cell. *Oncogenesis* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0044-8>
- Berry, M., Metzger, D., Chambon, P., 1990. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 9, 2811–2818.
- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., Topisirovic, I., 2015. Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 261–278. <https://doi.org/10.1038/nrd4505>
- Black, L.J., Sato, M., Rowley, E.R., Magee, D.E., Bekele, A., Williams, D.C., Cullinan, G.J., Bendele, R., Kauffman, R.F., Bensch, W.R., 1994. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest.* 93, 63–69. <https://doi.org/10.1172/JCI116985>
- Blanco, S., Bandiera, R., Popis, M., Hussain, S., Lombard, P., Aleksic, J., Sajini, A., Tanna, H., Cortés-Garrido, R., Gkatza, N., Dietmann, S., Frye, M., 2016. Stem cell function

- and stress response are controlled by protein synthesis. *Nature* 534, 335–340.
<https://doi.org/10.1038/nature18282>
- Broom, R.J., Tang, P.A., Simmons, C., Bordeleau, L., Mulligan, A.M., O'malley, F.P., Miller, N., Andrulis, I.L., Brenner, D.M., Clemons, M.J., 2009. Changes in Estrogen Receptor, Progesterone Receptor and Her-2/neu Status with Time: Discordance Rates Between Primary and Metastatic Breast Cancer. *Anticancer Res.* 29, 1557–1562.
- Bryngelson, J.D., Onuchic, J.N., Socci, N.D., Wolynes, P.G., 1995. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins* 21, 167–195.
<https://doi.org/10.1002/prot.340210302>
- Burns, K.A., Korach, K.S., 2012. Estrogen receptors and human disease: an update. *Arch. Toxicol.* 86, 1491–1504. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0868-5>
- Carroll, J.S., 2016. Mechanisms of oestrogen receptor (ER) gene regulation in breast cancer. *Eur. J. Endocrinol.* 175, R41–R49. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0124>
- Carroll, J.S., Meyer, C.A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T.R., Eeckhoute, 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.
<https://doi.org/10.1038/ng1901>
- Celik, L., Lund, J.D.D., Schiøtt, B., 2007. Conformational Dynamics of the Estrogen Receptor α : Molecular Dynamics Simulations of the Influence of Binding Site Structure on Protein Dynamics. *Biochemistry* 46, 1743–1758.
<https://doi.org/10.1021/bi061656t>
- Cen, B., Selvaraj, A., Burgess, R.C., Hitzler, J.K., Ma, Z., Morris, S.W., Prywes, R., 2003. Megakaryoblastic Leukemia 1, a Potent Transcriptional Coactivator for Serum Response Factor (SRF), Is Required for Serum Induction of SRF Target Genes. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6597–6608. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.18.6597-6608.2003>
- Chae, Y.K., Huang, H.-Y., Strickland, P., Hoffman, S.C., Helzlsouer, K., 2009. Genetic polymorphisms of estrogen receptors alpha and beta and the risk of developing prostate cancer. *PLoS One* 4, e6523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006523>
- Chan, P.P., Lowe, T.M., 2009. GtRNAdb: a database of transfer RNA genes detected in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 37, D93-97.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn787>
- Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M., Ingber, D.E., 1997. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science* 276, 1425–1428.
<https://doi.org/10.1126/science.276.5317.1425>
- Chen, D., Riedl, T., Washbrook, E., Pace, P.E., Coombes, R.C., Egly, J.M., Ali, S., 2000. Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7. *Mol. Cell* 6, 127–137.
- Chen, W., Helenius, J., Braakman, I., Helenius, A., 1995. Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6229–6233.
- Chung, G.G., Zerkowski, M.P., Ghosh, S., Camp, R.L., Rimm, D.L., 2007. Quantitative analysis of estrogen receptor heterogeneity in breast cancer. *Lab. Invest.* 87, 662–669. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700543>
- Clarke, R., Tyson, J.J., Dixon, J.M., 2015. Endocrine resistance in breast cancer--An overview and update. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418 Pt 3, 220–234.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.035>
- Currin, E., Peterson, L.M., Schubert, E.K., Link, J.M., Krohn, K.A., Livingston, R.B., Mankoff, D.A., Linden, H.M., 2016. Temporal Heterogeneity of Estrogen Receptor Expression

- in Bone-Dominant Breast Cancer: 18F-Fluoroestradiol PET Imaging Shows Return of ER Expression. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* 14, 144–147.
- DeBerardinis, R.J., Chandel, N.S., 2020. We need to talk about the Warburg effect. *Nat. Metab.* 2, 127–129. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0172-2>
- Deckert, A., Waudby, C.A., Wlodarski, T., Wentink, A.S., Wang, X., Kirkpatrick, J.P., Paton, J.F.S., Camilloni, C., Kukic, P., Dobson, C.M., Vendruscolo, M., Cabrita, L.D., Christodoulou, J., 2016. Structural characterization of the interaction of α -synuclein nascent chains with the ribosomal surface and trigger factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 5012–5017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519124113>
- Deroo, B.J., Korach, K.S., 2006. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* 116, 561–570. <https://doi.org/10.1172/JCI27987>
- Dever, T.E., 2002. Gene-Specific Regulation by General Translation Factors. *Cell* 108, 545–556. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00642-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00642-6)
- Dias, K., Dvorkin-Gheva, A., Hallett, R.M., Wu, Y., Hassell, J., Pond, G.R., Levine, M., Whelan, T., Bane, A.L., 2017. Claudin-Low Breast Cancer; Clinical & Pathological Characteristics. *PLoS ONE* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168669>
- Dittmar, K.A., Goodenbour, J.M., Pan, T., 2006. Tissue-specific differences in human transfer RNA expression. *PLoS Genet.* 2, e221. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020221>
- Dongre, A., Weinberg, R.A., 2019. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Ebright, R.Y., Lee, S., Wittner, B.S., Niederhoffer, K.L., Nicholson, B.T., Bardia, A., Truesdell, S., Wiley, D.F., Wesley, B., Li, S., Mai, A., Aceto, N., Vincent-Jordan, N., Szabolcs, A., Chirn, B., Kreuzer, J., Comaills, V., Kalinich, M., Haas, W., Ting, D.T., Toner, M., Vasudevan, S., Haber, D.A., Maheswaran, S., Micalizzi, D.S., 2020. Deregulation of ribosomal protein expression and translation promotes breast cancer metastasis. *Science* 367, 1468–1473. <https://doi.org/10.1126/science.aay0939>
- Ettinger, B., Black, D.M., Mitlak, B.H., Knickerbocker, R.K., Nickelsen, T., Genant, H.K., Christiansen, C., Delmas, P.D., Zanchetta, J.R., Stakkestad, J., Glüer, C.C., Krueger, K., Cohen, F.J., Eckert, S., Ensrud, K.E., Avioli, L.V., Lips, P., Cummings, S.R., 1999. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA* 282, 637–645. <https://doi.org/10.1001/jama.282.7.637>
- Evans, M.S., Sander, I.M., Clark, P.L., 2008. Cotranslational folding promotes beta-helix formation and avoids aggregation in vivo. *J. Mol. Biol.* 383, 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.035>
- Fedorov, A.N., Baldwin, T.O., 1997. Cotranslational Protein Folding. *J. Biol. Chem.* 272, 32715–32718. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.52.32715>
- Felipe Lima, J., Nofech-Mozes, S., Bayani, J., Bartlett, J.M.S., 2016. EMT in Breast Carcinoma-A Review. *J. Clin. Med.* 5. <https://doi.org/10.3390/jcm5070065>
- Ferrin, M.A., Subramaniam, A.R., 2017. Kinetic modeling predicts a stimulatory role for ribosome collisions at elongation stall sites in bacteria. *eLife* 6, e23629. <https://doi.org/10.7554/eLife.23629>
- Flouriot, G., Huet, G., Demay, F., Pakdel, F., Boujrad, N., Michel, D., 2014. The actin/MKL1 signalling pathway influences cell growth and gene expression through large-scale chromatin reorganization and histone post-translational modifications. *Biochem. J.* 461, 257–268. <https://doi.org/10.1042/BJ20131240>
- Fraser-Pitt, D., O’Neil, D., 2015. Cystic fibrosis - a multiorgan protein misfolding disease. *Future Sci. OA* 1, FSO57. <https://doi.org/10.4155/fso.15.57>

- Frasor, J., Danes, J.M., Komm, B., Chang, K.C.N., Lyttle, C.R., Katzenellenbogen, B.S., 2003. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 144, 4562–4574. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0567>
- Frydman, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hartl, F.U., 1999. Co-translational domain folding as the structural basis for the rapid de novo folding of firefly luciferase. *Nat. Struct. Biol.* 6, 697–705. <https://doi.org/10.1038/10754>
- Gao, J.J., Swain, S.M., 2018. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *The Oncologist* 23, 556–565. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0535>
- Gee, A.C., Katzenellenbogen, J.A., 2001. Probing conformational changes in the estrogen receptor: evidence for a partially unfolded intermediate facilitating ligand binding and release. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 15, 421–428. <https://doi.org/10.1210/mend.15.3.0602>
- Genuth, N.R., Barna, M., 2018a. The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Mol. Cell* 71, 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.018>
- Genuth, N.R., Barna, M., 2018b. Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. *Nat. Rev. Genet.* 19, 431–452. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0008-z>
- Gingold, H., Tehler, D., Christoffersen, N.R., Nielsen, M.M., Asmar, F., Kooistra, S.M., Christophersen, N.S., Christensen, L.L., Borre, M., Sørensen, K.D., Andersen, L.D., Andersen, C.L., Hulleman, E., Wurdinger, T., Ralfkiær, E., Helin, K., Grønbaek, K., Ørntoft, T., Waszak, S.M., Dahan, O., Pedersen, J.S., Lund, A.H., Pilpel, Y., 2014. A Dual Program for Translation Regulation in Cellular Proliferation and Differentiation. *Cell* 158, 1281–1292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.011>
- Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14, 121–141. <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.121>
- Gorochowski, T.E., Ignatova, Z., Bovenberg, R.A.L., Roubos, J.A., 2015. Trade-offs between tRNA abundance and mRNA secondary structure support smoothing of translation elongation rate. *Nucleic Acids Res.* 43, 3022–3032. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv199>
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., Chambon, P., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134–139. <https://doi.org/10.1038/320134a0>
- Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., Shine, J., 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150–1154. <https://doi.org/10.1126/science.3753802>
- Guertin, M.J., Zhang, X., Coonrod, S.A., Hager, G.L., 2014. Transient Estrogen Receptor Binding and p300 Redistribution Support a Squelching Mechanism for Estradiol-Repressed Genes. *Mol. Endocrinol.* 28, 1522–1533. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1130>
- Gugnoni, M., Sancisi, V., Manzotti, G., Gandolfi, G., Ciarrocchi, A., 2016. Autophagy and epithelial-mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer. *Cell Death Dis.* 7, e2520. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.415>
- Guimaraes, J.C., Zavolan, M., 2016. Patterns of ribosomal protein expression specify normal and malignant human cells. *Genome Biol.* 17, 236. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1104-z>
- Gupta, V., Warner, J.R., 2014. Ribosome-omics of the human ribosome. *RNA* 20, 1004–1013. <https://doi.org/10.1261/rna.043653.113>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.042>
- Hao, H., d'Alincourt-Salazar, M., Kelley, K.M.M., Shatnawi, A., Mukherjee, S., Shah, Y.M., Ratnam, M., 2007. Estrogen-induced and TAFII30-mediated gene repression by direct recruitment of the estrogen receptor and co-repressors to the core promoter and its reversal by tamoxifen. *Oncogene* 26, 7872–7884. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210592>
- Haraguchi, T., Kondo, M., Uchikawa, R., Kobayashi, Kazuyoshi, Hiramatsu, H., Kobayashi, Kyousuke, Chit, U.W., Shimizu, T., Iba, H., 2016. Dynamics and plasticity of the epithelial to mesenchymal transition induced by miR-200 family inhibition. *Sci. Rep.* 6, 21117. <https://doi.org/10.1038/srep21117>
- Hershey, J.W.B., Sonenberg, N., Mathews, M.B., 2012. Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011528. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011528>
- Horjales, S., Cota, G., Señorale-Pose, M., Rovira, C., Román, E., Artagaveytia, N., Ehrlich, R., Marín, M., 2007. Translational machinery and protein folding: Evidence of conformational variants of the estrogen receptor alpha. *Arch. Biochem. Biophys.* 467, 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.07.029>
- HU, R., HILAKIVI-CLARKE, L., CLARKE, R., 2015. Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). *Oncol. Lett.* 9, 1495–1501. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2962>
- Huet, G., Mérot, Y., Le Dily, F., Kern, L., Ferrière, F., Saligaut, C., Boujrad, N., Pakdel, F., Métivier, R., Flouriot, G., 2008. Loss of E-cadherin-mediated cell contacts reduces estrogen receptor alpha (ER α) transcriptional efficiency by affecting the respective contribution exerted by AF1 and AF2 transactivation functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.178>
- Huet, G., Mérot, Y., Percevault, F., Tiffoche, C., Arnal, J.-F., Boujrad, N., Pakdel, F., Métivier, R., Flouriot, G., 2009. Repression of the estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the Rho/megakaryoblastic leukemia 1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 33729–33739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.045534>
- Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S.W., Washburn, T.F., McLachlan, J.A., Korach, K.S., 1992. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4658–4662.
- Ingolia, N.T., 2014. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nat. Rev. Genet.* 15, 205–213. <https://doi.org/10.1038/nrg3645>
- Iorga, A., Cunningham, C.M., Moazeni, S., Ruffenach, G., Umar, S., Eghbali, M., 2017. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biol. Sex Differ.* 8. <https://doi.org/10.1186/s13293-017-0152-8>
- Ishimura, R., Nagy, G., Dotu, I., Zhou, H., Yang, X.-L., Schimmel, P., Senju, S., Nishimura, Y., Chuang, J.H., Ackerman, S.L., 2014. RNA function. Ribosome stalling induced by mutation of a CNS-specific tRNA causes neurodegeneration. *Science* 345, 455–459. <https://doi.org/10.1126/science.1249749>
- Jakacka, M., Ito, M., Weiss, J., Chien, P.-Y., Gehm, B.D., Jameson, J.L., 2001. Estrogen Receptor Binding to DNA Is Not Required for Its Activity through the Nonclassical AP1 Pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 13615–13621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008384200>
- Jovanovic, M., Rooney, M.S., Mertins, P., Przybylski, D., Chevrier, N., Satija, R., Rodriguez, E.H., Fields, A.P., Schwartz, S., Raychowdhury, R., Mumbach, M.R., Eisenhaure, T., Rabani, M., Gennert, D., Lu, D., Delorey, T., Weissman, J.S., Carr, S.A., Hacohen,

- N., Regev, A., 2015. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science* 347. <https://doi.org/10.1126/science.1259038>
- Karagiannis, G.S., Poutahidis, T., Erdman, S.E., Kirsch, R., Riddell, R.H., Diamandis, E.P., 2012. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol. Cancer Res. MCR* 10, 1403–1418. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0307>
- Karki, R., Pandya, D., Elston, R.C., Ferlini, C., 2015. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med. Genomics* 8. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0115-z>
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D., Chambon, P., 1995. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491–1494. <https://doi.org/10.1126/science.270.5241.1491>
- Keklikoglou, I., Koerner, C., Schmidt, C., Zhang, J.D., Heckmann, D., Shavinskaya, A., Allgayer, H., Gückel, B., Fehm, T., Schneeweiss, A., Sahin, Ö., Wiemann, S., Tschulena, U., 2012. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene* 31, 4150–4163. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.571>
- Kerdivel, G., Boudot, A., Habauzit, D., Percevault, F., Demay, F., Pakdel, F., Flouriot, G., 2014. Activation of the MKL1/actin signaling pathway induces hormonal escape in estrogen-responsive breast cancer cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 390, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.03.009>
- Khalid, A.B., Krum, S.A., 2016. Estrogen Receptors Alpha and Beta in Bone. *Bone* 87, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.03.016>
- Kim, J.H., Cho, H.T., Kim, Y.J., 2014. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocr. J.* 61, 1055–1067.
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.-W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., Gottesman, M.M., 2007. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315, 525–528. <https://doi.org/10.1126/science.1135308>
- Kininis, M., Chen, B.S., Diehl, A.G., Isaacs, G.D., Zhang, T., Siepel, A.C., Clark, A.G., Kraus, W.L., 2007. Genomic Analyses of Transcription Factor Binding, Histone Acetylation, and Gene Expression Reveal Mechanistically Distinct Classes of Estrogen-Regulated Promoters. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5090–5104. <https://doi.org/10.1128/MCB.00083-07>
- Kirchner, S., Cai, Z., Rauscher, R., Kastelic, N., Anding, M., Czech, A., Kleizen, B., Ostedgaard, L.S., Braakman, I., Sheppard, D.N., Ignatova, Z., 2017. Alteration of protein function by a silent polymorphism linked to tRNA abundance. *PLOS Biol.* 15, e2000779. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000779>
- Klinge, C.M., 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* 29, 2905–2919. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>
- Knight, A.M., Culviner, P.H., Kurt-Yilmaz, N., Zou, T., Ozkan, S.B., Cavagnero, S., 2013. Electrostatic Effect of the Ribosomal Surface on Nascent Polypeptide Dynamics. *ACS Chem. Biol.* 8, 1195–1204. <https://doi.org/10.1021/cb400030n>
- Knowlton, A.A., Lee, A.R., 2012. Estrogen and the Cardiovascular System. *Pharmacol. Ther.* 135, 54–70. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.007>
- Kolb, V.A., Makeyev, E.V., Spirin, A.S., 2000. Co-translational folding of an eukaryotic multidomain protein in a prokaryotic translation system. *J. Biol. Chem.* 275, 16597–16601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002030200>
- Komar, A.A., 2018. Unraveling co-translational protein folding: Concepts and methods. *Methods San Diego Calif* 137, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.11.007>
- Kowarik, M., Küng, S., Martoglio, B., Helenius, A., 2002. Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 10, 769–778.

- [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00685-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00685-8)
- Kumar, R., Zakharov, M.N., Khan, S.H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S., Jasuja, R., 2011. The Dynamic Structure of the Estrogen Receptor [WWW Document]. *J. Amino Acids*. <https://doi.org/10.4061/2011/812540>
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R., Chambon, P., 1987. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941–951. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90581-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90581-2)
- Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, A.K., Uht, R.M., Webb, P., 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 311–317. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00108-4](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00108-4)
- Lagadec, C., Vlashi, E., Bhuta, S., Lai, C., Mischel, P., Werner, M., Henke, M., Pajonk, F., 2014. Tumor cells with low proteasome subunit expression predict overall survival in head and neck cancer patients. *BMC Cancer* 14, 152. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-152>
- Lamb, R., Harrison, H., Smith, D.L., Townsend, P.A., Jackson, T., Ozsvari, B., Martinez-Outschoorn, U.E., Pestell, R.G., Howell, A., Lisanti, M.P., Sotgia, F., 2015. Targeting tumor-initiating cells: Eliminating anabolic cancer stem cells with inhibitors of protein synthesis or by mimicking caloric restriction. *Oncotarget* 6, 4585–4601.
- Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lanni, F., Waggoner, A.S., Taylor, D.L., 1985. Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 100, 1091–1102. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.4.1091>
- Lassak, J., Wilson, D.N., Jung, K., 2016. Stall no more at polyproline stretches with the translation elongation factors EF-P and IF-5A. *Mol. Microbiol.* 99, 219–235. <https://doi.org/10.1111/mmi.13233>
- Lee, H.-O., Mullins, S.R., Franco-Barraza, J., Valianou, M., Cukierman, E., Cheng, J.D., 2011. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* 11, 245. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-245>
- Leopold, P.E., Montal, M., Onuchic, J.N., 1992. Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8721–8725. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8721>
- Levinthal, C., 1969. How to Fold Graciously. *Mossbauer Spectrosc. Biol. Syst. Proc.* 67, 22–26.
- Li, C.I., Uribe, D.J., Daling, J.R., 2005. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br. J. Cancer* 93, 1046–1052. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602787>
- Li, L., Haynes, M.P., Bender, J.R., 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor α variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 4807–4812. <https://doi.org/10.1073/pnas.0831079100>
- 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 Importance of eRNAs for Estrogen-dependent Transcriptional Activation Events. *Nature* 498, 516–520. <https://doi.org/10.1038/nature12210>
- Li, Z., Hu, P., Tu, J., Yu, N., 2016. Luminal B breast cancer: patterns of recurrence and clinical outcome. *Oncotarget* 7, 65024–65033. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11344>
- Liu, F., Gu, L.-N., Shan, B.-E., Geng, C.-Z., Sang, M.-X., 2016. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update. *Oncol. Lett.* 12, 4869–4876. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5369>
- Liu, T.-Y., Huang, H.H., Wheeler, D., Xu, Y., Wells, J.A., Song, Y.S., Wiita, A.P., 2017.

- Time-Resolved Proteomics Extends Ribosome Profiling-Based Measurements of Protein Synthesis Dynamics. *Cell Syst.* 4, 636-644.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.05.001>
- Lu, J., Deutsch, C., 2005. Secondary structure formation of a transmembrane segment in Kv channels. *Biochemistry* 44, 8230–8243. <https://doi.org/10.1021/bi050372q>
- Ma, Z.Q., Santagati, S., Patrone, C., Pollio, G., Vegeto, E., Maggi, A., 1994. Insulin-like growth factors activate estrogen receptor to control the growth and differentiation of the human neuroblastoma cell line SK-ER3. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 8, 910–918. <https://doi.org/10.1210/mend.8.7.7984152>
- Mackay, A., Weigelt, B., Grigoriadis, A., Kreike, B., Natrajan, R., A'Hern, R., Tan, D.S.P., Dowsett, M., Ashworth, A., Reis-Filho, J.S., 2011. Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 662–673. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr071>
- Maggi, A., 2011. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 1054–1060. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.05.001>
- Maggi, A., Ciana, P., Belcredito, S., Vegeto, E., 2004. Estrogens in the Nervous System: Mechanisms and Nonreproductive Functions. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 291–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032802.154945>
- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., Band, V., 2010. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* 10, 955–960. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>
- Martin, M.B., Franke, T.F., Stoica, G.E., Chambon, P., Katzenellenbogen, B.S., Stoica, B.A., McLemore, M.S., Olivo, S.E., Stoica, A., 2000. A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 141, 4503–4511. <https://doi.org/10.1210/endo.141.12.7836>
- Martinkovich, S., Shah, D., Planey, S.L., Arnott, J.A., 2014. Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility. *Clin. Interv. Aging* 9, 1437–1452. <https://doi.org/10.2147/CIA.S66690>
- McConkey, E.H., 1982. Molecular evolution, intracellular organization, and the quinary structure of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 3236–3240. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.10.3236>
- McDonnell, D.P., Connor, C.E., Wijayarathne, A., Chang, C.-Y., Norris, J.D., 2002. Definition of the molecular and cellular mechanisms underlying the tissue-selective agonist/antagonist activities of selective estrogen receptor modulators. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 295–316. <https://doi.org/10.1210/rp.57.1.295>
- McGuire, W.L., 1973. Estrogen Receptors in Human Breast Cancer. *J. Clin. Invest.* 52, 73–77. <https://doi.org/10.1172/JCI107175>
- Mérot, Y., Métivier, R., Penot, G., Manu, D., Saligaut, C., Gannon, F., Pakdel, F., Kah, O., Flouriot, G., 2004. The Relative Contribution Exerted by AF-1 and AF-2 Transactivation Functions in Estrogen Receptor α Transcriptional Activity Depends upon the Differentiation Stage of the Cell. *J. Biol. Chem.* 279, 26184–26191. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402148200>
- Métivier, R., Penot, G., Flouriot, G., Pakdel, F., 2001. Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 15, 1953–1970. <https://doi.org/10.1210/mend.15.11.0727>
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., Ford, H.L., 2010. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 117–134.

- <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9178-9>
- Michalides, R., Griekspoor, A., Balkenende, A., Verwoerd, D., Janssen, L., Jalink, K., Floore, A., Velds, A., van 't Veer, L., Neeffjes, J., 2004. Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor α after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell* 5, 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.05.016>
- Mill, J., Kiss, E., Baji, I., Kapornai, K., Daróczy, G., Vetró, A., Kennedy, J., Kovacs, M., Barr, C., International Consortium for Childhood-Onset Mood Disorders, 2008. Association study of the estrogen receptor alpha gene (ESR1) and childhood-onset mood disorders. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* 147B, 1323–1326. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30751>
- Milo, R., 2013. What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values. *Bioessays* 35, 1050–1055. <https://doi.org/10.1002/bies.201300066>
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., Treisman, R., 2003. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329–342. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00278-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00278-2)
- Mitarai, N., Sneppen, K., Pedersen, S., 2008. Ribosome Collisions and Translation Efficiency: Optimization by Codon Usage and mRNA Destabilization. *J. Mol. Biol.* 382, 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.068>
- Modelska, A., Turro, E., Russell, R., Beaton, J., Sbarrato, T., Spriggs, K., Miller, J., Gräf, S., Provenzano, E., Blows, F., Pharoah, P., Caldas, C., Le Quesne, J., 2015. The malignant phenotype in breast cancer is driven by eIF4A1-mediated changes in the translational landscape. *Cell Death Dis.* 6, e1603. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.542>
- Moggs, J.G., Orphanides, G., 2001. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep.* 2, 775–781. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve185>
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., Puisieux, A., 2008. Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002888>
- Mori, K., Shibnuma, M., Nose, K., 2004. Invasive Potential Induced under Long-Term Oxidative Stress in Mammary Epithelial Cells. *Cancer Res.* 64, 7464–7472. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1725>
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621–628. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1226>
- Mugnier, P., Tuite, M.F., 1999. Translation termination and its regulation in eukaryotes: recent insights provided by studies in yeast. *Biochem. Biokhimiia* 64, 1360–1366.
- Mukherjee, A., Morales-Scheihing, D., Butler, P.C., Soto, C., 2015. Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. *Trends Mol. Med.* 21, 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.04.005>
- Naba, A., Clauser, K.R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S.A., Hynes, R.O., 2012. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 11, M111.014647. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014647>
- Naba, A., Clauser, K.R., Lamar, J.M., Carr, S.A., Hynes, R.O., 2014. Extracellular matrix signatures of human mammary carcinoma identify novel metastasis promoters. *eLife* 3, e01308. <https://doi.org/10.7554/eLife.01308>
- Nadal, A., Díaz, M., Valverde, M.A., 2001. The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 16, 251–255. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.6.251>

- Nakaya, Y., Sheng, G., 2008. Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view. *Dev. Growth Differ.* 50, 755–766.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01070.x>
- Nelson, C.M., Jean, R.P., Tan, J.L., Liu, W.F., Sniadecki, N.J., Spector, A.A., Chen, C.S., 2005. Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11594–11599.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0502575102>
- Nicola, A.V., Chen, W., Helenius, A., 1999. Co-translational folding of an alphavirus capsid protein in the cytosol of living cells. *Nat. Cell Biol.* 1, 341–345.
<https://doi.org/10.1038/14032>
- O'Day, E., Lal, A., 2010. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12, 201. <https://doi.org/10.1186/bcr2484>
- Onuchic, J.N., Luthey-Schulten, Z., Wolynes, P.G., 1997. THEORY OF PROTEIN FOLDING: The Energy Landscape Perspective. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 48, 545–600. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.48.1.545>
- Paige, L.A., Christensen, D.J., Grøn, H., Norris, J.D., Gottlin, E.B., Padilla, K.M., Chang, C.Y., Ballas, L.M., Hamilton, P.T., McDonnell, D.P., Fowlkes, D.M., 1999. Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER alpha and ER beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3999–4004.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3999>
- Pavon-Eternod, M., Gomes, S., Geslain, R., Dai, Q., Rosner, M.R., Pan, T., 2009. tRNA over-expression in breast cancer and functional consequences. *Nucleic Acids Res.* 37, 7268–7280. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp787>
- Peiris-Pagès, M., Martínez-Outschoorn, U.E., Pestell, R.G., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2016. Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res. BCR* 18.
<https://doi.org/10.1186/s13058-016-0712-6>
- Penzo, M., Montanaro, L., Tréré, D., Derenzini, M., 2019. The Ribosome Biogenesis—Cancer Connection. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8010055>
- Perou, C.M., 2010. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *The Oncologist* 15, 39–48. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-S5-39>
- Philips, R.M. & R., n.d. » How many proteins are in a cell? URL <http://book.bionumbers.org/how-many-proteins-are-in-a-cell/> (accessed 11.10.20).
- Pielak, G.J., 2005. A model of intracellular organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5901–5902. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501812102>
- Polyak, K., 2011. Heterogeneity in breast cancer. *J. Clin. Invest.* 121, 3786–3788.
<https://doi.org/10.1172/JCI60534>
- Polyak, K., Weinberg, R.A., 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 9, 265–273.
<https://doi.org/10.1038/nrc2620>
- Power, R.F., Mani, S.K., Codina, J., Conneely, O.M., O'Malley, B.W., 1991. Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 254, 1636–1639. <https://doi.org/10.1126/science.1749936>
- Prat, A., Perou, C.M., 2011. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* 5, 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., Muñoz, M., 2015. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast Edinb. Scotl.* 24 Suppl 2, S26-35.
<https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.008>
- Radisky, D.C., 2005. Epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* 118, 4325–4326.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02552>
- Razandi, M., Pedram, A., Merchanthaler, I., Greene, G.L., Levin, E.R., 2004. Plasma

- membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol. Endocrinol.* Baltim. Md 18, 2854–2865. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0115>
- Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., Leach, S.D., Stanger, B.Z., 2012. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148, 349–361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.025>
- Rogatsky, I., Trowbridge, J.M., Garabedian, M.J., 1999. Potentiation of Human Estrogen Receptor α Transcriptional Activation through Phosphorylation of Serines 104 and 106 by the Cyclin A-CDK2 Complex. *J. Biol. Chem.* 274, 22296–22302. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22296>
- Royo, F., Najera, L., Lirola, J., Jiménez, J., Guzmán, M., Sabadell, M.D., Baselga, J., Ramon y Cajal, S., 2007. 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 81–89. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1560>
- Ross, C.A., Poirier, M.A., 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 10 Suppl, S10-17. <https://doi.org/10.1038/nm1066>
- rs746432 RefSNP Report - dbSNP - NCBI [WWW Document], n.d. URL https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs746432#frequency_tab (accessed 11.27.20).
- Ruff, M., Gangloff, M., Marie Wurtz, J., Moras, D., 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res. BCR* 2, 353–359. <https://doi.org/10.1186/bcr80>
- Ruggero, D., 2013. Translational Control in Cancer Etiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012336>
- Safe, S., Kim, K., 2008. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J. Mol. Endocrinol.* 41, 263–275. <https://doi.org/10.1677/JME-08-0103>
- Sanchez, C.G., Teixeira, F.K., Czech, B., Preall, J.B., Zamparini, A.L., Seifert, J.R.K., Malone, C.D., Hannon, G.J., Lehmann, R., 2016. Regulation of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis Controls Germline Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell* 18, 276–290. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.11.004>
- Sancho, P., Burgos-Ramos, E., Tavera, A., Bou Kheir, T., Jagust, P., Schoenhals, M., Barneda, D., Sellers, K., Campos-Olivas, R., Graña, O., Viera, C.R., Yuneva, M., Sainz, B., Heeschen, C., 2015. MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab.* 22, 590–605. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.015>
- Sauna, Z.E., Kimchi-Sarfaty, C., Ambudkar, S.V., Gottesman, M.M., 2007. Silent Polymorphisms Speak: How They Affect Pharmacogenomics and the Treatment of Cancer. *Cancer Res.* 67, 9609–9612. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2377>
- Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., Enmark, E., Kuiper, G., Gustafsson, J.-Å., Safe, S., 2000. Ligand-, Cell-, and Estrogen Receptor Subtype (α/β)-dependent Activation at GC-rich (Sp1) Promoter Elements. *J. Biol. Chem.* 275, 5379–5387. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5379>
- Schnitt, S.J., 2010. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 23 Suppl 2, S60-64. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.33>
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., Brown, M., 2000. Cofactor Dynamics and Sufficiency in Estrogen Receptor–Regulated Transcription. *Cell* 103, 843–852. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00188-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00188-4)
- Sheeler, C.Q., Singleton, D.W., Khan, S.A., 2003. Mutation of serines 104, 106, and 118

- inhibits dimerization of the human estrogen receptor in yeast. *Endocr. Res.* 29, 237–255.
- Signer, R.A.J., Magee, J.A., Salic, A., Morrison, S.J., 2014. Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature* 509, 49–54. <https://doi.org/10.1038/nature13035>
- Singh, R., Mo, Y.-Y., 2013. Role of microRNAs in breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* 14, 201–212. <https://doi.org/10.4161/cbt.23296>
- Škovierová, H., Okajčková, T., Strnádel, J., Vidomanová, E., Halašová, E., 2018. Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis (Review). *Int. J. Mol. Med.* 41, 1187–1200. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3320>
- Song, R.X., Barnes, C.J., Zhang, Z., Bao, Y., Kumar, R., Santen, R.J., 2004. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2076–2081. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308334100>
- Stossi, F., Madak-Erdogan, Z., Katzenellenbogen, B.S., 2009. Estrogen Receptor Alpha Represses Transcription of Early Target Genes via p300 and CtBP1. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1749–1759. <https://doi.org/10.1128/MCB.01476-08>
- Sulima, S.O., Kampen, K.R., De Keersmaecker, K., 2019. Cancer Biogenesis in Ribosomopathies. *Cells* 8, 229. <https://doi.org/10.3390/cells8030229>
- Sundermann, E.E., Maki, P.M., Bishop, J.R., 2010. A Review of Estrogen Receptor α Gene (ESR1) Polymorphisms, Mood, and Cognition. *Menopause N. Y. N* 17, 874–886. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e3181df4a19>
- Sweeney, P., Park, H., Baumann, M., Dunlop, J., Frydman, J., Kopito, R., McCampbell, A., Leblanc, G., Venkateswaran, A., Nurmi, A., Hodgson, R., 2017. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Transl. Neurodegener.* 6, 6. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0077-5>
- Tamrazi, A., Carlson, K.E., Katzenellenbogen, J.A., 2003. Molecular Sensors of Estrogen Receptor Conformations and Dynamics. *Mol. Endocrinol.* 17, 2593–2602. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0239>
- Tecalco-Cruz, A.C., Pérez-Alvarado, I.A., Ramírez-Jarquín, J.O., Rocha-Zavaleta, L., 2017. Nucleo-cytoplasmic transport of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cell. Signal.* 34, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.03.011>
- Topisirovic, I., Sonenberg, N., 2011. mRNA translation and energy metabolism in cancer: the role of the MAPK and mTORC1 pathways. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76, 355–367. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010785>
- Tuasha, N., Petros, B., 2020. Heterogeneity of Tumors in Breast Cancer: Implications and Prospects for Prognosis and Therapeutics [WWW Document]. *Scientifica*. <https://doi.org/10.1155/2020/4736091>
- Turashvili, G., Brogi, E., 2017. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front. Med.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00227>
- Tutar, Y., Özgür, A., Tutar, L., 2013. Role of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases. *Neurodegener. Dis.* <https://doi.org/10.5772/54487>
- Vaklavas, C., Blume, S.W., Grizzle, W.E., 2017. Translational Dysregulation in Cancer: Molecular Insights and Potential Clinical Applications in Biomarker Development. *Front. Oncol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00158>
- Varlakhanova, N., Snyder, C., Jose, S., Hahm, J.B., Privalsky, M.L., 2010. Estrogen Receptors Recruit SMRT and N-CoR Corepressors through Newly Recognized Contacts between the Corepressor N Terminus and the Receptor DNA Binding Domain. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1434–1445. <https://doi.org/10.1128/MCB.01002-09>
- Vartiainen, M.K., Guettler, S., Larijani, B., Treisman, R., 2007. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 316,

- 1749–1752. <https://doi.org/10.1126/science.1141084>
- Venet, D., Dumont, J.E., Detours, V., 2011. Most Random Gene Expression Signatures Are Significantly Associated with Breast Cancer Outcome. *PLOS Comput. Biol.* 7, e1002240. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002240>
- Vlashi, E., Kim, K., Lagadec, C., Donna, L.D., McDonald, J.T., Eghbali, M., Sayre, J.W., Stefani, E., McBride, W., Pajonk, F., 2009. In Vivo Imaging, Tracking, and Targeting of Cancer Stem Cells. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 101, 350–359. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn509>
- Voutsadakis, I.A., 2016. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of EMT Factors by Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation. *J. Clin. Med.* 5. <https://doi.org/10.3390/jcm5010011>
- Wahl, G.M., Spike, B.T., 2017. Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intra-tumoral heterogeneity. *NPJ Breast Cancer* 3. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0012-z>
- Wang, C., Fu, M., Pestell, R.G., 2005. Estrogen receptor acetylation and phosphorylation in hormone responses. *Breast Cancer Online* 8. <https://doi.org/10.1017/S1470903105003196>
- Wang, C., Han, B., Zhou, R., Zhuang, X., 2016. Real-Time Imaging of Translation on Single mRNA Transcripts in Live Cells. *Cell* 165, 990–1001. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.040>
- Wang, J., Higuchi, R., Modugno, F., Li, J., Umblas, N., Lee, J., Lui, L.-Y., Ziv, E., Tice, J.A., Cummings, S.R., Rhees, B., 2007. Estrogen receptor alpha haplotypes and breast cancer risk in older Caucasian women. *Breast Cancer Res. Treat.* 106, 273–280. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9497-8>
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., Deuel, T.F., 2006. A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: Transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9063–9068. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603339103>
- Warner, M., Gustafsson, J.-Å., 2006. Nongenomic effects of estrogen: Why all the uncertainty? *Steroids* 71, 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.09.001>
- Welboren, W.-J., Sweep, F.C.G.J., Span, P.N., Stunnenberg, H.G., 2009. Genomic actions of estrogen receptor α : what are the targets and how are they regulated? *Endocr. Relat. Cancer* 16, 1073–1089. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0086>
- Wharton, W., Gleason, C.E., Olson, S.R.M.S., Carlsson, C.M., Asthana, S., 2012. Neurobiological Underpinnings of the Estrogen – Mood Relationship. *Curr. Psychiatry Rev.* 8, 247–256. <https://doi.org/10.2174/157340012800792957>
- What Is Cancer? - National Cancer Institute [WWW Document], 2007. URL <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (accessed 8.27.20).
- What Is Your Conceptual Definition of “Cell Type” in the Context of a Mature Organism?, 2017. . *Cell Syst.* 4, 255–259. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.03.006>
- White, F.H., 1961. Regeneration of native secondary and tertiary structures by air oxidation of reduced ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 236, 1353–1360.
- Williams, C.C., Basu, A., El-Gharbawy, A., Carrier, L.M., Smith, C.L., Rowan, B.G., 2009. Identification of four novel phosphorylation sites in estrogen receptor alpha: impact on receptor-dependent gene expression and phosphorylation by protein kinase CK2. *BMC Biochem.* 10, 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-10-36>
- Woolhead, C.A., McCormick, P.J., Johnson, A.E., 2004. Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. *Cell* 116, 725–736. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00169-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00169-2)

- Wruck, F., Katranidis, A., Nierhaus, K.H., Büldt, G., Hegner, M., 2017. Translation and folding of single proteins in real time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E4399–E4407. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617873114>
- Wu, J.I., Crabtree, G.R., Crabtree, G.R., 2007. Cell signaling. Nuclear actin as choreographer of cell morphology and transcription. *Science* 316, 1710–1711. <https://doi.org/10.1126/science.1145014>
- Wyckoff, M.H., Chambliss, K.L., Mineo, C., Yuhanna, I.S., Mendelsohn, M.E., Mumby, S.M., Shaul, P.W., 2001. Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J. Biol. Chem.* 276, 27071–27076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100312200>
- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S.D., Güpür, G., Muyan, M., 2016. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reprod. Med. Biol.* 16, 4–20. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>
- Zhang, Y., Ma, C., Yuan, Y., Zhu, J., Li, N., Chen, C., Wu, S., Yu, L., Lei, J., Gao, N., 2014. Structural basis for interaction of a cotranslational chaperone with the eukaryotic ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 1042–1046. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2908>
- Zhang, Z., Ye, Y., Gong, J., Ruan, H., Liu, C.-J., Xiang, Y., Cai, C., Guo, A.-Y., Ling, J., Diao, L., Weinstein, J.N., Han, L., 2018. Global analysis of tRNA and translation factor expression reveals a dynamic landscape of translational regulation in human cancers. *Commun. Biol.* 1. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0239-8>
- Zheng, B., Han, M., Bernier, M., Wen, J., 2009. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J.* 276, 2669–2685. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06986.x>
- Zimmerman, S.B., Trach, S.O., 1991. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 222, 599–620. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90499-v](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90499-v)
- Zwart, W., Leeuw, R. de, Rondaij, M., Neefjes, J., Mancini, M.A., Michalides, R., 2010. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J. Cell Sci.* 123, 1253–1261. <https://doi.org/10.1242/jcs.061135>