



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (PEDECIBA-Biología)

Resistencia a la terapia hormonal en el cáncer de mama:

Comprendiendo la relación entre el contexto celular y la conformación del receptor de estrógeno durante la transición epitelio-mesenquimal de cáncer mamario

Lic. MARCOS DAVYT BORTHAGARAY

Orientadora

Dra. MÓNICA MARÍN

Co-Orientador

Dr. RICARDO EHRLICH

Tribunal

Presidente – Dr. ALFONSO CAYOTA

Vocales – Dr. URIEL KOZIOL y Dr. PABLO SMIRCICH

Montevideo, Uruguay

2021

RESUMEN

Alrededor del 80% de los tumores mamarios expresan el receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$), el cual juega un rol relevante relacionado al tratamiento del cáncer de mama de respuesta hormonal. Los tumores $ER\alpha$ positivos en general responden bien a las terapias hormonales y tienen un mejor pronóstico. Sin embargo, durante la progresión tumoral, con frecuencia, los tumores $ER\alpha$ positivos dejan de responder al tratamiento y su fenotipo epitelial bien diferenciado se vuelve de tipo mesenquimal. Estos cambios celulares ocurren a través un proceso conocido como transición epitelio-mesenquimal (TEM), mediante el cual las células epiteliales adquieren características de células mesenquimales. Durante la progresión del cáncer mamario, la TEM puede estar involucrada en la pérdida de respuesta a la terapia hormonal, así como a la diseminación de células cancerosas y formación de metástasis. En este trabajo nos centramos en un aspecto poco explorado, buscando comprender los cambios que se producen en el aparato traduccional durante esta transición y sus implicancias en la cinética de traducción y biosíntesis de proteínas. Tanto la maquinaria de traducción como los mecanismos de síntesis de proteínas, han sido considerados como parte de un aparato muy conservado e invariable. Sin embargo, recientemente se ha reportado que sus componentes pueden variar de acuerdo a los distintos contextos celulares.

En este trabajo, nos propusimos estudiar el cambio en la conformación del $ER\alpha$ vinculado al cambio en el contexto celular. Para ello, utilizamos un modelo celular de TEM en el cual estudiamos los cambios conformacionales del $ER\alpha$ mediante ensayos de proteólisis limitada. Caracterizamos el estado de la población de ARNt por ensayos de microarreglos de forma comparativa entre las líneas celulares del modelo. Por último, complementamos un detallado estudio del estado metabólico de estas células realizado por RNA-Seq y Ribosome Profiling con ensayos de metabolómica.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	5
1.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA	5
1.2. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS	11
1.3. TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL (TEM)	22
1.4. EFECTOS LA CINÉTICA DE TRADUCCIÓN Y EL CONTEXTO CELULAR SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....	31
1.5. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	43
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
2.1. HIPÓTESIS.....	45
2.2. OBJETIVOS	45
3. MATERIALES	47
3.1. LÍNEAS CELULARES	47
3.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA LAS LÍNEAS CELULARES	49
3.3. ANTICUERPOS.....	50
3.4. MATERIALES PARA LOS MICROARREGLOS DE ARNT	50
4. MÉTODOS.....	54
4.1. PROTEÓLISIS LIMITADA EN CÉLULAS PERMEABILIZADAS	54
4.2. DOSIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	57
4.3. ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO POR DENSITOMETRÍA	58
4.4. MICROARREGLOS DE ARNT.....	58
4.5. METABOLÓMICA	63
5. RESULTADOS	67
5.1. ANÁLISIS DE LA CONFORMACIÓN DEL ERA SINTETIZADO EN DISTINTOS CONTEXTOS CELULARES MEDIANTE PROTEÓLISIS LIMITADA.....	67
5.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES DE ARNT POR MICROARREGLOS	75



5.3. ESTUDIO DEL METABOLISMO CELULAR POR METABOLÓMICA DE FORMA COMPARATIVA ENTRE LAS LÍNEAS CELULARES	87
6. DISCUSIÓN.....	98
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	114
8. REFERENCIAS	117
9. ANEXO.....	136
9.1. PROTEÓLISIS LIMITADA EN LAS LÍNEAS CELULARES SIN INDUCIR	136
9.2. COEFICIENTES DE VARIACIÓN ENTRE RÉPLICAS DEL ENSAYO DE MICROARREGLOS	137
9.3. EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS DE MODIFICACIÓN DE LOS ARNT.....	140
9.4. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO CELULAR Y DEL TAMAÑO DE LOS NUCLEOLOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	141
9.5. SOLUCIONES.....	143

PALABRAS CLAVE – *Receptor de estrógenos alfa (humano) –
Cáncer de mama - Transición epitelio-mesenquimal –
Cinética de traducción – Plegamiento proteico –
Maquinaria de traducción – Metabolismo celular*

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El presente trabajo de tesis de maestría formó parte de una línea de investigación centrada en el estudio de la cinética de traducción y el plegamiento de proteínas, la cual, sobre los últimos años, incluyó un enfoque biomédico, orientado a responder alguna de las incertidumbres relacionadas a la resistencia de la terapia hormonal en el cáncer de mama. De esta forma, en la introducción trataremos algunos conceptos acerca del cáncer de mama y su tratamiento; mencionaremos al receptor de estrógenos α (ER α) como blanco principal de las terapias, describiendo sus propiedades fisicoquímicas y estructurales; en tercer lugar revisaremos las características principales del proceso de transición epitelio-mesenquimal; y, por último, hablaremos acerca de la cinética de traducción de proteínas, dónde abordaremos el rol de la maquinaria de traducción y el estado metabólico de las células.

1.1. Generalidades del cáncer de mama

A nivel mundial, el cáncer mamario es una causa de enorme sufrimiento humano, siendo el cáncer más frecuente en las mujeres y junto con el cáncer de pulmón, son los que presentan mayor mortalidad también en las mujeres (Siegel et al., 2020). Si bien los números han mejorado en los últimos tiempos en cuanto a la mortalidad, gracias a los avances en las estrategias de detección, diagnóstico y tratamiento, el mal pronóstico de pacientes con cáncer en estados avanzados y la resistencia a los tratamientos desarrollada por algunos tumores, se presentan como los grandes desafíos para contener la enfermedad en la actualidad.

1.1.1. Clasificación de los tumores de mama

Para proporcionar un diagnóstico preciso y facilitar las decisiones a la hora de optar por diferentes opciones terapéuticas, se han desarrollado sistemas de clasificación basados en distintos aspectos de los tumores (Figura 1).

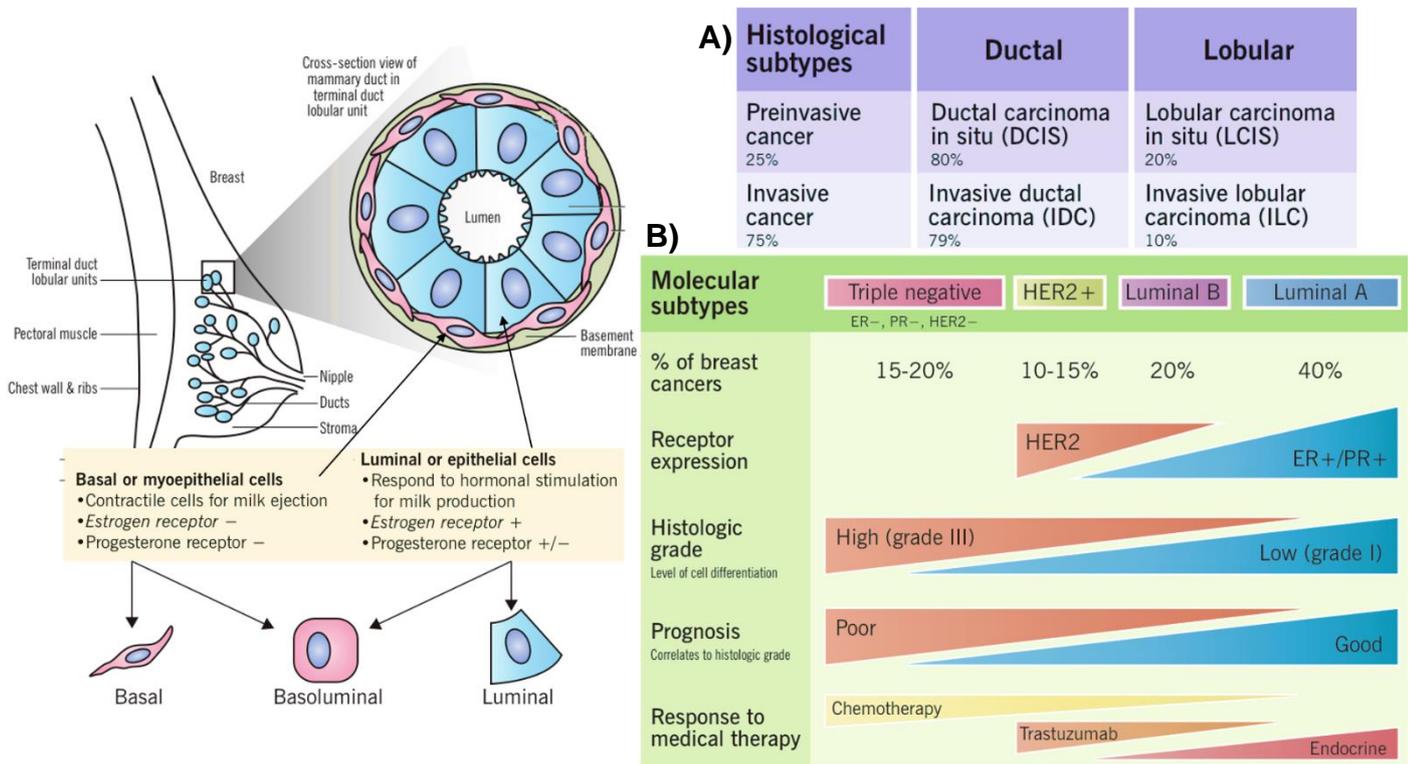


Figura 1. Clasificación de los tumores mamarios

Se describen los principales subtipos dentro de cada uno de los dos grandes sistemas de clasificación de tumores mamarios (A: clasificación histopatológica, B: Clasificación molecular), con sus porcentajes de incidencia respectivos. También se describen algunas características de cada subtipo. Modificado de *Eric Wong and Jenna Rebelo*.

a. Clasificación por histopatología

Bajo este sistema los tumores mamarios se pueden clasificar, a grandes rasgos, en carcinomas *in situ* (no invasivos o preinvasivos) y carcinomas invasivos. El carcinoma *in situ* se subclasifica además en ductal (DCIS) o lobular (LCIS), siendo el DCIS considerablemente más común que su contraparte y abarca un grupo heterogéneo de tumores que se subclasifican en varios subtipos. 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 (Malhotra et al., 2010).

b. Inmunofenotipificación

Los tumores son rutinariamente evaluados mediante inmunohistoquímica para determinar la presencia de distintos marcadores. Los tumores pueden ser clasificados según la presencia de los receptores de estrógenos (como ER α + o ER α -) y de progesterona (como PR+ o PR-). Los tumores que presentan estos receptores tienen mejor pronóstico ya que tienen la capacidad de responder a terapias hormonales. Aproximadamente un 70% de los tumores de mama son positivos para los dos o al menos uno de los receptores (Tsang and Tse, 2020). Los tumores de mama también son clasificados según la presencia o ausencia del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). Los tumores HER2+ sintetizan un exceso de este receptor debido a una amplificación del gen. Como consecuencia, las células tumorales crecen y se dividen de manera exacerbada por lo que los tumores son considerados más agresivos que los PR+ y/o ER α +. Aproximadamente el 15% de los tumores de mama son HER2+ (Tsang and Tse, 2020). El restante 15% de los tumores de mama no expresa ninguno de estos receptores. Este tipo de tumores se denominan triple negativo (TNBC, por sus siglas en inglés) y son los que presentan el peor pronóstico.

c. Clasificación en base al perfil molecular

A comienzos del siglo XXI, haciendo uso de novedosas técnicas genómicas se confirmó que existía una asociación entre la evolución del cáncer de mama y el perfil de expresión genética del tumor (Perou et al., 2000; van 't Veer et al., 2002). A raíz de ello, se estableció una nueva clasificación molecular. Para llevar a cabo este procedimiento existen distintas pruebas genómicas, como Oncotype DX, Recurrence Score, MammaPrint, Endopredict y Prosigna, que analizan la expresión de distintos grupos de

genes (Gao and Swain, 2018). En base a la expresión génica evaluada a través de estas plataformas, los tumores se pueden clasificar en los siguientes subtipos moleculares:

Luminal A: Suelen ser de grado histológico bajo y su pronóstico es el más favorable de todos, con una supervivencia a los 5 años mayor del 80%. 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 (Tsang and Tse, 2020). Representan entre el 40 y 50% de los cánceres de mama (Trop et al., 2014).

Luminal B: Su incidencia media es del 15 a 20% (Trop et al., 2014). Presentan tasas de supervivencia a los 5 años del 40%. Muestran una menor expresión de ER, pero mayor expresión de genes relacionados con la proliferación y una expresión variable de HER2 en comparación al subtipo luminal A. Pueden responder a la quimioterapia, a la terapia hormonal y al tratamiento dirigido a HER2. Sin embargo, tienen mayores porcentajes de recurrencia que el luminal A (Tsang and Tse, 2020).

HER2 positivos: Suponen entre el 15 y el 30% del total y corresponde a tumores de grado histológico intermedio o alto, con tendencia a la multifocalidad. Su supervivencia a los 5 años era del 30% antes de la introducción del trastuzumab (Elias et al., 2014). Incluye tumores que son ER negativos y PR negativos, pero HER2 positivos. Probablemente responden a la quimioterapia y al tratamiento dirigido contra HER2.

Basales (BLBC por sus siglas en inglés): Representan del 10% al 20% de todos los tumores, dependiendo de la población. Están asociados con la expresión de genes en células mamarias normales del tipo



basal/mioepitelial. También muestran sobreexpresión de genes relacionados con la proliferación, pero carecen de los receptores ER, PR y HER2, por eso se los define comúnmente como triple negativos. Histológicamente, los BLBC suelen ser de alto grado, con alto índice de proliferación siendo los de peor pronóstico. Estos tumores no responden bien a las terapias convencionales (Perou et al., 2000).

1.1.2. Resistencia a la terapia hormonal

Como se menciona anteriormente, hace ya algunos años que la mortalidad por cáncer de mama se ha mantenido proporcionalmente a la baja respecto a su incidencia, gracias al diagnóstico temprano y a los avances en las terapias. Cabe mencionar nuevamente que casi el 80% de los tumores mamarios son clasificados como ER+ (DeSantis et al., 2019). Debido a la fuerte dependencia de las células mamarias en los efectos de los estrógenos, la supresión de estas hormonas y el uso de antagonistas del ER α , han sido y siguen siendo, uno de los principales tratamientos para los tumores mamarios ER+ (Hanker et al., 2020) (Figura 2). De esta forma, las terapias endocrinas como los moduladores selectivos de los ER (SERM), los desreguladores selectivos de los ER (SERD) y los inhibidores de la aromatasa (AIs), fueron aprobados como tratamientos adyuvantes para pacientes con cáncer de mama ER+ (Aggelis and Johnston, 2019). En ensayos clínicos mostraron que las terapias endocrinas reducen considerablemente la recurrencia y la mortalidad del cáncer de mama (Lin and Winer, 2008), resaltando eficacia de estos agentes en estadios tempranos de esta enfermedad. Sin embargo, el 20% de los pacientes diagnosticados con tumores ER+ operables recurren con una metástasis (Pan et al., 2017). La pérdida de la expresión de ER α ocurre en una minoría (10%) de los cánceres de mama resistentes (Shiino et al., 2016). En cambio, la resistencia endocrina suele estar impulsada por la activación del ER α independiente del ligando (Miller et al., 2011) causada por mutaciones en el gen que codifica para el ER α , relacionadas a posibles variantes



conformacionales que llevan a interacciones alteradas del ER α con coactivadores/correpresores o a su degradación (Lin et al., 2020; Ma et al., 2015). En un estudio realizado recientemente se clasificó los tumores resistentes a la terapia hormonal en cuatro grupos de acuerdo a las alteraciones en el genoma. El 18% de los tumores presentaba alteraciones en el gen del ER α (ESR1), un 13% albergan lesiones en el gen que codifica para la quinasa MAPK, otro 9% de los tumores presenta mutaciones en distintos factores de transcripción, y el 60% restante de los casos aún no presenta mecanismos claros (Zhang et al., 2020). Esto deja la puerta abierta para estudiar otros mecanismos de resistencia a la terapia hormonal, relacionados con posibles cambios en la conformación del ER α .

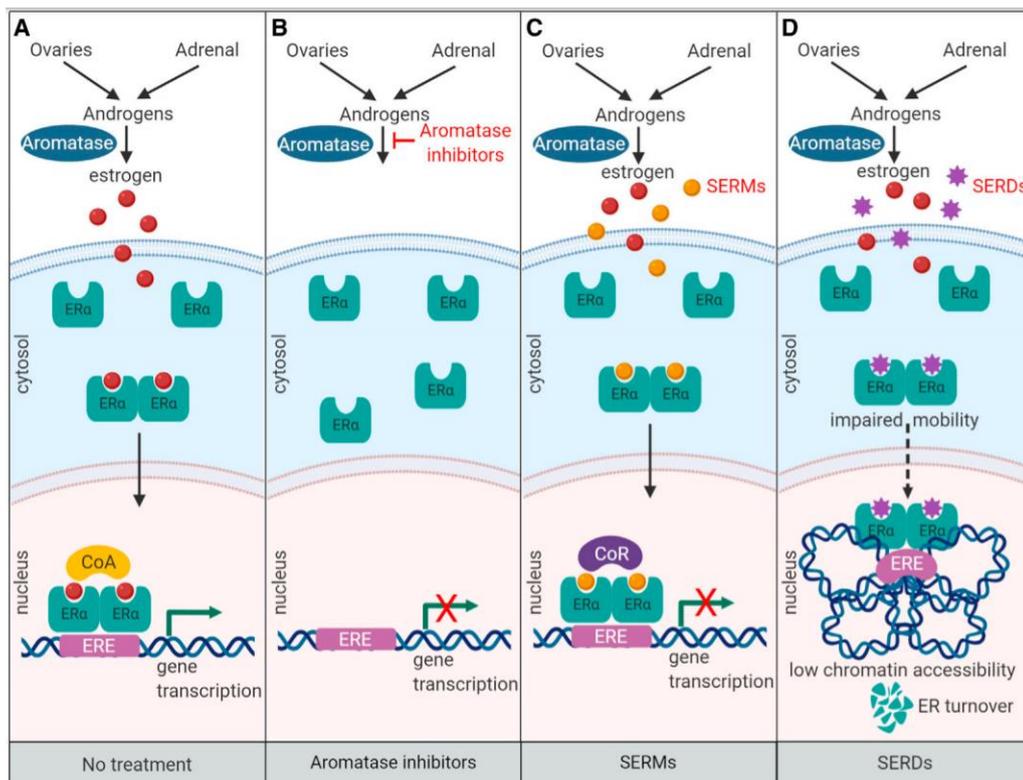


Figura 2. Mecanismos de acción de las terapias endócrinas contra el cáncer de mama

Se esquematizan los principales mecanismos de acción de las terapias endócrinas contra el cáncer de mama. ER α : Receptor de estrógenos α ; CoA: Coactivador; ERE: Elemento de respuesta a estrógenos; SERM: moduladores selectivos del ER α ; SERD: desreguladores selectivos del ER α . Adaptado de *Hanker et al., 2020*.

1.2. Receptores de estrógenos

Los receptores de estrógenos (ER) son factores de transcripción que median los efectos de estas hormonas, regulando la expresión de un gran número de genes en distintos tejidos. Aunque los estrógenos son históricamente vistos como hormonas exclusivamente reproductivas en los mamíferos, estas hormonas también inducen cambios celulares importantes en casi todos los tejidos (Liang and Shang, 2013). La comunicación mediada por la interacción entre los estrógenos y sus receptores, en particular por el estradiol (E2), resulta esencial para diversas funciones fisiológicas, jugando un rol principal en el desarrollo y función de la glándula mamaria (Koos, 2011). A su vez, debido al papel central de los estrógenos en la fisiología, no es sorprendente que estas hormonas estén implicadas en el desarrollo o progresión de enfermedades como el cáncer (de mama, endometrio y ovarios), la endometriosis, la osteoporosis, la obesidad, así como enfermedades cardiovasculares, autoinmunes y neurodegenerativas (Deroo and Korach, 2006).

No fue hasta 1958 gracias al trabajo de Elwood Jensen que se encontró la existencia de proteínas capaces de unir estrógenos. El mismo E. Jensen, demostró posteriormente que estas proteínas podían migrar al núcleo y estimular la transcripción génica (Jensen et al., 1968, 1967). Más de 20 años después, en 1986, se logró clonar el ER α a partir de células MCF-7 (Greene et al., 1986). En la actualidad, el ER α es de especial interés como marcador pronóstico del cáncer de mama debido a que se encuentran en altos niveles en la gran mayoría de estos tumores, siendo el blanco principal de varios tratamientos. Casi 30 años después, el grupo liderado por Jan-Ake Gustafsson descubrió un segundo subtipo de receptor de estrógenos que presentaba una alta homología con el primero por lo que lo denominaron como ER β . Este receptor posee una estructura similar pero no idéntica al ER α , y su papel en el cáncer de mama, es aún poco comprendido (Jia et al., 2015). Más recientemente, se descubrió un tercer



subtipo de receptores que se unen a los estrógenos, las “proteínas G acopladas a receptores de estrógenos” o GPER por sus siglas en inglés (también llamado GPER1). Estos receptores se encuentran unidos a la membrana plasmática y median una respuesta rápida a los estrógenos a través de cascadas de fosforilación. En términos de estructura, este subtipo de receptores no comparte similitudes con los dos anteriores, y presenta baja afinidad por el estradiol, lo cual se ve compensado por la amplificación de señal generada por los segundos mensajeros.

1.2.1. Estructura e isoformas del ER α

El ER α humano está codificado por el gen ESR1 (Gene ID: 2099) ubicado en el brazo largo del cromosoma 6 (Gosden et al., 1986). El ARNm presenta 8 exones codificantes, y es traducido en una proteína de 595 aminoácidos (66 kDa), pudiendo presentar a su vez varias isoformas.

En 1986, Krust y colaboradores propusieron, mediante alineamientos de secuencias aminoacídicas de los receptores nucleares (NR, por sus siglas en inglés), que los miembros de esta familia de factores de transcripción compartían una organización modular conformada por varios dominios conservados (Krust et al., 1986; Weikum et al., 2018).

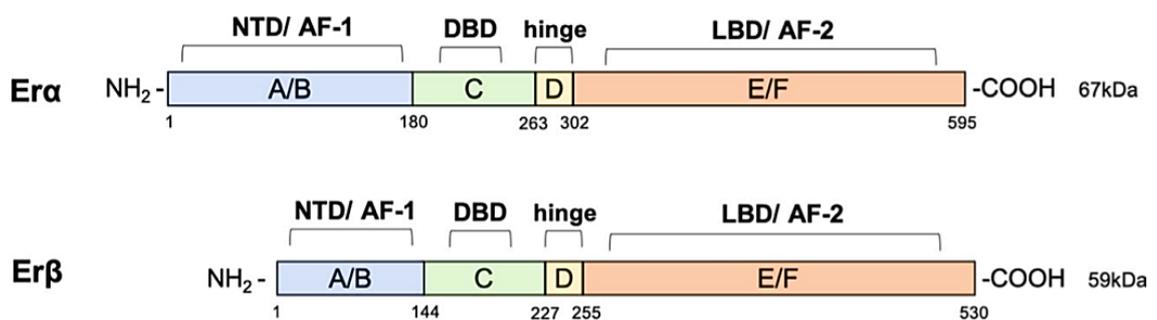


Figura 3. Dominios funcionales del ER α y ER β

Esquema de los dominios estructurales de los receptores de estrógeno. Ambos receptores tienen seis dominios. Un dominio N-terminal (NTD, A/B) no estructurado que contiene la región con actividad de transactivación (AF-1), un dominio de unión al ADN (DBD), una región bisagra flexible y un dominio de unión a ligandos (LBD) que interactúa con correguladores a través de la región de transactivación AF-2. Tomado de *Fuentes and Silveyra, 2019*.

El dominio N-terminal, denominado también como A/B, es altamente variable tanto en la secuencia primaria como en su longitud entre los distintos NR. En el ER α , el dominio B presenta una región con función de transactivación denominada AF-1. Esta función se caracteriza por ser independiente del ligando (Lees et al., 1989). Mediante esta región de transactivación, estos receptores interactúan con una variedad de proteínas correguladoras, las cuales pueden ser específicas de cada tejido y para cada promotor (Kumar and Thompson, 2003). Además, estos dominios también presentan un papel importante en la estabilización del receptor cuando se une al ADN y en la eficiencia de dimerización; y cuenta con numerosos sitios blanco de modificaciones postraduccionales (Anbalagan et al., 2012).

En la región central de la estructura primaria se encuentran los dominios C y D. El dominio C es el más conservado entre los NR y constituye el dominio de unión al ADN (DBD, por sus siglas en inglés) (Ruff et al., 2000). La estructura cristalográfica de este dominio demostró que presenta una estructura globular compacta formada por dos dedos de zinc, cada uno formado por cuatro residuos de cisteína que se encuentran coordinando un ion de zinc. En el caso del ER α , estos dominios se unen principalmente a secuencias en el ADN denominadas “elementos de respuesta a estrógenos” (ERE) que consisten en secuencias consenso de 13 pb de la siguiente forma: 5'-GGTCAnnnTGACC-3'. Este motivo palindrómico permite la unión del receptor en forma dimérica al ADN (Klinge, 2001). El dominio D por su parte, consiste en una región “bisagra” entre los dominios C y E y se trata de un dominio poco conservado en cuanto a tamaño y secuencia entre los NR. Está involucrado en los cambios conformacionales del ER α cuando éste se une al ADN o a su ligando y en las interacciones proteína-proteína cuando forma homo o heterodímeros. A su vez, contiene señales de localización nuclear (NLS), importantes para la translocación del receptor del citoplasma al núcleo (Zwart et al., 2010). El dominio D también es importante en la interacción del receptor con otros factores de

transcripción y está sujeto a diversas modificaciones postraduccionales que modulan la actividad del receptor, incluyendo fosforilación, acetilación y metilación (Anbalagan et al., 2012).

La región correspondiente al extremo C-terminal (dominio E/F) es una región relativamente extensa de los NR, donde se ubica el dominio de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés). Esta región está muy conservada entre los receptores de un mismo ligando, pero varía notoriamente entre los distintos tipos NR. A su vez, dentro de este dominio se presenta una región que permite la dimerización del receptor y otro sitio de transactivación denominado AF-2, que, a diferencia del primero, es dependiente de la unión del ligando. Estudios cristalográficos mostraron que el dominio E del ER α presenta 12 α -hélices (H1 a H12) y dos láminas β formando un bolsillo hidrofóbico donde se acomoda el ligando (Nettles et al., 2007) (Figura 4).

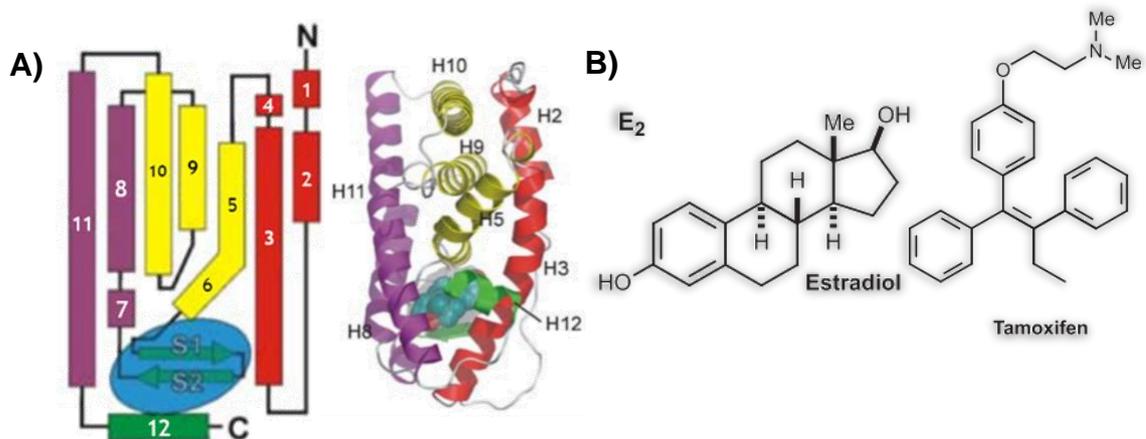


Figura 4. Dominio de unión al ligando y estructura química del E2 y del Tamoxifeno

A) Esquema y representación tridimensional del dominio de unión al ligando donde se numeran las 12 hélices alfa y el bolsillo hidrofóbico donde se acomoda el ligando en azul. Modificado de *Pike, 2006*. **B)** Estructura química del ligando natural del receptor, el 17- β -estradiol (E2) y la estructura del Tamoxifeno, uno de los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs) más conocidos. Modificado de *Arnal et al., 2017*.

La organización tridimensional de este dominio sufre un fuerte reordenamiento luego de la unión del ligando, que modula la actividad del ER α a través de la formación de una superficie de unión a distintos cofactores. Recientemente se demostró que este reordenamiento también lleva a una interacción entre el DBD y el LBD (Huang et al., 2018). La estructura tridimensional resultante del reordenamiento se vincula con los efectos agonistas o antagonistas de cada ligando, los cuales generan una exposición diferente de la superficie de unión a coactivadores y correpresores (Ruff et al., 2000).

Además de la isoforma más predominante del ER α de 66 kDa, existen algunas variantes del receptor que se expresan en forma tipo celular específica como producto del splicing alternativo o del uso de sitios de inicio de la traducción alternativos (Figura 5). Algunas de las isoformas cortas del receptor carecen del dominio de activación AF-1, las cuales se pueden unir al receptor completo formando heterodímeros, inhabilitándolo para actuar como factor de transcripción.

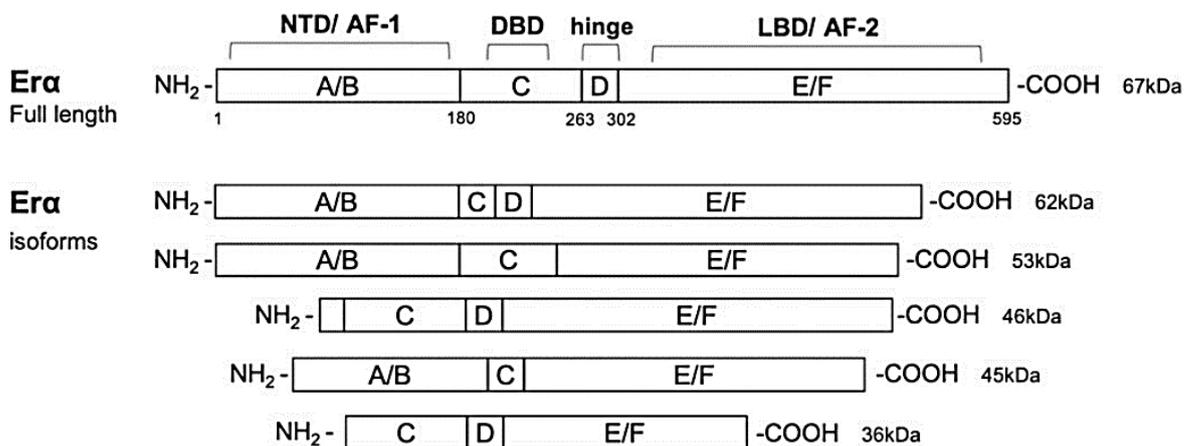


Figura 5. Isoformas del ER α

Se ilustran las isoformas más conocidas del ER α (66 kDa, 62 kDa, 53 kDa, 46 kDa, 45 kDa y 36 kDa) que resultan de un splicing alternativo y/o sitios de inicio de traducción alternativos. Tomado de *Fuentes and Silveyra, 2019*

1.2.2. Mecanismos de acción del ER α

La regulación mediada por el ER α abarca desde la inducción o represión de la transcripción de un gran número de genes hasta cambios en la señalización de cascadas de quinasas. Esta es establecida a través de dos grandes mecanismos, conocidos como mecanismos genómicos y no genómicos (Figura 6).

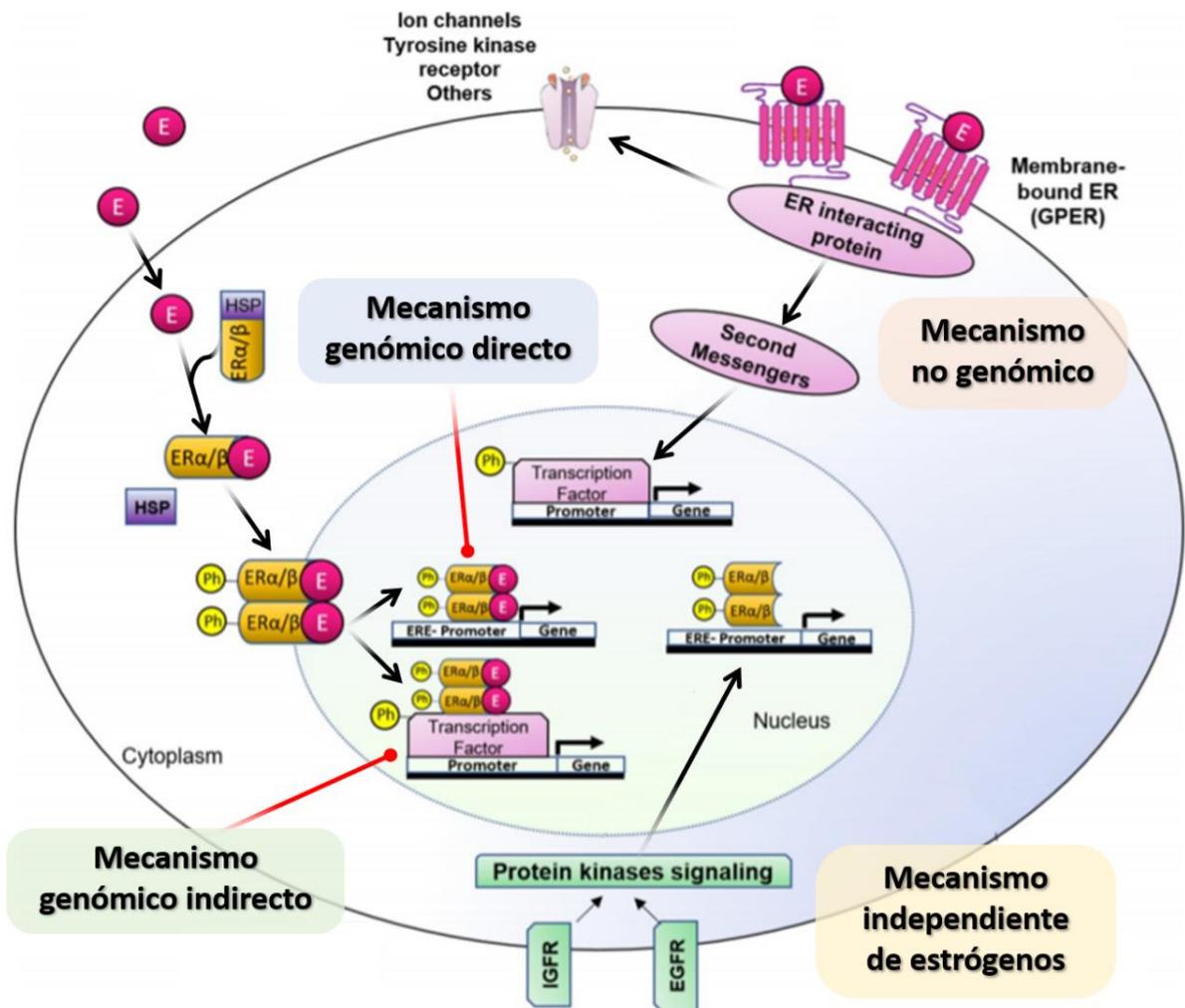


Figura 6. Mecanismos y vías de acción del ER α

El ER α puede actuar a través de varios mecanismos. En las vías genómicas, una vez que el ER α se une a su ligando (ej. Estradiol, E) es capaz de translocarse al núcleo e inducir la expresión de genes blanco uniéndose directamente al ADN en los motivos ERE (vía clásica) o indirectamente al unirse a otros factores de transcripción (vía no clásica o indirecta). El ER α también es capaz de inducir la expresión de genes blanco en forma independiente de ligando. Por otra parte, los ER pueden participar en la activación de cascadas de quinasas, en lo que se llama vía no genómica o vía rápida de acción del ER. Adaptado de *Fuentes and Silveyra, 2019*.

Por un lado, los mecanismos genómicos son aquellos que involucran la migración del complejo formado por el ligando y el receptor al núcleo celular, y su interacción de forma directa o indirecta con el ADN regulando la expresión génica (Arnal et al., 2017; Fernández-Calero et al., 2016). Existe una extensa bibliografía acerca de las distintas vías reguladas por el ER α a través de este mecanismo, algunas de las cuales mencionaremos más adelante. Por otro lado, más recientemente, ha surgido un interés creciente por los mecanismos no genómicos. Estos mecanismos son mediados principalmente por GPER, por el cual se regula la actividad de ciertas quinasas, aunque recientemente se ha demostrado que algunas formas del ER α también podrían estar implicadas en estos mecanismos, siendo tema de extenso debate en la actualidad (Fuentes and Silveyra, 2019). La existencia de respuestas celulares rápidas inducidas por estrógenos llevó a algunos investigadores a plantearse la hipótesis de que los estrógenos podrían estar actuando por mecanismos que no implicaran la transcripción de un gen y su posterior traducción, derivando en el descubrimiento del GPER (Prossnitz and Barton, 2011). Las vías que se engloban bajo esta forma de acción de los ER implican generalmente la producción de segundos mensajeros intracelulares, como cAMP o la fosforilación de algunas proteínas desencadenando cascadas de señalización que resultan en cambios en la expresión genética (Lösel and Wehling, 2003).

En cuanto a los mecanismos genómicos, se han descrito dos grandes vías por las cuales los ER ejercen su acción, la vía “clásica”, mediante la cual el receptor se une directamente al ADN en los EREs y la vía “no clásica o indirecta”, mediante la cual el receptor se une indirectamente al ADN a través de otros factores de transcripción ejerciendo la regulación de forma independiente de los EREs (Marino et al., 2006). En ausencia del ligando, el ER α habitualmente se encuentra soluble en el citoplasma unido a la chaperona Hsp90. La unión del ligando induce un cambio conformacional en el ER α que lleva a la disociación de Hsp90, exponiendo los principales

sitios de dimerización y transactivación presentes en el dominio E del ER α . Habitualmente es importante también la fosforilación del dominio D y/o E del receptor para la activación del mismo. A través de la vía clásica, el ER α activado forma homo o heterodímeros (con el ER β u otras isoformas del ER α) y regula la transcripción mediante su unión cooperativa a los EREs en el ADN (Arnal et al., 2017) y el reclutamiento de otros factores de transcripción (Figura 6). Hasta hace no mucho tiempo se creía que estos elementos de respuesta a estrógenos se encontraban principalmente en los promotores proximales de los genes diana o en sus cercanías. Estudios recientes demostraron que más del 90% de los sitios de unión del ER α son secuencias potenciadoras que se encuentran en regiones distales de los genes regulados por este (Carroll et al., 2006; Farcas et al., 2021). De esta forma el ER α regula la transcripción de sus genes diana a distancia mediante el reclutamiento de otros factores de transcripción a través de sus dominios de transactivación AF-1 y AF-2. Entre estos otros reguladores se encuentran coactivadores y correpresores que están implicados en la remodelación de la cromatina, la modificación de otras proteínas, la iniciación de la transcripción, la elongación y splicing del ARNm o en la terminación de la transcripción.

Hasta hace algunas décadas, el modelo de regulación de la transcripción mediado por el ER α era relativamente simple, como se describe en el párrafo anterior, la unión de un ligando agonista como el E2 lleva a que el ER α experimente cambios conformacionales que permiten su dimerización y unión al ADN en los EREs de los genes diana. Sin embargo, se han identificado un número cada vez mayor de factores correguladores que se unen al ER α estimulando o inhibiendo la expresión de genes diana, demostrando su importancia para la actividad del ER α (Arnal et al., 2017). Los efectos mediados por el receptor a través de su unión indirecta al ADN se engloban dentro de lo que se denomina la vía “no clásica o indirecta” de acción, en la cual la unión del ligando al ER α promueve la formación de complejos con otros factores de transcripción que se unen al ADN



independientemente de los EREs (Figura 7). Uno de estos factores es la proteína estimulante 1 (Sp1) a través del cual el ER α media la expresión de genes con promotores ricos en GC (O'Lone et al., 2004). Algunos estudios también han demostrado la unión del ER α con el factor NF- κ B (Kalaitzidis and Gilmore, 2005) y con los factores de la familia c-Fos y c-Jun que forman el complejo AP-1 a través del cual regula la expresión de genes involucrados en procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis (Piu et al., 2001).

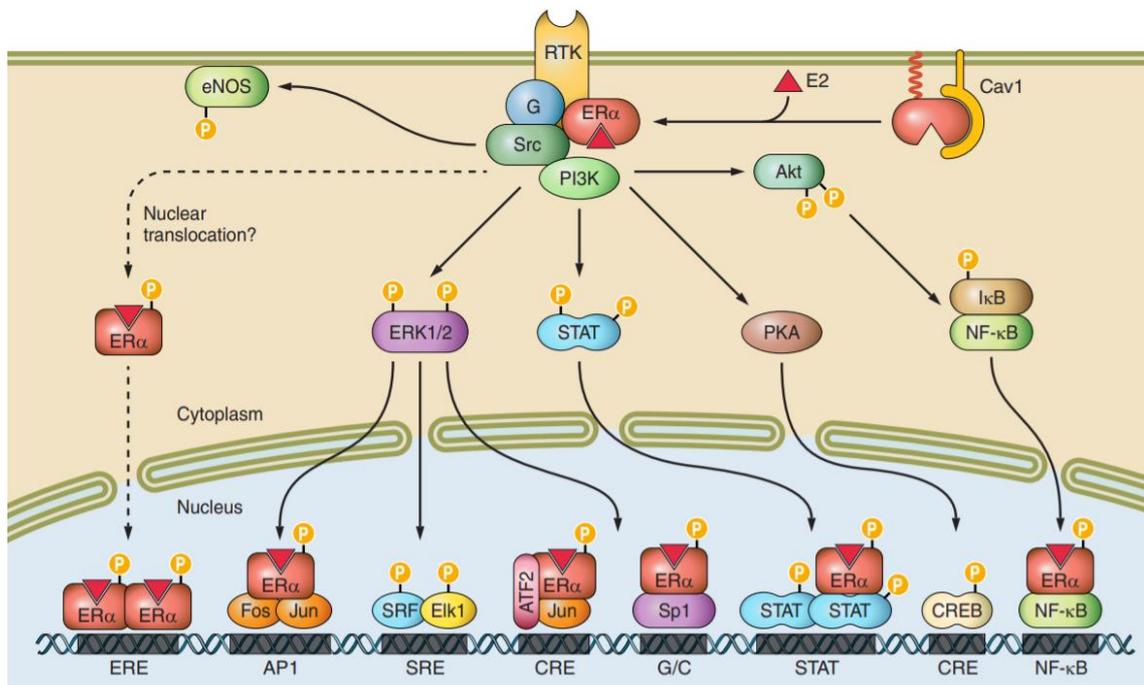


Figura 7. Factores de transcripción reclutados en la vía no clásica

Se presentan algunos de los factores a los que se asocia el ER α para mediar su acción, uniéndose a regiones del ADN de forma independiente de los EREs. Tomado de *Arnal et al., 2017*.

1.2.3. Bases moleculares y celulares de la respuesta tejido-específica de los ER

Los ER se encuentran expresados en un amplio espectro de tejidos, por lo que potencialmente podrían responder a la presencia de estas hormonas, cumpliendo distintas funciones en cada contexto celular. Esto ha sido demostrado con el uso de agentes farmacéuticos dirigidos contra el ER α ,

revelando la naturaleza tejido-específica de las respuestas desencadenadas. Originalmente, las terapias hormonales contra los tumores mamarios, que tenían como blanco el ER α , desarrollaban un gran número de efectos secundarios en los pacientes tratados, ya que afectaban de forma indeseada el funcionamiento del receptor en otros los tejidos secundarios. Por este motivo ha tomado gran relevancia en la medicina el desarrollo de los fármacos conocidos como moduladores selectivos de los ER (SERMs). Los SERMs regulan las funciones del ER α de forma tejido-específicas, actuando como agonistas en ciertos tejidos y como antagonistas en otros (Martinkovich et al., 2014). Entre ellos se encuentra el Tamoxifeno que actúa como antagonista en el tejido mamario y como agonista en el útero y tejido óseo, pudiendo desencadenar el cáncer de útero como efecto secundario (Farooq, 2015). La respuesta específica de cada tejido a los distintos compuestos estrogénicos se ha asociado en parte a los patrones de expresión de los distintos subtipos de ER y de sus corre reguladores, específicos de cada tipo celular. Los dos subtipos, el ER α y el ER β , pueden mediar funciones distintas dependiendo de la naturaleza de los ligandos unidos, las modificaciones postraduccionales que presenten y su interacción con distintos cofactores y elementos de respuesta en los promotores (Moggs and Orphanides, 2001; Sommer and Fuqua, 2001) (Figura 8).

A su vez, también se ha demostrado que el estado de diferenciación celular influye sobre la actividad del ER α . Esto se encuentra relacionado a la contribución relativa ejercida por las funciones de transactivación AF1 y AF2 en la actividad transcripcional de ER α , la cual se ha visto que depende del estado de diferenciación de la célula. Se ha observado 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).

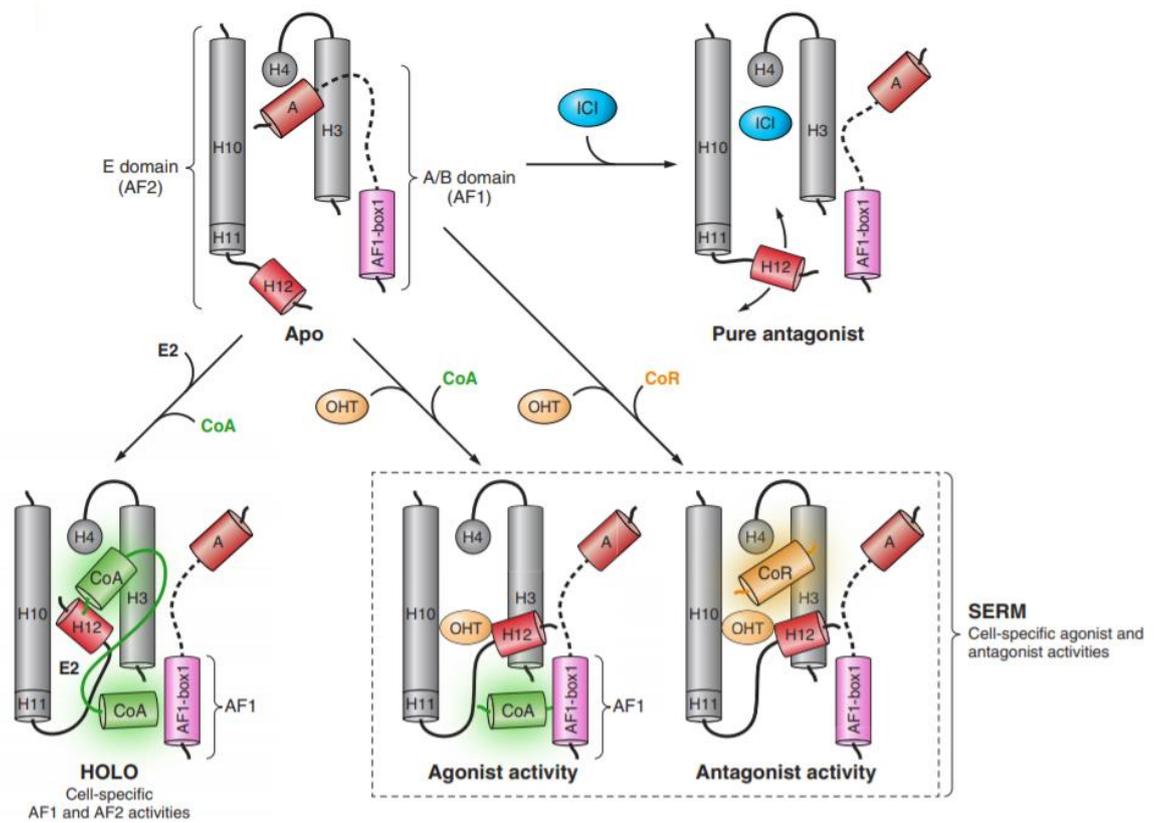


Figura 8. Cambios conformacionales del ER α frente a distintos ligandos

Representación esquemática del dominio de unión a ligando en la forma apo (sin ligando), unido a un agonista (E2), unido a un SERM (4-hidroxitamoxifeno: OHT) y unido a un antagonista puro (ICI o Fulvestrant). Estos esquemas se basan en estudios de cristalografía e interacciones. Se muestran las posiciones de las hélices principales del dominio E y las hélices de los dominios A y B del ER. Los cilindros rojos, rosado y marrón indican la posición de la hélice H12, el dominio AF-1-box1 y el dominio A respectivamente. CoA: Coactivador, CoR: Correpresor. Tomado de *Arnal et al., 2017*

Desafortunadamente para lo que respecta al tratamiento del cáncer de mama, algunos tumores mamarios generan resistencia a la terapia hormonal. En la actualidad, un área importante de investigación se centra en dilucidar los procesos que provocan la resistencia a los fármacos antiestrogénicos (Du and Shim, 2016; Moggs and Orphanides, 2001). La pérdida de la expresión o de actividad del ER α podría ser una forma de adquirir resistencia al tratamiento (Moggs and Orphanides, 2001). Se ha observado que algunos tumores mamarios sensibles al tratamiento hormonal, adquieren la resistencia al mismo cuando sufren un proceso de

transición epitelio-mesenquimal (TEM), cambiando su fenotipo de uno epitelial diferenciado a uno mesenquimal más desdiferenciado. Las células que sufren dicho proceso presentan una reducción de la actividad y/o de expresión del ER α y un aumento en la actividad de receptores de factores de crecimiento (Al Saleh et al., 2011).

1.3. Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM)

Entre los pacientes con cáncer de mama, más del 90% de las muertes no son causadas por el tumor primario, sino por el producto de su metástasis en sitios distantes (DeSantis et al., 2019). Por lo tanto, comprender el mecanismo que dirige el proceso de metástasis en el cáncer de mama es muy importante para su detección temprana y tratamiento eficaz. La acumulación de evidencia sugiere que un proceso de transición epitelio-mesenquimal (TEM) es uno de los principales mecanismos implicados en la metástasis de este tipo de cáncer (Creighton et al., 2010).

De acuerdo a los lineamientos propuestos recientemente por la Asociación Internacional de TEM (tEMTIA), este proceso consiste en un conjunto de eventos celulares y moleculares conservados evolutivamente que llevan a la transformación de células epiteliales diferenciadas en células con un fenotipo mesenquimal inmaduro (Yang et al., 2020). La TEM fue observada en las etapas iniciales del desarrollo embrionario, en donde las células del epitelio embrionario temprano se internalizan para dar lugar al tejido mesodérmico. En esta etapa, las células deben desprenderse de las uniones que las mantienen adheridas con otras células, cambiar su forma y polaridad, y migrar hacia otras regiones del embrión en desarrollo (Nieto et al., 2016; Voulgari and Pintzas, 2009). Por otro lado, en organismos adultos la TEM se encuentra asociada a eventos de cicatrización de heridas o con diversas patologías, como la fibrosis y el cáncer (Kourtidis, 2017). En medicina, un tumor es clasificado como maligno fundamentalmente por su



capacidad de diseminación hacia otras regiones del organismo. En el curso de la enfermedad, la masa del tumor se vuelve heterogénea ya que las células tumorales primarias acumulan alteraciones genéticas de forma independiente e interactúan de forma particular con su microambiente local (Scheel et al., 2007). Como resultado de esta heterogeneidad, en ciertas áreas del tumor, un pequeño número de células pueden escapar a los mecanismos de control y regulación, perdiendo su adhesión con las células vecinas, migrando e invadiendo localmente el tejido circundante (Figura 9).

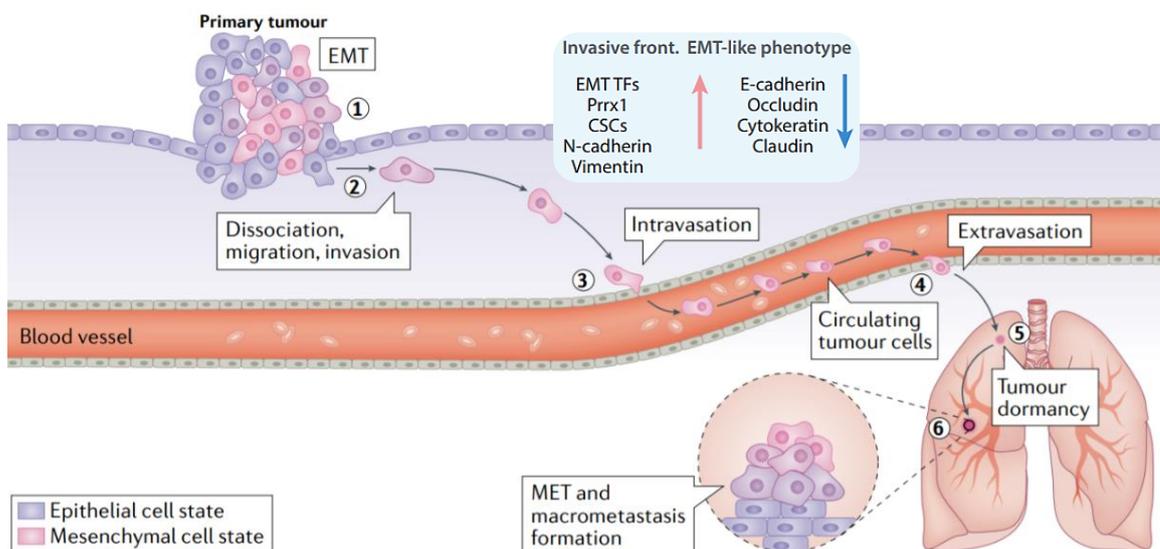


Figura 9. Secuencia de eventos que ocurren durante la TEM

El escape inicial del sitio primario (invasión) requiere que las células tumorales epiteliales disminuyan sus uniones célula-célula, adquiriendo movilidad (paso 1) y que degraden la membrana basal y la matriz extracelular (ECM), permitiendo que las células migren e invadan los tejidos normales cercanos (paso 2). El siguiente paso se denomina "intravasación", durante el cual las células tumorales invaden la lámina endotelial, penetran en los vasos vasculares o linfáticos y entran en la circulación sanguínea (paso 3). Eventualmente, algunas de las células que sobreviven a todos los pasos logran extravasar el endotelio capilar de órganos distantes hacia el parénquima de estos órganos (paso 4) y logran establecerse (paso 5) y proliferar desde crecimientos pequeños (micrometástasis) a tumores secundarios completamente malignos que son clínicamente detectables y potencialmente mortales (crecimiento secundario) (paso 6). Tomado de *Yang et al., 2020*.

Recientemente, la concepción de la TEM como un "switch" entre estos dos estados alternativos ha sido sustituida por una concepción más amplia y compleja, que contempla un gradiente de estados intermedios o parciales,

apoyada por una serie de estudios que demuestran la complejidad y heterogeneidad intrínseca de los distintos tumores y de sus contextos (Yang et al., 2020). De esta forma, tanto células epiteliales normales como neoplásicas suelen adquirir en un primer lugar estados parcialmente epiteliales / parcialmente mesenquimales, donde sólo parte de los marcadores se expresan en pequeños conjuntos de células a lo largo del espectro epitelio-mesenquimal de fenotipos (Figura 10) (Dongre and Weinberg, 2019; Voutsadakis, 2016; Wahl and Spike, 2017). Por otro lado, las células desdiferenciadas durante la TEM pueden revertir esta condición y reconvertirse nuevamente en un tipo epitelial a través de un proceso inverso conocido como transición mesenquimo-epitelial (TME).

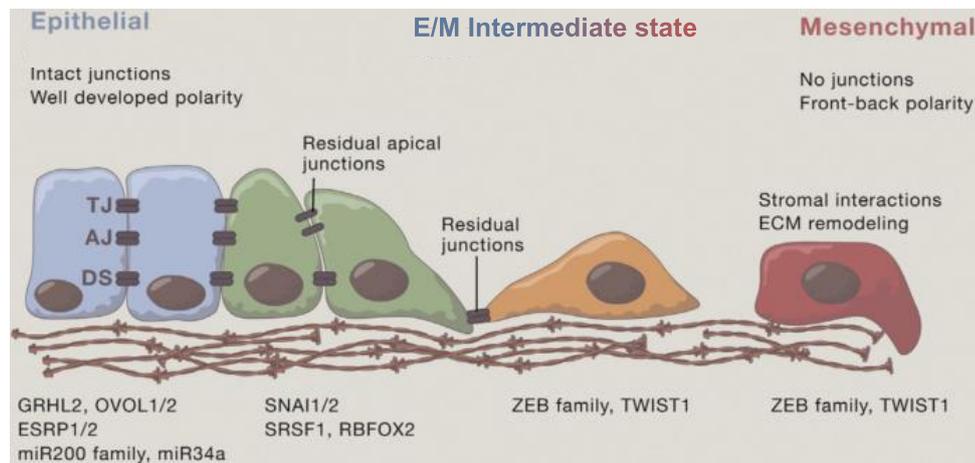


Figura 10. Gradiente de estados (fenotipos) durante el proceso de TEM

A medida que las células sufren la transición de izquierda (epitelial) a derecha (mesenquimal), estas pierden secuencialmente la polaridad apico-basal, la adherencia célula-célula, y comienzan a ganar polaridad frontal y aumentan las interacciones con la matriz. En la parte inferior de la figura se describen los reguladores principales implicados en el mantenimiento de cada estado. TJ, unión estrecha; AJ, unión adherente; DS, desmosoma. Modificado de *Nieto et al. 2016*.

1.3.1. Marcadores característicos de la TEM en cáncer de mama

Se han descrito una serie de marcadores presentes en la mayoría de los tumores de mama que sufren una TEM. Entre los más conocidos encontramos en primer lugar, la E-cadherina, una proteína de superficie que permite la adhesión entre células epiteliales (Mittal, 2018). La disminución en la expresión de E-cadherina es el marcador típico de células

que se encuentran cursando un proceso de TEM. La supresión de la función o expresión de esta proteína conduce a las células hacia un fenotipo mesenquimal y produce una mayor migración e invasión celular. Por lo general tiene lugar un cambio en el tipo de cadherina expresado en la célula, pasando de E-cadherina a N-cadherina (Mittal, 2018). En segundo lugar, la proteína CD44, presente en la superficie celular modulando la señalización celular al formar complejos con diversos receptores tirosín-quinasa, también desempeña un papel importante en la metástasis del cáncer de mama (Brown et al., 2011). En tercer lugar, la β -catenina es una proteína que se localiza en la membrana celular de células epiteliales normales y células tumorales no invasivas. En las células que sufren una TEM, la β -catenina se encuentra principalmente en el citoplasma o en el núcleo. La localización de β -catenina en el citoplasma es resultado de su disociación de la E-cadherina. Posteriormente, la β -catenina transloca al núcleo e induce la transcripción de genes que promueven la TEM (Zeisberg and Neilson, 2009). Por último, otro marcador de la TEM es un aumento en la expresión de la vimentina, una proteína que forma parte de los filamentos intermedios. La vimentina se expresa en sitios de elongación celular y se asocia con un fenotipo migratorio (Raymond and Leong, 1989).

1.3.2. Regulación de la TEM

Numerosas investigaciones han mostrado la gran complejidad que presenta la regulación de la TEM, proponiendo una regulación a distintos niveles, desde mecanismos regulatorios mediados por modificaciones epigenéticas, hasta la regulación transcripcional, el splicing alternativo y la estabilidad y localización subcelular de algunas proteínas (Nieto et al., 2016) (Figura 11). La regulación de la TEM clásica se centra en la supresión transcripcional de la molécula de adhesión E-cadherina (Lamouille et al., 2014). Los factores de transcripción que modulan la TEM pueden ser clasificados en función de su capacidad para reprimir la expresión de E-cadherina de forma directa o indirecta (Liu et al., 2016). Algunos de estos factores de transcripción son específicos de la TEM como Snail1, Snail2 (o

Slug), ZEB1 (o TCF8/ δ EF1), ZEB2 (o SIP1) y Twist, sumado a otros que participan de la regulación de vías más generales en procesos tumorales, como vías activadas por receptores de HER2/Neu en cáncer de mama. Algunos de ellos presentan funciones solapantes y pueden ser expresados en distintos estados de la TEM, mientras otros son esenciales en determinadas etapas. En particular para el cáncer mamario, la participación de Snail1 parece necesaria en el inicio del proceso de TEM, mientras que Twist se vuelve esencial durante el establecimiento de este proceso (Liu et al., 2016).

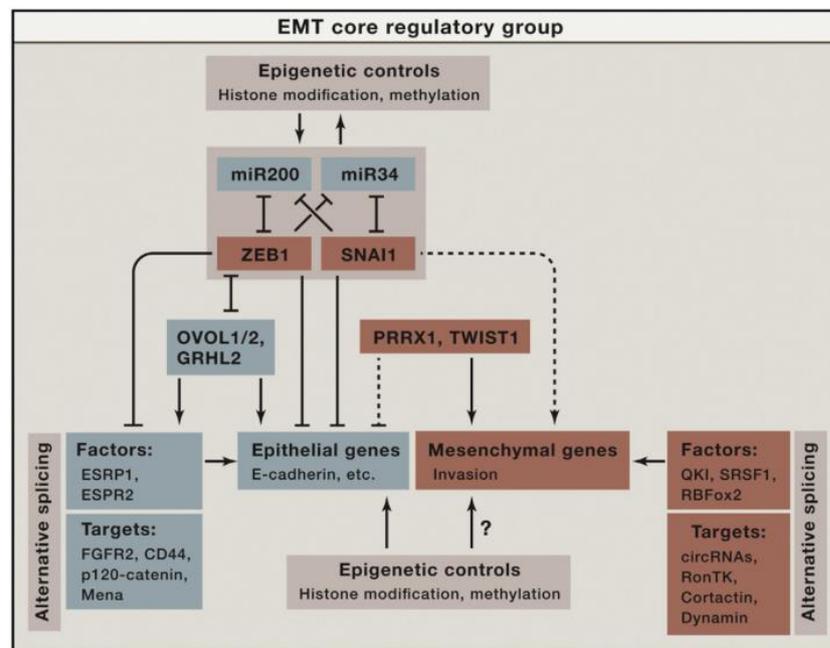


Figura 11. Maquinaria central de regulación de la TEM

La regulación de este proceso presenta una gran complejidad y abarca diversos mecanismos como modificaciones epigenéticas, controles a nivel transcripcional mediado por una serie de factores, splicing alternativo y regulación de la estabilidad y localización subcelular de ciertas proteínas. Extraído de *Nieto et al. 2016*.

A su vez, como mencionamos anteriormente, otro importante regulador de la TEM es el ER α . En condiciones normales, la actividad del ER α promueve la diferenciación y el fenotipo epitelial. Esto se debe, en parte, a que inhibe la expresión de los factores de transcripción antes mencionados (como los Snail y los ZEB). Existen investigaciones que demuestran que el knock-down del ER α mediante siRNA en células de cáncer de mama ER α +

conducen a una TEM y a un incremento de la migración celular (Al Saleh et al., 2011; Voutsadakis, 2016). En último lugar, un mecanismo que ha sido muy estudiado en los últimos años en estrecha relación con el cáncer de mama, es el relacionado a la activación de la vía de señalización MKL1/actina. Diversos estudios han mostrado que un aumento en la actividad de esta vía se asocia con una disminución en la expresión del ER α y un aumento en la expresión de factores de crecimiento, mostrando un fenotipo semejante al de células que atraviesan una TEM.

1.3.3. Vía de señalización MKL1/actina

Entre los mecanismos moleculares involucrados en la pérdida de la respuesta hormonal, estudios recientes sugieren que el factor de transcripción relacionado a la miocardina o MKL1 (“megakaryoblastic leukemia 1”, también denominado MRTF-A) juega un rol importante en la progresión del cáncer actuando como promotor o supresor tumoral dependiendo del contexto celular (Scharenberg et al., 2010). El factor MKL1 es un miembro de la familia de correguladores relacionados a la miocardina (MRTF, “myocardin-related transcription factor”), los cuales se caracterizan por regular la expresión génica sin unirse directamente al ADN (Wang et al., 2002). Todos los factores de esta familia se unen como coactivadores al factor de respuesta al suero (SRF), el cual controla la expresión génica en diversos tejidos, regulando procesos esenciales relacionados a la supervivencia celular y la apoptosis (Miano, 2003). La unión del SRF al ADN se da en secuencias ricas en A/T conocidas como “CArG boxes”, presentes en los promotores o en regiones intrónicas de los genes blanco (Sun et al., 2006). El factor MKL1 humano es expresado en un amplio rango de tejidos y codifica para una proteína de 931 aminoácidos que presenta una estructura modular conformada por varios dominios funcionales (Wang et al., 2002) (Figura 12).

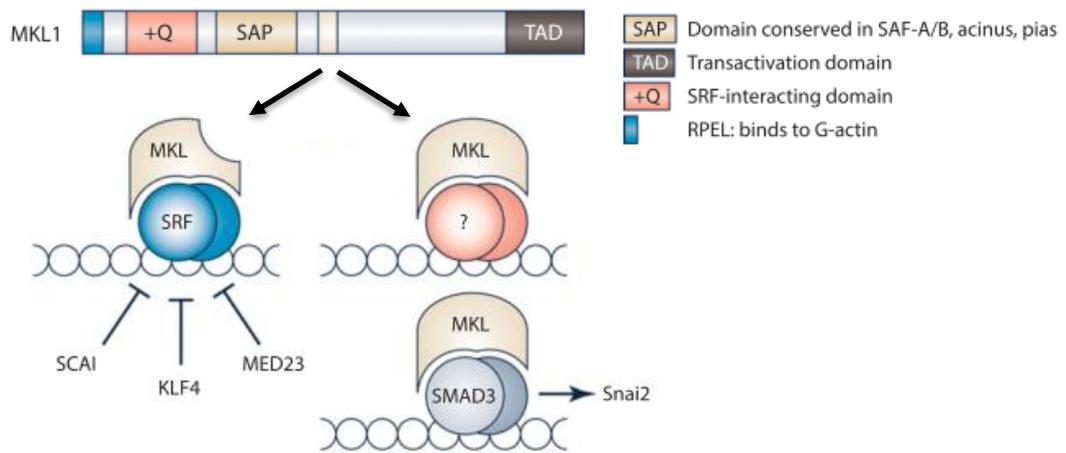


Figura 12. Dominios funcionales de MKL1 y sus correguladores

En la parte superior se esquematizan los dominios funcionales en la estructura de MKL1. En la parte inferior se ejemplifican algunas de las vías de acción de estos factores, siendo principalmente asociado a SRF o de forma independiente de SRF mediante el dominio SAP (todavía poco conocido). Modificado de *Swärd et al. 2016*.

En su extremo N-terminal presenta varias repeticiones del motivo RPEL (llamado así por los aminoácidos que lo conforman), esenciales para la unión a la actina monomérica/globular (G-actina) y por tanto su retención en el citoplasma (Miralles et al., 2003). Adyacente a esta región se encuentra un dominio rico en glutamina (rico en cargas positivas), necesario para su interacción con el SRF (Cen et al., 2003). La región C-terminal, presenta un dominio de transactivación (TAD) importante para la regulación de la actividad del SRF (Scharenberg et al., 2010).

La localización subcelular y la actividad transcripcional de MKL1 es regulada directamente a través de la interacción con la actina monomérica por medio de los motivos RPEL. Este mecanismo regulador involucra la señalización mediada por la GTPasa RhoA que regula la dinámica de la actina en la célula en respuestas a estímulos extracelulares (Vartiainen et al., 2007). En células no estimuladas, MKL1 se localiza predominantemente en el citoplasma asociado G-actina. Tras la activación de RhoA, aumenta la formación de filamentos de actina (F-actina), consumiendo el pool de G-actina presente en el citoplasma y en el núcleo. Esto genera la liberación

de MKL1 de la G-actina, lo que permite su importación al núcleo y permitiendo la interacción con el SRF modulando su actividad (Vartiainen et al., 2007). Por otro lado, se ha demostrado que la G-actina nuclear facilita la exportación MKL1 fuera del núcleo y evita que MKL1 active los genes blanco de SRF (Vartiainen et al., 2007).

En relación con el cáncer de mama, se ha descrito que las células tumorales de epitelio mamario diferenciadas y sensibles al tratamiento hormonal, exhiben poca o nula actividad de MKL1 (Scharenberg et al., 2010). Por otra parte, el proceso de TEM en estas células produce la un aumento en la relación F-actina/G-actina y en consecuencia, la activación de MKL1 (Kerdivel et al., 2014; Morita et al., 2007). Estudios recientes demuestran la existencia de una estrecha relación entre la actividad de MKL1 y el ER α (Huet et al., 2009). La inhibición de la actividad de MKL1 favorece la transactivación del ER α a través de su dominio AF-1 mientras que la activación de MKL1 inhibe la actividad del ER α a través de su dominio AF-1, dependiendo exclusivamente de su dominio AF-2, lo que reduce drásticamente su eficiencia de transactivación. Esta reducción de la actividad del ER α mediada por MKL1 conduce al escape hormonal y al aumento de la actividad de varios factores de crecimiento, apoyando el rol de MKL1 como un factor tumorigénico (Flouriot et al., 2014; Kerdivel et al., 2014).

Esto fue demostrado en gran parte por el grupo del Prof. Gilles Flouriot, quienes desarrollaron un modelo basado en tres líneas celulares derivadas de una línea de cáncer mamario (MCF7) las cuales fueron transfectadas de forma estable para expresar distintas variantes de MKL1 (Figura 13) por medio de un promotor inducible por tetraciclina (Huet et al., 2009; Kerdivel et al., 2014). Una de las variantes transfectadas presenta una delección de los primeros 200 aminoácidos del dominio N-terminal (MKL1 Δ N200) donde se encuentran los motivos RPEL involucrados en la interacción con la actina monomérica. De esta forma, al ser incapaz de unirse a la actina, esta



variante de MKL1 se encuentra constitutivamente activa en el núcleo. Luego del tratamiento con tetraciclina, estas células presentan un 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, 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 una presencia de marcadores mesenquimales como la disminución de la E-cadherina y el aumento de la expresión de vimentina y de actina (Kerdivel et al., 2014).

Por otro lado, en la otra variante transfectada fueron deletados los primeros 301 aminoácidos del extremo C-terminal, donde se encuentra el dominio de transactivación (TAD). Esta variante se localiza principalmente en el citoplasma y se comporta como una variante dominante negativa con pérdida de función (Huet et al., 2009). 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 (Kerdivel et al., 2014). Para completar el modelo, se utiliza como control una línea que fue transfectada con un plásmido vacío (sin ninguna variante de MKL1) que le confiere la resistencia a los antibióticos utilizados para la selección de estas líneas, Zeocina y Blastidina. Esta línea sólo expresa la MKL1 endógena. 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 AF-2. Mientras tanto en las células MCF7 MKL1 Δ C301 con características de células epiteliales diferenciadas, el receptor se encuentra en un contexto permisivo a AF-1.

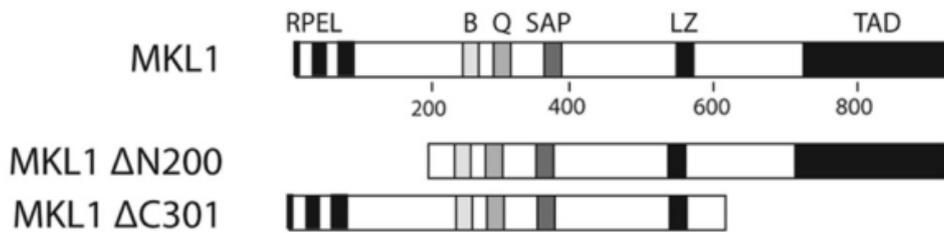


Figura 13. Representación esquemática de las variantes de MKL1.

La región N-terminal de MKL1 contiene motivos RPEL que median la unión a actina. La variante $\Delta N200$ carece de estos motivos por lo que no puede unirse a actina, encontrándose constitutivamente activa en el núcleo. Por otro lado, la variante $\Delta C301$ carece del dominio de transactivación por lo que presenta una pérdida de función. Modificado de *Huet et al., 2009*.

1.4. Efectos de la cinética de traducción y el contexto celular sobre la biosíntesis de proteínas

Para asegurar la viabilidad celular es requisito indispensable que la célula logre producir y mantener un proteoma funcional, encargado de llevar a cabo la gran mayoría de las diversas funciones celulares. Para ello, cada proteína debe alcanzar una estructura tridimensional definida. Esto requiere una precisa traducción del código presente en el ARNm, lo implica no sólo la síntesis de un polímero de aminoácidos, sino también el correcto plegamiento de este polímero para que la proteína pueda desarrollar su función. Sólo aquellas proteínas que se encuentren correctamente plegadas serán capaces de interactuar en forma específica con las moléculas adecuadas y desarrollar su actividad.

La biosíntesis de proteínas requiere una compleja coordinación de distintos factores en una coreografía de varios pasos, en la que un paso en falso puede alterar la homeostasis proteica (proteostasis). La aparición de dichas alteraciones en la síntesis de proteínas y, por ende, en la proteostasis, es la causa de diversas patologías, originadas tanto por un desequilibrio en la abundancia de una proteína nativa o por la acumulación de una proteína

mal plegada (Chiti and Dobson, 2017). 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). Por otro lado, algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la enfermedad del Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Creutzfeld-Jacob y la enfermedad de Huntington están asociadas a la acumulación de agregados de proteínas mal plegadas (Chiti and Dobson, 2017; Sweeney et al., 2017).

1.4.1. Cinética de traducción y el plegamiento de proteínas

Trabajos pioneros realizados por Christian Anfinsen y Cyrus Levinthal llevaron a proponer la hipótesis de que la secuencia de aminoácidos contiene toda la información necesaria para que una proteína alcance su conformación nativa (Anfinsen, 1973; Englander and Mayne, 2014) . En el medio siglo transcurrido desde estas observaciones, se han logrado grandes avances en la comprensión de los principios básicos que subyacen a este proceso, permitiendo reafirmar lo propuesto por Anfinsen y Levinthal. Actualmente está ampliamente aceptado que son las características de las cadenas laterales de los aminoácidos quienes definen las interacciones necesarias para generar las distintas estructuras (Englander and Mayne, 2014). Sin embargo, también se reconoce actualmente que no todas las proteínas pueden adoptar su conformación nativa a través de su plegamiento sin la participación de otros factores (Kim et al., 2013; Kramer et al., 2009; Pechmann et al., 2013). Esto es especialmente importante para las proteínas eucariotas que tienden a ser más grandes en comparación con las proteínas bacterianas y presentan múltiples dominios (Kim et al., 2013; Netzer and Hartl, 1997). Por lo tanto, el plegado de estas proteínas requiere una estricta regulación para garantizar que se alcancen las vías de plegado productivas y evitar así las muchas vías improductivas o de plegado incorrecto (Kim et al., 2013; Pechmann et al., 2013). Para superar este desafío, la célula ha desarrollado una estrategia que consiste en plegar

las proteínas de manera coordinada con su traducción, es decir de manera cotraduccional (Frydman et al., 1994). Para entender un poco mejor este concepto, debemos ver a la traducción como un proceso vectorial en el que el polipéptido naciente se produce en forma secuencial desde su extremo N-terminal a su extremo C-terminal. La naturaleza vectorial de la traducción permite dividir secuencialmente el plegamiento en los distintos dominios de las proteínas multidominio, limitando así el espectro de conformaciones posibles de la cadena naciente (Frydman et al., 1999). Sin embargo, el efecto colateral de lo anterior, es que los polipéptidos nacientes siguen siendo vulnerables al plegamiento incorrecto y a la agregación hasta que puedan adoptar su conformación nativa final una vez completada la traducción.

De lo anterior, se desprende que para mantener la proteostasis, es esencial lograr un ajuste preciso de la velocidad de síntesis de proteínas, así como el correcto accionar de un conjunto de proteínas accesorias que favorecen el correcto plegamiento de las mismas. Entre estas últimas se encuentran las chaperonas, que interactúan con el péptido naciente o con las proteínas mal plegadas para habilitar la exploración de otras alternativas de plegamiento, enzimas de modificación, que generan grupos funcionales necesarios para formar distintas interacciones y las proteínas de reconocimiento de señales, las cuales se unen directamente a los ribosomas y los redireccionan a sitios específicos en la célula (Kim et al., 2013; Pechmann et al., 2013; Preissler and Deuerling, 2012). Aunque aún quedan muchos detalles por dilucidar, está firmemente establecido que la cinética de traducción es un factor crítico para generar un proteoma saludable (Stein and Frydman, 2019).

1.4.2. Factores que pueden determinar la cinética de traducción

Hace más de 30 años, se postuló que la velocidad de traducción de las distintas regiones de las cadenas polipeptídicas está estrechamente relacionada con el plegamiento de las mismas (Purvis et al., 1987). Por un lado, se ha demostrado que si la traducción ocurre de forma rápida, si bien es deseable para aumentar la eficiencia y fidelidad de la traducción, existe un alto riesgo de formación de intermediarios mal plegados (Borgia et al., 2015). Por otro lado, si el plegamiento es más rápido en relación a la traducción, la probabilidad de obtener intermediarios mal plegados disminuye, lo que resulta deseable para obtener una proteína funcional (O'Brien et al., 2014; Zhou et al., 2009). Sin embargo, una traducción demasiado lenta, llegando incluso a una detención de los ribosomas, podría desencadenar tanto la degradación del péptido naciente como la degradación del ARNm (Borgia et al., 2015) (Figura 14).

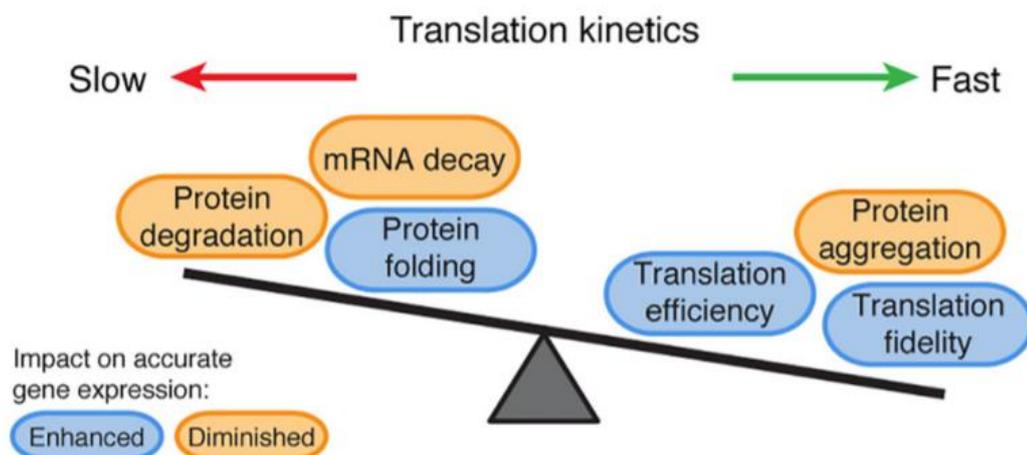


Figura 14. La cinética de traducción es un compromiso entre la producción de proteínas, su plegamiento y el control de calidad

Tasas de elongación variadas a lo largo de un transcripto dictan una serie de compensaciones que promueven (azul) o disminuyen (naranja) la expresión génica. Las tasas de elongación más lentas promueven la expresión génica al facilitar el correcto plegamiento de las proteínas, pero una traducción muy lenta (como el estancamiento de los ribosomas) disminuye la expresión génica al causar la degradación del péptido naciente y del ARNm. La traducción rápida también tiene sus ventajas y desventajas en la expresión génica, al mejorar la fidelidad y eficiencia de la síntesis, al tiempo que aumenta la probabilidad de plegamientos incorrectos y la agregación de las proteínas. Tomado de *Stein and Frydman, 2019*.

De esta forma, vemos que modular la cinética de traducción es un punto clave y energéticamente costoso para la célula, el cual es logrado a través de una compleja regulación de varios factores. Entre estos factores se encuentran el uso de codones, la abundancia y las propiedades de las poblaciones de ARNt, la estructura del ARNm (Hanson and Collier, 2018) y la composición de la maquinaria traduccional y sus interacciones con el péptido naciente (Wruck et al., 2017). Otros factores como las colisiones entre ribosomas, la cooperación entre la traducción y la maquinaria de transcripción en el caso de procariontes (Larson et al., 2014) y la concentración de Mg²⁺ (Borg and Ehrenberg, 2015), también pueden jugar un rol en la velocidad de traducción de cada codón (Figura 15).

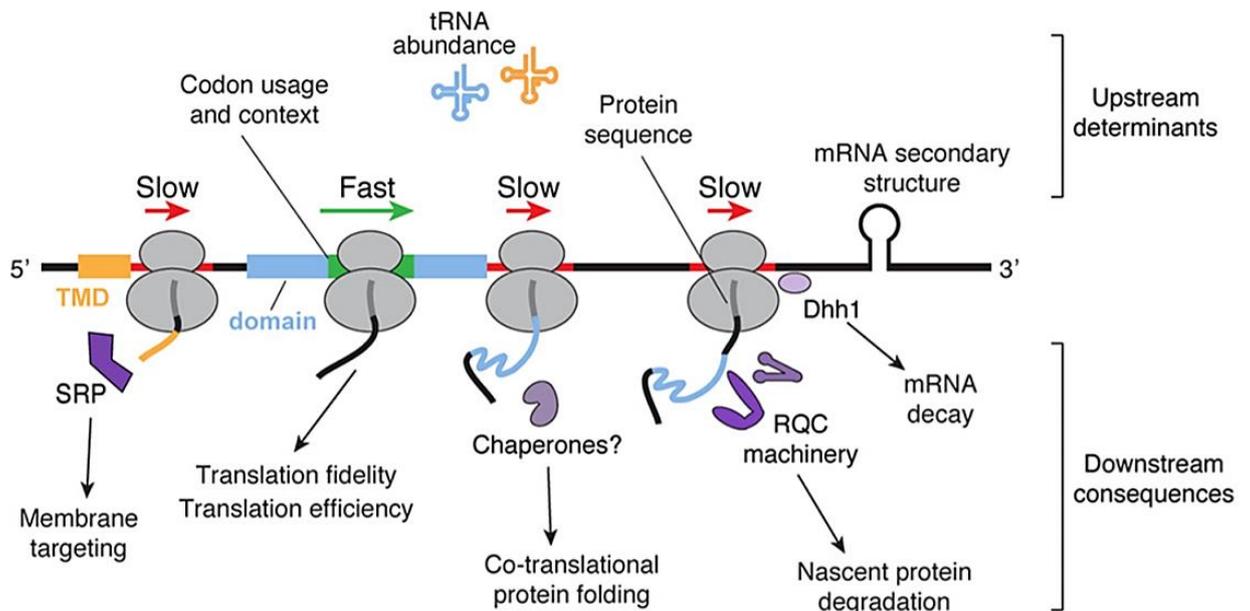


Figura 15. Varios factores regulan la cinética de traducción de manera interdependiente

Entre los determinantes de la cinética de traducción se incluyen el uso de codones y la abundancia de los ARNt, que definen la optimización del codón, junto con la estructura secundaria del mRNA y las secuencias específicas de en las proteínas. Los cambios en la tasa de elongación modulan entonces las vías que determinan el destino de los polipéptidos nacientes. Esto incluye el direccionamiento de las proteínas secretoras a la membrana mediante el reclutamiento del SRP después de la exposición de señales de direccionamiento como el dominio transmembrana (TMD), así como el plegamiento de proteínas posiblemente mediante el reclutamiento de chaperonas moleculares. Cuando un ribosoma se detiene, se recluta maquinaria RQC para degradar el polipéptido naciente y la helicasa Dhh1 de DEAD-box inicia la descomposición del ARNm. Tomado de *Stein and Frydman, 2019*.

En relación al alcance del presente trabajo, describiremos algunos de estos factores con mayor detalle:

a. Uso de codones

El factor más comúnmente estudiado es la frecuencia de codones en el transcriptoma, lo que se conoce como uso o sesgo de codones. El código genético es degenerado, lo que significa que el mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones. La frecuencia de los codones sinónimos en el transcriptoma puede variar en un orden de magnitud entre codones raros, es decir con baja frecuencia, y codones comunes, es decir aquellos que están mayormente presentes en el transcriptoma (Chaney and Clark, 2015). Durante mucho tiempo, los codones sinónimos se consideraron equivalentes, lo que llevó a acuñar el término de "mutaciones silenciosas" para describir mutaciones de un codón (sinónimo) por otro, sin un cambio de aminoácido. Sin embargo, ya hace varios años se ha demostrado que el término "silencioso" es inapropiado, debido a que las mutaciones sinónimas pueden efectivamente afectar el plegamiento y la actividad de algunas proteínas y están asociadas con la aparición de varias enfermedades (Fernández-Calero et al., 2016; Hunt et al., 2014; Marin, 2008). El uso de codones dicta la cinética de traducción principalmente a través de la interdependencia entre la frecuencia con la que aparecen codones en las secuencias codificantes y la abundancia de los ARNt que los decodifican (Chaney and Clark, 2015; Ikemura, 1985). Existen variaciones significativas en el número de genes de ARNt que decodifican los distintos codones. Algunos codones son reconocidos por ARNt codificados por un único gen, mientras que otros codones son reconocidos por múltiples ARNt (isodecodificadores) codificados en diferentes genes (Gingold and Pilpel, 2011; Tuller et al., 2010). La diferencia es mayor aún en algunos casos ya que existen codones que no disponen de un ARNt que logre un apareamiento completo a través de interacciones de Watson-Crick, y en su lugar requieren interacciones más inespecíficas en la tercera



posición del codón (primer nucleótido del anticodón) para su decodificación, conocidas como *wobbling* o de balanceo.

b. Los ARNt

Vemos que de forma interdependiente al uso de codones se presenta el estado de las poblaciones de ARNt celulares. Se ha estudiado que el número de copias de genes que codifican un ARNt dado se correlaciona positivamente con la abundancia de ese ARNt en el citoplasma, es decir que, los ARNt más abundantes tienen un mayor número de copias de genes (Gingold and Pilpel, 2011; Tuller et al., 2010). Esto genera una población de ARNt de composición diversa, con distintos ARNt con abundancias diferentes compitiendo por su incorporación en el centro de peptidil transferasa (PTC) del ribosoma. Dicha competencia influye en la tasa de elongación, particularmente determinada por la relación de concentración entre un ARNt con respecto sus isoaceptores (Fluitt et al., 2007). Cuando en una secuencia determinada del ARNm se encuentran codones que requieren ARNt isoaceptores de baja abundancia, la tasa de traducción se ralentiza ya que esta competencia requiere más tiempo para incorporar con precisión el ARNt correcto (Hanson and Collier, 2018; Rodnina, 2016).

La abundancia de ARNt y el uso de codones componen un equilibrio de oferta (ARNt) y demanda (codones en el ARNm), necesario para la correcta decodificación del mensaje contenido en el ARNm y define lo que se denomina como optimización de codones (Chaney and Clark, 2015; Pechmann et al., 2013). Bajo este concepto, se define como codones “óptimos” a los codones que son decodificados por ARNt abundantes. Por el contrario, los codones “no óptimos” generalmente consisten en codones raros decodificados por ARNt menos abundantes y, a menudo, subrepresentados en las secuencias codificantes (Chaney and Clark, 2015; Hanson and Collier, 2018; Ikemura, 1985). La consecuencia final es que los

codones “no óptimos” se decodifican con una velocidad menor que sus homólogos “óptimos”, lo que genera ciertas “pausas” o enlentecimientos en la traducción (Brule and Grayhack, 2017; Gardin et al., 2014; Letzring et al., 2010). La alteración de cuán “óptimo” resulta un codón en determinado contexto celular proporciona una forma versátil para ajustar el correcto plegamiento de una proteína sin alterar su secuencia aminoacídica (Chaney and Clark, 2015; Sander et al., 2014).

Hace no muchos años, se ha logrado demostrar que la composición de las poblaciones ARNt celulares no es algo estático, sino que puede variar de acuerdo a los diferentes contextos celulares o debido a ciertas enfermedades (Gingold et al., 2014; Goodarzi et al., 2016; Sagi et al., 2016). Quizás el ejemplo mejor caracterizado de la influencia de las poblaciones de ARNt en la expresión génica es la respuesta celular frente a la escasez de aminoácidos. En *E. coli*, el aminoácido leucina es decodificado por seis ARNt isoaceptores diferentes, y los codones correspondientes muestran un marcado sesgo en su frecuencia, dando lugar a codones “óptimos” y codones “no óptimos” para este aminoácido. En condiciones de limitación de nutrientes, la proporción de ARNt que reconocen los codones “óptimos” que se encuentran cargados con el aminoácido correspondiente disminuye considerablemente, mientras que la proporción de ARNt cargados para los codones “no óptimos” permanece relativamente constante (Elf et al., 2003). Este cambio en los niveles ARNt cargados lleva a un cambio en la optimización de los codones y favorece la traducción de mensajeros con codones que eran considerados como “no óptimos” en las condiciones previas a la inanición. Entre los ARNm favorecidos en estas condiciones de depleción de aminoácidos se encuentran los que codifican para las proteínas responsables de la biosíntesis de aminoácidos y el reciclaje de proteínas. Por lo tanto, sumado a los cambios que se generan por otros mecanismos en la transcripción y traducción con el objetivo de mantener la homeostasis frente a la privación de aminoácidos, el conjunto de ARNt puede cambiar dinámicamente en

respuesta a los cambios ambientales para adaptarse a las necesidades para restaurar la homeostasis (Wohlgemuth et al., 2013). En las células renales embrionarias humanas, los grupos de ARNt cargados se alteran en respuesta a la falta de aminoácidos para favorecer la traducción de los ARNm implicados en el reciclaje de proteínas por la vía del proteosoma, lo que sugiere que la adaptación de los grupos de ARNt a las demandas traduccionales es un fenómeno conservado en los distintos reinos (Saikia et al., 2016).

Un nivel aún más fino de regulación recae sobre las distintas modificaciones que sufren los ARNt en sus secuencias. Se ha demostrado que las modificaciones del ARNt influyen en la tasa de elongación, presumiblemente modulando las eficiencias de decodificación (Nedialkova and Leidel, 2015).

c. Otros componentes de la maquinaria de traducción

Otros factores que juegan un rol importante en la regulación de la velocidad de traducción son los propios 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; Mugnier and Tuite, 1999). Después de una decodificación precisa del ARNm, el siguiente paso en el ciclo de elongación implica la reacción de la peptidil transferasa que promueve la adición del aminoácido entrante a la cadena naciente en crecimiento. La eficacia de esta reacción influye en la velocidad de la elongación. Se ha estudiado que la prolina crea un posicionamiento desfavorable para esta reacción, tanto siendo donante como siendo aceptor, lo que genera que la reacción de la peptidil transferasa sea menos eficaz cuando la prolina está presente en el sitio A o P, ralentizando la traducción de los motivos ricos en prolina. Para resolver este inconveniente es necesario el reclutamiento del factor de elongación eIF5A (EF-P en

bacterias). Tanto eIF5A como EF-P dependen de modificaciones para su activación. En particular, eIF5A 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. Hace algunos años, la idea de que los ribosomas son entidades inmutables ha comenzado a cambiar con la aparición de nuevas técnicas para determinar la composición de los mismos en diferentes contextos (Genuth and Barna, 2018). Hoy en día existen numerosas evidencias de que algunos componentes de los ribosomas pueden variar de acuerdo a determinadas condiciones celulares, y ha empezado a tomar fuerza la idea de que existe una heterogeneidad de los ribosomas (Ni and Snyder, 2001; Segev and Gerst, 2017). La diversidad en la composición de los ribosomas como resultado de la expresión diferencial de las proteínas ribosomales y sus modificaciones postraduccionales, junto con la actividad de los factores asociados al ribosoma, pueden generar ribosomas "especializados" que pueden tener un fuerte impacto sobre la traducción de distintos transcritos en determinados contextos celulares (Genuth and Barna, 2018).

1.4.3. El contexto celular y la regulación de la síntesis de proteínas

Ya vimos que la correcta coordinación 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). Dicha coordinación está supeditada a que la célula logre cumplir con la alta demanda de los distintos componentes de la maquinaria de traducción, dependiendo así de las condiciones en las que se encuentre la célula. En particular, el contexto celular en el que se da la traducción puede variar ampliamente al variar el tipo celular, las condiciones de crecimiento y las distintas condiciones de estrés. A su vez, la traducción es el proceso que más energía y nutrientes demanda en células en crecimiento activo por lo que existe un vínculo muy estrecho entre el estado energético de la célula

y la síntesis de proteínas. Los estudios realizados en la levadura *S. cerevisiae* han ofrecido algunas pistas sobre cómo las señales nutricionales pueden influir sobre qué ARNm se convierten en proteína. En una levadura se pueden generar cerca de 2000 ribosomas por minuto para sustentar el rápido crecimiento celular. Se ha estimado que dicha producción requiere la mayor parte de la capacidad de transcripción de la célula para la síntesis del ARNr, y la mayor parte de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II para la síntesis de los ARNm de las proteínas ribosomales (Warner, 1999). Para una levadura que crece en glucosa, estas demandas pueden ser fácilmente satisfechas, sustentando la alta demanda de la biogénesis ribosomal y la tasa de crecimiento exacerbada. Sin embargo, al agotarse la glucosa, la traducción global se reduce rápidamente (Ashe et al., 2000) y la transcripción de los genes involucrados en la biogénesis de los ribosomas se reprime (Jorgensen et al., 2004; Marion et al., 2004), lo que a su vez limita la síntesis de nuevas proteínas y disminuye el consumo de energía. De forma análoga, las altas tasas de proliferación que atraviesan las células en los distintos procesos cancerígenos llevan a que las mismas se vean sometidas a tensiones fisiológicas, como la hipoxia y la escasez de aminoácidos, afectando también los niveles de traducción.

Hace ya algunas décadas, se ha encontrado uno de los reguladores maestros que vincula el estado metabólico de la célula con la síntesis proteica. Este regulador maestro lleva el nombre de mTOR por “mechanistic (previamente la -m- era por mammalian) target of rapamycin”, originado por las condiciones que llevaron a su descubrimiento (Liu and Sabatini, 2020; Saxton and Sabatini, 2017). mTOR es una serin/treonin quinasa y en los mamíferos forma parte de dos complejos moleculares que son funcional y estructuralmente distintos, mTORC1 y mTORC2 (Liu and Sabatini, 2020; Saxton and Sabatini, 2017). mTORC1 es un importante activador de la síntesis de proteínas y otros procesos anabólicos que consumen gran parte de los recursos celulares (Figura 16) y es uno de los encargados de integrar las señales sobre el estado metabólico de la célula.

mTORC1 regula la traducción principalmente al fosforilar la proteína 4E-BP (4E-BP1-3 en mamíferos), un inhibidor de la traducción, el cuál actúa impidiendo la unión de los factores de elongación de la traducción eIF4G y eIF4E (Bhat et al., 2015). La fosforilación de 4E-BP lo disocia de eIF4E, lo que permite la interacción entre eIF4E y eIF4G, formando el complejo llamado eIF4F. Se ha observado que la actividad de mTORC1 se encuentra aumentada en las células cancerígenas, lo que sumado a la sobreexpresión de eIF4E da como resultado un aumento global de la síntesis de proteínas. El aumento de la actividad de mTORC1 y por ende de la síntesis proteica ha sido relacionado con la resistencia tanto a la quimioterapia como a las terapias dirigidas (Lindqvist et al., 2018). El aumento en el consumo de energía tras la activación de mTORC1 se compensa mediante un aumento en la traducción de los ARNm que codifican para las proteínas que regulan la cantidad, función y dinámica de las mitocondrias (Morita et al., 2017, 2015, 2013). Estos hallazgos demuestran que el eje mTORC1/4E-BP juega un papel crucial en el mantenimiento del equilibrio energético al coordinar la producción de ATP mitocondrial y las tasas de síntesis de proteínas.

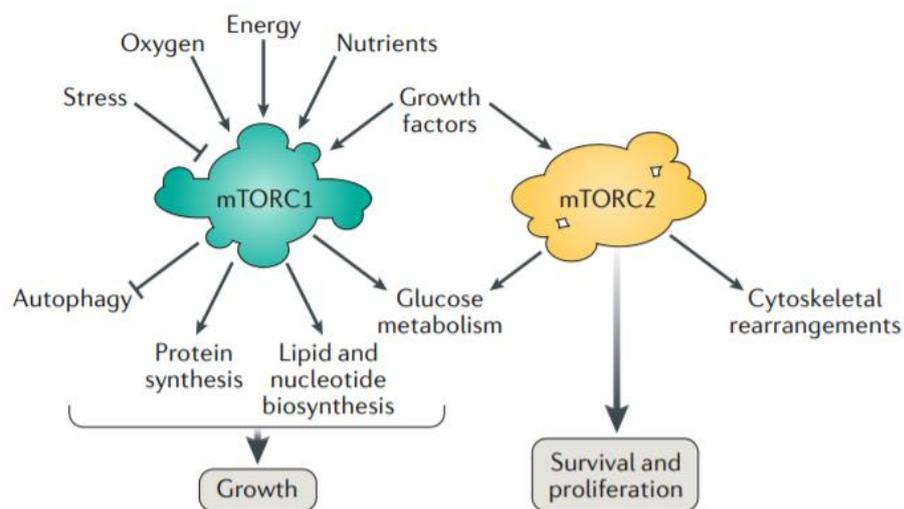


Figura 16. Estructura y función de mTORC1 y mTORC2

Los complejos mTORC1 y mTORC2 tienen distintas funciones de señalización en la célula. mTORC1 integra la información sobre estado nutricional para ajustar el equilibrio anabólico y catabólico de la célula, mientras que mTORC2 gobierna el comportamiento citoesquelético y activa varias vías de supervivencia. Tomado de *Liu and Sabatini, 2020*.

Otro mecanismo de regulación entre el contexto celular y la síntesis de proteínas recae sobre uno de los componentes más pequeños de la maquinaria de traducción, los ARNt, más precisamente sobre las modificaciones postranscripcionales que sufren los mismos. Desde hace ya mucho tiempo, se conoce que los ARNt poseen una gran variedad de modificaciones en sus nucleótidos, sin embargo, no fue hasta hace algunas décadas que se comenzó a reconocer su importancia (Björk et al., 1987). Se creía que estas modificaciones eran constitutivas e invariables, sin embargo, numerosos estudios han aportado evidencias que sugieren que algunas de estas modificaciones son de hecho dinámicas y están sujetas a una importante regulación por señales metabólicas (Laxman et al., 2013; Lee and Tu, 2017). Recientemente, mediante una caracterización exhaustiva de las modificaciones en la población de ARNt en *Vibrio cholerae*, se ha demostrado la presencia de una modificación en los ARNt específica de la fase de crecimiento exponencial (Kimura et al., 2020).

1.5. Antecedentes de la investigación

Hace algunos años, estudios de nuestro grupo demostraron, mediante ensayos de proteólisis limitada, que el ER α puede adoptar diferentes conformaciones y presentar diferencias en su afinidad por el estradiol, cuando este es sintetizado en diferentes sistemas de traducción *in vitro*, uno derivado de reticulocitos de conejo y otro de extractos de germen de trigo (Horjales et al., 2007). Estos resultados revelaron que ciertos componentes de los extractos celulares afectaban diferencialmente la traducción del ARNm, conduciendo a diferentes conformaciones del receptor y a diferencias en su afinidad por el ligando.

Más recientemente, otros estudios de nuestro grupo mostraron que una variante del ER α conteniendo una mutación sinónima que sustituye una G por una C en la tercera posición del codón que codifica para una alanina en



la posición 87 (ER α -Ala87), producía una alteración significativa en la funcionalidad de dicha variante con respecto a la obtenida para el ER α -WT, principalmente en la actividad de transactivación y localización subcelular (Fernández-Calero et al., 2014). Esto llevó a proponer la hipótesis de que los cambios en la actividad de la variante sinónima ER α -Ala87 estuvieran relacionados a cambios conformacionales de esta variante como consecuencia de una modificación de la cinética de traducción, probablemente debida a diferencias en la disponibilidad de las especies de ARNt que reconocen los codones GCG o GCC (Fernández-Calero et al., 2016).

A su vez, debido a la reciente asociación de numerosas enfermedades con el mal plegamiento de proteínas, ha surgido un interés creciente por comprender en qué medida el uso de codones y los cambios en la maquinaria de traducción afinan la traducción del ARNm originando diferencias en la síntesis y plegamiento de proteínas. Un claro ejemplo de lo anterior ha sido demostrado para la actividad del CFTR (“cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”). En un estudio en el que se integró el análisis de la concentración de los ARNt, en conjunto con estudios sobre la conformación del CFTR (por estabilidad térmica y ensayos de proteólisis limitada) y ensayos de actividad (medidas de la conductancia), se demostró que una variante sinónima del CFTR (T2562G-CFTR) podía modificar la velocidad local normal de traducción del ARNm debido a diferencias en la concentración de los ARNt correspondientes y, en consecuencia, alteraba tanto la conformación como la funcionalidad del CFTR (Kirchner et al., 2017; Rauscher et al., 2021). A su vez, mostraron como al aumentar la concentración celular del ARNt-Thr (CGU) se rescataba tanto la expresión como la actividad de la variante sinónima T2562G-CFTR (Kirchner et al., 2017). Por lo tanto, este trabajo dejó en evidencia el un vínculo directo entre la abundancia de un ARNt específico y la funcionalidad del CFTR. De esta forma se demostró como la población de ARNt podría modular la cinética de traducción y el plegamiento de proteínas.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Tomando en conjunto todos los antecedentes planteados anteriormente, nos planteamos como hipótesis que el proceso de transición epitelio-mesenquimal (TEM) involucra cambios adaptativos en el aparato traduccional y en el metabolismo energético y que dichos cambios pueden conducir a opciones alternativas del plegamiento de proteínas. Específicamente nos centramos en los efectos sobre el receptor de estrógenos α (ER α) buscando descifrar si dichas variantes conformacionales pueden estar asociadas a la resistencia al tratamiento hormonal del cáncer mamario.

2.2. Objetivos

En particular, en este trabajo buscamos estudiar las posibles variantes de estructura y conformación que puede presentar el ER α en los distintos contextos celulares de la TEM. En forma paralela, se busca establecer los posibles cambios en la maquinaria de traducción, en particular, el estado de la población de los ARNt. Adicionalmente, vinculado a los cambios en la maquinaria de traducción y en la proteostasis, nos propusimos completar el estudio de la “adaptación celular” analizando el estado metabólico de las distintas líneas celulares.

Específicamente nos propusimos llevar a cabo los siguientes objetivos:

- I. Caracterizar los cambios conformacionales del ER α en las líneas celulares que conforman el modelo de transición epitelio-mesenquimal (MCF7 Control, MCF7 MKI1 Δ N200 y MKL1 Δ C301),



comparando los perfiles de degradación obtenidos a través de ensayos de proteólisis limitada en las células permeabilizadas.

- II. Caracterizar las poblaciones de ARNt en las líneas del modelo ya mencionado, mediante la cuantificación de la abundancia relativa de los distintos isoaceptores y su nivel de aminoacilación a través de microarreglos de ARNt.
- III. Verificar por ensayos de metabolómica los cambios observados en la expresión de las enzimas de circuitos del metabolismo energético ocurridos en la transición epitelio-mesenquimal, obtenidos previamente por aproximaciones genómicas (RNA-seq y Ribosome Profiling) (Tamara Fernández-Calero, Tesis de Doctorado, 2020).



3. MATERIALES

3.1. Líneas celulares

Los ensayos realizados en el presente trabajo se llevaron a cabo empleando un modelo celular de transición epitelio-mesenquimal desarrollado por el Prof. G Flouriot y colaboradores de la Universidad de Rennes, Francia, con quién nuestro grupo presenta numerosas colaboraciones.

Dicho modelo está conformado por tres líneas celulares derivadas de la línea MCF7 (generada a partir de un carcinoma mamario y que expresa un ER α funcional, N $^{\circ}$ de catálogo ATCC: HTB-22) que fueron transfectadas de forma estable para expresar distintas variantes del gen de MKL1 (Figura 17). Dos de estas tres líneas, además de expresar el MKL1 endógeno, sobreexpresan distintas variantes de MKL1 dirigidas por un promotor inducible con tetraciclina. La línea MCF7 Control o ZB (notación originada por los antibióticos utilizados para la selección, Zeocina y Blastidina, ver sección 3.2) fue transfectada con el vector vacío el cual les confiere la resistencia a los antibióticos, pero no porta ninguna variante del gen de MKL1, por lo que esta línea sólo expresa MKL1 endógeno. Esta línea es la que se utiliza como control de la línea celular. La línea MCF7 “MKL1 Δ N200” fue transfectada de forma estable para sobreexpresar una forma constitutivamente activa de MKL1. En dicha variante de MKL1 fueron eliminados los primeros 200 aminoácidos del dominio N-terminal (Δ N200), región donde se encuentra el dominio de unión a actina, la cual actúa como represora de la actividad transcripcional de MKL1. La línea MCF7 “MKL1 Δ C301” por otro lado fue transfectada de forma estable para sobreexpresar una forma inactiva de la proteína MKL1 en la cual fueron eliminados los últimos 301 aminoácidos del dominio C-terminal (Δ C301), región que posee el dominio de transactivación. Esta última línea celular es utilizada también como control, en la que observamos el efecto de la sobreexpresión de una proteína exógena. Luego de inducida la expresión de las distintas formas



de MKL1 con tetraciclina, las células MCF7 MKL1 Δ N200 adquieren un fenotipo del tipo mesenquimal, mientras que las dos líneas control mantienen el fenotipo epitelial. Es importante mencionar que las distintas formas de MKL1 transfectadas en las células originando las líneas MKL1 Δ C301 y MKL1 Δ N200 fueron diseñadas de forma de expresarse fusionadas a un FLAG-tag. Esta característica fue utilizada para corroborar la identidad de las líneas celulares previo a la realización de los distintos experimentos (previamente descrito en mi tesis de grado). Con el apoyo de la Unidad de Biología Celular (UBC) del Instituto Pasteur de Montevideo, contamos con un banco maestro y un banco de trabajo de dichas células, ambos realizados en el momento en que fueron recibidas las células.

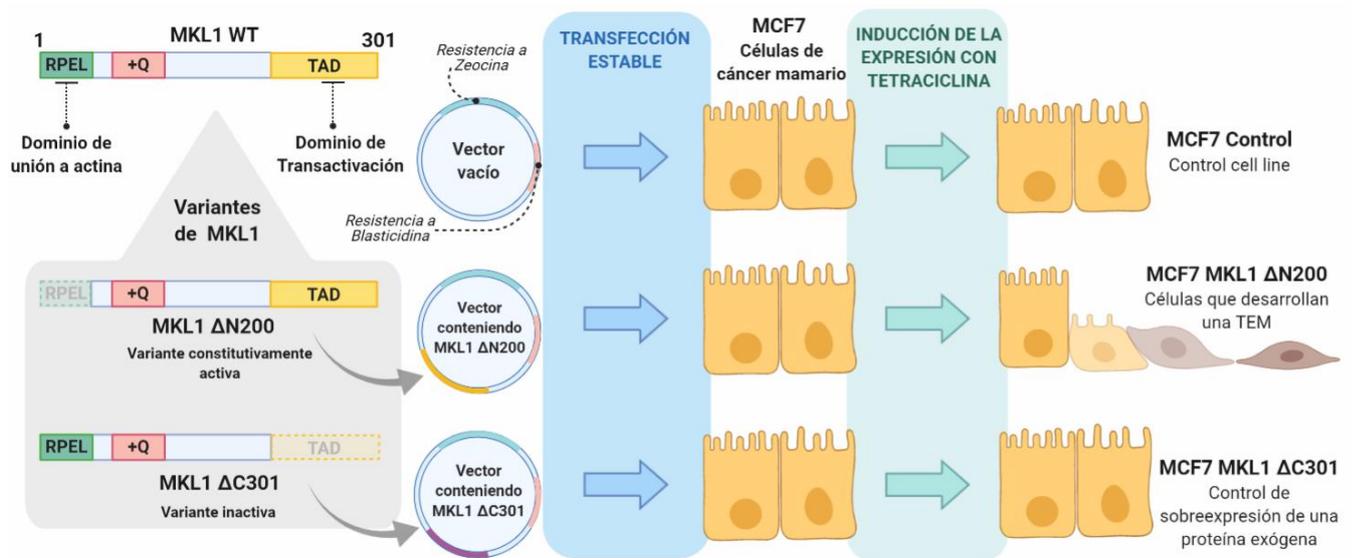


Figura 17. Modelo celular de transición epitelio-mesenquimal

Modelo celular de transición epitelio-mesenquimal desarrollado por el Prof. Flouriot y colaboradores (Huet et al., 2009). Se muestran las distintas variantes de MKL1 transfectadas de forma estable en células MCF7 utilizando un vector conteniendo un promotor inducible por tetraciclina. Luego de la inducción se muestran los distintos fenotipos adquiridos por las células.

3.2. Medios de cultivo para las líneas celulares

3.2.1. Medio de mantenimiento

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Gibco™ GlutaMAX™ con rojo fenol, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) sin tetraciclina y con los antibióticos de selección Zeocina (Invitrogen), concentración final $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ y Blastidina (Invivogen), concentración final $5 \mu\text{g}/\text{mL}$.

3.2.2 Medio de inducción para la expresión de las variantes de MKL1

DMEM sin rojo fenol, suplementado con 2,5% de SFB charcoal-stripped, 1% de piruvato y 1% de L-glutamina. Se le agrega tetraciclina en una concentración final de $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ para inducir la diferenciación celular. El suero charcoal-stripped se encuentra libre de componentes lipídicos incluyendo hormonas, retinoides y ácidos grasos ligandos de receptores nucleares. Es necesario utilizar este suero en el medio de inducción para que estos compuestos no induzcan cambios en el ER α .



3.3. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en los distintos ensayos con sus características y las diluciones respectivas se describen en la siguiente tabla.

Tabla 1. Anticuerpos

Se detallan algunas características de los anticuerpos, así como las diluciones utilizadas.

	Anticuerpos	Fabricante	Código	Origen	Características	Dilución
Primarios	Anti-ER α (HC-20)	Lab. Sta Cruz	SC-543	Ratón	Policlonal	1:500
	Anti- α -tubulina		AA4.3	Ratón	Monoclonal	1:800
Secundarios	Anti-IgG de ratón	Promega	W4021	Cabra	Conjugado a HRP	1:2000
	Anti-IgG de conejo	Promega	W4011	Cabra	Conjugado a HRP	1:2000

3.4. Materiales para los microarreglos de ARNt

3.4.1 Sondas complementarias a los ARNt

En la tabla a continuación se muestran las sondas que fueron implantadas en los chips de microarreglos (vidrios que se colocan en los equipos para la hibridación de los ARNt), complementarias a las secuencias de los ARNt humanos. Dichas sondas fueron diseñadas por el grupo de la Prof. Zoya Ignatova en la Universidad de Hamburgo. Estas sondas fueron diseñadas de tal forma de lograr individualizar la mayor cantidad de ARNt posibles. Sin embargo, no fue posible individualizar aquellos isoaceptores (ARNt que cargan el mismo aminoácido) que difieren en menos de ocho nucleótidos en sus secuencias (se marcan con un asterisco en la Tabla 2).



Tabla 2. Sondas complementarias a los ARNt humanos.

K = G/T; M = A/C; R = G/A; S = G/C; W = A/T; Y = T/C; B = G/T/C; D = G/A/T; H = A/T/C; V = G/A/C; N = G/A/T/C

ARNt	Sonda	Secuencia de la sonda complementaria a los ARNt humanos en sentido 5'-3'
Ala-hGC*	Ala1h	TGGAGAATGYGGGCGTCGATCCCRCTACCTCTYGCATGCTAAGCRAGCGCTCTACCRCTGAGCTAATTCCCC
Ala-IGC*	Ala2h	TGGAGRTGCCGGGATYGAACCCGGRCCTCRTRCATGCSAAGCAYGCGCTCTACCACTGAGCTACAYCCCC
Arg-ICG	Arg1h	CGAGCCAGCCAGGAGTGAACCTRGAATCTTCTGATCCGTAGTCAGACGCGTTATCCATTGCGCCACTGGCCC
Arg-yCG*	Arg2h	CAACCACGRAGGGACTCGAACCCCTCAATCTTCTGATCCGRARTCAGACGCGTTATCCATTAGGCCACGCGGCC
Arg-CCT	Arg3h	TACCCAGGTGGGACTCGAACCCACAATCCCTGGCTTAGGAGGCCAGTGCCTTATCCATTAGGCCACTGGGGC
Arg-TCT	Arg4h	CGACTCTGCGGGACTCGAACCCGWAACCTTTGAATTAGAAGTCCAATGCGCTATCCATTGCGCCACAGAGCC
Asn-GTT	Asn1h	CGTCCCTGGGTGGGCTCGAACCCCAACCTTTCGGTTAACAGCCGAACGCGCTAACCGATTGCGCCACAGAGAC
Asp-GTC	Asp1h	CTCCCCGTCGGGAATCGAACCCCGTCTCCCGCTGACAGCGGGGATACTCACCCTATACTAACGAGGA
Cys-GCA	Cys1h	AGGGGACACCYGGATTGAACCRGGGACCTCTTGATCTGCAGTCAAATGCTCTACCMCTGAGCTATAACCCC
Gln-yTG*	Gln1h	AGGTTCCACCAGAYTTGAATCGGATCGTGGATTTCARAGTCCAGAGTGCTHACCATTACACCATGGRACC
Glu-yTC*	Glu1h	TTCCCTGACCGGAATCGAACCCGGGCCWMGGCGGTGARAGCGCGAATCCTARCCACTAGACCACAGGGR
Glu-TTC	Glu2h	TTCCAYACCGGGAGTTCGAACCCGGGCCRCCTGGGTGAAAACAGGAATCCTAACCGCTAGACCATRTGGGA
Gly-sCC*	Gly1h	TGCATTGGCCRGGAAATYGAACCCGGGYCTCCRCGTGGWAGGCGAGAATCTACCACTGMACCACCMAYGC
Gly-TCC	Gly2h	TGCGTTGGCCGGGAATCGAACCCGGGTCAACTGCTTGAAGGAGTATGCTCACCCTATAACCACCAACGC
His-GTG	His1h	TGCCGTGACTCGGATTCGAACCGAGTTGCTGCGGCCACAACGAGAGTACTAACCACTATACGATCACGGC
Ile-AAT	Ile1h	TGGCCMGTACGGGGATCGAACCCGGGACCTTGGCGTTATTAGCACCAGCTTAACCAACTGAGCTAACRRGCC
Ile-TAT	Ile2h	TGCTCCAGGTGAGGMTCGAACTCACAACCTCGGCATTATAAGTACCGCGCTAACCGATTGCGCCACTGGAGC
Leu-wAG*	Leu1h	TGGCAGYGGTGGGATTCRAACCCACGCCYCCGAARAGACTGGAGCCTTAATCCAGCGCCTTAGACCRCTCGGCCACRCTA
Leu-CAG	Leu2h	TGTCARAAGTGGGATTCGAACCCACGCCTCCAGWGGAGGWTCGATTGAACGCAGCGCCTTAAGACYGCTCGGCCATCC
Leu-CAA	Leu3h	TGTCAGAAGTGGGATTCGAACCCACGCCTCCATTGGAGACCAGAATTCGATCTGGCGCCTTAGACCCTCGGCCATCC
Leu-TAA1	Leu4h	TACCRGGAGTGGGGYTCGAACCCACGGGACAYCSGTCCATTGGATCTTAAGTCCAACGCCTTAACCACTCRGCCATCC
Leu-TAA2	Leu6h	TGTTAAKRAGAGGAGTTGAACCTCTGATTATAAARTTTTAAAGTYTTATGCAATTRCCRRGGCTCTGCCATCTTAAC
Lys-CTT	Lys1h	CGCCCAACGTGGGGCTCGAACCCACGACCTGAGATTAAGAGTCTCATGCTCTACCGACTGAGCTAGCCGGGC
Lys-TTT1	Lys2h	CGCCYGAACAGGGACTTGAACCCCTGGACCCTCAGATTAAAAGTCTGATGCTCTACCRCTGAGCTATCCRGGC
Lys-TTT2	Lys3h	CACCCAAAAGGGACATGAACCTTGGACCCTCAGATTAAAAGTCTGATGCTCTACTGACTGAGCTATCTGGGT
Lys-TTT3	Lys4h	CGCTGGACAGGGACTTGAACCCCTAGACCCTCAGATTAAAAGTCTGATGTTCTACTACTGAGCTACCCAGGT
Met-i	Met1h	TAGCAGAGGATGGTTTCGATCCATCGACCTCTGGGTATGGGCCAGCAGCCTCCGCTGCGCCACTCTGCT
Met-e	Met2h	TGCCCCTCTGAGGCTCGAACTCAGGACCTTCAGATTATGAGACTGACGCGCTGCCHRCTGCGCTAAGRRGGC
Phe-GAA	Phe1h	TGCGYAAACCCGGGATYGAACCCAGGGACCTTTAGATCTTCAGTCTAACGCTCTCCCAACTGAGCTATTTCCGC
Pro-hGG*	Pro1h	GGGCTCGTCCGGGATTTGAACCCGGGACCTCTCGCACCCDAAGCGAGAATCATACCCCTAGACCAACGAGCC
Ser-CGA	Ser1h	GCTGTGAGCAGGATTTGAACCTGCGCGGGGARACCCCAATTGGATTTTCGAGTCCAACGCCTTAACCACTCGGCCATCACAG
Ser-wGA*	Ser2h	GTAGYCGGCAGGATTCGAACCTGCGCGGGGARACCCCAATGGATTTCSAGTCCATCGCCTTAACCACTCGGCCACGACTA
Ser-GCT	Ser3h	GACGAGGRTGGGATTCGAACCCACGYGTGCAGAGCACAAATGGATTAGCAGTCCATCGCCTTAACCACTCGGCCACCTCGT
Thr-mGT*	Thr1h	AGGCCCCRCTGGGAKTCGAACCCAGGATCTCTGTTTACKAGACAGGCGCTTAACCARCTAAGCCAYRGNCC
Thr-TGT	Thr2h	AGGCCCCAGGAGATTYGAATCGCGACCCCTGGTTTACAAGACCAGTGCCTAACCMCTGAGCTATGGAGCC
Thr-CGT	Thr5h	AGGCACGGACGGGTTTCGAACCCGYGATCTTCGGTTTACGAGACCGACGCTTACCACTTGGCCACCGCGCC
Trp-CCA	Trp1h	TGACCCGACGTGATTTGAACACGCAACCTTCTGATCTGGAGTCAGACGCGCTACCGTTGCGCCACGAGGTC
Tyr-GTA	Tyr2h	TCCTTCGAGCCGASTCGAACCCAGCGACCTAAGGATCTACAGTCTCCGCTCTACCARCTGAGCTATCGAAGG
Val-mAC*	Val1h	TGTTTCYGCCYGGTTTCGAACCRGGGACCTTTCGGTGTGKAGGCGAACGTGATAACCACTACACTACRGAAC
Val-TAC	Val4h	TGGTTCCACTGGGGCTCGAACCCAGGACCTTCTGCGTGTAAAGCAGACGTGATAACCACTACACTATGGAACC

3.4.2. Oligonucleótidos marcados con fluoróforos (Atto y Cy3):

Los ARNt fueron marcados con oligonucleótidos híbridos de ADN-ARN los cuales fueron previamente marcados con los fluoróforos Cy3 (532 nm) y Atto (635 nm). Estos oligonucleótidos híbridos marcados con una molécula fluorescente se unen al extremo 3' libre de cada ARNt gracias a la propiedad de la ADN ligasa T4 que une dos extremos ARN cuando estos se encuentran apareados a una cadena de ADN (ver Figura 19B) (Dittmar et al., 2006). La secuencia de estos híbridos de ARN:ADN se muestra a continuación:

5' pC G C A C U G C dT dT X dT dT dG dC dA dG dT dG dC dG dT dG dG dN

X = dT marcado con fluoróforo Cy3 o Atto

Los oligonucleótidos fueron comprados liofilizados. Se resuspendieron en agua hasta una concentración de 90 µM y se conservaron alicuotados a -80°C y en la oscuridad.

3.4.3. Estándares de ARNt

En la tabla a continuación se muestran las sondas que fueron implantadas en los chips de microarreglos, complementarias a las secuencias de los estándares de ARNt no humanos utilizados como control interno para normalizar las intensidades de fluorescencia

En la tabla 4 se muestran las secuencias de los estándares de ARNt, así como los cebadores “forward” y “reverse” para sintetizarlos.

Tabla 3. Sondas complementarias a los estándares de ARNt

Nombre	Secuencia de la sonda complementaria a los estándares de ARNt en sentido 5'-3'
E. Coli Lys-2	TGGGTCGTGCAGGATTCGAACCTGCGACCAATTGATTAAGTCAACTGCTCTACCAACTGAGCTAACGACCC
E. Coli Tyr-2	TGGGGGAAGGATTCGAACCTTCGAAGTCGATGACGGCAGATTTACAGTCTGCTCCCTTTGGCCGCTCGGGAACCCACC
Levadura Phe-3	TGCGAATTCTGTGGATCGAACACAGGACCTCCAGATCTTCAGTCTGGCGCTCTCCCAACTGAGCTAAATCCGC
Levadura Ala-5	TGGACGAGTCCGGAATCGAACCCGAGACCTCTCCCATGCTAAGGGAGCGCGCTACCGACTACGCCACACGCCC



Tabla 4. Secuencia de los estándares de ARNt y sus cebadores.

En azul se muestra la secuencia del cebador "forward" y subrayado se muestra la secuencia del cebador "reverse"

Estándares de ARNt y sus cebadores (sentido 5'-3')

E. Coli Lys-2

TAATACGACTCACTATAGGGTCGTTAGCTCAGTTGGTAGAGCAGTTGACTTTTAAATCAATTGGTCGCAGGTTCGAATCCTGCAGGACCAcca

Forward TAATACGACTCACTATAGGGTCGTTAGCTCAGTTGGTAGAGCAGTTGACTTTTAAATCA

Reverse GTAGAGCAGTTGACTTTTAAATCAATTGGTCGCAGGTTCGAATCCTGCAGGACCAcca

E. Coli Tyr-2

TAATACGACTCACTATAGGTGGGGTTCCCGAGCGGCCAAAGGGAGCAGACTGTAAATCTGCGGTCATCGACTTCGAAGGTTCGAATCCTTCCCCACCAcca

Forward TAATACGACTCACTATAGGTGGGGTTC

Reverse GGAGCAGACTGTAAATCTGCCGTCATCGACTTCGAAGGTTCGAATCCTTCCCCACCAcca

Levadura Phe-3

TAATACGACTCACTATAGCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAGATCTGGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCAcca

Forward TAATACGACTCACTATAGCGGATTTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCAGACTGAAGATC

Reverse GCGCCAGACTGAAGATCTGGAGGTCCTGTGTTTCGATCCACAGAATTCGCAcca

Levadura Ala-5

TAATACGACTCACTATAGGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTTCCGGTTCGATTCCGGACTCGTCCAcca

Forward TAATACGACTCACTATAGGGCGTGTGGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCAT

Reverse CGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTTCCGGTTCGATTCCGGACTCGTCCAcca



4. MÉTODOS

4.1. Proteólisis limitada en células permeabilizadas

La proteólisis limitada en células permeabilizadas permite analizar la accesibilidad diferencial de distintas proteasas a las proteínas en su conformación natural, mediante el seguimiento de los perfiles de degradación por western blot (WB). Una de las proteasas comúnmente usadas en estos ensayos es la α -Quimotripsina (E.C.3.4.21.1, de ahora en más “Qt”). Esta proteasa hidroliza los enlaces peptídicos contiguos a los aminoácidos aromáticos: tirosina, triptófano o fenilalanina, y con menor frecuencia luego de leucina o metionina. El perfil de péptidos generado es consecuencia de los diferentes sitios de corte a los que accede la proteasa, reflejando un estado de plegamiento determinado. Cuando una proteína cambia su conformación o su acervo de modificaciones postraduccionales, los sitios de corte a los que accede la proteasa podrían verse alterados, generando un perfil de degradación diferente. Para estudiar posibles diferencias conformacionales en el ER α llevamos a cabo ensayos de proteólisis limitada a partir de los cultivos de las tres líneas celulares. El protocolo fue adaptado a partir de lo descrito por Kirchner et al., 2017 y se esquematiza en la Figura 18.

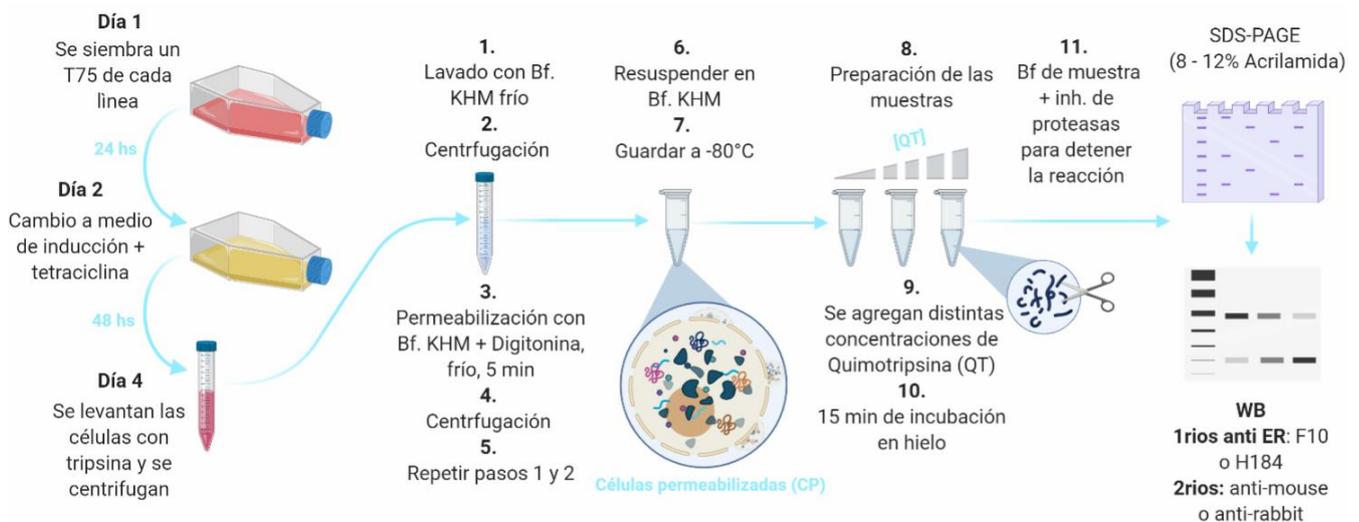


Figura 18. Esquema del protocolo de proteólisis limitada en células permeabilizadas

Se esquematiza de forma general los distintos pasos del protocolo.

Se comienza sembrando una botella de cultivo T75 con 2×10^6 células de cada línea celular (de tal forma que al Día 4 se alcance una confluencia levemente por encima del 80%). Al día siguiente (Día 2), se retira el medio de mantenimiento de todas las botellas y se agregan 3 mL de PBS 1X (ver sección 9.5). Se agita suavemente para lavar los restos de medio de mantenimiento y a continuación se agregan 13 mL de medio de inducción en cada botella. Luego de 48 horas de incubación en el medio de inducción (con o sin tetraciclina), se retira el medio de todas las botellas, se hace un lavado rápido con 3 mL de PBS 1X, se levantan las células con 1,5 mL de tripsina 1X. Luego se neutraliza la tripsina con 3 mL de medio de mantenimiento y se transfiere la suspensión celular a un tubo cónico de 15 mL. Posteriormente se centrifuga a 200 g por 5 minutos a 4°C y se descarta el sobrenadante. A continuación, se realiza la permeabilización de las membranas celulares de la siguiente forma. Se resuspenden las células en 5 mL de buffer KHM (ver sección 9.5) previamente enfriado en hielo. Se repite el paso de centrifugación y se descarta el sobrenadante. Luego se resuspenden las células en 6 mL de buffer KHM conteniendo Digitonina en una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ver sección 9.5), también previamente enfriado en hielo, y se incuba por exactamente 5 minutos en hielo. Luego de este tiempo, se frena la permeabilización añadiendo 8 mL de buffer KHM sin Digitonina y se repite el paso de centrifugación. Antes de finalizar, se realiza un lavado resuspendiendo las células en 5 mL de buffer KHM y se repite la centrifugación por última vez. Finalmente, se resuspenden las células permeabilizadas (CP) en 410 μL de buffer KHM, se transfieren 200 μL a dos tubos de microcentrifuga y 10 μL a un tercer tubo y se guardan los 3 tubos de cada línea a -80°C por al menos 24 horas.

Previo a la preparación de las muestras para la proteólisis, se descongelan las alícuotas que contienen los 10 μL de suspensión de CP de cada línea, a las que inmediatamente se le agregan inhibidores de proteasas y se determina la concentración de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico (BCA, ver sección 4.2).



Una vez determinada la concentración de proteínas, se descongela una de las alícuotas que contiene 200 μL de suspensión de CP de la línea de interés (MCF7 MKL1 $\Delta\text{N}200$ o MCF7 MKL1 $\Delta\text{C}301$) y una alícuota de la línea MCF7 control, además de una alícuota de Quimotripsina stock (Qt, ver sección 9.5). Teniendo en cuenta la concentración de proteínas determinada anteriormente, se coloca un volumen de CP correspondiente a 5-10 μg de proteínas en una serie de tubos de microcentrífuga (el número de tubos dependerá del rango de concentraciones de Qt que se utilizará en cada caso). Se realizan los cálculos necesarios para determinar cuánto agregar de Qt a cada tubo para lograr un rango de concentraciones entre 0 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cuánto se debe añadir de buffer KHM para obtener dichas concentraciones para un volumen final de 40 μL . De esta forma, primero se agrega el volumen de buffer KHM correspondiente en cada tubo, los cuales ya contienen las CP. Una vez agregado las CP y el volumen de buffer KHM correspondiente, se agrega en paralelo, es decir, al mismo tiempo, el volumen de Qt correspondiente a cada tubo en la muestra de la línea de interés y en la muestra de la línea control. Se incuba por 15 minutos en hielo y se detiene la proteólisis agregando el volumen correspondiente de buffer de muestra 6X (ver sección 9.5), suplementado previamente con inhibidores de proteasas 25X. Se calientan las muestras a 37°C por 10 minutos y se centrifuga a 16000 g por 5 minutos a 4°C para precipitar los restos celulares. Se le agrega un volumen DNAsal (Thermo) correspondiente a 5 unidades y se incuba por 15 minutos a 37°C.

Los péptidos resultantes son analizados por SDS-PAGE y WB. Se realiza una SDS-PAGE en gel discontinuo de 8 a 12% de poliacrilamida (ver en cada caso) cargando también un marcador de peso molecular preteñido (ver sección 9.6). Se ensambla el dispositivo para electroforesis de BioRad y se completa la cuba de electroforesis con buffer de corrida (ver sección 9.5), se cierra el dispositivo para la electroforesis y se corre a 90 V hasta que el frente de corrida llega a la interfaz entre el gel concentrador y el gel

separador, en este punto se aumenta el voltaje a 160 V y se deja migrar hasta que la banda de 36 kDa del marcador eluye del gel. Se desarma el dispositivo de electroforesis y se monta el gel junto con una membrana de nitrocelulosa en el *cassette* que se utiliza para realizar la transferencia de las proteínas a la membrana, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (BioRad). La transferencia se realiza en el buffer de transferencia (ver sección 9.5) refrigerado (para evitar el calentamiento del buffer) a 400 mA por una hora. Se retira la membrana del dispositivo con la ayuda de unas pinzas y se la incuba en solución de bloqueo (ver Anexo) toda la noche a 4°C. Se retira la solución de bloqueo, se hace un lavado rápido con TBST (ver sección 9.5) y se incuba con el la dilución del anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo al 1% (ver sección 3.3) a temperatura ambiente, con agitación a 200 rpm por una hora. Se retira el anticuerpo primario y se realizan varios lavados con TBST (un total de 30 minutos de lavados). Luego, se incuba la membrana con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo dependiendo del anticuerpo primario que fue utilizado, ver sección 3.3) por una hora a temperatura ambiente y con agitación a 200 rpm. Se retira el anticuerpo secundario y se repiten los lavados con TBST.

Finalmente se visualiza por quimioluminiscencia incubando la membrana con el reactivo ECL (Thermo) durante un minuto y colocándola en el G-Box (Syngene) para su detección.

4.2. Dosificación de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas por el método del ácido bicinconínico (BCA, Pierce). Se utiliza como estándar una serie de 8 diluciones de seroalbúmina bovina (BSA) de concentración conocida (1.0, 0.75, 0.50, 0.37, 0.25, 0.12 0.06, 0.012 mg/mL). La determinación de cada medida se realizó en placa de ELISA utilizando 10 µL de muestra y agregando en cada pocillo 200 µL de una solución de reacción que contiene 49 partes de ácido

bicinconínico y una parte de sulfato de sodio. Cada medida se realiza por triplicado siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se incuba la placa con las muestras durante 30 minutos a 37°C hasta desarrollar color y se mide la absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Labsystems Multiscan). Se realiza la curva de calibración y en base a la ecuación de la recta y a la absorbancia de las muestras se determina la concentración proteica.

4.3. Análisis semicuantitativo por densitometría

Las imágenes obtenidas de la degradación del ER α a través de los ensayos de WB fueron procesadas utilizando el software Image J para calcular la intensidad de las bandas obtenidas en las membranas. Para ello, se genera una selección rectangular de un tamaño tal que abarque la región central de una de las bandas al azar. A partir de esta selección rectangular, la cual debe mantenerse siempre del mismo tamaño dentro de un mismo análisis, se utiliza la variable densidad integrada como aproximación para cuantificar la intensidad de cada banda. También se mide una sección de la membrana dónde no haya bandas para utilizar como “blanco”.

4.4. Microarreglos de ARNt

Esta estrategia se basa en la hibridación de los ARNt con sondas complementarias a sus secuencias y el uso de oligonucleótidos marcados que se unen a los extremos 3' de los mismos. Pan y colaboradores fueron los primeros en aplicar esta tecnología para la cuantificación del ARNt. Estos investigadores diseñaron chips de microarreglos para cuantificar ARNt de diferentes especies, como *B. subtilis*, *E. coli* y *H. sapiens* (Dittmar et al., 2006, 2005, 2004). En primer lugar, se marcan todos los ARNt aprovechando la secuencia CCA común en el extremo 3' de todos los ARNt mediante la unión de un oligonucleótido previamente marcado con un

fluoróforo de forma complementaria a este extremo CCA-3'. En una segunda instancia se lleva a cabo la hibridación de los ARNt con las sondas diseñadas de forma complementaria a las secuencias de los ARNt, las cuales fueron sintetizadas y adheridas sobre una superficie (de vidrio generalmente, de ahora en adelante la llamaremos como "slide") sobre la cual luego se agrega la muestra para determinar los niveles de ARNt. Dichas sondas se distribuyen a lo largo del slide de tal manera que se pueden cuantificar simultáneamente varios ARNt. Una de las grandes limitaciones de esta técnica es que sólo permite distinguir ARNt que difieren en al menos ocho nucleótidos, lo que imposibilita el reconocimiento de muchos isodecodificadores, incluso presentando problemas para resolver algunos isoaceptores. Más recientemente, un método mejorado también desarrollado por Pan y colaboradores, permitió la detección de isoaceptores de ARNt con una resolución de un solo nucleótido (Pavon-Eternod et al., 2009). Sin embargo, solo detecta diferencias de un nucleótido cuando las mismas se dan en el bucle del anticodón, lo que no permite la discriminación de isodecodificadores que difieren en un nucleótido en otra parte del ARNt.

Los procedimientos para determinar la abundancia y el porcentaje de aminoacilación de las poblaciones de ARNt en las tres líneas celulares fueron adaptados a partir de lo descrito en Polte et al., 2019 y se esquematizan en la Figura 19A. El protocolo detallado es de acceso público [[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.hfcb3iw](https://doi.org/10.17504/protocols.io.hfcb3iw)].

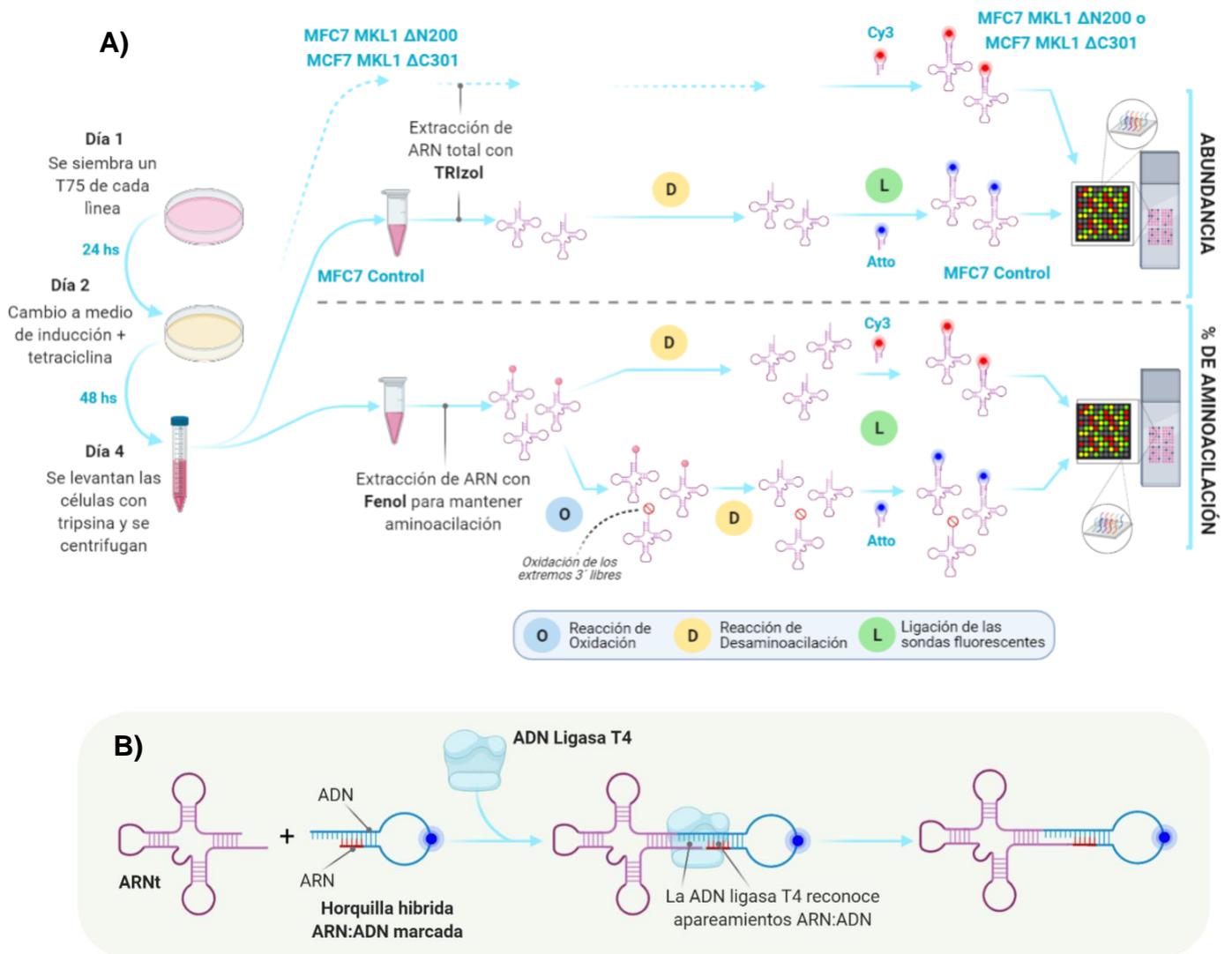


Figura 19. Esquema del protocolo de microarreglos de ARNt

A) Se esquematiza de forma general los distintos pasos del protocolo para determinar la abundancia de los ARNt y por otro lado el porcentaje de aminoacilación de los mismos. El protocolo de para determinar el porcentaje de aminoacilación es exactamente igual para las tres líneas celulares. El protocolo para determinar la abundancia varía en el paso de ligación. **B)** Se detalla el proceso de ligación. Se ligan las horquillas híbridas de ARN:ADN marcadas con el fluoróforo a los ARNt desaminoacilados usando la ADN ligasa T4 (NEB) durante 1 hora a temperatura ambiente. Este proceso de ligación del extremo 3' del ARNt con el extremo 5' ARN de la horquilla se lleva a cabo aprovechando la propiedad de la ADN ligasa T4 que une dos extremos ARN cuando estos se encuentran apareados a una cadena de ADN.

Se siembra una placa de cultivo de 10 cm de diámetro con $2,5 \times 10^6$ células de cada línea celular. A las 24 horas se realiza el cambio de medio para

inducir la expresión de las variantes de MKL1 con tetraciclina. Luego de 48 horas de incubación con el medio de inducción, se retira el medio de las placas, se hace un lavado con 3 mL de PBS 1X, se levantan las células con 1,5 mL de tripsina 1X, luego se neutraliza la tripsina con 3 mL de medio de mantenimiento y se transfiere la suspensión celular a un tubo cónico de 15 mL. Se centrifuga a 200 g por 5 minutos y se resuspende el precipitado de células en 2,5 mL de medio de mantenimiento. La suspensión celular resultante se divide en dos partes.

Por un lado, para determinar la abundancia relativa de las distintas poblaciones de ARNt, a partir de una de las suspensiones celulares, se realiza una extracción de ARN con TRIzol de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Ambion). Se evalúa la integridad del ARN mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida al 10%, 8 M Urea y a su vez se cuantifica la concentración de ARN en las muestras utilizando el NanoDrop (Thermo). Para asegurarse que los ARNt se encuentran completamente desaminoacilados, se incuban 10 µg de ARN total de cada línea en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 9,0 durante 45 minutos a 37°C (Walker and Fredrick*, 2008). Durante este paso de desaminoacilación se agregan a cada muestra 2 µM de cada uno de los cuatro estándares de ARNt (ver sección 3.4.3), los cuales son previamente sintetizados por transcripción *in vitro* y purificados a partir de un gel de poliacrilamida. Estos estándares de ARNt no hibridan con las secuencias de ARNt humanas y funcionan como un control interno del proceso para la posterior normalización de los resultados. Una vez realizado este paso, se vuelve a purificar el ARN mediante precipitación un volumen de una solución de NaOAc 100 mM, pH 4,8; NaCl 100 mM, glucógeno 20 mg/mL, y 2,7 volúmenes de etanol. A continuación, se lleva a cabo la ligación de las sondas fluorescentes (ver sección 3.4.2) a los ARNt. Se ligan las horquillas híbridas de ARN:ADN marcadas con el fluoróforo a los ARNt desaminoacilados usando la ADN ligasa T4 (NEB) durante 1 hora a temperatura ambiente. Este proceso de ligación del extremo 3' del ARNt con el extremo 5' ARN de la horquilla se



lleva a cabo aprovechando la propiedad de la ADN ligasa T4 que une dos extremos ARN cuando estos se encuentran apareados a una cadena de ADN (Figura 19B) (Dittmar et al., 2006). Es importante destacar que, para el caso de la determinación de las abundancias, los ARNt de las células de MCF7 Control se ligan a las sondas marcadas con Atto647, mientras que los ARNt de las otras dos líneas celulares se ligan a las sondas marcadas con Cy3. Una vez realizada la ligación de las sondas a los ARNt se realiza nuevamente un paso de purificación usando fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Roth) y se precipitan con etanol. Se analiza la eficacia de la ligación mediante una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 10%, y se analizan las señales fluorescentes utilizando el ChemiDoc XRS+ de BioRad y se compara con el ARNt sin ligar luego de teñir el mismo gel con SYBR gold (Invitrogen). Finalmente, se colocan a hibridar en dos chips de microarreglos independientes, por un lado 2 µg de ARNt de la línea MCF7 MKL1 ΔN200 junto con 2 µg de ARNt de la línea MCF7 control y por otro lado 2 µg de ARNt de la línea MCF7 MKL1 ΔC301 junto con 2 µg de ARNt de la línea MCF7 control durante 16 horas a 60°C en el buffer de solución salina-citrato de sodio 6X (SSC; ver sección 9.5). Después de lavar los chips de microarreglos en buffer SSC 2X a 35°C y luego en buffer SSC 0,2X a 30°C, se registra la intensidad de fluorescencia con un escáner GenPIX 4200A (Molecular Devices). Cada chip de microarreglo contiene 12 bloques idénticos, con dos réplicas de cada tDNA por bloque (24 réplicas en total), incluidos los 4 estándares por bloque. Se evaluaron dos réplicas biológicas para cada matriz de modo que se analizaron 48 puntos para cada especie de ARNt.

Los resultados de la medición de fluorescencia se analizaron utilizando algoritmos desarrollados por Polte et al., 2019. Para ello, la mediana de la proporción de señales Cy3/Atto647 se normaliza respecto a los estándares, que estaban presentes en proporciones equimolares en las muestras marcadas con Atto653 y Cy3 en cada matriz y su proporción de intensidad de fluorescencia se estableció en 1.

Para determinar el porcentaje de aminoacilación, se extrae el ARN de las células con fenol ácido pH 4,5 (el pH bajo conserva el grupo aminoacilo en los ARNt). Cada muestra se divide en dos alícuotas. Una alícuota se somete a un tratamiento con periodato, el cual oxida los extremos 3' de los ARNt libres de aminoácidos, lo cual impide la ligación posterior a la sonda fluorescente. En estos casos, luego de la desaminoacilación a pH alcalino, sólo los ARNt que estaban cargados con aminoácidos fueron protegidos de la reacción de oxidación con el periodato y lograrán unirse a las sondas fluorescentes. Estos ARNt son ligados con la sonda marcada con Atto653 y dicha fracción se designa como fracción de ARNt cargados. La segunda alícuota se desaminoacila completamente como se describe anteriormente, (sin el tratamiento previo con periodato) y se liga a la sonda marcada con Cy3, denominando a esta fracción como ARNt total. En cada matriz, se cargan los ARNt marcados con Atto647 y los ARNt total marcados con Cy3 y se lleva a cabo la hibridación como se mencionó anteriormente.

4.5. Metabolómica

Nos propusimos estudiar el estado metabólico de las células mediante dos aproximaciones. Por un lado, se analizaron los niveles de expresión de las enzimas de las principales rutas metabólicas mediante transcriptómica y traductómica, llevado a cabo por la T. Fernández-Calero. Por otro lado, desarrollamos un análisis metabólico para determinar si la concentración de los sustratos y los productos de estas vías seguía el mismo comportamiento que lo observado en los estudios de expresión. Para este último estudio, se realizó la preparación de las muestras a partir de los cultivos celulares, a partir de las cuales se determinó la concentración de los metabolitos que se detalla más adelante, utilizando la plataforma de espectrometría de masa del departamento de Biología

Molecular de Sistemas del Centro Helmholtz de Investigación Ambiental (UFZ, Leipzig, Alemania), a través de un servicio.

Para la preparación de las muestras, se siguió el protocolo descrito previamente por el Dr. Martin von Bergen y colaboradores (Baumann et al., 2013), del Centro Helmholtz de Investigación Ambiental (UFZ, Leipzig, Alemania), esquematizado en la Figura 20.

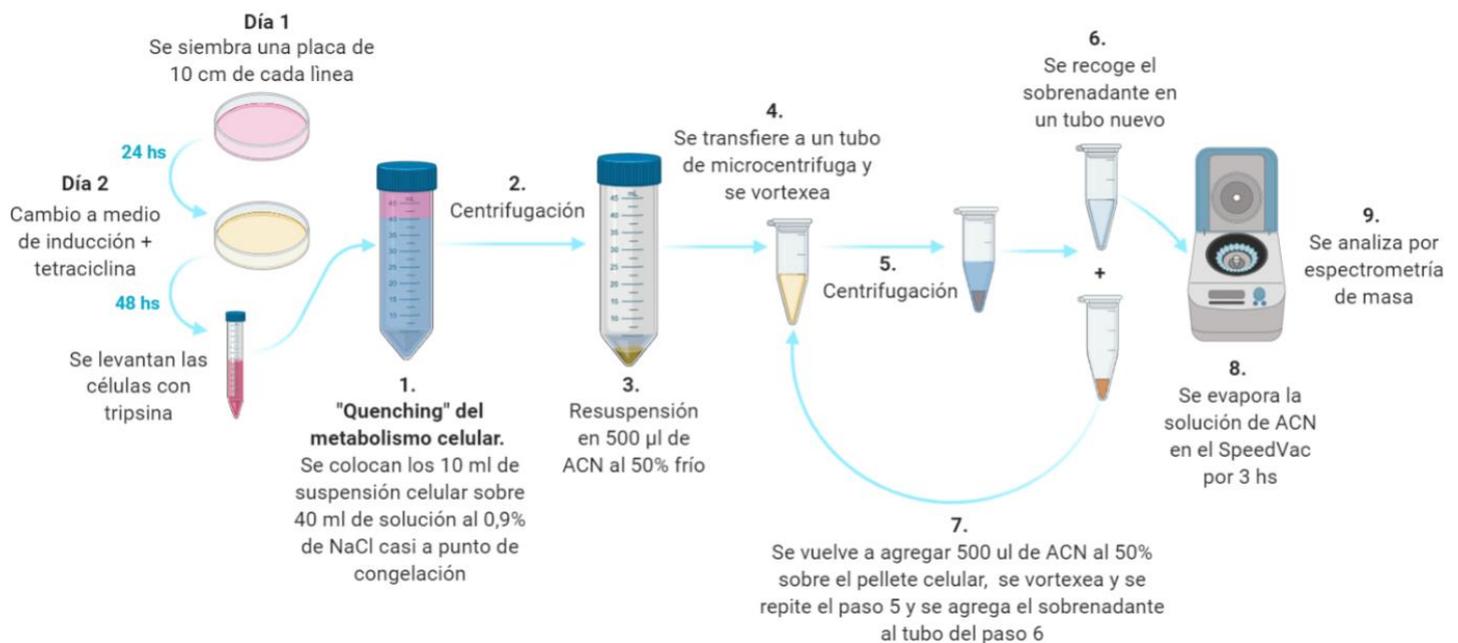


Figura 20. Esquema del protocolo para la preparación de muestras para la metabolómica

Se esquematiza de forma general los distintos pasos del protocolo.

Se siembra una placa de cultivo de 10 cm de diámetro con $2,5 \times 10^6$ células de cada línea celular. A las 24 horas se realiza el cambio de medio para inducir la expresión de las variantes de MKL1 con tetraciclina. Luego de 48 horas de incubación con el medio de inducción, se retira el medio de las placas, se hace un lavado con 3 mL de PBS 1X, se levantan las células con 3 mL de tripsina y se agrega 7 mL de medio de mantenimiento para inactivar la tripsina. Se toma una alícuota para hacer el recuento de células y de forma inmediata se transfieren los 10 mL de suspensión celular a un tubo cónico de 50 mL conteniendo 40 mL de una solución al 0,9% de NaCl

previamente enfriada casi al punto de congelación. El paso anterior se denomina “Quenching” y permite frenar el metabolismo celular de manera eficiente, minimizando así la pérdida de metabolitos intracelulares (Dietmair et al., 2010). A su vez, este paso también permite eliminar los metabolitos extracelulares presentes en el medio de cultivo. Luego de agregar la suspensión celular a la solución de NaCl, se realiza un paso de centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos para bajar las células. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado de células en 500 μ L de una solución al 50% de Acetonitrilo (ACN) previamente enfriado. Se transfiere la suspensión a un tubo de microcentrífuga y se agita por 1 minuto a máxima velocidad y posteriormente se centrifuga nuevamente a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. Esta vez, el sobrenadante se transfiere a otro tubo de microcentrífuga y se mantiene en hielo. Se repite el procedimiento anterior, agregando nuevamente 500 μ L de la solución de ACN al precipitado celular, se agita, se centrifuga y se recupera el sobrenadante el cual se añade al tubo con el sobrenadante obtenido anteriormente. Finalmente se lleva a cabo la evaporación de la solución de ACN mediante una centrifugación en vacío utilizando el SpeedVac a máxima velocidad por 3 horas.

Los tubos de microcentrífuga secos conteniendo los metabolitos se guardan a -80°C hasta ser enviados a la plataforma para su análisis. Para el análisis de los metabolitos por espectrometría de masa (HPLC-Qtrap), se resuspenden las muestras en 100 μ L de agua ultrapura y se introducen en el equipo para realizar una cromatografía líquida y una fragmentación iónica y posterior medición de las relaciones de masa/carga de las partículas para su identificación. Para la cuantificación se utilizó una serie de estándares. Las condiciones utilizadas en la cromatografía fueron:

Solvente A: Tributilamina (TBA) 10 mM, ácido acético 10 mM, 5% metanol, 2% isopropanol.

Solvente B: Isopropanol

Utilizando el software Analyst se realizó la cuantificación relativa de los siguientes metabolitos intracelulares:

Glucólisis

Glucosa
Fructosa-6-Fosfato
Fructosa-1,6-Bifosfato
Dihidroxiacetona Fosfato
Glucosa-1-Fosfato
Fosfoenolpiruvato
Piruvato
Lactato

Aminoácidos

Glutamina
Glicina
Asparagina
Glutamato
Aspartato
Alanina

Vía del Ácido Tricarboxílico (TCA)

Citrato
Cis-Aconitato
 α -Cetoglutarato
Succinato
Fumarato
Malato



5. RESULTADOS

Tomando en cuenta los antecedentes presentados en la introducción sobre los cambios conformacionales del ER α vinculados a variaciones en la maquinaria de traducción, junto a la evidencia aportada por otros grupos en esta materia, nos llevó a preguntarnos si la resistencia a la terapia hormonal del cáncer de mama, atribuida a los cambios de actividad del ER α , podría estar relacionada a cambios en su conformación, como consecuencia de variaciones en el aparato traduccional. Específicamente, queremos entender si un proceso de transición epitelio-mesenquimal, frecuentemente asociado a tumores avanzados y que deriva en una serie de cambios celulares, podría llevar a la alteración en el plegamiento del ER α y explicar, por lo menos en parte, la resistencia a la terapia hormonal en estos tumores.

Esto nos impulsó a caracterizar los cambios conformacionales que podría adquirir el ER α utilizando un modelo celular de transición epitelio-mesenquimal. Siguiendo esta misma línea, nos propusimos investigar el contexto celular en que se da la síntesis y el plegamiento del receptor, caracterizando la maquinaria de traducción y el estado metabólico de estas células.

5.1. Análisis de la conformación del ER α sintetizado en distintos contextos celulares mediante proteólisis limitada

Estudios previos de genes reporteros en el modelo celular realizados durante mi tesis de grado demostraron que la actividad directa del ER α endógeno se veía muy disminuida en la línea celular MCF7 MKL1 Δ N200, en comparación con la actividad del ER α sintetizado en las otras dos líneas control. Al analizar la cantidad de receptor presente en cada una de las líneas mediante western blot (WB), observamos que existía una clara

reducción en la cantidad del receptor en la línea MCF7 MKL1 Δ N200, lo que podía estar explicando el descenso en la actividad. Esto también fue observado por estudios transcriptómicos, evidenciando un descenso en la expresión del receptor en esta línea (Kerdivel et al., 2014). Sin embargo, tomando en cuenta los valores relativos, es decir, la actividad del receptor en la línea MCF7 MKL1 Δ N200 respecto a las líneas control y en paralelo, la cantidad relativa de ER α entre dichas líneas, se observó que el descenso en la actividad era varias veces mayor de lo esperado para la cantidad de receptor observada. Esta discordancia, sumado a los antecedentes acerca del cambio conformacional del ER α en distintos contextos celulares, nos condujo a pensar que parte de este descenso en la actividad podría ser debido a un cambio conformacional del receptor.

El estudio del plegamiento de una proteína *in vivo* es una tarea compleja debido a la dificultad para individualizar la proteína de interés del resto de proteínas presentes en el extracto sin generar un sesgo metodológico significativo. Para llevar a cabo este objetivo, las diferencias de conformación fueron estudiadas por ensayos de proteólisis limitada. Esta metodología ya ha sido utilizada por nuestro grupo para detectar cambios conformacionales del ER α sintetizado *in vitro* en distintas condiciones (Horjales et al., 2007). Sin embargo, en dicha instancia, se contaba con altos niveles de expresión de ER α , a diferencia de lo que sucede en el modelo celular en estudio, donde obtenemos bajas cantidades del ER α . Por este motivo, gran parte de la maestría fue destinada a poner a punto un ensayo que permitiera estudiar los cambios conformacionales del ER α endógeno sintetizado en las tres líneas celulares del modelo de TEM.

Inicialmente, intentamos adaptar el protocolo utilizado previamente, mediante el cual las células todavía adheridas a la botella de cultivo, eran lisadas por la adición de un extenso volumen de buffer de lisis, necesario para cubrir toda la superficie celular. Esto planteaba una gran desventaja,



derivada de las bajas concentraciones proteicas obtenidas como consecuencia de los volúmenes de buffer de lisis requeridos. A pesar de todos los esfuerzos por optimizar los distintos pasos del protocolo para obtener intensidades de banda (correspondientes al ER α) cuantificables en las detecciones por WB, los resultados obtenidos no fueron los deseados. Por este motivo, decidimos cambiar de protocolo, recurriendo al protocolo de proteólisis limitada en células permeabilizadas, como se describe en la sección 4.1. Este protocolo presenta la gran ventaja de disminuir en gran medida el volumen de buffer utilizado para extraer las proteínas, por lo que permitía mejorar las concentraciones proteicas de las muestras de partida. Luego de sucesivos intentos, esta vez sí logramos poner a punto el ensayo, optimizando las concentraciones de Qt y de muestra de partida, obteniendo bandas cuantificables en los ensayos de WB. Se determinó que el rango óptimo de concentraciones de Qt para ver una respuesta de degradación del ER α expresado en células MCF7 es de 0 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El protocolo completo se detalla en la sección 4.1.

A continuación, se muestra el resultado de la proteólisis limitada del ER α endógeno sintetizado por la línea MCF7 Control, la cual presenta un fenotipo del tipo epitelial, y el ER α endógeno sintetizado por la línea MCF7 MKL1 $\Delta\text{N}200$, la cual presenta un fenotipo con características mesenquimales. Se utilizó el rango de concentraciones de Qt mencionado previamente y el anticuerpo policlonal HC-20, específico para la región N-terminal del ER α humano.



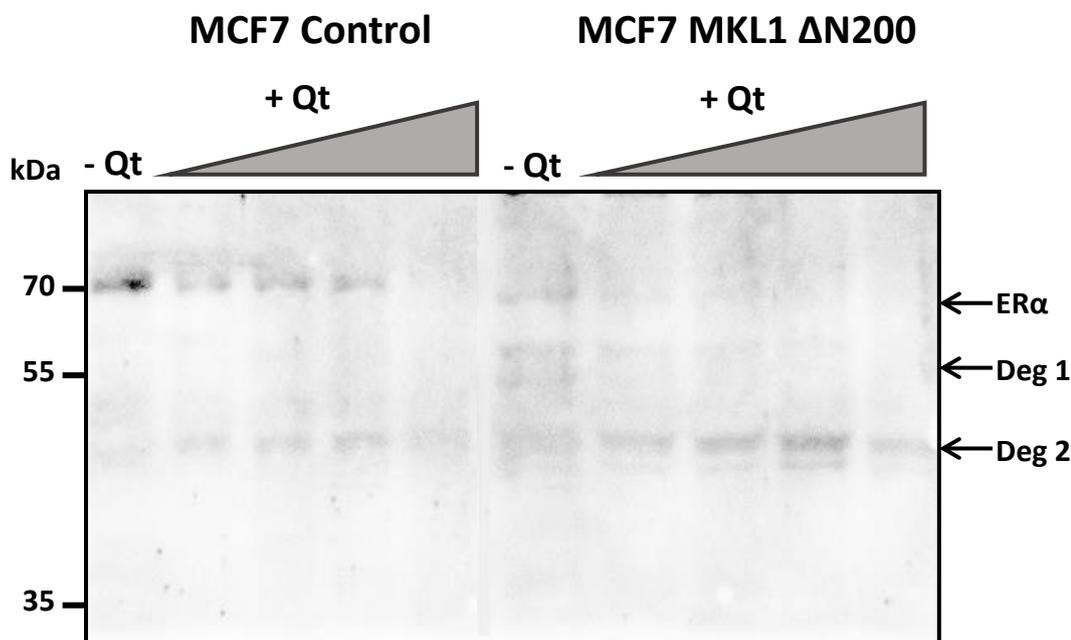


Figura 21. Proteólisis limitada del ER α en MCF7 MKL1 Δ N200 y MCF7 Control

Se permeabilizaron las células para extraer las proteínas citoplasmáticas. Se usó un rango de concentraciones de Qt para degradar las proteínas durante 15 minutos en hielo. Se frenó la reacción luego de este tiempo y se realizó una SDS-PAGE al 12%. Finalmente se detectó el ER α y sus bandas de degradación utilizando una dilución del anticuerpo HC-20. Qt: Quimotripsina. Deg 1: Banda de degradación 1. Deg 2: Banda de degradación 2

En primer lugar, notamos que el ER α de 66 kDa parece degradarse por completo a concentraciones menores de Qt en las células MCF7 MKL1 Δ N200 en comparación a la degradación obtenida en las MCF7 Control. Debido a la degradación del receptor de 66 kDa se originan fragmentos de peso molecular de aproximadamente 54 y 47 kDa (Deg 1 y 2 respectivamente). La intensidad de las bandas correspondientes a dichos fragmentos se ve incrementada a medida que se degrada el receptor de mayor tamaño. Los fragmentos de menor peso molecular (Deg 2), permanecen incluso a altas concentraciones de Qt, sugiriendo una estructura más compacta y resistente a la Qt. Estos resultados sugieren que el ER α sintetizado en las células MCF7 Control es más resistente a la degradación. Sin embargo, esto podría deberse a una diferencia en la cantidad de ER α presente en cada línea. Sabiendo que el ER α es menos



expresado en la línea MCF7 MKL1 Δ N200, al sembrar la misma cantidad de proteína total de ambas líneas celulares, se observaría una menor proporción de ER α en los carriles correspondientes a la línea MCF7 MKL1 Δ N200. Por este motivo, la intensidad de la banda correspondiente al ER α en los carriles donde fueron sembradas las muestras sin Qt, resulta bastante dispar entre MCF7 Control y MCF7 MKL1 Δ N200. Para poder comparar los perfiles de degradación debimos ajustar el volumen de reacción que se carga en los geles de electroforesis, sin modificar la cantidad de proteína que se coloca inicialmente en la reacción de degradación.

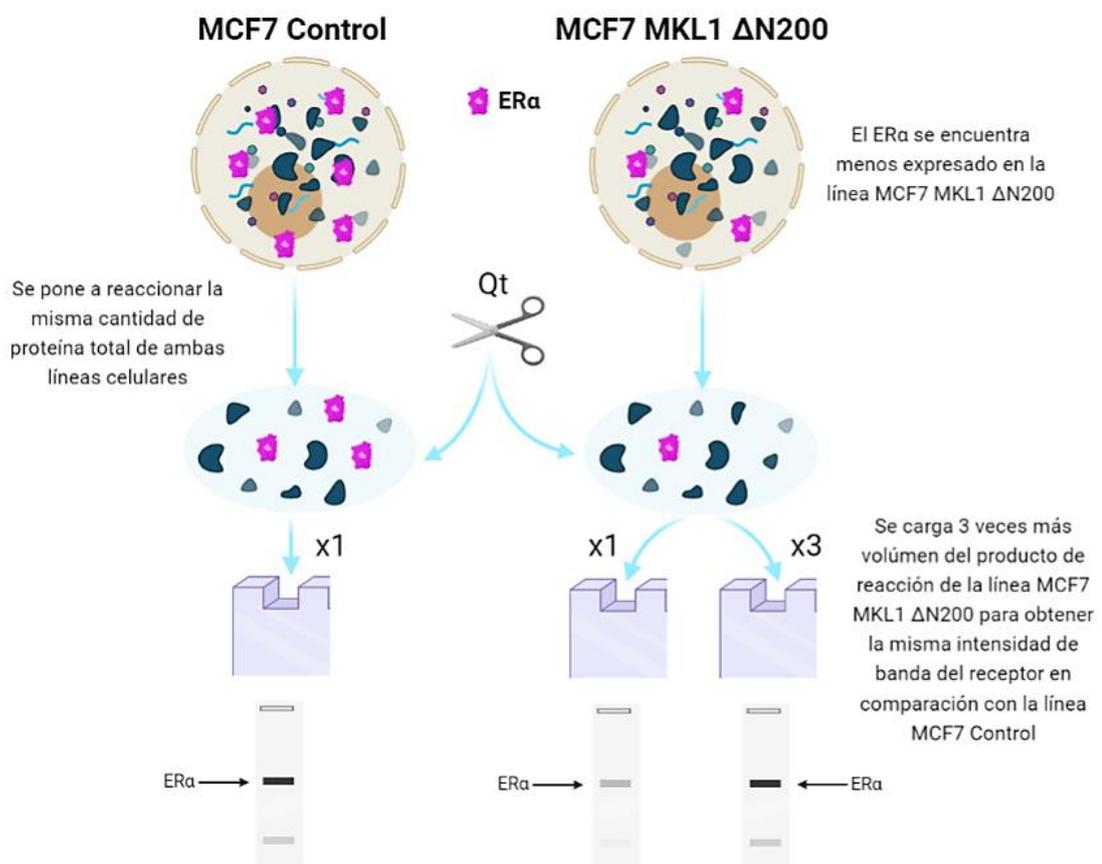


Figura 22. Explicación del ajuste realizado en el ensayo de proteólisis

Por otro lado, lo que resulta muy interesante en la Figura 21 es la diferencia en el perfil de bandas de degradación generado (Deg 1 y Deg 2). De forma

muy tenue, en la línea MCF7 MKL1 Δ N200 se aprecian unas bandas de degradación de aproximadamente 54 kDa, que no son apreciables en la línea MCF7 Control, incluso teniendo en cuenta la mayor cantidad de receptor presente en esta línea. Esto sugiere que los sitios de corte a los que accede la Qt se verían alterados, ya sea favorecidos o reprimidos, en el ER α presente en la línea MCF7 MKL1 Δ N200. Para confirmar este resultado, se repitió el ensayo con una tanda nueva de células, aplicando el ajuste mencionado anteriormente y observamos lo siguiente.

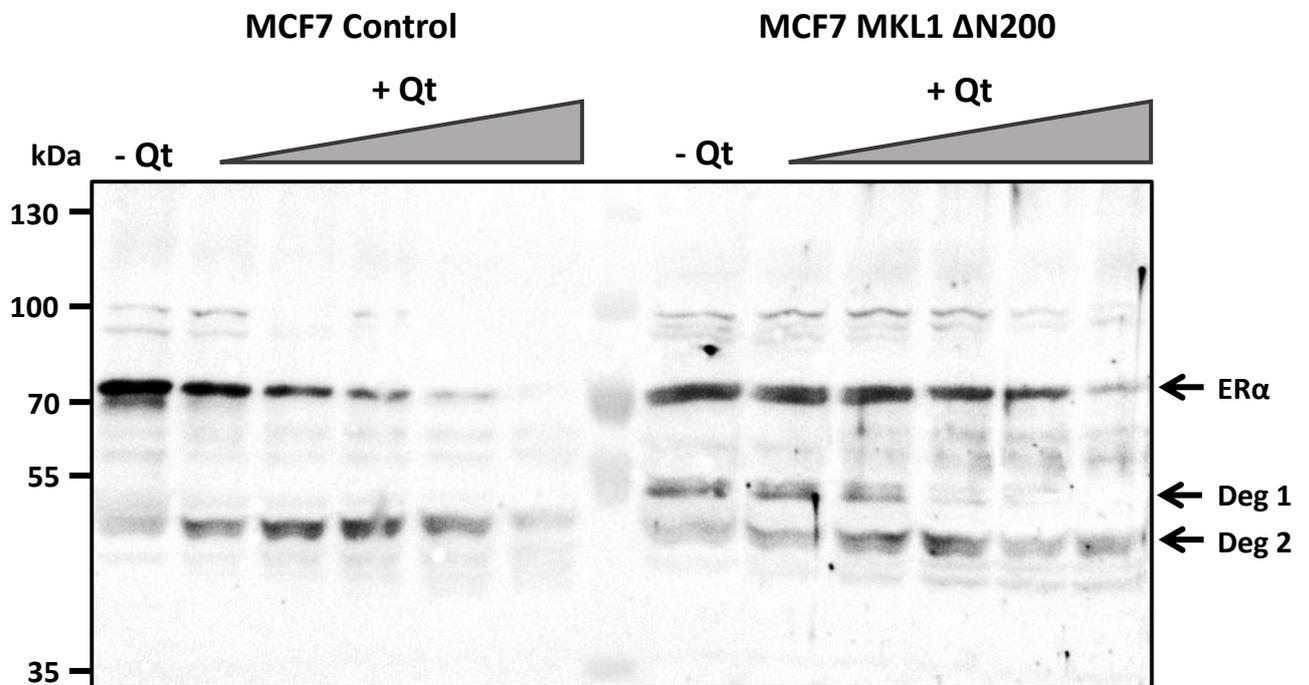


Figura 23. Proteólisis limitada del ER α en MCF7 MKL1 Δ N200 y MCF7 Control

Se permeabilizaron las células para extraer las proteínas citoplasmáticas. Se usó un rango de concentraciones de Qt para degradar las proteínas durante 15 minutos en hielo. Se frenó la reacción luego de este tiempo y se realizó una SDS-PAGE al 12%. Finalmente se detectó el ER α y sus bandas de degradación utilizando una dilución del anticuerpo HC-20. Qt: Quimotripsina. Deg 1: Banda de degradación 1. Deg 2: Banda de degradación 2

En primer lugar, a diferencia de lo observado en la Figura 21, gracias al ajuste mencionado se logró una intensidad similar de la banda correspondiente al ER α sin Qt en ambas líneas. En segundo lugar, en contraposición a lo indicado anteriormente, este resultado sugiere que el

ER α sería más estable en la línea MCF7 MKL1 Δ N200 en comparación con el ER α de la línea control. Para llevar a cabo un análisis semicuantitativo, se determinó la intensidad de las bandas utilizando el software Image J como se describe en la sección 4.3. A continuación se muestran los resultados de la cuantificación de las bandas del receptor de 66 kDa.

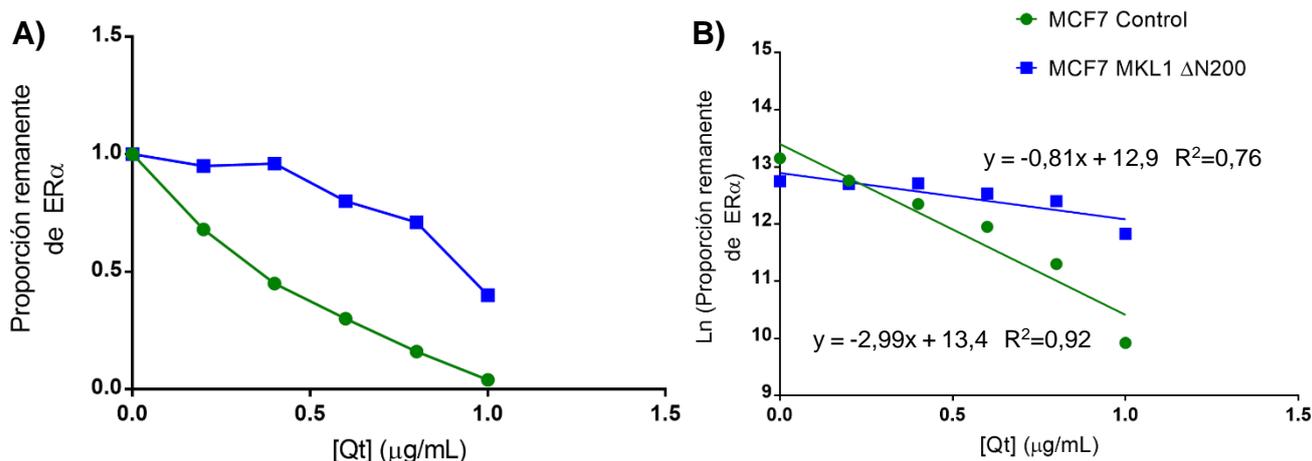


Figura 25. Fracción de ER α remanente

A) Se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes al ER α de 66 kDa utilizando el software ImageJ y se graficó como la relación de la intensidad de cada banda respecto a la intensidad de la banda sin Qt en función de la concentración de Qt. **B)** Linealización de los valores anteriores aplicando el logaritmo neperiano.

A partir de la ecuación de la recta obtenida de la gráfica en la Figura 25 B, pudimos determinar la concentración necesaria para degradar el 50% del ER α en cada línea, siendo de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ para el caso de la línea MCF7 Control y de 0,9 para el caso de la línea MCF7 MKL1 Δ N200, demostrando la mayor resistencia a la degradación del ER α sintetizado en la línea MCF7 MKL1 Δ N200. Este resultado es coherente con los resultados obtenidos durante el trabajo de grado de Gabriela Cuestas (Gabriela Cuestas, Tesis de Grado, 2020). En dicho trabajo, se realizaron ensayos de proteólisis limitada del receptor utilizando otros anticuerpos para la detección del ER α y variando los tiempos de incubación con Qt, observando que el receptor



presente en la línea MCF7 MKL1 Δ N200 se degradaba más lentamente que en la línea MCF7 Control.

Más allá de las diferencias observadas en la estabilidad del ER α de 66 kDa, lo más llamativo del resultado presentado en la Figura 23, es que se observa nuevamente una clara diferencia en el perfil de degradación entre las dos líneas celulares. Esto reafirma nuestra hipótesis acerca de cambios en la accesibilidad de la Qt a los sitios de corte presentes en el ER α sintetizado en los dos contextos celulares.

Para determinar si este fenómeno se debía exclusivamente a los cambios ocurridos durante la transición y no a diferencias previas del receptor endógeno expresado en cada línea, realizamos el mismo experimento, pero esta vez no agregamos tetraciclina en el medio de inducción, por lo que las células MCF7 MKL1 Δ N200 no deberían de ver alterado su fenotipo. En dichos ensayos se observó que los perfiles de las bandas de degradación del ER α en estas condiciones eran muy similares entre ambas líneas. De esta forma, estos resultados sugieren que la diferencia en la conformación del ER α sería dependiente del cambio en el contexto celular, originado por el proceso de transición epitelio-mesenquimal que sufren las células MCF7 MKL1 Δ N200 (ver Anexo, sección 9.1).

A pesar de no contar con un número exhaustivo de réplicas debido a los tiempos que insumió la optimización del ensayo, podemos decir que fuimos muy minuciosos al extremar los cuidados necesarios para una técnica que resulta muy sensible a pequeños cambios en los distintos pasos. De esta forma, podemos afirmar que las observaciones acerca de la diferencia en la degradación del ER α sintetizado en dos contextos celulares diferentes resultan muy alentadoras y son un excelente punto de partida para futuras investigaciones a través aproximaciones complementarias.

5.2. Caracterización de las poblaciones de ARNt por microarreglos

Hace algunos años, el aparato traduccional era concebido como una entidad poco alterable por los cambios celulares. Este fue particularmente el caso de la estructura del ribosoma y la población de los ARNt. Sin embargo, la evidencia se ha acumulado progresivamente en contra de esta idea, mostrando una amplia variación de la composición de los ribosomas (Guimaraes and Zavolan, 2016; Sloan et al., 2016) y de las poblaciones de ARNt en respuesta a los cambios celulares, durante la diferenciación o debido a diversas enfermedades.

Si bien se ha avanzado mucho en los métodos de análisis de los ARNt, aún hoy la caracterización precisa de las poblaciones de estas moléculas sigue constituyendo un desafío técnico importante. Varios grupos han desarrollado novedosas técnicas para la cuantificación de las distintas especies de ARNt celulares, sin embargo, el *gold standard* para la cuantificación de ARNt todavía continúan siendo los microarreglos. Los detalles de esta técnica se describen en la sección 4.4.

Para cumplir con el segundo objetivo propuesto para este trabajo, se cuantificó mediante microarreglos, la población de ARNt presentes en la línea MKL1 Δ N200 y MKL1 Δ C301 respecto a la línea MCF7 Control y se determinó el porcentaje de aminoacilación de los ARNt en cada línea celular. Esto fue realizado durante una pasantía en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Hamburgo, que surgió de la colaboración con el grupo liderado por la Prof. Zoya Ignatova,

En primer lugar, se ajustaron las condiciones de cultivo de nuestro modelo celular en el laboratorio de la Prof. Ignatova, así como el número de células de acuerdo a lo sugerido en el protocolo (Polte et al., 2019). Luego, se llevó

a cabo la extracción del ARN “total” y “aminoacilado” (esta denominación se origina de las condiciones de extracción del ARN que permiten que se conserve el estado de aminoacilación de los ARNt). Posteriormente se cuantificó por espectrofotometría a 260nm (NanoDrop) y controló la integridad por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. Este proceso, así como los pasos que se describen más adelante fueron realizados para dos réplicas biológicas independientes de cada una de las tres líneas celulares. A continuación, se muestra a modo ilustrativo, una tabla con los valores obtenidos de la cuantificación realizada para una de las réplicas biológicas (Tabla 5) y una imagen de uno de los geles de poliacrilamida (Figura 26).

Tabla 5. Resultados de la cuantificación del ARN por espectrofotometría a 260 nm

Muestra	[] (ng/μL)	μg ARN *	A₂₆₀/A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₃₀
ARN Total MCF7 Control	586,8	29,34	2,1	2,0
ARN Total MKL1 ΔN200	-	-	-	-
ARN Total MKL1 ΔC301	622,0	31,10	2,1	1,7
ARN Aminoacilado MCF7 Control	243,4	12,17	2,0	1,6
ARN Aminoacilado MKL1 ΔN200	335,3	16,77	2,0	1,9
ARN Aminoacilado MKL1 ΔC301	269,7	13,49	2,0	1,7

*μg de ARN en el volumen total de muestra



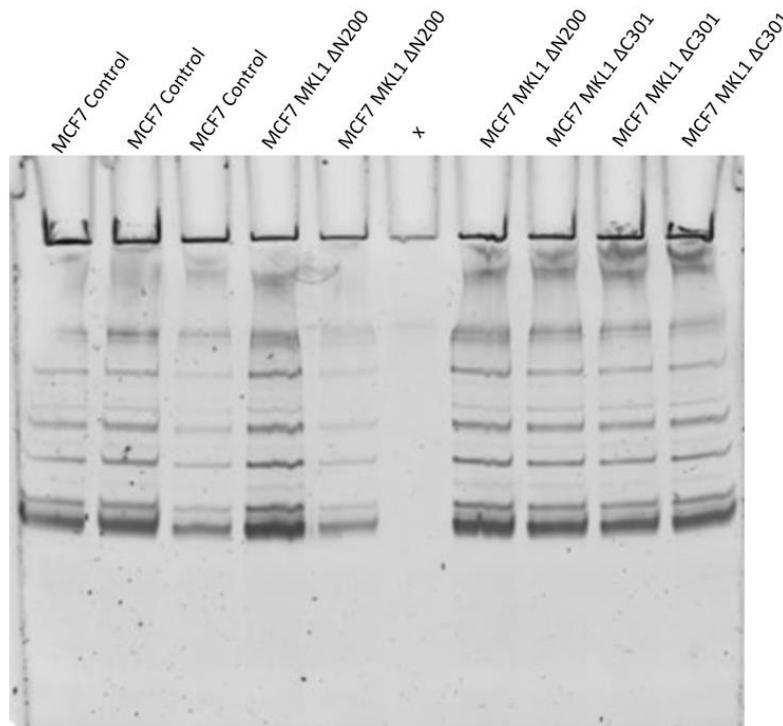


Figura 26. Evaluación de la integridad del ARN

Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% y 8 M urea, se sembraron las muestras, en este caso particular, las muestras de la extracción realizada con fenol, se corrió el gel a 20W por 50 minutos aproximadamente y se tiñó con una dilución 1:1000 de SYBR gold.

En primer lugar cabe aclarar que la ausencia de los valores en la fila correspondiente a la muestra “ARN Total MKL1 Δ N200” se debe a inconvenientes surgidos durante la extracción de ARN en estas muestras. De todas formas, esto no generó mayores inconvenientes gracias a que se obtuvo suficiente ARN de las muestras “ARN Aminoacilado MKL1 Δ N200” para ambas determinaciones.

En segundo lugar, vale mencionar que los procesos de extracción fueron exitosos, obteniéndose valores de ARN acordes al número de células utilizado, con coeficientes de absorbancia 260nm/280nm y 260nm/230nm, dentro de los valores adecuados que aseguran una buena calidad de extracción respecto a contaminaciones por proteínas y compuestos orgánicos respectivamente. Asimismo, se verificó la integridad del ARN al

no observar indicios de degradación en la electroforesis en gel de poliacrilamida.

Posteriormente, se realizaron los pasos correspondientes de oxidación, desaminoacilación y ligación de las sondas fluorescentes como se describe en la sección 4.4 y se corroboró la correcta ligación de las sondas, llevando a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones de oscuridad para proteger de la luz a los fluoróforos. Se observó la presencia de las sondas ligadas a los ARNt mediante fluorescencia utilizando el ChemiDoc XRS+ de BioRad. Dicho gel también fue teñido con SYBR Gold para observar la presencia de la banda de ARNt sin ligar. A continuación, se muestra a modo ilustrativo, una imagen de uno de los geles de poliacrilamida revelado con fluorescencia de un lado y con SYBR gold del otro (Figura 27).

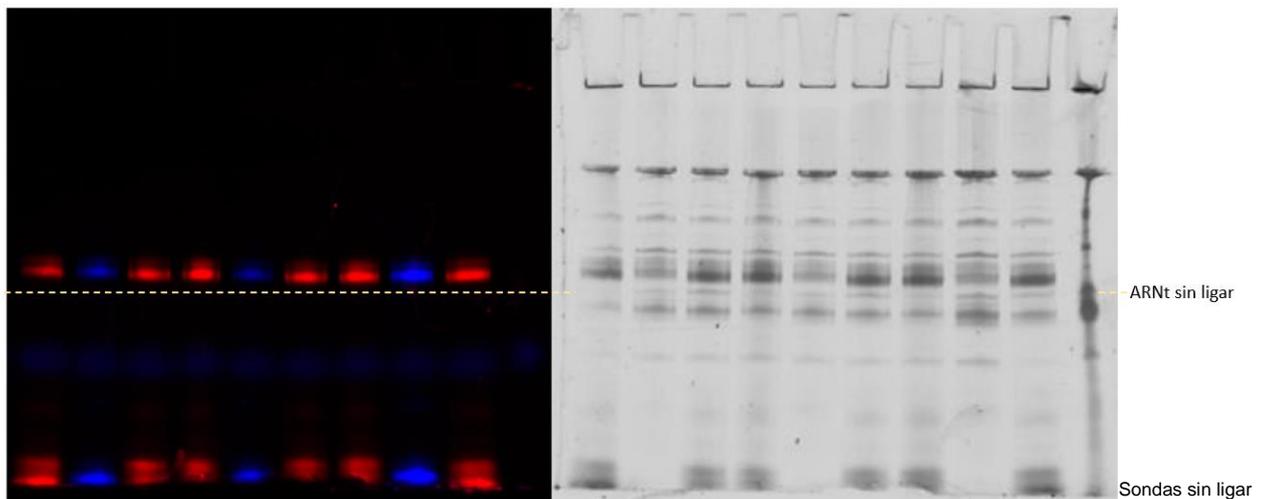


Figura 27. Evaluación del proceso de ligación de las sondas fluorescentes

Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% y 8M urea, se sembraron las muestras, obtenidas luego del paso de ligación, se corrió el gel a 20W por 50 minutos aproximadamente y observó la intensidad de fluorescencia utilizando el ChemiDoc XRS+ de BioRad en dos canales diferentes, uno para Atto657 y otro para Cy3 y finalmente se teñió con una dilución 1:1000 de SYBR gold.

Como se puede observar a la izquierda en la Figura 27, el proceso de ligación fue exitoso, detectando la presencia de ARNt marcados con los dos fluoróforos, Atto647 en azul y Cy3 en rojo. Esto a su vez, concuerda con el corrimiento de las bandas marcadas con respecto a la posición de la banda de los ARNt sin ligar observada por tinción con SYBR gold a la derecha de la misma figura.

Finalmente, una vez realizada la ligación de las muestras con las sondas fluorescentes correspondientes, se colocan a hibridar por un lado las muestras preparadas de acuerdo al protocolo de abundancia y por otro lado las muestras preparadas de acuerdo al protocolo de porcentaje de aminoacilación. Luego de la hibridación, se captura la intensidad de fluorescencia utilizando el escáner GenPIX 4200A (Molecular Devices) y posteriormente se analizan los resultados utilizando herramientas bioinformáticas desarrolladas en el laboratorio de la Prof. Ignatova (Polte et al., 2019). En la Figura 28 se muestra la abundancia relativa de cada especie de ARNt en la línea MKL1 Δ N200 o MKL1 Δ C301 respecto a la línea MCF7 control en forma de gráfico de barras. En la Figura 29, también en forma de gráfico de barras, se grafica la proporción de ARNt aminoacilados de cada especie para las tres líneas celulares.

Observando los resultados de las Figuras 28 y 29, destacamos la buena correlación que existe entre las dos réplicas biológicas, demostrado por los valores que obtuvimos para los coeficientes de variación, los cuales toman en cuenta los desvíos estándares para cada caso. La mayoría de estos coeficientes se encuentran por debajo del 20% de variación, estando dentro de los límites aceptados para la técnica (ver Anexo, sección 9.2). Esto nos permitió promediar los valores de las dos réplicas y graficar estos resultados en forma de heatmaps. En la Figura 30 se muestra un heatmap con los valores de “fold change” de abundancia de cada especie de ARNt



entre las líneas, en la Figura 31 se muestra un heatmap con los porcentajes de aminoacilación de cada ARNt y por último, la Figura 32 muestra un heatmap con los valores de “fold change” para comparar los porcentajes de aminoacilación entre las líneas celulares (Figura 32).

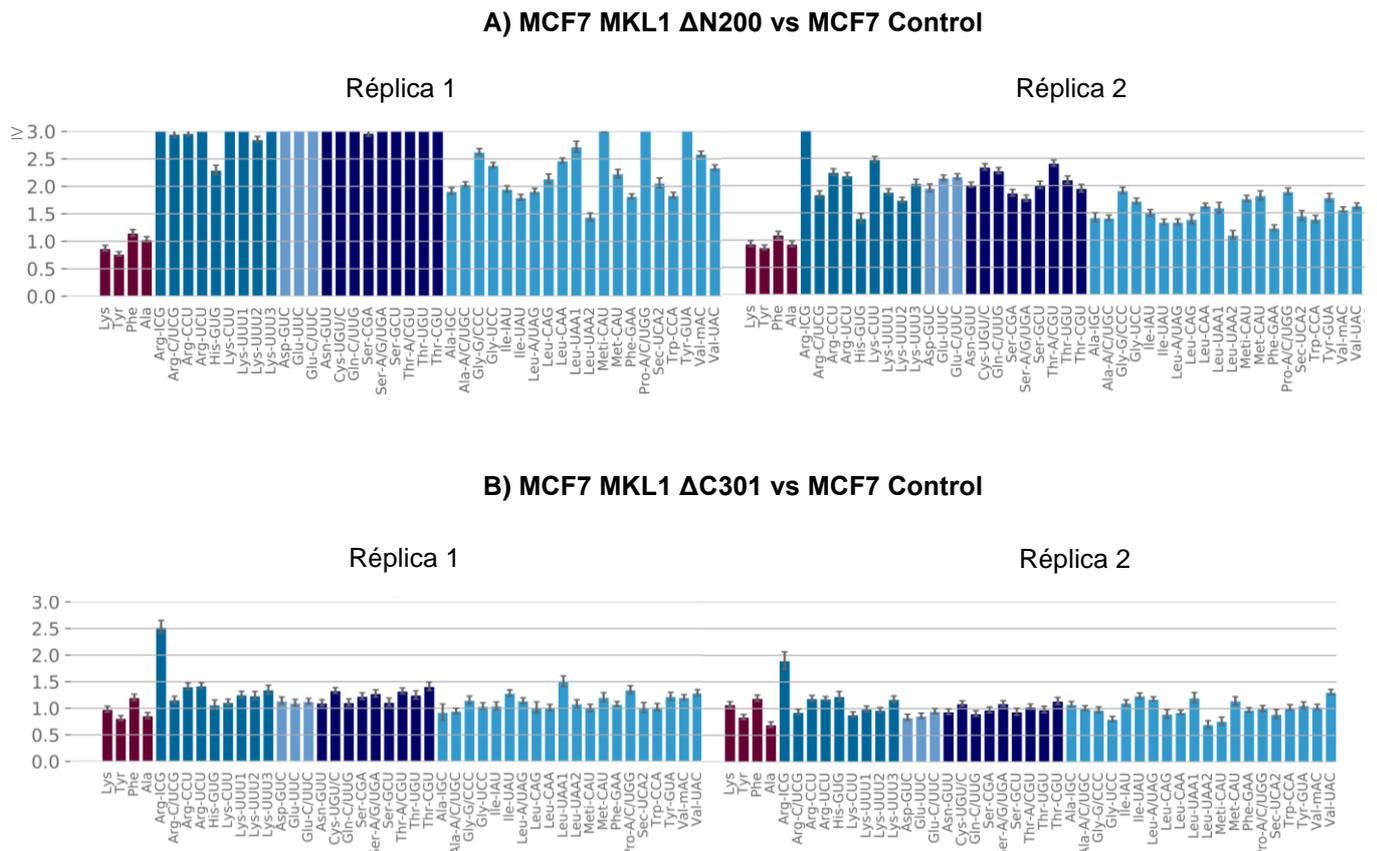


Figura 28. Abundancia relativa de cada especie de ARNt

Valores de “fold change” para **A) MCF7 MKL1 ΔN200 vs MCF7 Control** y **B) MCF7 MKL1 ΔN200 vs MCF7 Control**. En el eje de las abscisas se muestra el nombre de cada especie de ARNt. El color de las barras depende de las características de los aminoácidos que carga cada ARNt. En azul marino ARN que cargan aminoácidos con carga positiva, en celeste clarito aminoácidos con carga negativa, en azul oscuro aminoácidos hidrofóbicos y en celeste verdoso aminoácidos hidrofílicos. En bordó se muestran los valores de los ARNt estándares los cuales deberían presentar valores cercanos a 1.

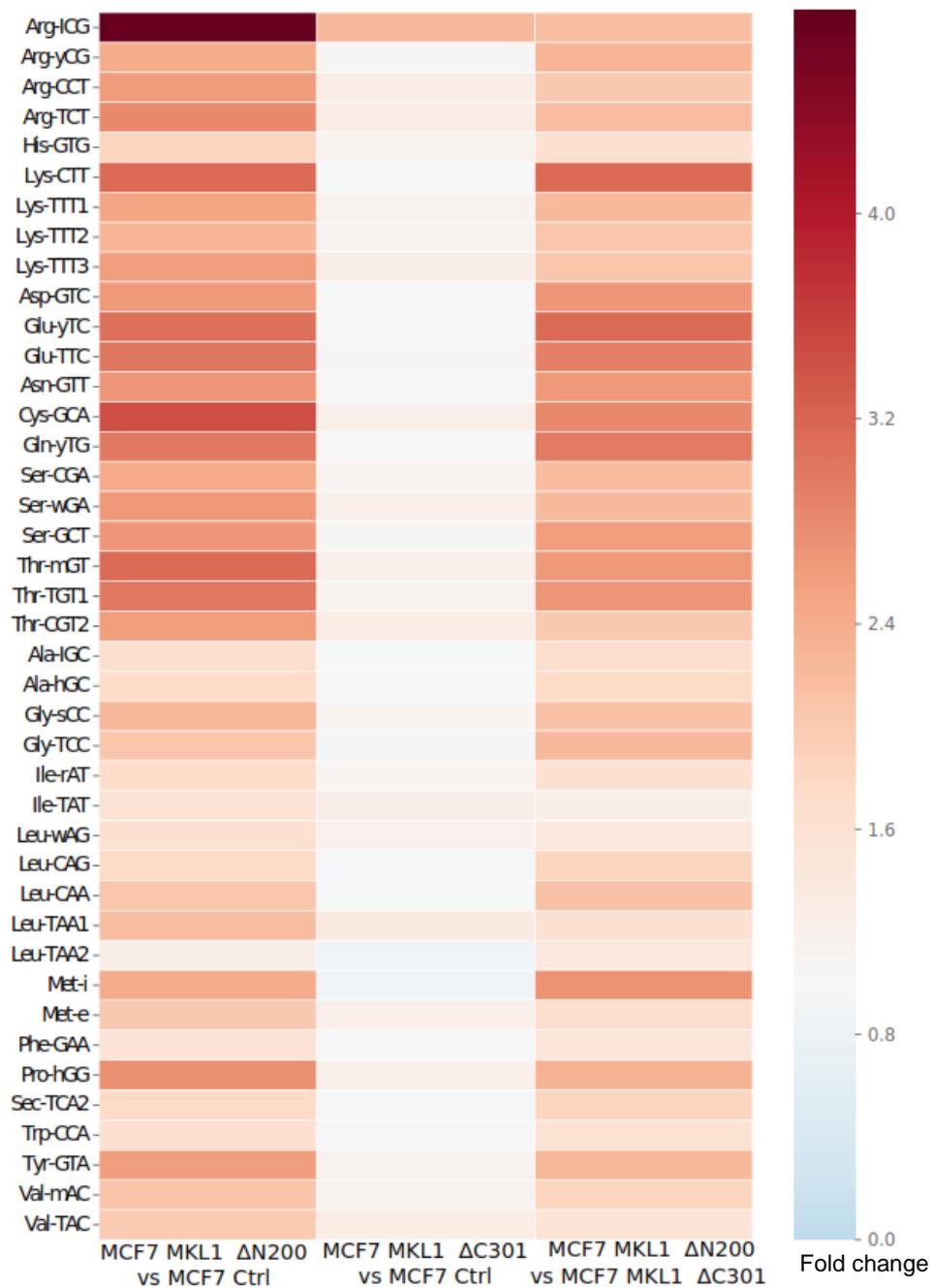


Figura 30. Abundancia relativa de cada especie de ARNt

Luego de evaluar el coeficiente de variación, se promediaron los valores de “fold change” obtenidos para cada una de las réplicas. A la izquierda de cada fila se indica la especie de ARNt. Se utiliza un código de letras para designar las bases degeneradas de acuerdo a las sondas presentes en los microarreglos (w=A o U, y=C o U, m=C o A, s= C o G, k = G o U, r=A o G, h=A o C o U). A la derecha se muestra la referencia de colores.

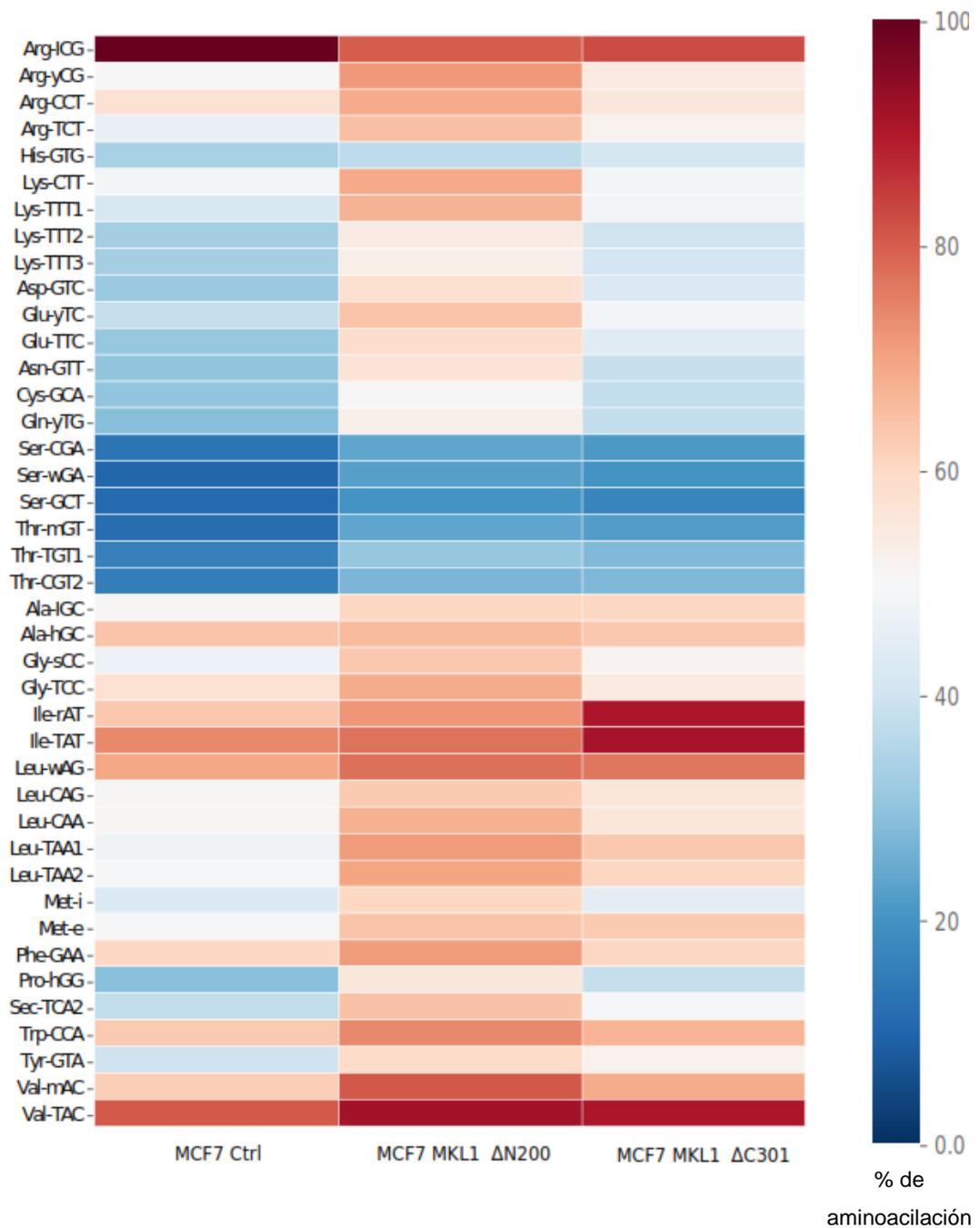


Figura 31. Porcentaje de aminoacilación de cada especie de ARNt

Luego de evaluar el coeficiente de variación, se promediaron los valores de porcentajes de aminoacilación obtenidos para cada una de las réplicas. A la izquierda de cada fila se indica la especie de ARNt. Se utiliza un código de letras para designar las bases degeneradas de acuerdo a las sondas presentes en los microarreglos (w=A o U, y=C o U, m=C o A, s= C o G, k = G o U, r=A o G, h=A o C o U). A la derecha se muestra la referencia de colores.

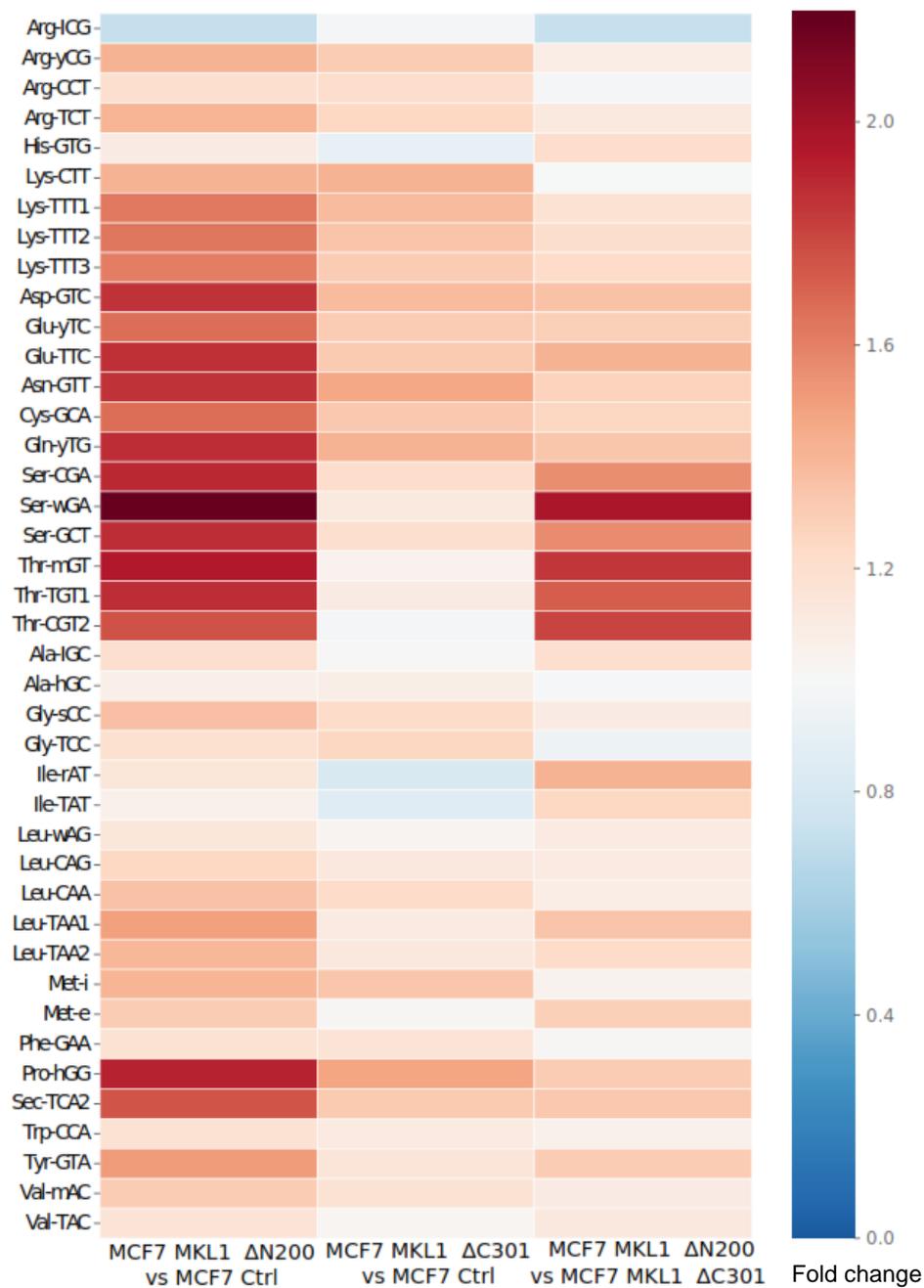


Figura 32. Cambios en el porcentaje de aminoacilación

Luego de evaluar el coeficiente de variación, se promediaron los valores de porcentaje de aminoacilación obtenidos para cada una de las réplicas y se calculó el “fold change” entre las líneas indicadas en el eje de las abscisas. A la izquierda de cada fila se indica la especie de ARNt. Se utiliza un código de letras para designar las bases degeneradas de acuerdo a las sondas presentes en los microarreglos (w=A o U, y=C o U, m=C o A, s= C o G, k = G o U, r=A o G, h=A o C o U). A la derecha se muestra la referencia de colores.

La cuantificación de la abundancia de los ARNt mostrada en la Figura 30, revela de forma contundente que las células MCF7 MKL1 Δ N200 presentan un aumento en los niveles de todos los ARNt en comparación con las dos líneas control (MCF7 MKL1 Δ C301 y MCF7 Control). Este fenómeno parecería ser consecuencia de una regulación a gran escala y no a nivel específica de ciertos ARNt. Lo que sí dejan en claro estos resultados es que las células MCF7 MKL1 Δ N200 cuentan con una mayor disponibilidad de ARNt en comparación con las células control. A su vez, los resultados de la aminoacilación nos permitieron determinar como se muestra en la Figura 32 que casi todos los ARNt presentan mayores niveles globales de aminoacilación en las células MCF7 MKL1 Δ N200 en comparación a las dos líneas control. Por lo que efectivamente la población de ARNt en las células MCF7 MKL1 Δ N200 se ve afectada, presentando tanto un aumento en la cantidad de cada ARNt como en la proporción de ARNt aminoacilados.

En ambos resultados, resulta particularmente llamativo el caso del ARNt-Arg-ICG, el cual presenta muy altos niveles de abundancia en las líneas MCF7 MKL1 Δ N200 y MKL1 Δ C301 en comparación con la línea MCF7 Control y es la única especie que presentan valores de “fold change” menores a uno en la comparación de los porcentajes de aminoacilación entre las líneas MCF7 MKL1 Δ N200 y MCF7 Control. Al observar la Figura 29 A, notamos que el valor para dichas especies de ARNt se encuentra por encima de 1, esto se debe a fenómenos de hiperfluorescencia (Ferro et al., 2017) de alguno de los puntos de estos ARNt en algunos slides, lo que se refleja en el gran desvío estándar que presentan los valores de aminoacilación para este ARNt. De todas formas, sería necesario realizar otros estudios para confirmar este resultado.

Por otro lado, para ser completamente funcionales, los ARNt deben ser



modificados luego de la transcripción. Entendiendo la importancia de las modificaciones en los ARNt para la síntesis de proteínas, analizamos los cambios en la expresión de las enzimas involucradas en las modificaciones de los ARNt, como una primera aproximación al estudio del estado de los ARNt en nuestro modelo celular. Estos resultados surgen del análisis de los datos de Ribosome Profiling obtenidos por T. Fernández-Calero y deben ser confirmados por técnicas complementarias como WB de las enzimas de modificación y espectrometría de masa para cuantificar alguna de las modificaciones. Los cambios en la expresión de las enzimas de modificación de los ARNt indican profundas alteraciones en algunas de ellas. Estas variaciones son ilustradas en la Figura 33 (a partir de los datos de la Tabla 7 presentada en el Anexo, sección 9.3), donde se presenta un esquema de un ARNt universal indicando las modificaciones que se verían alteradas en las células MCF7 MKL1 Δ N200 respecto a las MCF7 Control.

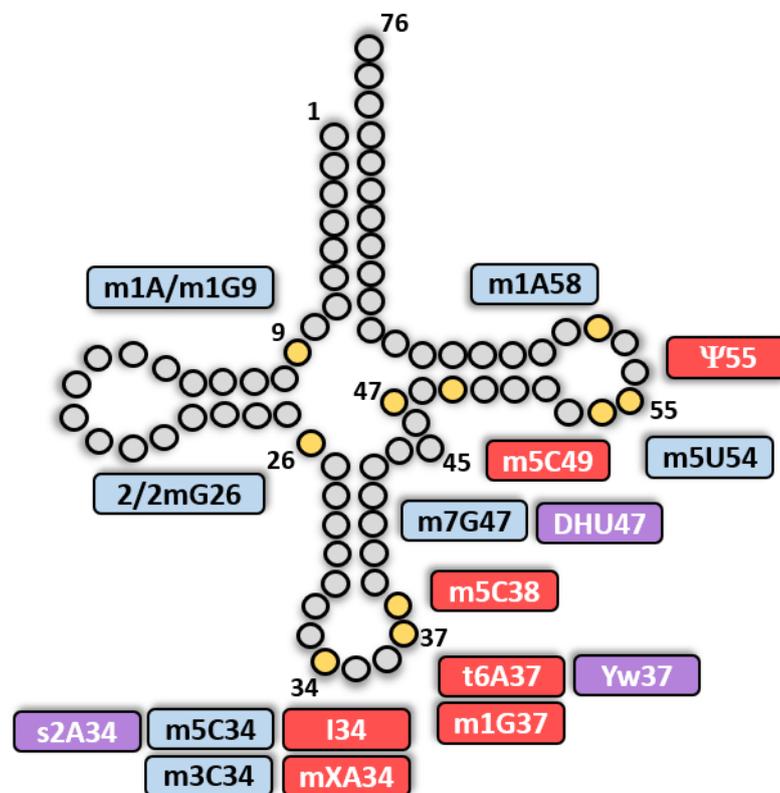


Figura 33. Cambios las modificaciones de los ARNt

Representación esquemática de un ARNt humano con las modificaciones alteradas de acuerdo a los niveles de expresión de las enzimas correspondientes entre las células MCF7 MKL1 Δ N200 y MCF7 Control. Se muestran aquellos con valores de $\log_2(\text{FC})$ mayores a 0,5 en celeste y menores a -0,5 en rojo. En violeta se muestran aquellos sitios donde los cambios en las enzimas de modificación resultan variables entre las diferentes enzimas del complejo. Modificaciones: m1A (1-metiladenosina), m1G (1-metilguanosina), m2G (N2-metilguanosina), m5C (5-metilcitidina), m3C (3-metilcitidina), m7G (7-metilguanosina), I (Inosina), t6A (N6-treonilcarbamoiladenosina), yW (wybutosina), m5U (5-metiluridina), Ψ (pseudouridina), (ver <https://iimcb.genesilico.pl/modomics/>) (Boccaletto et al., 2018).

Estos cambios en las enzimas de modificación sugieren la existencia de poblaciones heterogéneas de ARNt específicos que presentarían alteraciones en algunas modificaciones esenciales en la decodificación de los codones. En resumen, observamos que la línea MCF7 MKL1 Δ N200 presenta un aumento considerable en la abundancia de todas las especies de ARNt (que pudieron ser medidas por microarreglos) en comparación con ambas líneas control. A su vez, observamos también en esta línea, un aumento en la relación de ARNt cargados respecto a los no cargados para cada especie de ARNt en comparación a la relación obtenida para las líneas control, sugiriendo una gran disponibilidad de ARNt cargados, posiblemente necesarios para un fenómeno de síntesis proteica exacerbada. Y por último observamos cambios significativos en la expresión de las enzimas de modificación de los ARNt, sugiriendo alteraciones importantes en la presencia de determinadas modificaciones que son esenciales para modular la actividad del ARNt y asegurar la fidelidad de la traducción.

5.3. Estudio del metabolismo celular por metabolómica de forma comparativa entre las líneas celulares

Como fue mencionado en la introducción, existe un vínculo muy estrecho entre el estado metabólico de la célula con la maquinaria de traducción y la

biosíntesis de proteínas, siendo este último uno de los procesos más costosos para la célula. Aunque la mayor parte del gasto energético recae sobre la biogénesis de los ribosomas, la mayoría de las modificaciones presentes en los ARNt también dependen de la disponibilidad de algunos metabolitos y coenzimas (Helm and Alfonzo, 2014). La concentración celular de estos compuestos puede variar dramáticamente dependiendo del estado metabólico (Fernández Arroyo et al., 2011). Por tanto, en cierta medida el estado metabólico de la célula podría definir las variantes de ARNt presentes en un determinado contexto celular.

Para cumplir con el tercer objetivo propuesto para este trabajo, llevamos a cabo un estudio del estado metabólico de las tres líneas celulares mediante dos aproximaciones. Por un lado, se analizaron los cambios de expresión de las enzimas de las correspondientes rutas metabólicas mediante transcriptómica (RNA-Seq) y traductómica (Ribosome Profiling), llevado a cabo por T. Fernández-Calero en el marco de su trabajo de tesis de doctorado (Tamara Fernández-Calero, Tesis de Doctorado, 2020). Por otro lado, implementamos un análisis metabólico complementario para determinar si la concentración de los sustratos y los productos de estas vías concordaba con lo observado en los estudios de expresión. Se analizaron los analitos principales de la vía glucolítica y del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), así como algunos aminoácidos puntuales. Cabe mencionar la robustez estadística de los resultados, ya que se realizaron tres réplicas biológicas, partiendo de tres tandas de cultivos diferentes y a su vez se realizaron tres réplicas técnicas de la primer réplica biológica y dos réplicas técnicas de la segunda y la tercera réplica biológica. Es decir que cada analito fue medido siete veces. A continuación, se muestran las gráficas de concentración (en unidades arbitrarias) de los distintos analitos en cada línea celular, agrupados según la vía metabólica, glucólisis (Figura 34), vía del TCA (Figura 35) y aminoácidos (Figura 36).



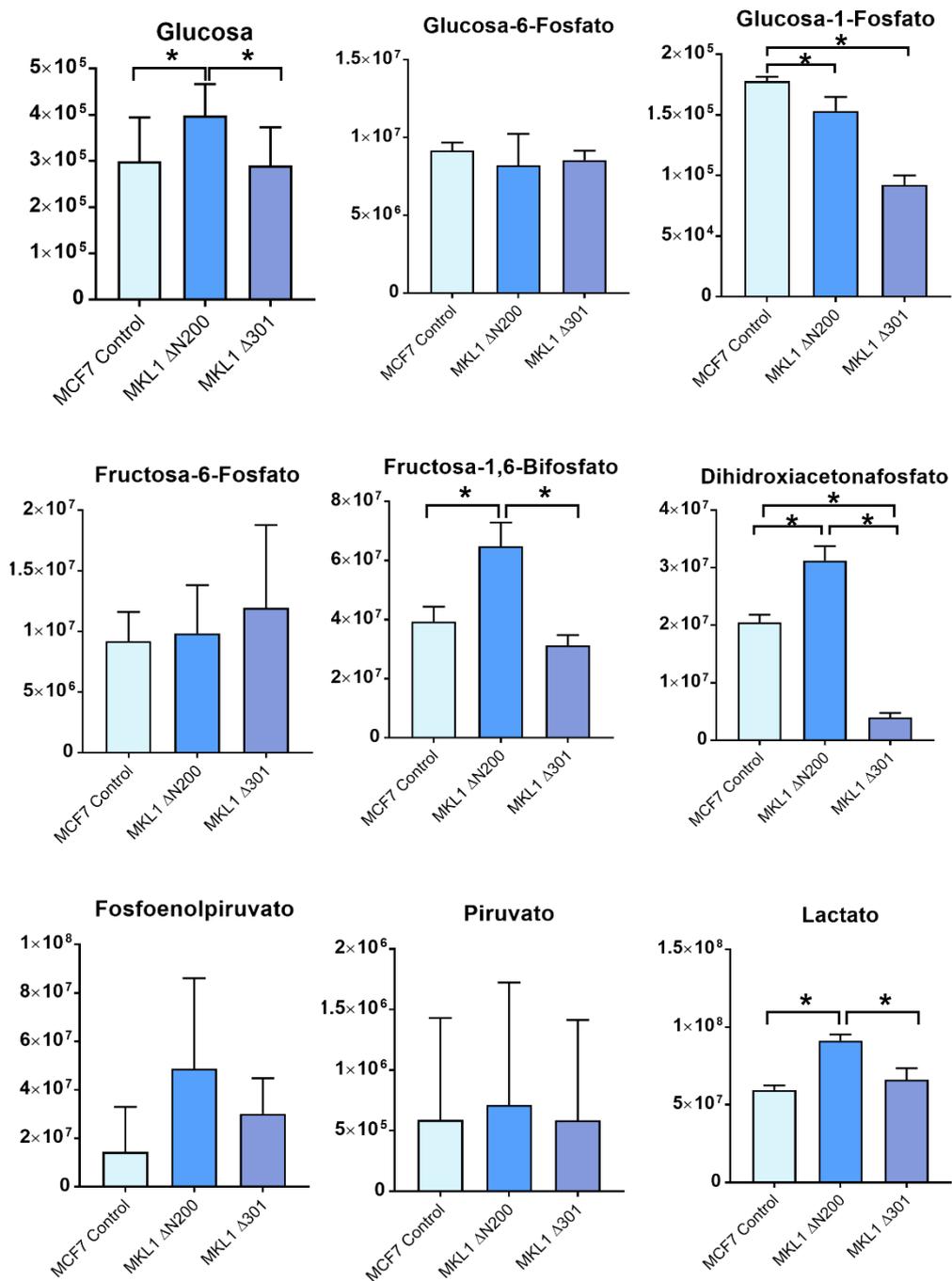


Figura 34. Metabolitos principales de la glucólisis

Se grafica la concentración (en unidades arbitrarias) para cada analito en las tres líneas celulares. Los datos son el promedio de siete réplicas técnicas a partir de tres réplicas biológicas \pm SD (* p < 0,05, test de Student). Para la Glucosa-6-fosfato sólo tres réplicas técnicas fueron medidas, para la Dihidroxiacetonafosfato y la Glucosa-1-fosfato sólo cuatro réplicas técnicas fueron medidas.

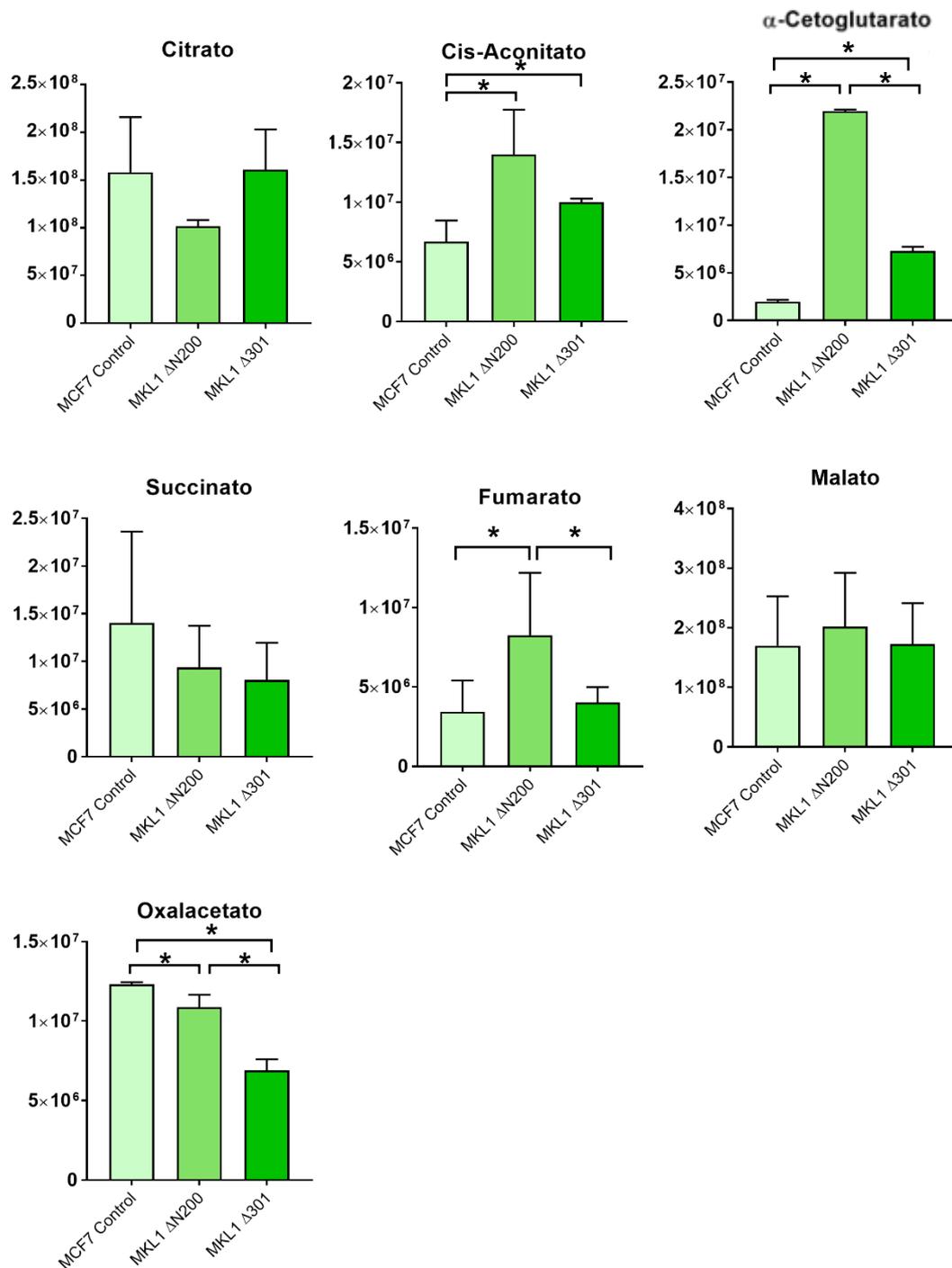


Figura 35. Metabolitos principales en la vía del TCA

Se grafica la concentración de concentración (en unidades arbitrarias) para cada analito en las tres líneas celulares. Los datos son el promedio de siete réplicas técnicas a partir de tres réplicas biológicas ± SD (* p < 0,05, test de Student). Para el α-Cetoglutarato y el Oxalacetato sólo tres réplicas técnicas fueron medidas.

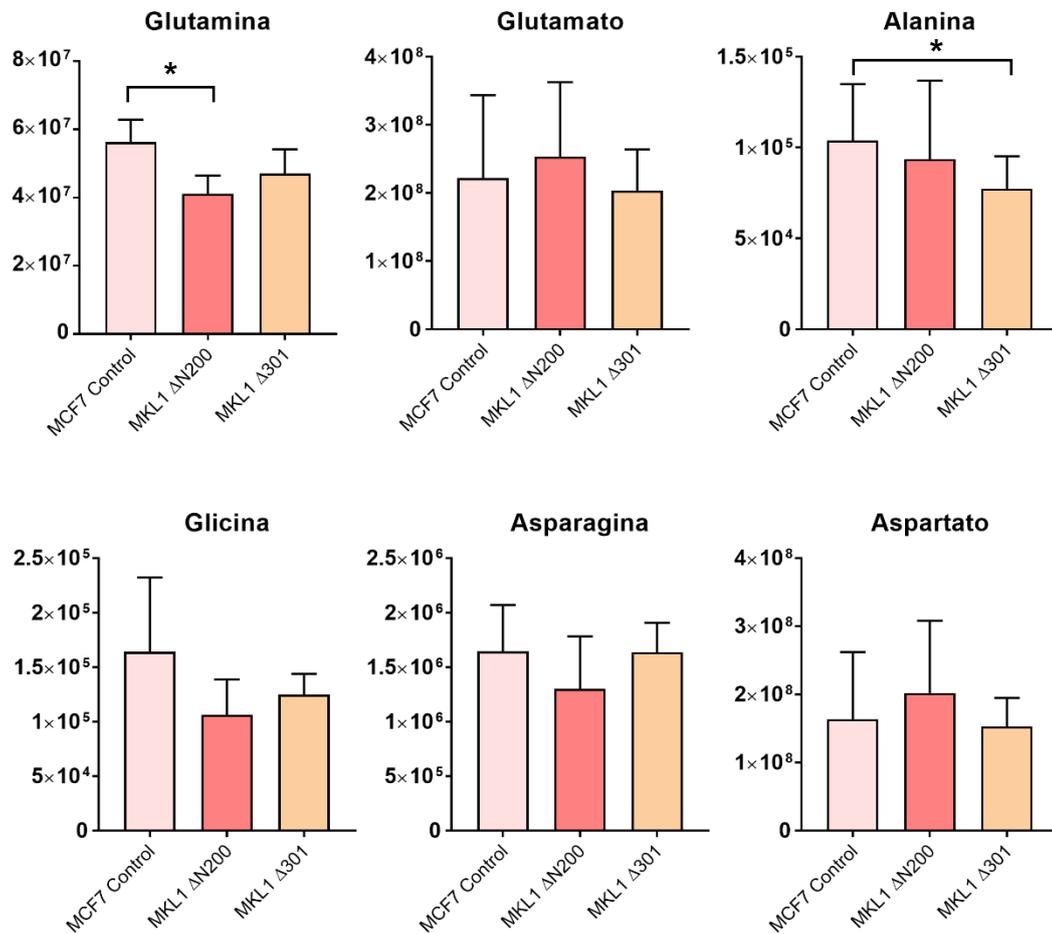


Figura 36. Aminoácidos

Se grafica la concentración (en unidades arbitrarias) para cada analito en las tres líneas celulares. Los datos son el promedio de siete réplicas técnicas a partir de tres réplicas biológicas \pm SD (* $p < 0,05$, test de Student).

Estos resultados muestran que existen diferencias significativas en la concentración intracelular de varios metabolitos entre la línea MCF7 MKL1 Δ N200 y las dos líneas control. A pesar de que las dos líneas control presentaron concentraciones de metabolitos similares entre ellas, también presentaron diferencias significativas en algunos de ellos (Dihidroxiacetonafofato, Cis-Aconitato, α -Cetoglutarato, Oxalacetato y Alanina). Para facilitar la interpretación de estos resultados diseñamos una tabla donde se presentan los valores de “fold change” cuando los cambios son significativos (Tabla 6).

Tabla 6. Cambios significativos en la concentración de ciertos metabolitos

Se muestran los valores de “fold change” promedio de los cambios que resultaron significativos ($p < 0,05$, test de Student). El promedio fue realizado a partir de los valores de siete réplicas técnicas, que se tomaron de tres réplicas biológicas. NS: no significativo. *Sólo se midieron dos réplicas biológicas (cuatro réplicas técnicas) para la Glucosa 6-Fosfato y el Oxalacetato. **Solo se midió una réplica biológica (tres réplicas técnicas) para la Dihidroxiacetonafosfato y el α -Cetoglutarato.

Vía / Metabolito	MCF7 MKL1 Δ N200 / MCF7 MKL1 Δ C301	MCF7 MKL1 Δ N200 / MCF7 Control	MCF7 MKL1 Δ C301 / MCF7 Control
Glucólisis			
Glucosa	1,5	1,5	NS
Glucosa 6-Fosfato*	NS	NS	NS
Fructosa 6-Fosfato	NS	NS	NS
Fructosa 1,6-Bifosfato	2	1,7	NS
Dihidroxiacetonafosfato**	7,7	1,2	0,2
Fosfoenolpiruvato	NS	NS	NS
Piruvato	NS	NS	NS
Lactato	1,4	1,5	NS
Ciclo del TCA			
Citrato	NS	NS	NS
Cis-Aconitato	NS	2,1	1,7
α Cetoglutarato**	2,9	11	3,8
Succinato	NS	NS	NS
Fumarato	1,7	2,8	NS
Malato	NS	NS	NS
Oxalacetato*	1,6	0,9	0,6
Aminoácidos			
Glutamina	NS	0,8	NS
Alanina	NS	NS	0,8

Estos resultados muestran la existencia de un cambio en el estado metabólico de las células que presentan un fenotipo con características mesenquimales (MCF7 MKL1 Δ N200). Resulta particularmente interesante



el aumento de la glucosa y el lactato intracelular en esta línea respecto a las líneas control, ya que confirman lo reportado previamente durante mi trabajo de grado, en donde mostramos que estas células presentaban un elevado consumo de glucosa y una alta tasa de producción de lactato. En dicha instancia, las medidas de concentración de glucosa y lactato fueron realizadas a partir de los sobrenadantes del cultivo, utilizando el Bioanalyzer 4 (Nova Biomedical). A continuación, se presenta una gráfica de la concentración de glucosa y lactato en el sobrenadante de cultivo, la cual fue adaptada a partir de los resultados obtenidos en aquel entonces (Figura 37).

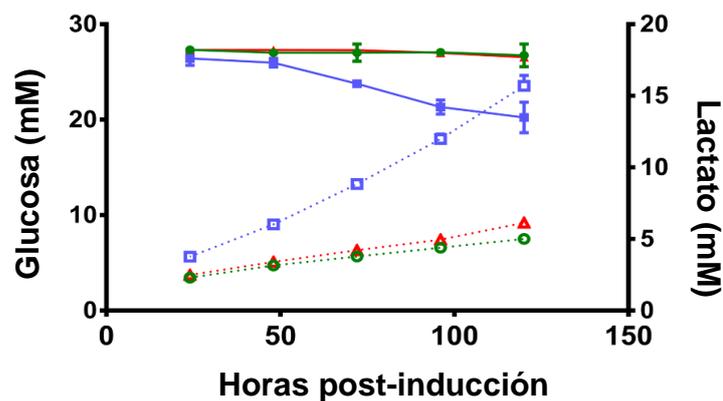
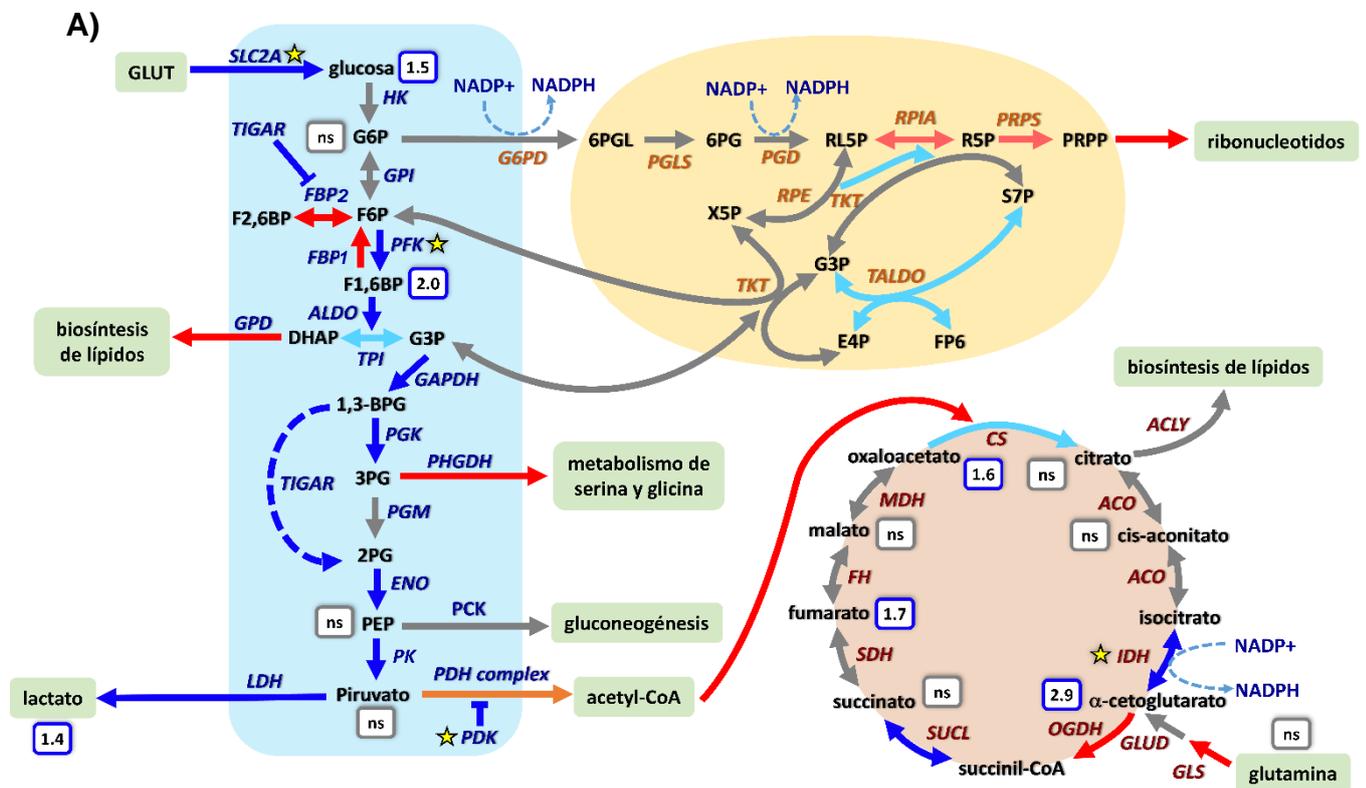


Figura 37. Curvas de concentración de glucosa y lactato en el sobrenadante de cultivo

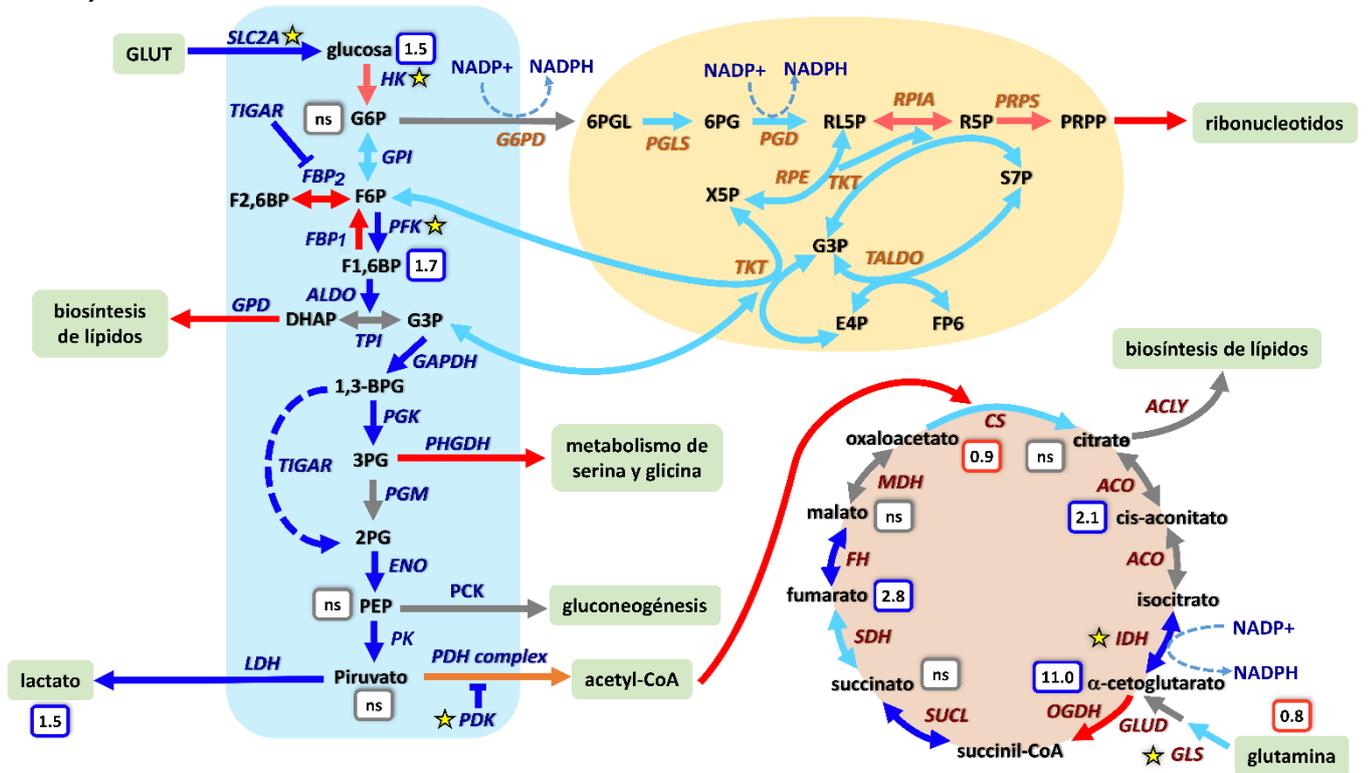
Se muestran las curvas de concentración de glucosa y lactato medidas en el sobrenadante de cultivo a distintos tiempos luego de la inducción con tetraciclina. Los colores representan las líneas celulares: MCF7 Control (verde), MCF7 MKL1 Δ N200 (azul), MCF7 MKL1 Δ C301 (rojo). Los símbolos llenos muestran los valores de glucosa (eje a la izquierda) y los símbolos vacíos muestran los valores de lactato (eje a la derecha).

Por otro lado, estos resultados concuerdan con lo observado por RNA-Seq y Ribosome Profiling sobre los cambios de expresión de las enzimas implicadas en las vías metabólicas en cuestión. En conjunto, estos resultados permitieron generar una visión del estado de dichas vías metabólicas en cada línea celular y ahondar en la comprensión del estado metabólico general de estas células (MCF7 MKL1 Δ N200 vs MCF7 MKL1

Δ C301, Figura 38A; MCF7 MKL1 Δ N200 vs MCF7 Control, Figura 38B; MCF7 MKL1 Δ C301 vs MCF7 Control, Figura 38C). En dichas figuras se representan los cambios en la expresión de las enzimas que surgen de la comparación de las tres líneas celulares. Cabe mencionar que estos resultados, junto con los resultados de concentración de glucosa y lactato mostrados anteriormente y otros resultados del grupo, dieron lugar a una reciente publicación en la revista *Cancer & Metabolism* (Fernández-Calero et al., 2020).



B)



C)

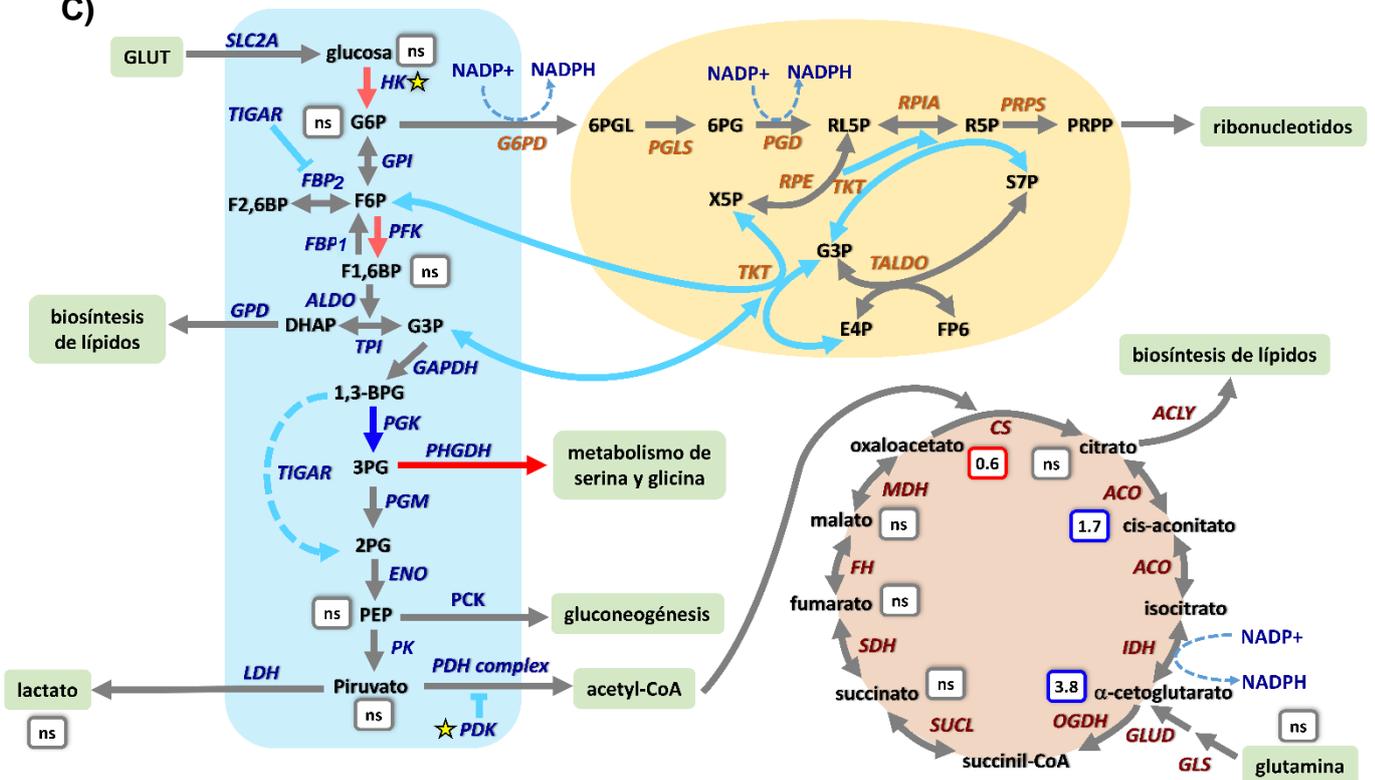


Figura 38. Esquemas de la glucólisis, el ciclo del TCA y la vía de la pentosa fosfato

Se muestran los cambios a nivel de traducción de las enzimas implicadas en los diferentes pasos entre las líneas: **A)** MCF7 MKL1 Δ N200 vs MCF7 MKL1 Δ C301, **B)** MCF7 MKL1 Δ N200 vs MCF7 Control y **C)** MCF7 MKL1 Δ C301 vs MCF7 Control. Se consideraron sólo los valores de "fold change" superiores a 0,5 (FDR <0,01). Los colores de las flechas indican los cambios de expresión de las enzimas implicadas en cada paso: aumenta (azul oscuro: FC > 1.0, azul claro: 1.0 > FC > 0.5); disminuye (rojo oscuro: FC > 1.0, rojo claro: 1.0 > FC > 0.5); sin cambios significativos (gris); cambios variables dentro de un complejo enzimático (naranja). Los valores mostrados dentro de los recuadros pequeños indican el "fold change" de concentración cada metabolito entre ambas líneas celulares. Las estrellas representan cambios en la isoforma predominante. Los fondos de colores indican: glucólisis (celeste); vía de las pentosas fosfato (naranja); ciclo del TCA (rosado).

A partir de los esquemas de la Figura 38 A y B se deduce, en primer lugar, que en la línea MCF7 MKL1 Δ N200 la glucólisis se encuentra exacerbada en comparación con las líneas control, indicado por el color azul oscuro de las flechas que marcan los pasos de esta vía. Se observa de forma clara que estas células presentan una marcada captación de glucosa y producción de lactato, como se mencionó anteriormente. 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 la lactato deshidrogenasa (LDH) responsable de la producción de lactato a partir de piruvato. Esto es consistente con los resultados que obtuvimos por metabolómica que demostraron un aumento significativo en la concentración de lactato en las células MCF7 MKL1 Δ N200 respecto a las células control, aumento que no fue observado cuando se comparó las dos líneas control entre sí. En conjunto, estos resultados apuntan a que las células de la línea MCF7 MKL1 Δ N200 presentan un metabolismo glucídico más acelerado en comparación con las células de las líneas control.

Por otro lado, se observó un fuerte cambio en la expresión de las enzimas involucradas en el ciclo del TCA en estas células en comparación con ambas células control, lo que también se refleja en las mediciones de los intermediarios que obtuvimos por metabolómica. Los resultados indican



claramente que el ciclo del TCA se encuentra alterado en las células MCF7 MKL1 Δ N200, pero no permiten inferir acerca del sentido o el volumen del flujo de los distintos pasos del ciclo. En este sentido, sería interesante analizar el flujo de las distintas rutas más en detalle, utilizando por ejemplo moléculas marcadas con isótopos radiactivos.

En resumen, estos resultados proporcionan una evidencia contundente de una profunda adaptación metabólica de las células MCF7 MKL1 Δ N200, que implica una glucólisis completamente activa, un ciclo del TCA severamente perturbado y la vía de las pentosas fosfato orientada al mantenimiento del estado redox de la célula.

6. DISCUSIÓN

La pregunta central que guía el presente trabajo se basa en comprender si el cambio en el contexto celular podría llevar a un cambio en la maquinaria de traducción que altere el plegamiento de las proteínas. Específicamente nos centramos en los efectos sobre el receptor de estrógenos α (ER α) buscando descifrar si dichas variantes conformacionales pueden estar asociadas a la resistencia al tratamiento hormonal del cáncer mamario. Para ello, llevamos a cabo un análisis de los cambios conformacionales del ER α a través de ensayos de proteólisis limitada. Luego estudiamos el estado de la población de los ARNt realizando ensayos de microarreglos de ARNt en forma comparativa entre las células que atraviesan la TEM respecto las células control. Y, por último, estudiamos el estado metabólico de estas células a través de ensayos de metabolómica, complementando un estudio exhaustivo de la expresión de las enzimas de distintas vías metabólicas por RNA Seq y Ribosome Profiling.

Los cimientos de este trabajo surgen del interés de nuestro grupo por comprender la base de las diferencias en la actividad del ER α en distintos tejidos celulares y frente a distintos ligandos. Esto llevó a una serie de investigaciones, en primer lugar, demostrando que el ER α presentaba cambios en su conformación y afinidad por su ligando cuando era sintetizado en dos sistemas de traducción *in vitro* diferentes (Horjales et al., 2007). Este primer trabajo propuso que las distintas condiciones de traducción llevan a diferencias en la conformación del ER α , las cuales podrían, en parte, explicar las diferencias en su actividad. En línea con la hipótesis anterior, se avanzó hacia un sistema celular, en el cual en lugar de modular la cinética de traducción a través de un cambio del aparato traduccional, se buscó estudiar si un cambio sinónimo de un codón en la secuencia del ER α podía afectar su conformación y su actividad (Fernández-Calero et al., 2014). En este trabajo, se logró demostrar que el



cambio sinónimo de un codón en la secuencia del ER α producía diferencias la actividad y localización subcelular del mismo, sugiriendo que un posible cambio en la cinética de traducción estaría vinculado con un cambio en el plegamiento y por ende en la actividad del ER α . Cabe notar que en dicho trabajo se condujo un análisis bioinformático para descartar que el cambio de base tuviera consecuencias mayores sobre los motivos de unión a proteínas, señales de reconocimiento, señales de splicing alternativo y en la estructura del ARNm del ER α . Ello llevó a plantear que el cambio de codón sólo generaba un cambio en los sets de ARNt encargados de decodificar cada uno de los codones. Por un lado, el codón WT para Ala87 GCG se trata de un codón poco frecuente en el genoma humano y es decodificado por las poblaciones de ARNt Ala-CGC y Ala-UGC, mientras que el codón sinónimo GCC se trata de un codón de alta frecuencia y es reconocido por las poblaciones Ala-IGC (la "I" denota la presencia de inosina) y Ala-GGC. Esta variación, aunque sutil, podría explicar el cambio en la cinética de traducción del ER α y las diferencias funcionales entre ambas variantes.

Basados en estos antecedentes, decidimos ahondar todavía un poco más sobre los cambios conformacionales del ER α , y hallamos una problemática interesante en el papel que juega el ER α en la resistencia al tratamiento hormonal del cáncer de mama. Casi el 80% de los tumores mamarios son clasificados como ER+ (DeSantis et al., 2019). Sin embargo, el 20% de los pacientes diagnosticados con tumores ER+ operables recurren con una metástasis (Pan et al., 2017; Szostakowska et al., 2019). La pérdida de la expresión de ER α ocurre en una minoría (10%) de los cánceres de mama resistentes (Shiino et al., 2016). En cambio, la mayor parte de la resistencia endocrina suele estar impulsada por la activación del ER α independiente del ligando (Miller et al., 2011), causada por mutaciones de ganancia de función en ER α o cambios conformacionales que llevan a interacciones alteradas de ER α con coactivadores/correpresores (Ma et al., 2015). La



metástasis es un proceso que involucra una intensa reprogramación celular muchas veces caracterizada por una transición epitelio-mesenquimal (TEM). En este contexto, surge la hipótesis de nuestro trabajo, donde nos cuestionamos si el proceso de TEM podría desarrollar cambios adaptativos en el aparato traduccional y en el metabolismo energético, que condujeran a opciones alternativas del plegamiento del ER α , y que dichos cambios estuvieran vinculados con la resistencia a la terapia hormonal. Para responder a los tres objetivos específicos presentados en este trabajo utilizamos un modelo celular de TEM previamente descrito (Flouriot et al., 2014; Huet et al., 2009).

El primer objetivo se centró en caracterizar los posibles cambios conformacionales que el ER α podría sufrir al ser sintetizado en distintos contextos celulares adquiridos durante un proceso de transición epitelio-mesenquimal de cáncer de mama (sección 5.1).

Múltiples trabajos 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 pocos 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 es debido a que el estudio del plegamiento de una proteína *in vivo* es una tarea compleja. En condiciones celulares, las diferencias de conformación pueden ser estudiadas mediante ensayos de proteólisis limitada o por fluorescencia pero en condiciones muy particulares (Rodnina and Wintermeyer, 2016). Esta metodología permite analizar la accesibilidad diferencial de distintas proteasas a las proteínas en su conformación natural, mediante el seguimiento de los perfiles de degradación por WB. Gran parte del trabajo de maestría se dedicó a optimizar un protocolo de proteólisis limitada en células permeabilizadas para seguir los cambios conformacionales del ER α en nuestro modelo celular.

Los resultados obtenidos indicarían un posible cambio conformacional en el ER α sintetizado en las células MCF7 MKL1 Δ N200 en comparación al receptor sintetizado en las células MCF7 Control. El cambio de conformación podría originarse tanto por cambios durante su síntesis (lo cual iría en la línea con nuestra hipótesis de trabajo), pero también por cambios en las modificaciones postraduccionales inducidas por los cambios en el contexto celular. 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). 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 utilizando otros anticuerpos y ensayos de unión al ADN. Por otro lado, descartamos la posibilidad de que las bandas de degradación observadas se deban a isoformas del receptor ya que las mismas presentan deleciones en la región reconocida por el anticuerpo que utilizamos por lo que difícilmente puedan ser reconocidas por el mismo. Creemos que las bandas de degradación que se observan en las muestras sin Qt, resultan de una degradación por las propias proteasas celulares ya que las muestras no fueron tratadas con inhibidores de proteasas.

Habiendo demostrado posibles cambios en la conformación del ER α , el segundo objetivo se centró en estudiar el estado de la maquinaria de traducción en las líneas del modelo celular (sección 5.2).

Gracias a contundentes evidencias recientes, la idea de la maquinaria de traducción, y en especial, de las poblaciones de ARNt como entidades poco alterables por el contexto celular ha comenzado a transformarse, reconociéndose que las mismas pueden variar de acuerdo al estado de diferenciación celular (Gingold et al., 2014). A partir de la cuantificación de

grupos de ARNt en diferentes células humanas, algunos investigadores propusieron la existencia de programas de traducción distintos que operan durante la proliferación y diferenciación (Gingold et al., 2014). Esto apoya la hipótesis de que las diferencias tipo celulares específicas observadas en la actividad directa del ER α cuando es sintetizado en las diferentes líneas celulares que componen el modelo de TEM, puedan estar orquestadas por las variaciones de las poblaciones de los ARNt. 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).

Por medio de ensayos de microarreglos de ARNt, logramos demostrar que las células MCF7 MKL1 Δ N200 presentan un aumento en la abundancia de todas las especies de ARNt cuantificadas. Al aumentar de forma considerable la abundancia de los ARNt, de no existir una coordinación con el proceso de aminoacilación, llevaría a pensar que el porcentaje de aminoacilación de cada especie de ARNt debería disminuir. Sin embargo, observamos que la proporción de ARNt cargados respecto a su contraparte no cargada se mantenía o incluso aumentaba al comparar dichas proporciones con las obtenidas en las células control. Esto sugiere una posible coordinación del aumento de los ARNt con la expresión de las aminoacil-ARNt sintetasas.

Resulta interesante mencionar que el aumento generalizado de todas las especies de ARNt es coherente con la disminución observada en la expresión de MAF1 en las células MCF7 MKL1 Δ N200 respecto a ambas líneas control (alrededor de 1,5 veces menos tanto en la transcripción como en la traducción, ver tablas de expresión en *Fernández-Calero et al., 2020*, archivos suplementarios S2 y S3). MAF1 es un represor de la transcripción

mediada por ARN polimerasa III, regulando la producción de ARNt muy abundantes, ARNr 5S y otros ARN pequeños no codificantes (Gerber et al., 2020; Graczyk et al., 2018). Esto a su vez, podría estar relacionado con un estado particular de la cromatina. Por otro lado, aún no se ha descrito un mecanismo que regule de forma general la aminoacilación de todos los ARNt. En este sentido, sería interesante conocer el estado de las aminoacil-ARNt sintetasas, las cuales no parecerían ser un factor limitante en estas células.

Para ser completamente funcionales, los ARNt deben modificarse en gran medida después de la transcripción. Se estima que cada molécula de ARNt tiene un promedio de 13 modificaciones en sus nucleótidos (Oberbauer and Schaefer, 2018; Parisien et al., 2013; Phizicky and Hopper, 2015) y sólo en eucariotas existen alrededor de un centenar de diferentes modificaciones químicas que afectan a diferentes posiciones de los ARNt (Torres et al., 2014). Debido a que las modificaciones del ARNt pueden afectar la precisión y eficiencia de la traducción, así como la estabilidad general del ARNt, se esperaría que la falta de tales modificaciones pudiera tener efectos profundos y generalizados sobre la síntesis de proteínas. Por el contrario, ciertas modificaciones del ARNt podrían afectar la traducción de solo un subconjunto definido de transcripciones enriquecidas en ciertos tipos de codones, los cuales podrían estar vinculados a una vía celular común (Novoa et al., 2012). En cualquier caso, podemos plantear la hipótesis de que la regulación de los niveles de modificación del ARNt podría usarse como un método para modular la síntesis de proteínas y regular procesos celulares complejos. La creciente evidencia indica que las modificaciones los ARNt y las enzimas que catalizan tales modificaciones desempeñan un papel importante en diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama (Bartlett et al., 2010; Frye et al., 2010; Frye and Watt, 2006; Rodriguez et al., 2007). Entendiendo la importancia de las modificaciones en los ARNt para la síntesis de proteínas, se analizaron los

cambios en la expresión de las enzimas involucradas en las modificaciones del ARNt como una primera aproximación al estudio del estado de los ARNt en nuestro modelo celular. Los cambios en la expresión de las enzimas de modificación del ARNt indican profundas alteraciones en la presencia de las distintas modificaciones de la población de ARNt. Por ejemplo, observamos un aumento en la expresión de NSUN2 en la línea MCF7 MKL1 Δ N200 respecto a la línea MCF7 Control sugiriendo un aumento de la presencia de la modificación inducida por esta enzima. La enzima NSUN2, encargada de la metilación de citosinas en varios sitios del ARNt, se expresa en niveles bajos en tejidos normales, pero es abundante en tumores de mama (Frye and Watt, 2006). Curiosamente, NSUN2 se localiza en la región genómica 5p15, que se duplica en el 32% de los pacientes con cáncer de mama y en varias líneas celulares de cáncer de mama diferentes (Frye et al., 2010).

En paralelo, con el objetivo de caracterizar otro actor del aparato traduccional, se estudió el estado de los ribosomas, determinando la expresión de las proteínas ribosomales, así como la conformación de los perfiles polisomales como aproximación de los cambios en las tasas de ensamblaje de los ribosomas (trabajo llevado a cabo durante el doctorado de T. Fernández-Calero). Estos estudios demostraron un aumento significativo en la traducción de los mensajeros codificantes para casi la totalidad de las proteínas ribosomales.

En conjunto, estos resultados muestran unas células MCF7 MKL1 Δ N200 con una maquinaria de traducción muy incrementada, asociada a un incremento a nivel traduccional, sugiriendo una posible necesidad de estas células por aumentar sus niveles de traducción. Esto fue confirmado por ensayos de Polysome y Ribosome Profiling que demostraron un aumento generalizado de la traducción en la línea celular MCF7 MKL1 Δ N200 en comparación a las dos líneas control (Fernández-Calero et al., 2020). Estos

cambios observados en los componentes de la maquinaria de traducción sugieren fuertemente que la cinética de traducción se vería bastante alterada, apoyando nuestra hipótesis acerca del cambio conformacional del ER α .

A su vez, la relevancia de estos resultados se ve reflejada en la coherencia que mantienen con resultados recientemente publicados por dos grupos distintos. Por un lado, Prakash y colaboradores demostraron que la biogénesis de los ribosomas potencia la transición epitelio-mesenquimal tanto en el desarrollo embrionario como en distintas patologías (Prakash et al., 2019). Por otro lado, Goodarzi y colaboradores evidenciaron que el pool de ARNt puede modular la expresión génica y la progresión del cáncer (Goodarzi et al., 2016). En el primero, los autores muestran como la biogénesis ribosomal y el aumento de la actividad traduccional es una característica común en los procesos de TEM. Estos autores demuestran el aumento de la biogénesis ribosomal a través del análisis en el tamaño de los nucleolos (Prakash et al., 2019). Para confirmar los resultados obtenidos sobre el aumento de la biogénesis ribosomal en nuestras células, llevamos a cabo mediciones de los nucleolos mediante microscopía electrónica de transmisión. Los resultados aún son muy preliminares por lo que no se incluyeron en el presente trabajo, pero indicarían que la tendencia se mantiene, observando nucleolos que aumentan de tamaño en la línea MCF7 MKL1 Δ N200 (ver Anexo, sección 9.4).

A partir de todos estos resultados resulta lógico preguntarse el porqué de la necesidad de estas células de mantener los altos niveles de traducción observados. Una respuesta posible sería que estas células presentan una alta tasa de proliferación requiriendo una maquinaria de traducción que lo acompañe. Sin embargo, durante mi tesis de grado, demostramos mediante ensayos de crecimiento que las células MCF7 MKL1 Δ N200 no proliferan, incluso disminuye su viabilidad celular. En línea con esto, los

resultados de expresión mostraron una represión de los genes vinculados a las vías de proliferación celular. Por lo que la proliferación no parecería ser la respuesta más acertada. Por otra parte, estas células presentan un aumento en el tamaño celular observado a través de ensayos de citometría de flujo y por observaciones al microscopio electrónico de transmisión (ver Anexo, sección 9.4). Otra respuesta posible sería que estas células se estarían preparando para el proceso de migración. La hipótesis surge en parte por los resultados de expresión obtenidos por T. Fernández-Calero, 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. Sumado a lo anterior estas células presentan un aumento en la síntesis y exportación de proteínas de la matriz extracelular (ECM), principalmente colágeno de tipo 3, sugerido por los datos de la expresión génica. Llamativamente, una de las especies de ARNt que más despertó nuestra atención por su aumento tanto en abundancia como en porcentaje de aminoacilación es la encargada de decodificar los codones prolina. El aminoácido prolina es el segundo más utilizado en la síntesis de colágeno, dando lugar también a un derivado de la prolina, la hidroxiprolina, indispensable para la estructura rígida del colágeno. Los estudios de expresión mostraron un aumento tanto en la síntesis de colágeno como en las enzimas necesarias para la modificación de la prolina a hidroxiprolina lo que sugiere que efectivamente estas células estarían utilizando gran parte de la maquinaria de traducción para la síntesis de colágeno. En este sentido estudios de determinación de colágeno en el sobrenadante de cultivo podrían confirmar esta hipótesis.

Si esta segunda hipótesis fuese 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 distante del sitio de origen del tumor. Esta

hipótesis es coherente con lo descrito recientemente por R. Ebright y colaboradores, donde demuestran que la desregulación de la expresión de las proteínas ribosomales promueve la metástasis en el cáncer de mama, llevando a cabo un estudio en células tumorales circulantes (CTCs) (Ebright et al., 2020)

Esta enorme demanda energética producida por el aumento de la traducción, sumado al estrés al que se ven sometidas estas células debido a los cambios en sus interacciones con el entorno y a la remodelación de la ECM, lleva a pensar que las células MCF7 MKL1 Δ N200 deberían presentar una extensa reprogramación metabólica. El tercer objetivo de este trabajo se centró en comprender los cambios metabólicos ocurridos en las células durante la TEM (sección 5.3).

Como se discutió anteriormente, la activación de TEM está involucrada tanto en la resistencia al tratamiento hormonal como en la latencia de los tumores mamarios. Aunque el papel del metabolismo en estos procesos no es profundamente comprendido, trabajos recientes sugieren que el recableado metabólico puede ser importante tanto en la resistencia como en la latencia del tumor. Durante un proceso de TEM, las células cancerosas adquieren la capacidad de erosionar la matriz extracelular, la motilidad para extravasar al torrente sanguíneo y la plasticidad para crecer en un tejido diferente. En todas estas fases, el suministro de nutrientes puede ser limitado y las células cancerosas experimentan diferentes grados de estrés (Vanharanta and Massagué, 2013). En consecuencia, las células metastásicas ajustan su metabolismo para adaptarse a los constantes cambios en su entorno (Payen et al., 2016; Porporato et al., 2016). En línea con esta observación, parte de la reprogramación génica orquestada por la TEM afecta la expresión de genes de enzimas metabólicas, regulando el metabolismo de glucosa, lípidos, glutamina, entre otros. De esta forma, resulta muy relevante estudiar el estado metabólico de nuestras células.

Para estudiar el estado metabólico de nuestro modelo celular llevamos a cabo dos estrategias complementarias, abordando la expresión de las enzimas involucradas en las diferentes vías metabólicas (realizado por T-Fernández-Calero mediante RNA-Seq y Ribosome Profiling) y la cuantificación de algunos metabolitos intracelulares por metabolómica. De esta forma, con los datos de metabolómica y los de expresión, logramos generar una idea del estado metabólico de la célula, aunque sin poder inferir de forma concluyente acerca del flujo de las diferentes vías. Los resultados obtenidos a través de ambas estrategias fueron plasmados en los esquemas de las Figuras 38 A, B y C donde se muestra la comparación entre las diferentes líneas celulares. Estos resultados muestran que el estado metabólico de las células MCF7 MKL1 Δ N200 presentan un esquema general consistente con un efecto Warburg acentuado, donde HIF-1 α , un importante regulador transcripcional, desempeña un papel protagónico en los cambios metabólicos (Samanta and Semenza, 2017; Semenza, 2017). Estos cambios incluyen una alteración del ciclo del TCA, el aumento en el consumo de glucosa y la producción de lactato, y cambios en la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo energético.

En primer lugar, se destaca la alta tasa de captación de glucosa y producción de lactato en las células MCF7 MKL1 Δ N200. Debido a que este fenómeno sucede en condiciones de presencia de oxígeno, estaríamos en las condiciones que caracterizan un efecto Warburg (DeBerardinis and Chandel, 2020). Vale aclarar que se trata de un efecto Warburg acentuado ya que las líneas control presentan de por sí una glucólisis aeróbica aumentada en comparación a células no tumorales, pero vemos que, aun así, las células MCF7 MKL1 Δ N200 presentan un incremento en la incorporación de glucosa y la producción de lactato respecto a las células control. El incremento en la glicólisis aerobia y disminución del ciclo del TCA es la alteración metabólica más distintiva de las células cancerosas

(Hanahan and Weinberg, 2011; Pavlova and Thompson, 2016), sin embargo, el papel de las enzimas glucolíticas en la inducción de la TEM ha tomado mayor importancia recién sobre los últimos años. Los resultados observados en las Figuras 38 A y B muestran que la línea MCF7 MKL1 Δ N200 presenta un descenso en la expresión de la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa 1 (FBP1), involucrada en la conversión de fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato. El descenso en la expresión de FBP1 se ha descrito como un evento crítico en la TEM de células tipo basales de cáncer de mama (Dong et al., 2013). También se ha estudiado que la restauración de FBP1 suprime la TEM inducida por Snail en células de cáncer de hígado (Liu et al., 2018).

Por otro lado, dentro de los cambios relacionados con la inducción de HIF-1 α , las células MCF7 MKL1 Δ N200 mostraron una mayor expresión de ENO1, PKM2, ALDOA, ALDOB, ALDOC, LDHA y PDK1 en la glucólisis (Jose et al., 2011; Marín-Hernández et al., 2009; Yeung et al., 2016), algunas de las cuales también se han visto involucradas en la inducción de TEM. Por ejemplo, el silenciamiento de la aldolasa A (ALDOA), una enzima que convierte la fructosa-1,6-bisfosfato en gliceraldehídos-3-fosfato e hidroxiacetona, altera la motilidad y la tumorigénesis de las células del carcinoma escamoso de pulmón, y se asocia con la represión de marcadores mesenquimales (Du et al., 2014). También se ha observado que la sobreexpresión de la lactato deshidrogenasa (LDH), la enzima que convierte el piruvato en lactato, conduce a un aumento de la migración y la invasión de las células cancerosas de la vejiga (Jiang et al., 2016). Tanto la ALDOA como la LDH se encuentran significativamente aumentadas en la línea MCF7 MKL1 Δ N200 de acuerdo a los resultados de expresión, y son apoyados por los valores de lactato registrados en esta línea, lo que sugiere que estas células presentarían una elevada capacidad migratoria. Esto fue confirmado por ensayos de invasión en Matrigel (Fernández-Calero et al., 2020).

Las primeras hipótesis de Otto Warburg proponían que las células cancerosas presentaban una función mitocondrial deteriorada, reposando sobre la glucólisis la función principal de abastecimiento de ATP (DeBerardinis and Chandel, 2020; Warburg, 1956a, 1956b). Hoy en día, está claro que las células cancerosas exhiben glucólisis aeróbica debido a varios factores como la activación de oncogenes, la pérdida de supresores tumorales y la regulación positiva de la vía PI3K, y que las altas tasas glucolíticas confieren ventajas a las células tumorales al generar una gran disponibilidad de precursores para las vías anabólicas y no como única fuente de ATP (Dang, 2012; Pavlova and Thompson, 2016). 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 MCF7 MKL1 Δ N200 al controlar el balance redox de las mismas. 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.

Por otro lado, la disfunción mitocondrial es una característica que se ha asociado con frecuencia a una mayor agresividad y potencial metastásico en distintos tipos de cáncer (Chen, 2012; Porporato et al., 2016). Hace algunos años se demostró que la disfunción mitocondrial en las células mamarias conduce a profundos cambios morfológicos y moleculares que se asemejan a la TEM, incluido una mayor expresión de factores de transcripción característicos de este proceso, así como de metaloproteasas y la supresión de E-cadherina (Guha et al., 2014). A su vez, se ha logrado demostrar el vínculo entre la TEM con tumores que albergan mutaciones en algunas enzimas del ciclo del TCA, como la fumarato hidratasa (FH), la succinato deshidrogenasa (SDH) y la isocitrato deshidrogenasa (IDH) (Grassian et al., 2011; Lorient et al., 2012; Sciacovelli et al., 2016).

Nuestros resultados muestran, que no existen grandes diferencias a nivel de expresión de las enzimas del ciclo del TCA entre las líneas celulares utilizadas como control. Sin embargo, observamos que las células de la línea MCF7 MKL1 Δ N200 presentan un ciclo del TCA bastante perturbado en comparación con ambas líneas control. En este sentido, vemos un aumento significativo en la concentración de α -cetoglutarato y fumarato, presente de forma consistente en las comparaciones con ambas células control. Estos resultados son coherentes con lo observado en la expresión de las enzimas esta vía. Es interesante destacar que el fumarato ha sido descrito como un oncometabolito en varios tumores. Esto significa que se ha demostrado que la acumulación de fumarato en algunos tumores favorece la progresión tumoral, mediando efectos distintos de su rol como metabolito (Yang et al., 2013; Yong et al., 2020). Estudios recientes muestran que el fumarato inhibe una variedad de dioxigenasas dependientes de α -cetoglutarato (α -KGDD), enzimas involucradas en múltiples procesos celulares que van desde el metabolismo hasta la señalización y la epigenética (Laukka et al., 2016; Salminen et al., 2015; Xiao et al., 2012). Ejemplos de α -KGDD inhibidas por el fumarato son algunas prolihidroxilasas (PHD), las cuales se conoce que actúan como reguladores negativos de HIF-1 α (Isaacs et al., 2005). En consecuencia, el fumarato provoca la estabilización de HIF-1 α incluso en condiciones de pseudohipoxia, un sello distintivo de los tumores deficientes en FH (Isaacs et al., 2005). Las α -KGDD también participan en la desmetilación de ADN, ARN e histonas. Datos recientes han demostrado que el fumarato actúa como un potente inhibidor de la familia TET de ADN demetilinasas y de una serie de histona demetilinasas (Laukka et al., 2016; Xiao et al., 2012). En este contexto, el fumarato se considera un modificador epigenético importante (revisado en Yang et al., 2012). También se ha demostrado que la acumulación de fumarato inhibe la desmetilación del ADN en ciertas regiones que regulan la expresión de miARN antimetastásicos, la familia

miR200, favoreciendo los procesos de TEM (Sciacovelli et al., 2016). Esta actividad epigenética del fumarato puede tener un papel crítico en el origen del tumor.

Por otro lado, el α -cetoglutarato juega un rol central en la interconexión de varias vías celulares. El α -cetoglutarato vincula la vía de síntesis de colágeno con la regulación de la estabilidad HIF-1 α actuando como sustrato de la prolil-4-hidroxilasa (P4H) (Stegen et al., 2019). Recientemente se ha demostrado en tumores de mama que el aumento en la expresión de P4HA1 (P4H alpha 1 subunit) favorece la estabilidad de HIF-1 α al competir por el α -cetoglutarato, el cual actúa como sustrato de la PHD responsable de la hidroxilación de las prolinas presentes en HIF-1 α (Xiong et al., 2018). Llamativamente esta enzima se encuentra aumentada varias veces en la línea MCF7 MKL1 Δ N200, sugiriendo un aumento en la síntesis de colágeno y en la estabilización de HIF-1 α . A su vez, el α -cetoglutarato tiene también un rol protagónico en la biología del cáncer y la TEM debido a su relación con las isocitrato deshidrogenasas (IDH). Estas enzimas están encargadas de la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato. Se han identificado tres isoformas de IDHs: la IDH1 citosólica y la IDH2 mitocondrial son enzimas dependientes de NADP⁺, mientras que la IDH3 mitocondrial es una proteína dependiente de NAD⁺ (Cohen et al., 2013). Se han descrito mutaciones neomórficas específicas de IDH1 e IDH2 que conducen a la producción de 2-hidroxiglutarato (2HG o D2HG), una forma reducida del α -cetoglutarato (Cohen et al., 2013; Losman and Kaelin, 2013). Los altos niveles de 2HG se han vinculado a procesos de TEM, interfiriendo con la función de las dioxigenasas que requieren α -cetoglutarato, implicadas en la regulación de la expresión génica. Este fenómeno se observó en tumores de mama (Grassian et al., 2012) y en células de cáncer colorrectal (Colvin et al., 2016; Grassian et al., 2012). Sorprendentemente, las células MCF7 MKL1 Δ N200 presentan un cambio de isoforma de IDH3 a IDH2 lo que podría favorecer la síntesis de 2HG posicionando al α -

cetoglutarato en un punto clave de regulación.

Todos estos resultados sugieren que las células MCF7 MKL1 Δ N200 están efectivamente sometidas a un extenso recableado metabólico, presentando un estado de pseudohipoxia con una glucólisis exacerbada, con HIF-1 α jugando un papel principal en su regulación y un ciclo del TCA muy perturbado, mostrando un aumento de metabolitos cruciales para los procesos de TEM.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A través del presente trabajo, avanzamos en el entendimiento de la contribución del contexto celular sobre los cambios conformacionales del ER α . En primer lugar, logramos optimizar el ensayo de proteólisis limitada en células permeabilizadas a nuestro modelo de estudio, una estrategia que nos permite estudiar los cambios conformacionales de una proteína en un contexto celular. Mediante este ensayo, reportamos las primeras evidencias de una posible alteración en la conformación del ER α sintetizado en la línea MCF7 MKL1 Δ N200, las cuales deben ser confirmadas a través de otras aproximaciones. Las diferencias en la conformación del ER α entre las líneas modelo MCF7 MKL1 Δ N200 y MCF7 Control sientan una base para continuar explorando las propiedades del receptor en células tumorales de mama que pudieran tener un impacto en el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer de mama.

En segundo lugar, demostramos una importante alteración del aparato traduccional, que podría explicar los cambios de conformación del ER α en las células MCF7 MKL1 Δ N200. Caracterizamos la población de ARNt en las diferentes líneas del modelo utilizando análisis de microarreglos. Determinamos tanto la abundancia relativa de cada especie de ARNt, como el porcentaje de aminoacilación. A su vez, estudiamos de forma aproximada, las modificaciones de los ARNt que se podrían ver alteradas por el cambio de contexto celular. En conjunto, estos resultados mostraron que la línea MCF7 MKL1 Δ N200 presenta un aumento tanto en abundancia de los ARNt como en el porcentaje de aminoacilación respecto a las dos líneas celulares control, las cuales no mostraron grandes diferencias entre sí. Sumado a otros resultados de nuestro grupo donde se observa el aumento en la síntesis de proteínas ribosomales y la biogénesis de ribosomas en esta misma línea celular (Fernández-Calero et al., 2020), se demostró un aumento generalizado de la traducción. Este aumento de la

traducción no parece estar vinculado a una proliferación celular activa, sino que parece responder a un aumento del tamaño celular y a un aumento de la secreción de proteínas, incluyendo cambios a nivel de la interacción con la matriz extracelular.

Por último, debemos entender que todos estos cambios ocurren en un contexto celular, en donde existe una estrecha relación entre los niveles de traducción y el metabolismo celular. En este sentido demostramos que el estado metabólico de las células MCF7 MKL1 Δ N200 presentan un esquema general consistente con un efecto Warburg acentuado, donde HIF-1 α desempeña un papel protagónico en los cambios metabólicos, incluyendo un deterioro del ciclo del TCA, un aumento en las tasas de consumo de glucosa y producción de lactato, y cambios en la expresión de distintas isoformas involucradas en puntos claves del metabolismo energético. Estas observaciones sugieren que estas células sufren un intenso recableado metabólico.

En resumen, respecto a los tres objetivos específicos que nos propusimos para este trabajo, hemos caracterizado los cambios conformacionales en el ER α y determinamos una alteración de la maquinaria de traducción y del estado metabólico de las líneas celulares en el contexto de una TEM de cáncer de mama. 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 . Si bien, somos conscientes que se trata de un modelo particular donde la transición es inducida por la translocación nuclear de MKL1 y tenemos claro las limitaciones y el alcance de las posibles conclusiones, es un buen punto de partida para próximas investigaciones. A futuro es interesante explorar si algunos cambios de los observados son trasladables a lo que sucede en tumores de pacientes.

Este trabajo abre nuevas preguntas para continuar con la búsqueda de la comprensión del impacto potencial del contexto celular en la síntesis, plegamiento y funcionalidad de proteínas.

Como perspectivas de la primera parte, sería interesante realizar un estudio *in silico* de los posibles sitios de corte por Qt que se podrían ver alterados. Adicionalmente, sería necesario contar con ensayos de proteólisis utilizando otros anticuerpos específicos para distintas regiones del receptor que permitieran revelar la degradación de las distintas regiones del mismo. También sería interesante realizar estos mismos ensayos en presencia de estradiol como ligando del receptor, para estudiar si existen cambios en la estabilidad del ER α debido a la interacción con el mismo, observando perfiles de degradación alternativos. Profundizando un poco más, sería muy interesante estudiar lo que sucede con las pausas traduccionales sobre el ARNm del ER α mediante ensayos de Ribosome Profiling comparativo entre las líneas celulares

Como perspectiva de la segunda parte, sería interesante estudiar el plegamiento del receptor utilizando sistemas de traducción *in vitro* en los que se varíe la cantidad de ARNt específicos y observar si afecta la conformación del mismo.

Como perspectiva de la última parte, sería interesante analizar el flujo de las distintas rutas metabólicas en mayor detalle, utilizando por ejemplo moléculas marcadas con isótopos radiactivos.

8. REFERENCIAS

- Aggelis, V., Johnston, S.R.D., 2019. Advances in Endocrine-Based Therapies for Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *Drugs* 79, 1849–1866. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01208-8>
- 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>
- Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., Rowan, B.G., 2012. Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl. Recept. Signal.* 10, e001. <https://doi.org/10.1621/nrs.10001>
- Anfinsen, C.B., 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223–230. <https://doi.org/10.1126/science.181.4096.223>
- Arnal, J.-F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M., Fontaine, C., Gourdy, P., Chambon, P., Katzenellenbogen, B., Katzenellenbogen, J., 2017. Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol. Rev.* 97, 1045–1087. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2016>
- Ashe, M.P., De Long, S.K., Sachs, A.B., 2000. Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol. Biol. Cell* 11, 833–848. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.3.833>
- Bartlett, J.M., Thomas, J., Ross, D.T., Seitz, R.S., Ring, B.Z., Beck, R.A., Pedersen, H.C., Munro, A., Kunkler, I.H., Campbell, F.M., Jack, W., Kerr, G.R., Johnstone, L., Cameron, D.A., Chetty, U., 2010. Mammostrat® as a tool to stratify breast cancer patients at risk of recurrence during endocrine therapy. *Breast Cancer Res. BCR* 12, R47. <https://doi.org/10.1186/bcr2604>
- Baumann, S., Kalkhof, S., Hackermüller, J., Otto, W., Tomm, J.M., Wissenbach, D.K., Rolle-Kampczyk, U., Von Bergen, M., 2013. Requirements and Perspectives for Integrating Metabolomics with other Omics Data. *Curr. Metabolomics* 1, 15–27. <https://doi.org/10.2174/2213235X130103>
- 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>
- Björk, G.R., Ericson, J.U., Gustafsson, C.E., Hagervall, T.G., Jönsson, Y.H., Wikström, P.M., 1987. Transfer RNA modification. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 263–287. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.001403>
- Borg, A., Ehrenberg, M., 2015. Determinants of the rate of mRNA translocation in bacterial protein synthesis. *J. Mol. Biol.* 427, 1835–1847. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.10.027>

- Borgia, A., Kemplen, K.R., Borgia, M.B., Soranno, A., Shammas, S., Wunderlich, B., Nettels, D., Best, R.B., Clarke, J., Schuler, B., 2015. Transient misfolding dominates multidomain protein folding. *Nat. Commun.* 6, 8861. <https://doi.org/10.1038/ncomms9861>
- Brown, R.L., Reinke, L.M., Damerow, M.S., Perez, D., Chodosh, L.A., Yang, J., Cheng, C., 2011. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* 121, 1064–1074. <https://doi.org/10.1172/JCI44540>
- Brule, C.E., Grayhack, E.J., 2017. Synonymous Codons: Choose Wisely for Expression. *Trends Genet. TIG* 33, 283–297. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.02.001>
- 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>
- 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>
- Chaney, J.L., Clark, P.L., 2015. Roles for Synonymous Codon Usage in Protein Biogenesis. *Annu. Rev. Biophys.* 44, 143–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-034333>
- Chen, E.I., 2012. Mitochondrial dysfunction and cancer metastasis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 44, 619–622. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9465-9>
- Chiti, F., Dobson, C.M., 2017. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 27–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045115>
- Cohen, A., Holmen, S., Colman, H., 2013. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 13, 345. <https://doi.org/10.1007/s11910-013-0345-4>
- Colvin, H., Nishida, N., Konno, M., Haraguchi, N., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Kawamoto, K., Asai, A., Tsunekuni, K., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., 2016. Oncometabolite D-2-Hydroxyglurate Directly Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and is Associated with Distant Metastasis in Colorectal Cancer. *Sci. Rep.* 6, 36289. <https://doi.org/10.1038/srep36289>
- Creighton, C.J., Chang, J.C., Rosen, J.M., 2010. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in

- breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 253–260. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9173-1>
- Dang, C.V., 2012. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 26, 877–890. <https://doi.org/10.1101/gad.189365.112>
- 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>
- Deroo, B.J., Korach, K.S., 2006. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* 116, 561–570. <https://doi.org/10.1172/JCI27987>
- DeSantis, C.E., Ma, J., Gaudet, M.M., Newman, L.A., Miller, K.D., Sauer, A.G., Jemal, A., Siegel, R.L., 2019. Breast cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* 69, 438–451. <https://doi.org/10.3322/caac.21583>
- 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)
- Dietmair, S., Timmins, N.E., Gray, P.P., Nielsen, L.K., Krömer, J.O., 2010. Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol. *Anal. Biochem.* 404, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.04.031>
- 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>
- Dittmar, K.A., Mobley, E.M., Radek, A.J., Pan, T., 2004. Exploring the regulation of tRNA distribution on the genomic scale. *J. Mol. Biol.* 337, 31–47. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.024>
- Dittmar, K.A., Sørensen, M.A., Elf, J., Ehrenberg, M., Pan, T., 2005. Selective charging of tRNA isoacceptors induced by amino-acid starvation. *EMBO Rep.* 6, 151–157. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400341>
- Dong, C., Yuan, T., Wu, Y., Wang, Y., Fan, T.W.M., Miriyala, S., Lin, Y., Yao, J., Shi, J., Kang, T., Lorkiewicz, P., St Clair, D., Hung, M.-C., Evers, B.M., Zhou, B.P., 2013. Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* 23, 316–331. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.01.022>
- 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>
- Du, B., Shim, J.S., 2016. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Mol. Basel Switz.* 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21070965>
- Du, S., Guan, Z., Hao, L., Song, Y., Wang, L., Gong, L., Liu, L., Qi, X., Hou, Z., Shao, S., 2014. Fructose-bisphosphate aldolase a is a potential metastasis-associated marker of lung squamous cell carcinoma and promotes lung cell tumorigenesis and migration. *PloS One* 9, e85804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085804>

- 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>
- Elf, J., Nilsson, D., Tenson, T., Ehrenberg, M., 2003. Selective charging of tRNA isoacceptors explains patterns of codon usage. *Science* 300, 1718–1722. <https://doi.org/10.1126/science.1083811>
- Elias, S.G., Adams, A., Wisner, D.J., Esserman, L.J., van't Veer, L.J., Mali, W.P.T.M., Gilhuijs, K.G.A., Hylton, N.M., 2014. Imaging features of HER2 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 23, 1464–1483. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-1170>
- Englander, S.W., Mayne, L., 2014. The nature of protein folding pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 15873–15880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411798111>
- Farcas, A.M., Nagarajan, S., Cosulich, S., Carroll, J.S., 2021. Genome-Wide Estrogen Receptor Activity in Breast Cancer. *Endocrinology* 162. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa224>
- Farooq, A., 2015. Structural and Functional Diversity of Estrogen Receptor Ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 1372–1384. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150413154841>
- Fernández Arroyo, S., Rodríguez Medina, I., Beltrán-Debón, R., Pasini, F., Joven, J., Micol, V., Segura Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2011. Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. *Food Res. Int.* 44, 1490–1495. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.040>
- Fernández-Calero, T., Astrada, S., Alberti, Á., Horjales, S., Arnal, J.F., Rovira, C., Bollati-Fogolín, M., Flouriot, G., Marín, M., 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.* 143, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.02.016>
- Fernández-Calero, T., Cabrera-Cabrera, F., Ehrlich, R., Marín, M., 2016. Silent Polymorphisms: Can the tRNA Population Explain Changes in Protein Properties? *Life* 6, 9. <https://doi.org/10.3390/life6010009>
- Fernández-Calero, T., Davyt, M., Perelmuter, K., Chalar, C., Bampi, G., Persson, H., Tosar, J.P., Hafstað, V., Naya, H., Rovira, C., Bollati-Fogolín, M., Ehrlich, R., Flouriot, G., Ignatova, Z., Marín, M., 2020. Fine-tuning the metabolic rewiring and adaptation of translational machinery during an epithelial-mesenchymal transition in breast

- cancer cells. *Cancer Metab.* 8, 8. <https://doi.org/10.1186/s40170-020-00216-7>
- Ferro, I., Liebeton, K., Ignatova, Z., 2017. Growth-Rate Dependent Regulation of tRNA Level and Charging in *Bacillus licheniformis*. *J. Mol. Biol.* 429, 3102–3112. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.09.010>
- 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>
- Fluitt, A., Pienaar, E., Viljoen, H., 2007. Ribosome kinetics and aa-tRNA competition determine rate and fidelity of peptide synthesis. *Comput. Biol. Chem.* 31, 335–346. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2007.07.003>
- 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>
- 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>
- Frydman, J., Nimmegern, E., Ohtsuka, K., Hartl, F.U., 1994. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370, 111–117. <https://doi.org/10.1038/370111a0>
- Frye, M., Dragoni, I., Chin, S.-F., Spiteri, I., Kurowski, A., Provenzano, E., Green, A., Ellis, I.O., Grimmer, D., Teschendorff, A., Zouboulis, C.C., Caldas, C., Watt, F.M., 2010. Genomic gain of 5p15 leads to over-expression of Misu (NSUN2) in breast cancer. *Cancer Lett.* 289, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.08.004>
- Frye, M., Watt, F.M., 2006. The RNA Methyltransferase Misu (NSun2) Mediates Myc-Induced Proliferation and Is Upregulated in Tumors. *Curr. Biol.* 16, 971–981. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.027>
- Fuentes, N., Silveyra, P., 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 116, 135–170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- 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>
- Gardin, J., Yeasmin, R., Yurovsky, A., Cai, Y., Skiena, S., Futcher, B., 2014. Measurement of average decoding rates of the 61 sense codons in vivo. *eLife* 3, e03735. <https://doi.org/10.7554/eLife.03735>
- Genuth, N.R., Barna, M., 2018. 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>

- Gerber, A., Ito, K., Chu, C.-S., Roeder, R.G., 2020. Gene-Specific Control of tRNA Expression by RNA Polymerase II. *Mol. Cell* 78, 765-778.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.023>
- Gingold, H., Pilpel, Y., 2011. Determinants of translation efficiency and accuracy. *Mol. Syst. Biol.* 7, 481. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.14>
- 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., Grønbæk, 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>
- Goodarzi, H., Nguyen, H.C.B., Zhang, S., Dill, B.D., Molina, H., Tavazoie, S.F., 2016. Modulated Expression of Specific tRNAs Drives Gene Expression and Cancer Progression. *Cell* 165, 1416–1427. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.046>
- Gosden, J.R., Middleton, P.G., Rout, D., 1986. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24----q27 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 43, 218–220. <https://doi.org/10.1159/000132325>
- Graczyk, D., Cieśla, M., Boguta, M., 2018. Regulation of tRNA synthesis by the general transcription factors of RNA polymerase III - TFIIIB and TFIIIC, and by the MAF1 protein. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1861, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.01.011>
- Grassian, A.R., Lin, F., Barrett, R., Liu, Y., Jiang, W., Korpai, M., Astley, H., Gitterman, D., Henley, T., Howes, R., Levell, J., Korn, J.M., Pagliarini, R., 2012. Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations promote a reversible ZEB1/microRNA (miR)-200-dependent epithelial-mesenchymal transition (EMT). *J. Biol. Chem.* 287, 42180–42194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.417832>
- Grassian, A.R., Metallo, C.M., Coloff, J.L., Stephanopoulos, G., Brugge, J.S., 2011. Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation. *Genes Dev.* 25, 1716–1733. <https://doi.org/10.1101/gad.16771811>
- 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>
- Guha, M., Srinivasan, S., Ruthel, G., Kashina, A.K., Carstens, R.P., Mendoza, A., Khanna, C., Van Winkle, T., Avadhani, N.G., 2014. Mitochondrial retrograde signaling induces epithelial–mesenchymal transition and generates breast cancer stem cells. *Oncogene* 33, 5238–5250. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.467>

- 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>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanker, A.B., Sudhan, D.R., Arteaga, C.L., 2020. Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell* 37, 496–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.009>
- Hanson, G., Collier, J., 2018. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 20–30. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.91>
- Helm, M., Alfonzo, J.D., 2014. Posttranscriptional RNA Modifications: playing metabolic games in a cell's chemical Legoland. *Chem. Biol.* 21, 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.10.015>
- Hershey, J.W.B., Sonenberg, N., Mathews, M.B., 2012. Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4. <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>
- Huang, W., Peng, Y., Kiselar, J., Zhao, X., Albaqami, A., Mendez, D., Chen, Y., Chakravarthy, S., Gupta, S., Ralston, C., Kao, H.-Y., Chance, M.R., Yang, S., 2018. Multidomain architecture of estrogen receptor reveals interfacial cross-talk between its DNA-binding and ligand-binding domains. *Nat. Commun.* 9, 3520. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06034-2>
- Huet, G., Mérot, Y., Percevault, F., Tiffoche, C., Arnal, J.F., Boujrad, N., Pakdel, F., Métiver, R., Flouriot, G., 2009. Repression of the estrogen receptor- α transcriptional activity by the Rho/megakaryoblastic leukemia 1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 33729–33739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.045534>
- Hunt, R.C., Simhadri, V.L., Iandoli, M., Sauna, Z.E., Kimchi-Sarfaty, C., 2014. Exposing synonymous mutations. *Trends Genet. TIG* 30, 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.04.006>
- Ikemura, T., 1985. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evol.* 2, 13–34. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040335>
- Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Mole, D.R., Lee, S., Torres-Cabala, C., Chung, Y.-L., Merino, M., Trepel, J., Zbar, B., Toro, J., Ratcliffe, P.J., Linehan, W.M., Neckers, L., 2005. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 8, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.06.017>

- Jensen, E.V., Desombre, E.R., Kawashima, T., Suzuki, T., Kyser, K., Jungblut, P.W., 1967. Estrogen-binding substances of target tissues. *Science* 158, 529–530. <https://doi.org/10.1126/science.158.3800.529-c>
- Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, P.W., DeSombre, E.R., 1968. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 59, 632–638. <https://doi.org/10.1073/pnas.59.2.632>
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J.-Å., 2015. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., Nuclear hormone receptors for the clinician* 29, 557–568. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008>
- Jiang, F., Ma, S., Xue, Y., Hou, J., Zhang, Y., 2016. LDH-A promotes malignant progression via activation of epithelial-to-mesenchymal transition and conferring stemness in muscle-invasive bladder cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469, 985–992. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.078>
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R., Tyers, M., 2004. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev.* 18, 2491–2505. <https://doi.org/10.1101/gad.1228804>
- Jose, C., Bellance, N., Rossignol, R., 2011. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 552–561. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.012>
- Kalaitzidis, D., Gilmore, T.D., 2005. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 16, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.01.004>
- 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>
- Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., Ulrich Hartl, F., 2013. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 323–355. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>
- Kimura, S., Dedon, P.C., Waldor, M.K., 2020. Comparative tRNA sequencing and RNA mass spectrometry for surveying tRNA modifications. *Nat. Chem. Biol.* 16, 964–972. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0558-1>
- 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. <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>
- Koos, R.D., 2011. Minireview: Putting physiology back into estrogens' mechanism of action. *Endocrinology* 152, 4481–4488. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1449>
- Kourtidis, A., 2017. A central role for cadherin signaling in cancer 8.
- Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., Bukau, B., 2009. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 589–597. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1614>
- Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M., Chambon, P., 1986. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5, 891–897.
- Kumar, R., Thompson, E.B., 2003. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 17, 1–10. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0258>
- 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>
- Larson, G., Piperno, D.R., Allaby, R.G., Purugganan, M.D., Andersson, L., Arroyo-Kalin, M., Barton, L., Vigueira, C.C., Denham, T., Dobney, K., Doust, A.N., Gepts, P., Gilbert, M.T.P., Gremillion, K.J., Lucas, L., Lukens, L., Marshall, F.B., Olsen, K.M., Pires, J.C., Richerson, P.J., Casas, R.R. de, Sanjur, O.I., Thomas, M.G., Fuller, D.Q., 2014. Current perspectives and the future of domestication studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6139–6146. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323964111>
- 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>
- Laukka, T., Mariani, C.J., Ihantola, T., Cao, J.Z., Hokkanen, J., Kaelin, W.G., Godley, L.A., Koivunen, P., 2016. Fumarate and Succinate Regulate Expression of Hypoxia-inducible Genes via TET Enzymes. *J. Biol. Chem.* 291, 4256–4265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.688762>
- Laxman, S., Sutter, B.M., Wu, X., Kumar, S., Guo, X., Trudgian, D.C., Mirzaei, H., Tu, B.P., 2013. Sulfur amino acids regulate translational capacity and metabolic homeostasis through modulation of tRNA thiolation. *Cell* 154, 416–429. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.043>
- Lee, C.-D., Tu, B.P., 2017. Metabolic influences on RNA biology and translation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 52, 176–184. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1283294>

- Lees, J.A., Fawell, S.E., Parker, M.G., 1989. Identification of constitutive and steroid-dependent transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. *J. Steroid Biochem.* 34, 33–39. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(89\)90063-0](https://doi.org/10.1016/0022-4731(89)90063-0)
- Letzring, D.P., Dean, K.M., Grayhack, E.J., 2010. Control of translation efficiency in yeast by codon–anticodon interactions. *RNA* 16, 2516–2528. <https://doi.org/10.1261/rna.2411710>
- Liang, J., Shang, Y., 2013. Estrogen and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 225–240. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183708>
- Lin, N.U., Winer, E.P., 2008. Advances in adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 798–805. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0946>
- Lin, X., Xiang, H., Luo, G., 2020. Targeting estrogen receptor α for degradation with PROTACs: A promising approach to overcome endocrine resistance. *Eur. J. Med. Chem.* 206, 112689. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112689>
- Lindqvist, L.M., Tandoc, K., Topisirovic, I., Furic, L., 2018. Cross-talk between protein synthesis, energy metabolism and autophagy in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 48, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.11.003>
- 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 (review). *Oncol. Lett.* 12, 4869–4876. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5369>
- Liu, G.-M., Li, Q., Zhang, P.-F., Shen, S.-L., Xie, W.-X., Chen, B., Wu, J., Hu, W.-J., Huang, X.-Y., Peng, B.-G., 2018. Restoration of FBP1 suppressed Snail-induced epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 9, 1132. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1165-x>
- Liu, G.Y., Sabatini, D.M., 2020. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 183–203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>
- Loriot, C., Burnichon, N., Gadessaud, N., Vescovo, L., Amar, L., Libé, R., Bertherat, J., Plouin, P.-F., Jeunemaitre, X., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Favier, J., 2012. Epithelial to mesenchymal transition is activated in metastatic pheochromocytomas and paragangliomas caused by SDHB gene mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E954–962. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3437>
- Lösel, R., Wehling, M., 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 46–55. <https://doi.org/10.1038/nrm1009>
- Losman, J.-A., Kaelin, W.G., 2013. What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev.* 27, 836–852. <https://doi.org/10.1101/gad.217406.113>
- Ma, C.X., Reinert, T., Chmielewska, I., Ellis, M.J., 2015. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Nat. Rev. Cancer* 15, 261–275. <https://doi.org/10.1038/nrc3920>

- 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>
- Marin, M., 2008. Folding at the rhythm of the rare codon beat. *Biotechnol. J.* 3, 1047–1057. <https://doi.org/10.1002/biot.200800089>
- Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J.C., Ralph, S.J., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R., 2009. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 1084–1101. <https://doi.org/10.2174/138955709788922610>
- Marino, M., Galluzzo, P., Ascenzi, P., 2006. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr. Genomics* 7, 497–508. <https://doi.org/10.2174/138920206779315737>
- Marion, R.M., Regev, A., Segal, E., Barash, Y., Koller, D., Friedman, N., O’Shea, E.K., 2004. Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14315–14322. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405353101>
- 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>
- 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>
- Miano, J.M., 2003. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 577–593. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(03\)00110-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(03)00110-x)
- Miller, T.W., Balko, J.M., Fox, E.M., Ghazoui, Z., Dunbier, A., Anderson, H., Dowsett, M., Jiang, A., Smith, R.A., Maira, S.-M., Manning, H.C., González-Angulo, A.M., Mills, G.B., Higham, C., Chanthaphaychith, S., Kuba, M.G., Miller, W.R., Shyr, Y., Arteaga, C.L., 2011. ER α -dependent E2F transcription can mediate resistance to estrogen deprivation in human breast cancer. *Cancer Discov.* 1, 338–351. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0101>
- 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)
- Mittal, V., 2018. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu. Rev. Pathol.* 13, 395–412. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043854>
- 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>

- Morita, M., Gravel, S.-P., Chénard, V., Sikström, K., Zheng, L., Alain, T., Gandin, V., Avizonis, D., Arguello, M., Zakaria, C., McLaughlan, S., Nouet, Y., Pause, A., Pollak, M., Gottlieb, E., Larsson, O., St-Pierre, J., Topisirovic, I., Sonenberg, N., 2013. mTORC1 Controls Mitochondrial Activity and Biogenesis through 4E-BP-Dependent Translational Regulation. *Cell Metab.* 18, 698–711. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.001>
- Morita, M., Gravel, S.-P., Hulea, L., Larsson, O., Pollak, M., St-Pierre, J., Topisirovic, I., 2015. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle Georget. Tex* 14, 473–480. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.991572>
- Morita, M., Prudent, J., Basu, K., Goyon, V., Katsumura, S., Hulea, L., Pearl, D., Siddiqui, N., Strack, S., McGuirk, S., St-Pierre, J., Larsson, O., Topisirovic, I., Vali, H., McBride, H.M., Bergeron, J.J., Sonenberg, N., 2017. mTOR Controls Mitochondrial Dynamics and Cell Survival via MTFP1. *Mol. Cell* 67, 922–935.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.013>
- Morita, T., Mayanagi, T., Sobue, K., 2007. Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial–mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J. Cell Biol.* 179, 1027–1042. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708174>
- 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>
- Nedialkova, D.D., Leidel, S.A., 2015. Optimization of Codon Translation Rates via tRNA Modifications Maintains Proteome Integrity. *Cell* 161, 1606–1618. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.022>
- Nettles, K.W., Bruning, J.B., Gil, G., O'Neill, E.E., Nowak, J., Guo, Y., Hughs, A., Kim, Y., DeSombre, E.R., Dilis, R., Hanson, R.N., Joachimiak, A., Greene, G.L., 2007. Structural plasticity in the oestrogen receptor ligand-binding domain. *EMBO Rep.* 8, 563–568. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400963>
- Netzer, W.J., Hartl, F.U., 1997. Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* 388, 343–349. <https://doi.org/10.1038/41024>
- Ni, L., Snyder, M., 2001. A Genomic Study of the Bipolar Bud Site Selection Pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 12, 2147–2170. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.7.2147>
- Nieto, M.A., Huang, R.Y.Y.J., Jackson, R.A.A., Thiery, J.P.P., 2016. Emt: 2016. *Cell* 166, 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- Novoa, E.M., Pavon-Eternod, M., Pan, T., Ribas De Pouplana, L., 2012. A role for tRNA modifications in genome structure and codon usage, *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.050>

- Oberbauer, V., Schaefer, M.R., 2018. tRNA-Derived Small RNAs: Biogenesis, Modification, Function and Potential Impact on Human Disease Development. *Genes* 9. <https://doi.org/10.3390/genes9120607>
- O'Brien, E.P., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., 2014. Kinetic modelling indicates that fast-translating codons can coordinate cotranslational protein folding by avoiding misfolded intermediates. *Nat. Commun.* 5, 2988. <https://doi.org/10.1038/ncomms3988>
- O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., Hansen, U., 2004. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 18, 1859–1875. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0044>
- Pan, H., Gray, R., Braybrooke, J., Davies, C., Taylor, C., McGale, P., Peto, R., Pritchard, K.I., Bergh, J., Dowsett, M., Hayes, D.F., 2017. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years [WWW Document]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1701830>. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1701830>
- Parisien, M., Wang, X., Pan, T., 2013. Diversity of human tRNA genes from the 1000-genomes project. *RNA Biol.* 10, 1853–1867. <https://doi.org/10.4161/rna.27361>
- Pavlova, N.N., Thompson, C.B., 2016. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 23, 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- 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>
- Payen, V.L., Porporato, P.E., Baselet, B., Sonveaux, P., 2016. Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 1333–1348. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2098-5>
- Pechmann, S., Willmund, F., Frydman, J., 2013. The Ribosome as a Hub for Protein Quality Control. *Mol. Cell* 49, 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.020>
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P.O., Botstein, D., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Phizicky, E.M., Hopper, A.K., 2015. tRNA processing, modification, and subcellular dynamics: past, present, and future. *RNA N. Y. N* 21, 483–485. <https://doi.org/10.1261/rna.049932.115>
- Piu, F., Aronheim, A., Katz, S., Karin, M., 2001. AP-1 repressor protein JDP-2: inhibition of UV-mediated apoptosis through p53 down-regulation.

- Mol. Cell. Biol. 21, 3012–3024.
<https://doi.org/10.1128/MCB.21.9.3012-3024.2001>
- Polte, C., Wedemeyer, D., Oliver, K.E., Wagner, J., Bijvelds, M.J.C., Mahoney, J., de Jonge, H.R., Sorscher, E.J., Ignatova, Z., 2019. Assessing cell-specific effects of genetic variations using tRNA microarrays. *BMC Genomics* 20. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5864-1>
- Porporato, P.E., Payen, V.L., Baselet, B., Sonveaux, P., 2016. Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 2: Mitochondria, lipid and amino acid metabolism. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 1349–1363. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2100-2>
- Prakash, V., Carson, B.B., Feenstra, J.M., Dass, R.A., Sekyrova, P., Hoshino, A., Petersen, J., Guo, Y., Parks, M.M., Kurylo, C.M., Batchelder, J.E., Haller, K., Hashimoto, A., Rundqvist, H., Condeelis, J.S., Allis, C.D., Drygin, D., Nieto, M.A., Andäng, M., Percipalle, P., Bergh, J., Adameyko, I., Farrants, A.K.Ö., Hartman, J., Lyden, D., Pietras, K., Blanchard, S.C., Vincent, C.T., 2019. Ribosome biogenesis during cell cycle arrest fuels EMT in development and disease. *Nat. Commun.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10100-8>
- Preissler, S., Deuerling, E., 2012. Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis. *Trends Biochem. Sci.* 37, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.03.002>
- Prossnitz, E.R., Barton, M., 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 715–726. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.122>
- Purvis, I.J., Bettany, A.J., Santiago, T.C., Coggins, J.R., Duncan, K., Eason, R., Brown, A.J., 1987. The efficiency of folding of some proteins is increased by controlled rates of translation in vivo. A hypothesis. *J. Mol. Biol.* 193, 413–417. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90230-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90230-0)
- Rauscher, R., Bampi, G.B., Guevara-Ferrer, M., Santos, L.A., Joshi, D., Mark, D., Strug, L.J., Rommens, J.M., Ballmann, M., Sorscher, E.J., Oliver, K.E., Ignatova, Z., 2021. Positive epistasis between disease-causing missense mutations and silent polymorphism with effect on mRNA translation velocity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010612118>
- Raymond, W.A., Leong, A.S., 1989. Vimentin--a new prognostic parameter in breast carcinoma? *J. Pathol.* 158, 107–114. <https://doi.org/10.1002/path.1711580205>
- Rodnina, M.V., 2016. The ribosome in action: Tuning of translational efficiency and protein folding. *Protein Sci.* 25, 1390–1406. <https://doi.org/10.1002/pro.2950>
- Rodnina, M.V., Wintermeyer, W., 2016. Protein Elongation, Co-translational Folding and Targeting. *J. Mol. Biol.* 428, 2165–2185. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.022>

- Rodriguez, V., Chen, Y., Elkahloun, A., Dutra, A., Pak, E., Chandrasekharappa, S., 2007. Chromosome 8 BAC array comparative genomic hybridization and expression analysis identify amplification and overexpression of TRMT12 in breast cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 46, 694–707. <https://doi.org/10.1002/gcc.20454>
- Ruff, M., Gangloff, M., Wurtz, J.M., 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>
- Sagi, D., Rak, R., Gingold, H., Adir, I., Maayan, G., Dahan, O., Broday, L., Pilpel, Y., Rechavi, O., 2016. Tissue- and Time-Specific Expression of Otherwise Identical tRNA Genes. *PLoS Genet.* 12, e1006264. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006264>
- Saikia, M., Wang, X., Mao, Y., Wan, J., Pan, T., Qian, S.-B., 2016. Codon optimality controls differential mRNA translation during amino acid starvation. *RNA* 22, 1719–1727. <https://doi.org/10.1261/rna.058180.116>
- Salminen, A., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., 2015. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases are sensors of energy metabolism, oxygen availability, and iron homeostasis: potential role in the regulation of aging process. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 3897–3914. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1978-z>
- Samanta, D., Semenza, G.L., 2017. Maintenance of redox homeostasis by hypoxia-inducible factors. *Redox Biol.* 13, 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.022>
- Sander, I.M., Chaney, J.L., Clark, P.L., 2014. Expanding Anfinsen's principle: contributions of synonymous codon selection to rational protein design. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 858–861. <https://doi.org/10.1021/ja411302m>
- Saxton, R.A., Sabatini, D.M., 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Scharenberg, M.A., Chiquet-Ehrismann, R., Asparuhova, M.B., 2010. Megakaryoblastic leukemia protein-1 (MKL1): Increasing evidence for an involvement in cancer progression and metastasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1911–1914. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.08.014>
- Scheel, C., Onder, T., Karnoub, A., Weinberg, R.A., 2007. Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior. *Cancer Res.* 67, 11476–11479; discussion 11479–11480. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1653>
- Sciacovelli, M., Gonçalves, E., Johnson, T.I., Zecchini, V.R., da Costa, A.S.H., Gaude, E., Drubbel, A.V., Theobald, S.J., Abbo, S.R., Tran, M.G.B., Rajeeve, V., Cardaci, S., Foster, S., Yun, H., Cutillas, P., Warren, A., Gnanaprasagam, V., Gottlieb, E., Franze, K., Huntly, B.,

- Maher, E.R., Maxwell, P.H., Saez-Rodriguez, J., Frezza, C., 2016. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature* 537, 544–547. <https://doi.org/10.1038/nature19353>
- Segev, N., Gerst, J.E., 2017. Specialized ribosomes and specific ribosomal protein paralogs control translation of mitochondrial proteins. *J. Cell Biol.* 217, 117–126. <https://doi.org/10.1083/jcb.201706059>
- Semenza, G.L., 2017. Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *EMBO J.* 36, 252–259. <https://doi.org/10.15252/embj.201695204>
- Shiino, S., Kinoshita, T., Yoshida, M., Jimbo, K., Asaga, S., Takayama, S., Tsuda, H., 2016. Prognostic Impact of Discordance in Hormone Receptor Status Between Primary and Recurrent Sites in Patients With Recurrent Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* 16, e133–e140. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.05.014>
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2020. Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* 70, 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Sloan, C.A., Chan, E.T., Davidson, J.M., Malladi, V.S., Strattan, J.S., Hitz, B.C., Gabdank, I., Narayanan, A.K., Ho, M., Lee, B.T., Rowe, L.D., Dreszer, T.R., Roe, G., Podduturi, N.R., Tanaka, F., Hong, E.L., Cherry, J.M., 2016. ENCODE data at the ENCODE portal. *Nucleic Acids Res.* 44, D726–D732. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1160>
- Sommer, S., Fuqua, S.A., 2001. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 11, 339–352. <https://doi.org/10.1006/scbi.2001.0389>
- Stegen, S., Laperre, K., Eelen, G., Rinaldi, G., Fraisl, P., Torrekens, S., Van Looveren, R., Loopmans, S., Bultynck, G., Vinckier, S., Meersman, F., Maxwell, P.H., Rai, J., Weis, M., Eyre, D.R., Ghesquière, B., Fendt, S.-M., Carmeliet, P., Carmeliet, G., 2019. HIF-1 α metabolically controls collagen synthesis and modification in chondrocytes. *Nature* 565, 511–515. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0874-3>
- Stein, K.C., Frydman, J., 2019. The stop-and-go traffic regulating protein biogenesis: How translation kinetics controls proteostasis. *J. Biol. Chem.* 294, 2076–2084. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002814>
- Sun, Q., Chen, G., Streb, J.W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C.J., Miano, J.M., 2006. Defining the mammalian CArGome. *Genome Res.* 16, 197–207. <https://doi.org/10.1101/gr.4108706>
- 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>
- Szostakowska, M., Trębińska-Stryjewska, A., Grzybowska, E.A., Fabisiewicz, A., 2019. Resistance to endocrine therapy in breast

- cancer: molecular mechanisms and future goals. *Breast Cancer Res. Treat.* 173, 489–497. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-5023-4>
- Torres, A.G., Batlle, E., Ribas de Pouplana, L., 2014. Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends Mol. Med.* 20, 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.01.008>
- Trop, I., LeBlanc, S.M., David, J., Lalonde, L., Tran-Thanh, D., Labelle, M., El Khoury, M.M., 2014. Molecular Classification of Infiltrating Breast Cancer: Toward Personalized Therapy. *RadioGraphics* 34, 1178–1195. <https://doi.org/10.1148/rg.345130049>
- Tsang, J.Y.S., Tse, G.M., 2020. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv. Anat. Pathol.* 27, 27–35. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>
- Tuller, T., Carmi, A., Vestsigian, K., Navon, S., Dorfan, Y., Zaborske, J., Pan, T., Dahan, O., Furman, I., Pilpel, Y., 2010. An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. *Cell* 141, 344–354. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.031>
- van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A.M., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R., Friend, S.H., 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530–536. <https://doi.org/10.1038/415530a>
- Vanharanta, S., Massagué, J., 2013. Origins of metastatic traits. *Cancer Cell* 24, 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.007>
- 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>
- Voulgari, A., Pintzas, A., 2009. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1796, 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.03.002>
- Voutsadakis, I., 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, 11. <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, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0012-z>
- Walker, S.E., Fredrick*, K., 2008. Preparation and evaluation of acylated tRNAs. *Methods San Diego Calif* 44, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.09.003>
- Wang, D.-Z., Li, S., Hockemeyer, D., Sutherland, L., Wang, Z., Schrott, G., Richardson, J.A., Nordheim, A., Olson, E.N., 2002. Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related

- transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14855–14860. <https://doi.org/10.1073/pnas.222561499>
- Warburg, O., 1956a. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.
- Warburg, O., 1956b. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Warner, J.R., 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 24, 437–440. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01460-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01460-7)
- Weikum, E.R., Liu, X., Ortlund, E.A., 2018. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective 17.
- Wohlgemuth, S.E., Gorochofski, T.E., Roubos, J.A., 2013. Translational sensitivity of the *Escherichia coli* genome to fluctuating tRNA availability. *Nucleic Acids Res.* 41, 8021–8033. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt602>
- 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>
- Xiao, M., Yang, H., Xu, W., Ma, S., Lin, H., Zhu, H., Liu, L., Liu, Y., Yang, C., Xu, Y., Zhao, S., Ye, D., Xiong, Y., Guan, K.-L., 2012. Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev.* 26, 1326–1338. <https://doi.org/10.1101/gad.191056.112>
- Xiong, G., Stewart, R.L., Chen, J., Gao, T., Scott, T.L., Samayoa, L.M., O'Connor, K., Lane, A.N., Xu, R., 2018. Collagen prolyl 4-hydroxylase 1 is essential for HIF-1 α stabilization and TNBC chemoresistance. *Nat. Commun.* 9, 4456. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06893-9>
- Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H.L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G.J., Hadjantonakis, A.K., Huang, R.J.Y., Kalcheim, C., Kalluri, R., Kang, Y., Khew-Goodall, Y., Levine, H., Liu, J., Longmore, G.D., Mani, S.A., Massagué, J., Mayor, R., McClay, D., Mostov, K.E., Newgreen, D.F., Nieto, M.A., Puisieux, A., Runyan, R., Savagner, P., Stanger, B., Stemmler, M.P., Takahashi, Y., Takeichi, M., Theveneau, E., Thiery, J.P., Thompson, E.W., Weinberg, R.A., Williams, E.D., Xing, J., Zhou, B.P., Sheng, G., 2020. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 341–352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>
- Yang, M., Soga, T., Pollard, P.J., 2013. Oncometabolites: linking altered metabolism with cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 3652–3658. <https://doi.org/10.1172/JCI67228>

- Yang, M., Soga, T., Pollard, P.J., Adam, J., 2012. The emerging role of fumarate as an oncometabolite. *Front. Oncol.* 2, 85. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00085>
- Yeung, M.Y., Ding, Q., Brooks, C.R., Xiao, S., Workman, C.J., Vignali, D.A.A., Ueno, T., Padera, R.F., Kuchroo, V.K., Najafian, N., Rothstein, D.M., Jude, S., Hospital, W., Florida, C.C., 2016. HHS Public Access 15, 942–953. <https://doi.org/10.1111/ajt.13087>.TIM-1
- Yong, C., Stewart, G.D., Frezza, C., 2020. Oncometabolites in renal cancer. *Nat. Rev. Nephrol.* 16, 156–172. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0210-z>
- Zeisberg, M., Neilson, E.G., 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 119, 1429–1437. <https://doi.org/10.1172/JCI36183>
- Zhang, J., Wang, Qianying, Wang, Qing, Cao, J., Sun, J., Zhu, Z., 2020. Mechanisms of resistance to estrogen receptor modulators in ER+/HER2- advanced breast cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 77, 559–572. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03281-4>
- Zhou, T., Weems, M., Wilke, C.O., 2009. Translationally Optimal Codons Associate with Structurally Sensitive Sites in Proteins. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1571–1580. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp070>
- Zwart, W., de Leeuw, R., 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>

9. ANEXO

9.1. Proteólisis limitada en las líneas celulares sin inducir

Se realizó el mismo ensayo de proteólisis, pero en este caso partiendo de las líneas celulares sin inducir con tetraciclina.

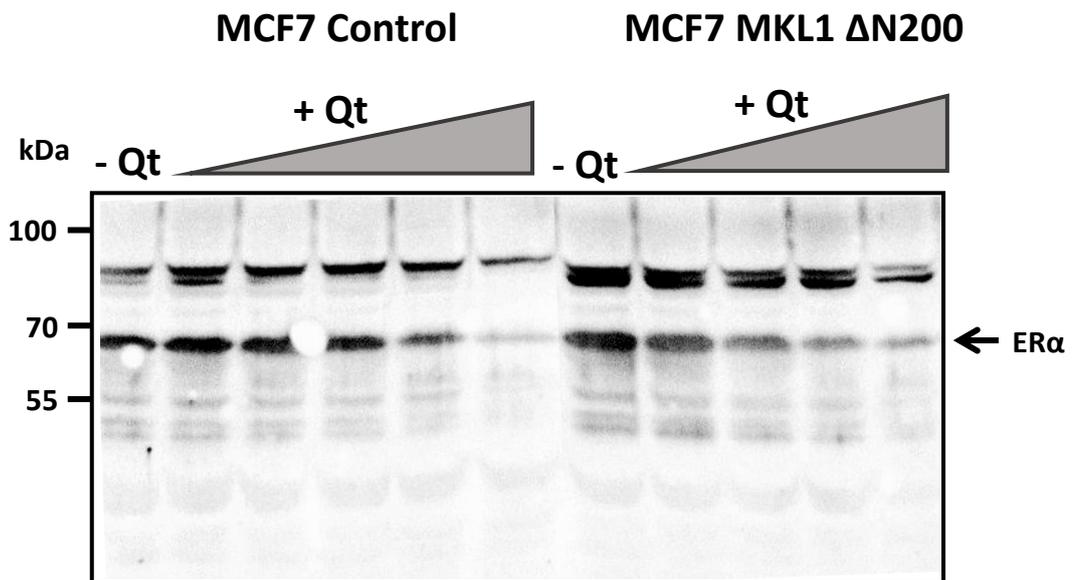
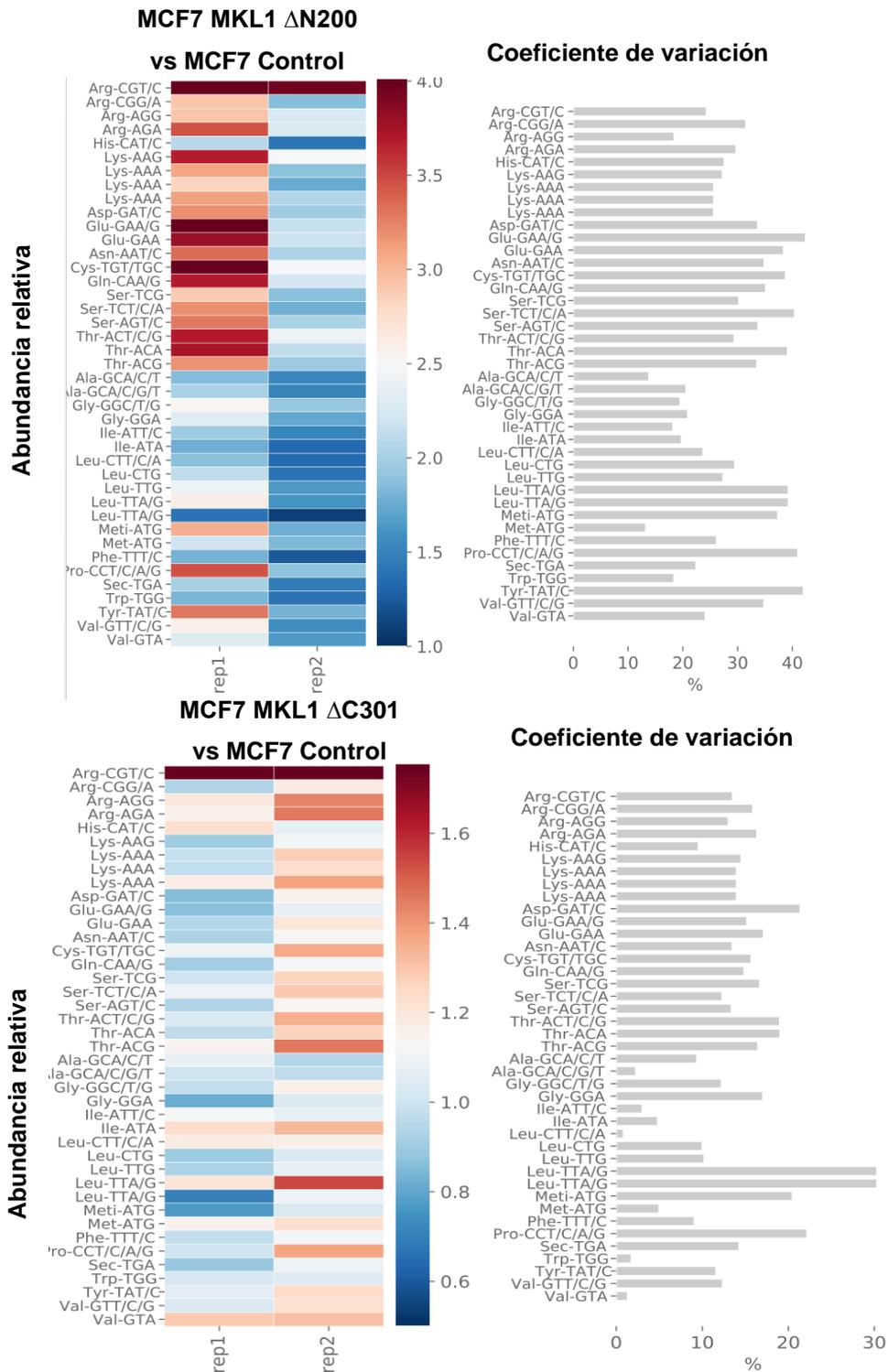


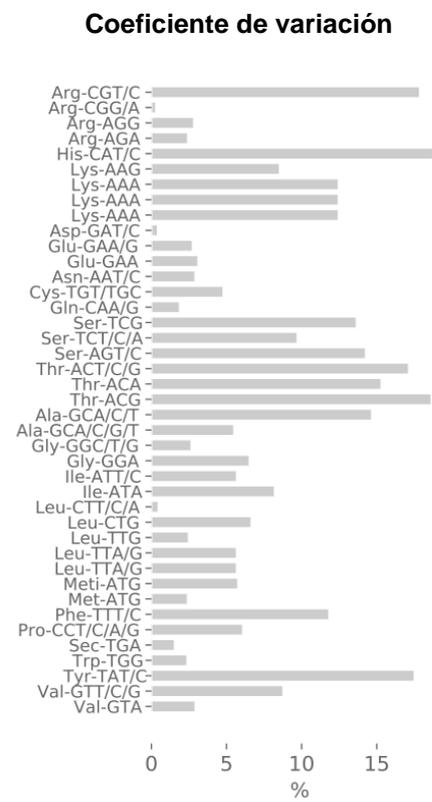
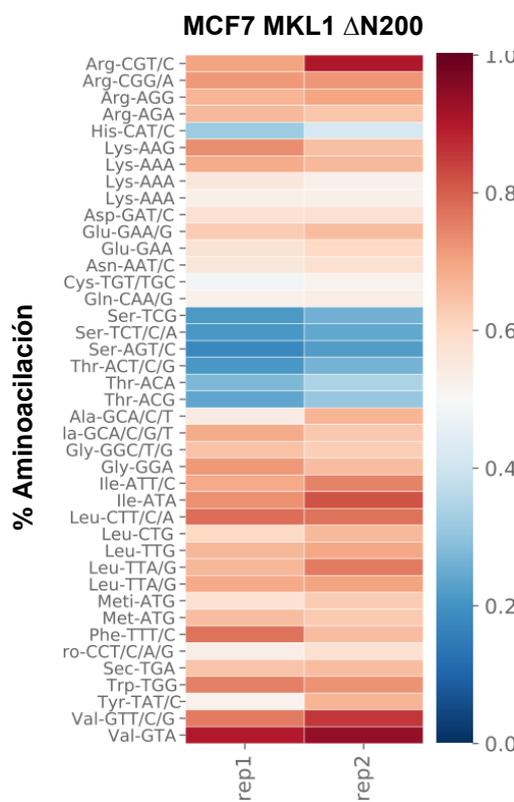
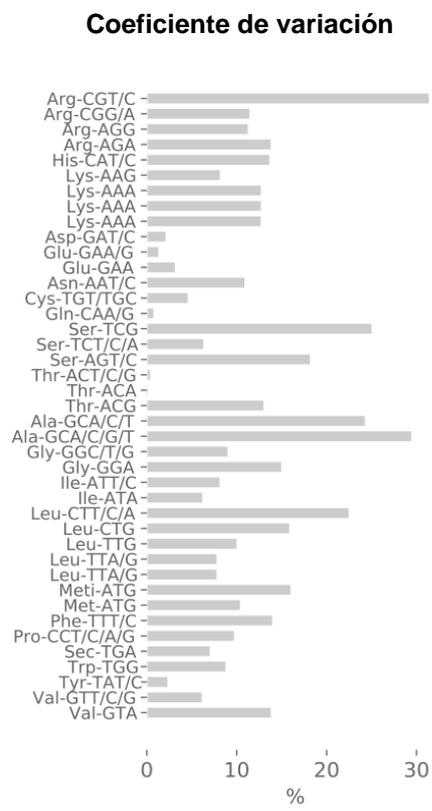
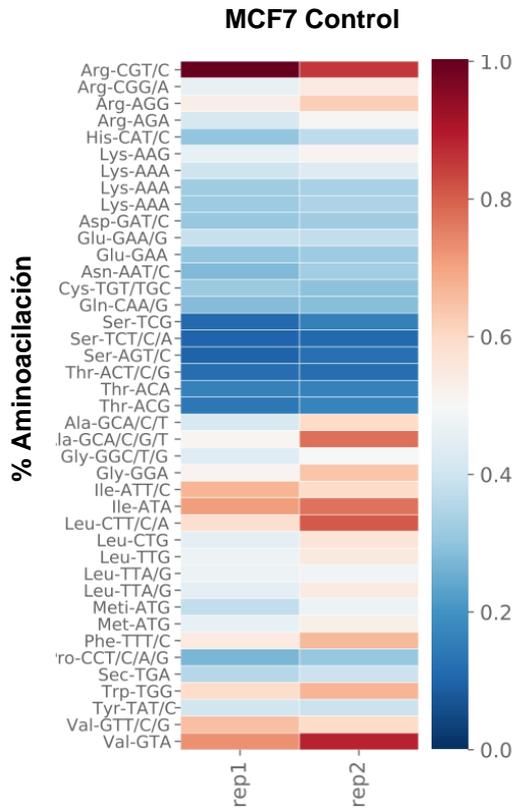
Figura 25. Proteólisis limitada del ER α en MCF7 MKL1 Δ N200 y MCF7 Control sin inducir la diferenciación por el agregado de tetraciclina

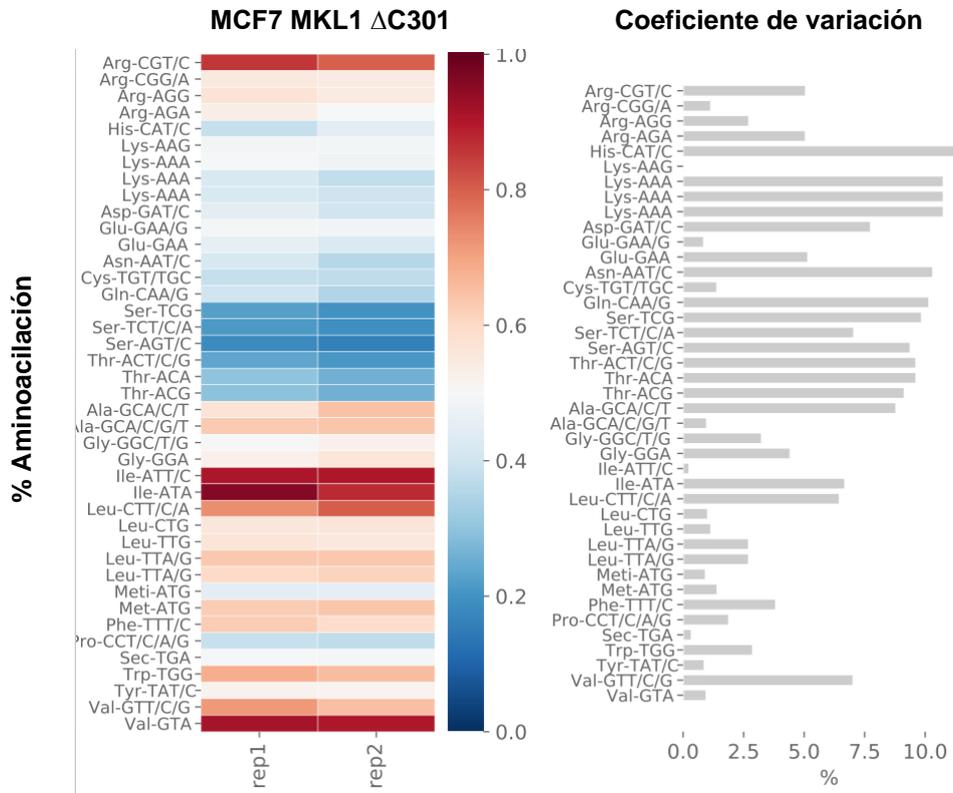
Se permeabilizaron las células para extraer las proteínas citoplasmáticas. Se usó un rango de concentraciones de Qt para degradar las proteínas durante 15 minutos en hielo. Se frenó la reacción luego de este tiempo y se realizó una SDS-PAGE al 12%. Finalmente se detectó el ER α y sus bandas de degradación utilizando una dilución del anticuerpo HC-20. Qt: Quimotripsina. Deg 1: Banda de degradación 1. Deg 2: Banda de degradación 2

No se observaron cambios aparentes en los perfiles presentados por las bandas de degradación.

9.2. Coeficientes de variación entre réplicas del ensayo de microarreglos







9.3. Expresión de las enzimas de modificación de los ARNt



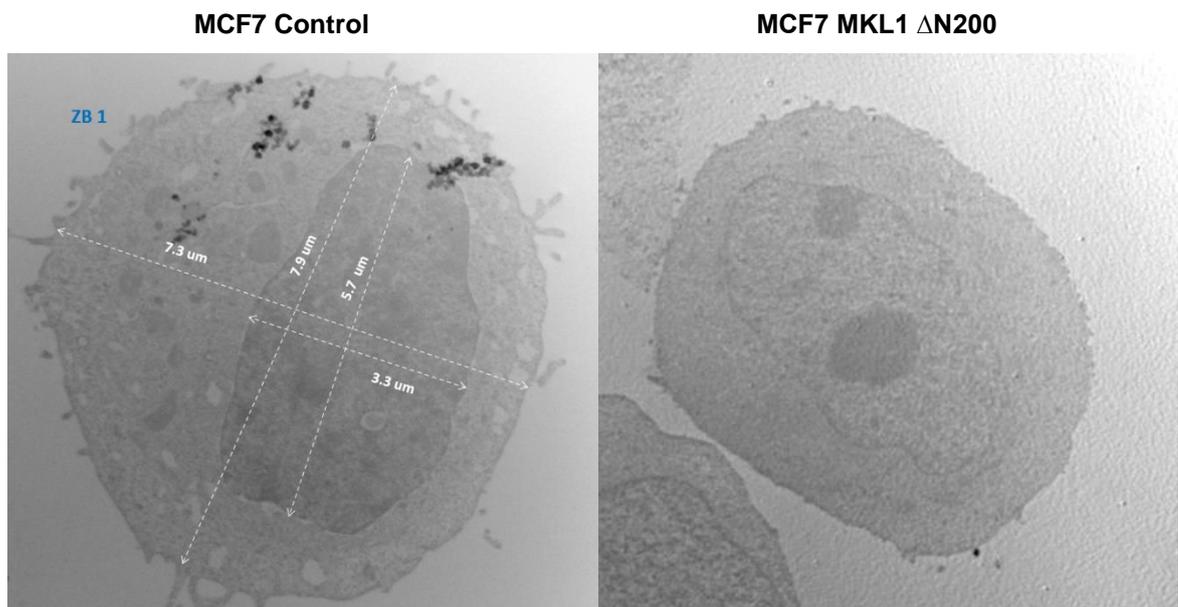
Tabla 7. Expresión de las enzimas modificadoras de los ARNt

Estos resultados surgen del análisis de los ensayos de RNA-Seq y Ribosome Profiling realizados por T. Fernández-Calero. Se muestran los valores de FC significativos de las distintas enzimas involucradas en las modificaciones postranscripcionales de los ARNt.

En tonalidades de rojo se muestran los cambios que disminuyeron y en tonalidades de azul los que aumentaron.

9.4. Determinación del tamaño celular y del tamaño de los nucleolos por microscopía electrónica de transmisión

Para la observación de las células al microscopio electrónico de transmisión se llevó a cabo el protocolo de fijación de células descrito por la Unidad de Microscopía de Facultad de Ciencias. Se realizaron las mediciones de las dimensiones celulares de 11 células de cada línea. A continuación, se muestran a modo de ejemplo, una imagen de cada una de las líneas (no respetan la misma escala) y posteriormente una tabla con el análisis de los diferentes valores.



		Célula			Núcleo		
	Medida	Area (um ²)	Eje mayor (um)	Eje menor (um)	Area (um ²)	Eje mayor (um)	Eje menor (um)
MCF7 Control	Media	81.9	10.6	9.3	39.8	7.6	6.2
	Mediana	74.2	9.9	8.9	36.8	7.5	6.0
	Valor Máximo	140.0	14.1	12.6	70.3	9.9	8.5
	Valor Mínimo	46.3	7.9	6.8	15.4	5.7	3.3
MCF7 MKL1 ΔN200	Media	195.1	18.0	13.4	56.1	10.0	7.0
	Mediana	207.4	18.1	14.2	60.2	9.8	6.6
	Valor Máximo	254.7	22.6	16.5	76.4	12.8	9.5
	Valor Mínimo	80.3	15.1	7.2	27.0	4.9	4.7

		Núcleo 1			Núcleo 2			Núcleo 3		
	Medida	Area (um ²)	Eje mayor (um)	Eje menor (um)	Area (um ²)	Eje mayor (um)	Eje menor (um)	Area (um ²)	Eje mayor (um)	Eje menor (um)
MCF7 Control	Media	1.9	1.6	1.2	1.3	1.3	0.8	1.4	1.3	1.0
	Mediana	1.8	1.5	0.9	1.0	1.2	0.7	1.4	1.3	1.0
	Valor Máximo	5.3	2.8	2.2	2.8	1.6	1.3	2.2	1.6	1.3
	Valor Mínimo	0.6	1.0	0.7	0.7	1.0	0.7	0.6	1.0	0.6
MCF7 MKL1 ΔN200	Media	3.8	2.4	1.8	1.7	1.7	1.1	-	-	-
	Mediana	3.2	2.2	1.8	1.7	1.7	1.1	-	-	-
	Valor Máximo	6.2	3.2	2.4	2.3	2.0	1.4	-	-	-
	Valor Mínimo	2.8	2.0	1.3	1.0	1.4	0.8	-	-	-

		Análisis			
	Medida	% Nucleo en célula	% Nucleolo 1 en Nucleo	% Nucleolo 2 en Nucleo	% Nucleolo 3 en Nucleo
MCF7 Control	Media	49.0	4.1	2.8	2.3
	Mediana	50.2	3.4	2.8	2.3
	Valor Máximo	61.3	9.6	4.0	3.1
	Valor Mínimo	33.3	1.8	1.4	1.5
MCF7 MKL1 ΔN200	Media	29.5	7.3	3.0	-
	Mediana	30.1	7.4	3.0	-
	Valor Máximo	38.8	10.3	3.9	-
	Valor Mínimo	20.0	4.1	2.1	-



9.5. Soluciones

9.5.1. Soluciones para el ensayo de proteólisis limitada en células permeabilizadas

Buffer Fosfato Salino (PBS) solución stock 10X (pH~7,3)

80 g NaCl (137 mM)
2 g KCl (2,7 mM)
2 g KH₂PO₄ 2 g (1,4 mM)
11,5 g Na₂HPO₄ (4 mM)
Llevar a 1 L con H₂O mφ

Buffer KHM (Acetato de Potasio, "K", HEPES, "H", Acetato de Magnesio, "M")

110 mM KOAc
20 mM HEPES – KOH ph 7,2
2 mM MgOAc

Solución de Digitonina Stock (40 mg/mL)

40 mg Digitonina Stock (Sigma, D – 141)
1 mL DMSO (Merck, D – 5879)

Buffer KHM + Digitonina

50 mL Buffer KHM
50 μL Digitonina Stock

Buffer Quimotripsina

1 mM HCl
2 mM CaCl₂

Solución de Quimiotripsina Stock (0,1 mg/mL)

0,1 mg de α – Quimotripsina de páncreas bovino (Sigma, C 3142)

1 mL Buffer Quimotripsina

Buffer de corrida geles poliacrilamida, Tris-glicina, Stock 10X

125 mM Tris

1,25 M Glicina

0,5% SDS

Buffer de transferencia de proteínas

25mM Tris – HCl pH 8,3

150mM Glicina

0.037% SDS

20% EtOH

Buffer TBST

Tris – HCl pH 7.5 – 10 mM

Tween 20 – 0.1%

NaCl – 75 mM

Solución de bloqueo para western blot (TBST-5% leche)

2,5 g leche en polvo

50 mL TBST

9.5.2. Soluciones para el ensayo de microarreglos de ARNt

Solución salina-citrato de sodio (SSC) 20X

3 M NaCl

300 mM Citrato de Sodio pH 7

9.6. Marcadores de peso molecular

El marcador de peso molecular utilizado en las electroforesis en geles de poliacrilamida fue el: PageRuler Prestained Protein Ladder Thermo Scientific (#26619).



AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que de alguna forma han contribuido durante estos tres años, que culminan en este trabajo como la cara visible, pero que por otro lado me han permitido crecer enormemente a nivel personal, con vínculos muy fuertes que trascienden más allá de este trabajo.

Quisiera agradecer a Mónica y a Ricardo muy especialmente, por enseñarme y orientarme en todo este proceso, más allá de lo académico, permitiéndome formar parte de este grupo tan apasionado por la ciencia, del que espero haber tomado una mínima fracción aunque sea de esa pasión. También agradecerles a ambos por las oportunidades que me brindaron y por las puertas que me abrieron, al contactarme con investigadores de todo el mundo, y permitirme divulgar nuestro trabajo en varias oportunidades.

Entre las varias personas con las que me pusieron en contacto se encuentra la Dra. Zoya Ignatova, de la Universidad de Hamburgo, Alemania, a quién habíamos leído varias veces en nuestro grupo por sus artículos muy detallados relacionados al plegamiento de proteínas y la maquinaria de traducción. Agradezco enormemente la posibilidad que me brindó la Zoya de realizar una pasantía en su laboratorio y por confiar en mí su hogar en Berlín para que pudiera recorrer la ciudad. Durante dicha pasantía pude discutir sobre mi trabajo con muchas personas que me ayudaron y me hicieron sentir como en casa. Vayan mis agradecimientos para Giovana, Negar y Priyanka, mis compañeras de oficina y de salidas, a Christine, que me culturizó tanto en la técnica de microarreglos como en la bebida predilecta de Alemania, la cerveza, y a todo el grupo en general con los que compartí varios almuerzos y retiros.



También quisiera agradecer particularmente a todos los integrantes de la Sección Bioquímica que hacen que esta sea, a opinión personal, la mejor Sección de toda la Facultad, logrando generar una sensación de gran familia y haciendo que ir a trabajar sea una tarea muy agradable y que me hizo mucha falta durante la cuarentena en esta época de pandemia de COVID-19.

En particular a Mario y a Cora por siempre guiarme y ayudarme con el trabajo en el laboratorio, y especialmente por las discusiones de las tardes de las que tanto me llevo. A Tamara por todos sus consejos y por el reconocimiento de permitirme ser coautor del trabajo que publicamos en Cancer and Metabolsim. Y a Nacho, que en este último tiempo me guio y aconsejó en varias oportunidades tanto para los experimentos como para mi futura experiencia de investigación en el exterior.

Quiero agradecer muy particularmente a Tania por ser tan intensa que logra sacar energías en momentos donde no las hay y por musicalizar la 305 con su querida Rosalía. Y a Vale por su alegría inagotable, por ser mi dos en los muchos experimentos de proteólisis y por todos los mates (pre-covid) y discusiones que compartimos, y por bancarme en todos los momentos de nervios en los congresos. Gracias a ambas por la complicidad en las bromas y en los desafíos que se fueron presentando.

También quiero agradecer a Eliana, que más allá de una excelente jefa, fue mi madre académica, que me acompañó en este proceso y que siempre me aconsejó en las difíciles decisiones a la hora de tomar los distintos cargos y que siempre tuvo las palabras justas para cada situación.

No quiero dejar de agradecer a las personas del Instituto Pasteur, donde desarrollé gran parte de este trabajo. A Karen por enseñarme a trabajar en “cultivo”, por su disposición para ayudarme siempre que me surgía alguna

duda y más que nada por siempre estar atenta cuando me mandaba alguna macana con las células, siempre logrando arreglarla. A Mariela y a todas las integrantes de la UBC por permitirme realizar la pasantía en su unidad y por involucrarse en este trabajo aportando ideas.

Agradecer especialmente también a los miembros del Tribunal, a Alfonso, Uriel y Pablo por su buena disposición para evaluar este trabajo. Una historia que les va a sonar bastante conocida habiendo evaluado el trabajo de Tamara.

Esta época de pandemia me hizo valorizar mucho las juntadas con amigos que a veces postergué priorizando otras actividades. Vayan mis agradecimientos a mis amigos y amigas de la vida por seguir bancándome después de publicar tantas veces sobre los recortes a la ciencia en las redes sociales y por interesarse en lo que trabajaba, aunque no entendieran mucho acerca de proteínas y ácidos nucleicos.

También quiero agradecer enormemente a mis amigos de la Facultad, un grupo de personas muy especial, con los que de forma impensada para muchos, logramos organizar un viaje increíble para 20 personas a Colombia, fuente de todo tipo de anécdotas que voy a guardar para siempre. Podría mencionar aspectos particulares de cada uno de ellos, pero me llevaría demasiadas carillas.

Mi pasión por la biología celular y molecular, que derivó en la realización de este trabajo, es en gran parte gracias a mis padres, que sembraron la semilla de la ciencia desde temprano y me apoyaron en todos los pasos que fui dando en mi formación. También quiero agradecer a mi hermano por bancarse mis momentos de aburrimiento, a mis abuelos que me regalaron mi primer libro de bioquímica y a toda mi familia por siempre

apoyarme y alentarme. También van mis agradecimientos para mi familia política que siempre me apoyaron.

Y por último, quiero agradecer a una persona que hizo que todo este trabajo tuviera un propósito más que el académico. A una persona que me bancó en los momentos de mayor frustración y que me ayudó a encontrar la salida, a una persona que me hizo disfrutar de estar en cuarentena, y a una persona que por sobre todo me hizo ver lo importante que es el tiempo que dedicamos a cultivar nuestras relaciones personales. Por su amor, su paciencia y su tiempo, quiero agradecer a Lu que estuvo al firme en todo este camino.

Financiación

El presente trabajo de maestría fue realizado gracias al apoyo de la Comisión Académica de Posgrado (CAP) a través de una beca de posgrado y una beca de finalización, desde marzo de 2019 hasta la finalización del trabajo en 2021. También fue gracias al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por medio de las alícuotas de estudiante y de investigador que permitieron la realización de la investigación. Por otro lado, durante el transcurso de este trabajo obtuve el apoyo del Programa de Movilidad Académica (MIA) de la CSIC, financiando tanto el pasaje como la estadía para una pasantía de investigación de tres meses en Alemania. Dicha pasantía tuvo también el apoyo de la Universidad de Hamburgo para la estadía y los gastos de la investigación. También gracias a una beca para congresos de PEDECIBA pude presentar alguno de los resultados obtenidos en un congreso realizado en Chile.

Por otro lado, quiero agradecer a Biorender por facilitar el diseño ilustraciones orientadas a la biología y a Sci-hub por brindarme el acceso a bibliografía que de otra forma sería inaccesible por temas económicos.