



**Ensayos preliminares de proteólisis limitada  
para el estudio de variantes conformacionales  
del receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) en un  
modelo de transición epitelio-mesenquimal de  
cáncer mamario humano**

**Gabriela Cuestas**

**Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Tesina de grado**

**Orientadora: Dra. Mónica Marín**

**Sección Bioquímica y Biología Molecular**

**Facultad de Ciencias, Udelar**

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a Mónica Marín quien me aceptó para la realización de este trabajo, me orientó y que gracias a su comprensión y enseñanza pudo ser finalizado. También quiero agradecer a todos en la sección Bioquímica y Biología Molecular que supieron brindarme su apoyo y conocimiento, en especial Marcos Davyt por sus colaboraciones.

A amigos, compañeros, familia y pareja, que estuvieron, siempre.

## Índice

### 1. Introducción

1.1- Generalidades.....	1
1.2- Receptor de Estrógenos alfa.....	3
1.3- Estructura del Receptor de estrógenos alfa.....	3
1.4- Mecanismos de acción del receptor de estrógenos alfa.....	7
1.5- Transición epitelio-mesenquimal.....	9
1.6- Gen MKL-1 y vía de señalización Rho/actina/MKL1.....	12
1.7- El modelo celular: línea celular MCF 7.....	14

### 2. Objetivos del trabajo

2.1- Objetivos generales.....	17
2.2- Estrategia experimental.....	17

### 3. Materiales y métodos

3.1- Cultivos celulares.....	18
3.2- Proteólisis limitada.....	19
3.3- Western blot.....	19
3.4- Densitometría y análisis semi-cuantitativo.....	20

### 4. Resultados

4.1- Puesta a punto de obtención de extractos celulares.....	21
4.2- Puesta a punto de ensayos de proteólisis limitada.....	21
4.3- Análisis de resultados de proteólisis limitada.....	22

### 5. Discusión.....

	29
--	----

### 6. Bibliografía.....

	39
--	----

### 7. Anexo I.....

	42
--	----

### 8. Anexo II.....

	44
--	----

## **1. Introducción**

### **1.1 - Generalidades**

La estructura tridimensional de las proteínas está definida en gran parte por su secuencia aminoacídica, que es característica de cada proteína en función al entorno físico-químico en que se encuentra. Los estudios in vitro de plegamiento de proteínas previamente desnaturalizadas han sido considerados un buen modelo para entender el mecanismo por el cual una cadena polipeptídica adquiere una única estructura tridimensional dentro de la célula. Esta estructura, resultante de factores intrínsecos y extrínsecos, tales como pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de otros componentes, entre otros, representa una estructura termodinámicamente estable para las condiciones dadas.

A partir de trabajos clásicos en el estudio del plegamiento proteico in vitro se han descrito modelos de plegamiento post-traduccionales, tal como el modelo del "glóbulo fundido". Este modelo establece que la desnaturalización de proteínas se produce a través de consecutivos estados conformacionales intermedios, donde las estructuras secundarias serían las más resistentes a la desnaturalización. Estos estados intermedios, previos a la desnaturalización completa son llamados estados metaestables, a partir de los cuales es aún posible la renaturalización y la posible recuperación de funcionalidad. (Basharov, 2003)

Si bien el plegamiento de las proteínas es explicado en parte por estos modelos in vitro, las condiciones del medio celular, caracterizado por una alta concentración de proteínas y otras macromoléculas, hacen que el plegamiento in vivo posea características particulares. Se ha mostrado que en el plegamiento in vivo intervienen otros mecanismos moleculares y es condicionado por el contexto celular. En este sentido se ha visto la importancia de la acción de chaperonas asociadas al ribosoma que se unen a la cadena polipeptídica nascente y la posterior cooperación con chaperonas citosólicas tales como la HSP60, HSP70 y HSP90 para el correcto plegamiento de las proteínas. Una característica de las chaperonas es la unión transitoria a estructuras intermediarias de plegamiento, que, al unirse a regiones hidrofóbicas, evitan la generación de agregados e interacciones no apropiadas (Deuerling et al., 2004).

Otro factor que ha sido propuesto, y que podría estar involucrado en el plegamiento, es la velocidad de traducción de las cadenas polipeptídicas. (Kramer et al, 2009).

Por un lado, las variaciones en la velocidad de traducción pueden resultar de la estructura secundaria del mRNA, ya que estructuras locales estables del mRNA podrían alterar el avance de la traducción (Kramer et al, 2009).

Por otro lado, se ha descrito el efecto de la presencia de codones lentos o raros en el plegamiento y funcionalidad de la proteína resultante. En este sentido, son ilustrativos los estudios en *Escherichia coli* donde se ha mostrado que la eficiencia de plegamiento de una proteína multidominio (SufI) es alterada por la introducción experimental de sustituciones sinónimas de codones raros por otros cuya abundancia relativa de tRNAs es mayor (Zhang et al., 2009). Asimismo, se ha visto que los codones raros están asociados predominantemente a regiones que codifican límites entre dominios y elementos de la estructura secundaria específicos, tales como las hojas  $\beta$  (Thanaraj et al., 1997). A pesar de encontrarse evidencias de este fenómeno en procariotas y en menor medida en eucariotas, no es del todo claro el rol del uso de codones en estos últimos, por lo que el rol de la velocidad de traducción en el plegamiento proteico en eucariotas aún se encuentra bajo estudio.

Todas estas observaciones sugieren que diversos mecanismos de plegamiento tanto co-traduccionales como post-traduccionales, interacciones con ligandos, otras proteínas y modificaciones post-traduccionales se ven involucrados en la estructura tridimensional de las proteínas dando lugar a diversos estados y variantes conformacionales en las mismas. La importancia de dichas conformaciones tridimensionales radica en su potencial de modulación de la actividad biológica de las proteínas, por lo que el entendimiento de los factores que subyacen a la generación de cambios y variantes conformacionales, así como su caracterización, se torna crucial para el estudio de muchas manifestaciones de salud.

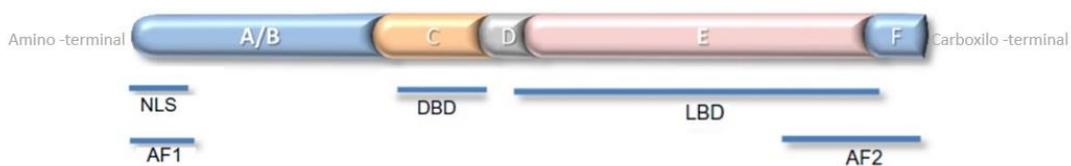
## 1.2- Receptor de Estrógenos alfa

El Receptor de Estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) es un factor de transcripción miembro de la superfamilia de receptores nucleares inducibles por ligandos, la cual incluye a los receptores hormonales esteroideos (receptor de glucocorticoides, mineralocorticoides, receptor de progesterona, receptor de andrógenos y ERs), receptores de hormonas tiroideas y retinoides, receptor de la vitamina D y otros cuyos ligandos son desconocidos, llamados receptores huérfanos (Fox et al., 2004)

El ER $\alpha$  es una molécula de gran importancia en procesos biológicos normales de homeostasis, proliferación y diferenciación celular y se expresa en un amplio rango de tipos celulares y tejidos, principalmente en la glándula mamaria, útero, epidídimo, glándula tiroides y adrenales, tejido óseo, hígado, riñones, algunas regiones del cerebro y corazón (Cheung et al, 2003). El ER $\alpha$ , junto con los estrógenos, en particular el estradiol (E2) son esenciales para diversas funciones fisiológicas, entre ellas el desarrollo sexual y la función reproductiva y juegan un rol esencial en el desarrollo y función normales de la glándula mamaria.

## 1.3- Estructura del Receptor de estrógenos alfa

El ER $\alpha$  al igual que el resto de los receptores nucleares, posee una estructura modular conservada con diferentes dominios, nombrados de A a F (Figura 1)



**Figura 1. Estructura del Receptor de estrógenos  $\alpha$ .** Abreviaturas: AF1, función de transactivación 1; NLS, señal de localización nuclear; DBD, dominio de unión al ADN; LBD, dominio de unión al ligando; AF2, función de transactivación 2. Tomado y modificado de May 2014.

El ER $\alpha$  está codificado por el gen ESR1 ubicado en el brazo largo del cromosoma 6 y su ARN mensajero posee 8 exones, el cual se traduce a su isoforma más

abundante, de 595 aminoácidos y con un peso molecular de 66 kDa, siendo la isoforma que presenta mayor peso molecular aparente de las descritas en la literatura (Fox et al., 2004).

La isoforma de 66 kDa presenta todos los dominios característicos de los receptores nucleares. El dominio A/B del ER $\alpha$  está compuesto por los 180 aminoácidos del extremo amino terminal y contiene la función de transactivación 1 (AF-1) que es una región independiente de ligando involucrada en interacciones proteína-proteína y en la activación transcripcional de sus genes diana. Posee, además, una señal de localización nuclear (NLS). Los detalles estructurales de AF-1 no son bien entendidos ya que se ha observado que la región N- terminal es una región intrínsecamente desordenada en solución acuosa (Wärnmark et al., 2001; Lavery et al., 2005)

El dominio A/B es seguido por el dominio C que presenta el dominio de unión al ADN (DBD) abarcando desde el aminoácido 181 al 263. Este dominio es el más conservado entre los miembros de los receptores nucleares. Posee dos estructuras de dedos de zinc que, actuando de forma colaborativa, son cruciales para la dimerización y unión específica al ADN, asimismo este dominio posee una segunda NLS (May et al., 2014). Ubicadas en los dedos de zinc, se encuentran las llamadas P-box y D-box, dos secuencias aminoacídicas cortas, la primera situada dentro del dedo de zinc hacia el amino terminal, y la segunda en el dedo que se ubica hacia el carboxilo terminal. Estas cortas secuencias permiten el reconocimiento específico de los sitios de elementos de respuesta a estrógenos (EREs) siendo la P-box la secuencia que permite la unión sitio específica y la D-box, la que estabiliza la unión DBD-ERE al formar parte de la superficie de dimerización (Ruff et al., 2000). Los EREs son secuencias palindrómicas, lo cual explica que la dimerización del receptor sea importante para la unión estable al ADN (Fox et al., 2004).

Entre el DBD y el sitio de unión a ligando (LBD) se encuentra una región bisagra, el dominio D (desde el aminoácido 264 al 302), que posee funciones regulatorias, y puede tener modificaciones post-traduccionales. En dicha región bisagra en ausencia de ligando se encuentra unida una proteína chaperona, la Hsp90 confiriéndole estabilidad en su estado inactivo y regulando así la activación de ER $\alpha$  (Fox et al., 2004).



unión a coactivadores (Ruff et al., 2000). De la comparación del tamaño de la molécula de estradiol con el del bolsillo hidrofóbico se ha deducido que el estradiol no ocupa enteramente la cavidad y de esta forma se explica por qué el ER $\alpha$  es capaz de unirse a una gran variedad de esteroides (Fox et al., 2004). Por último, la región F (una región muy poco conservada en la familia de receptores nucleares) comprende parte de la AF-2 y se ha visto implicada en la regulación diferencial de la transcripción en respuesta a estrógenos y antiestrógenos de manera dependiente del tipo celular (Fox et al., 2004).

Además de la isoforma del ER $\alpha$  de peso molecular de 66 KDa se han descrito otras variantes producto de splicing alternativo o uso de promotores alternativos. Una gran variedad de ARN mensajeros coexiste en las células junto con el correspondiente a la isoforma de 66 KDa y han sido identificados en tejidos normales tales como endometrio, epitelio mamario, entre otros, así como en células tumorales de diversos tipos. La expresión de algunas de estas variantes de splicing se ha asociado con la adquisición del fenotipo independiente de hormonas en algunos cánceres de mama (Kerdivel, 2013)

Si bien se han reportado múltiples variantes de splicing en diversos tejidos, pocas isoformas de la proteína han podido ser caracterizadas a la fecha (Barone et al., 2010). Se ha sugerido la presencia de isoformas de 39 y 46 kDa en ensayos de inmunoprecipitación usando anticuerpos monoclonales anti-ER $\alpha$  contra el dominio LBD en osteoblastos primarios y células de la línea MCF-7 (Denger et al., 2001). Si bien la proteína de 39 kDa no ha sido definitivamente confirmada como una isoforma de ER $\alpha$ , si lo fue la isoforma de 46 kDa a través de ensayos de inmunoblot en la línea celular MCF-7 utilizando anticuerpos policlonales tanto como monoclonales (HC20 y H222, respectivamente) contra el extremo carboxilo terminal de ER $\alpha$  (Flouriot et al., 2000). Posteriormente se encontró otra variante de splicing de 36 kDa, la cual también fue correlacionada con la resistencia endócrina. Esta variante carecería de los dominios de transactivación AF1 y AF2 (Wang et al., 2005).

Existe evidencia de que estas isoformas podrían cumplir un rol significativo en eventos de señalización. Por ejemplo, la isoforma de 46 kDa, que carece de los primeros 173 aminoácidos correspondientes al AF-1, presenta una localización

celular alterada que le confiere una respuesta de señalización más rápida que la isoforma 66 kDa. Si bien también se ha observado que esta isoforma opera como un inhibidor competitivo al formar heterodímeros con la isoforma 66 kDa, y que la proporción de ambas isoformas tiene una correlación con la proliferación celular en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, la función y mecanismos de acción de esta isoforma aún no han sido del todo dilucidadas (Flouriot et al., 2000; Barone et al., 2010), si bien se ha propuesto su rol como inhibidor de la progresión tumoral (Klinge et al., 2010)

Por otro lado, la isoforma de 36 kDa es expresada tanto en tumores de mama ER $\alpha$  positivos como negativos. Esta isoforma carece de actividad transcripcional intrínseca, pero suprime eficientemente la actividad del ER $\alpha$ -66 kDa. Similar a la isoforma 46 kDa, esta isoforma se localiza en la membrana celular, donde media cascadas de señalización no genómicas, estimulando la proliferación celular. Así, la sobre expresión de esta isoforma se asocia con un peor pronóstico en casos de cáncer de mama (Wang et al., 2015).

Aumentando aún más la diversidad estructural y funcional del ER $\alpha$ , se ha descrito la existencia de variantes conformacionales del ER $\alpha$  a partir de ensayos de traducción in vitro en diferentes sistemas de traducción eucarióticos, lo cual sugiere la influencia del contexto celular en las propiedades estructurales y funcionales del ER $\alpha$  resultante (Horjales et al., 2007).

#### **1.4- Mecanismos de acción del receptor de estrógenos alfa**

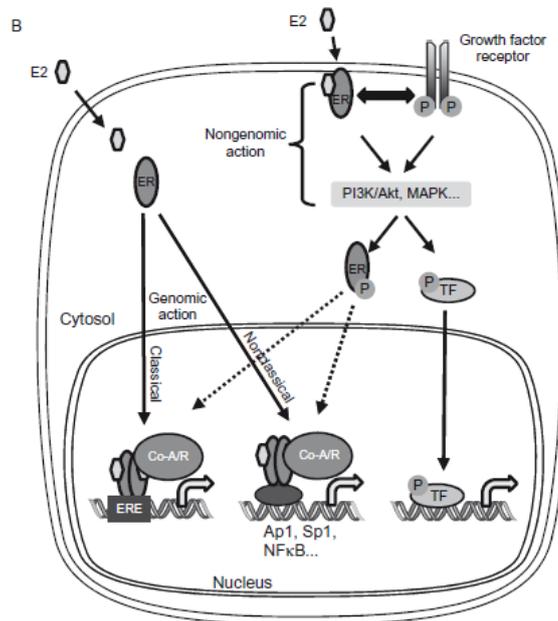
La amplia distribución del ER $\alpha$  y su participación en una gran variedad de vías de señalización y mecanismos de acción hacen que los estrógenos tengan un gran número de efectos pleiotrópicos haciendo que se encuentren involucrados en una cantidad de procesos fisiológicos tanto normales como patológicos.

Como el mediador de los estrógenos, en especial del estradiol (E2), la unión de éstos genera cambios conformacionales que permiten su activación como regulador transcripcional. El ER $\alpha$  se encuentra secuestrado en las células en su forma inactiva en un complejo que incluye las proteínas de shock térmico HSP 70 y HSP 90, entre otras. La unión de alta afinidad a los estrógenos provoca la

disociación del complejo (May, 2014) dando lugar a la dimerización del receptor y su posterior acción.

El ER $\alpha$  puede mediar sus acciones tanto a través de la acción genómica como de la no genómica (Figura 3).

En el primer caso, la unión a su ligando promueve la unión al ADN, ya sea directamente a través de elementos de respuesta a estrógenos (EREs) presentes en los promotores de los genes blanco o a través de la interacción con factores de transcripción tales como proteína específica Sp1, proteína activadora 1 (Ap1) o el factor nuclear kapa (NF $\kappa$ B), ya unidos al ADN. Los cambios conformacionales asociados a la activación del ER $\alpha$  también permiten el reclutamiento de, además de la ARN polimerasa II, coactivadores o corepresores transcripcionales tales como CBP/p300, SRC y NCOA1 por lo que el perfil de activación transcripcional de ER $\alpha$  depende en gran medida tanto del contexto celular como el de los promotores.



**Figura 3. Esquema de acciones genómicas y no genómicas de ER $\alpha$ .**  
Tomado de Kerdivel et al., 2013.

Otros mecanismos de acción del E2 se producen a través de acciones no genómicas. A través de la activación de una subpoblación de moléculas de ER $\alpha$

unidas a la membrana celular o ubicadas en el citosol, se activan vías de señalización intracelular tales como MAPK y PI3K, a través de la interacción con proteínas adaptadoras tales como MNAR o a través del entrecruzamiento con diversas vías de señalización que involucran receptores de factor de crecimiento por ejemplo el receptor del factor de crecimiento insulínico (IGFR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). La activación de estas vías resulta en la fosforilación y activación de varios factores de transcripción, incluyendo el mismo ER $\alpha$  y sus cofactores (Kerdivel et al., 2013).

Se ha observado la expresión del ER $\alpha$  en un 70% de los casos diagnosticados de cáncer de mama (tumores ER $\alpha$  positivos), los cuales se correlacionan con un fenotipo de proliferación dependiente de E2 (Kerdivel et al., 2014). En células ER $\alpha$  positivas, la presencia de E2 estimula la proliferación y supervivencia estimulando genes anti-apoptóticos y promitóticos (Kerdivel et al., 2013) sin embargo aún en presencia de estrógenos muestran generalmente ser menos invasivas y más diferenciadas que las células ER $\alpha$  negativas. Esto se ha asociado a un rol del ER $\alpha$  de mantenimiento del fenotipo epitelial (Kerdivel et al., 2013). La proliferación dependiente de E2 hace que los tumores ER $\alpha$  sean sensibles a las terapias hormonales anti-estrógenos, tales como el tamoxifeno, y por este motivo la expresión del ER $\alpha$  se encuentra asociada con un mejor pronóstico. Sin embargo, con cierta frecuencia, los tumores ER $\alpha$  positivos desarrollan resistencia a los tratamientos hormonales. Este fenómeno denominado “escape hormonal” implica un cambio de fenotipo dependiente de E2 a uno independiente de E2 y se lo ha asociado a la pérdida del fenotipo epitelial y la adquisición de un fenotipo mesenquimal.

### **1.5- Transición epitelio-mesenquimal**

La transición epitelio-mesenquimal (EMT) es un proceso normal y esencial en el desarrollo y permite la reprogramación de células epiteliales polarizadas hacia un fenotipo mesenquimal con motilidad. Durante el desarrollo embrionario es esencial para los grandes movimientos celulares requeridos por ejemplo en la gastrulación y la organogénesis, además de estar involucrado en la regeneración normal de tejidos en adultos (Mani et al, 2008)

La desregulación de la EMT da lugar a condiciones patológicas y en el caso de tumores no metastásicos que atraviesan la EMT se genera un aumento en la capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales, pudiendo dar lugar a metástasis. Se ha asociado el fenotipo adquirido de células que sufren EMT con el de células madre cancerosas (CSC), un tipo de célula tumoral con alta capacidad tumorigena que presenta características de autorenovación y regeneración de la heterogeneidad del tumor primario. Existen profundos cambios fenotípicos asociados a la EMT que involucran la expresión de factores de transcripción que dirigen la expresión alterada de genes involucrados en la adhesión celular, motilidad y la reorganización del citoesqueleto, con la concomitante pérdida de polaridad apicobasal (May et al., 2011).

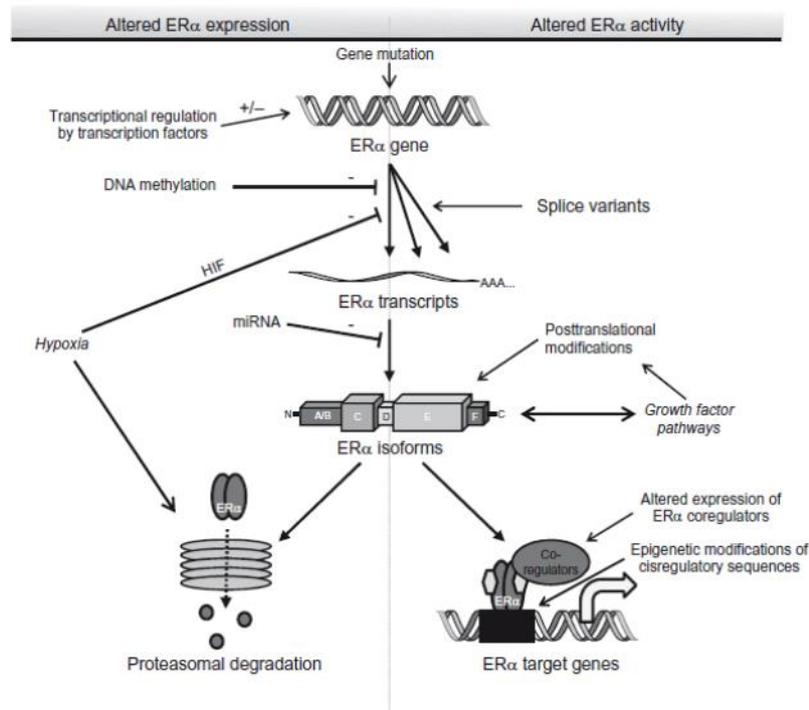
Un evento crítico en la EMT es la pérdida de uniones intercelulares mediadas por E-cadherinas, un componente de las uniones adherentes.

Entre otros mecanismos, la pérdida de estas uniones celulares y por lo tanto la EMT, están asociadas a activación del gen MKL1 el cual juega un rol importante en la progresión del cáncer, ya sea como promotor tumoral o supresor, dependiendo del contexto celular. El rol pro-metastático de MKL1 es generalmente explicado por su efecto en la expresión de genes involucrados en funciones motiles (Scharenberg et al., 2010; Flouriot et al., 2014; Kerdivel et al., 2014)

Asimismo, durante la EMT se ha descrito una reducción de la expresión de ER $\alpha$ , así como del receptor de progesterona (PR) y de HER2, generándose un fenotipo triple negativo (ER $\alpha$ -, PR- y HER2-) que exhibe características más agresivas y con pérdida de respuesta a los estrógenos. Este cambio fenotípico también se ha asociado con la activación del gen MKL1 (Kerdivel et al., 2014). Concomitantemente, en la EMT, los niveles de actividad de señalización de receptores de factores de crecimiento- tales como EGFR o IGFR- se incrementan. De este modo, la sobreexpresión o aumento de la actividad de los componentes pertenecientes a las vías de receptores de factores de crecimiento son potenciales mecanismos de proliferación y supervivencia alternativa de las células tumorales (Barone et al., 2010) y explican en parte la proliferación independiente de estrógenos en células que cursan la EMT.

Además de la alteración de la expresión de ER $\alpha$  existe alteración de su actividad durante la progresión tumoral, lo cual se refleja en la expresión y actividad de

ER $\alpha$  en distintos contextos celulares. Diversos mecanismos moduladores pueden influir en el proceso de pérdida de respuesta a estrógenos. Estos mecanismos se han observado a distintos niveles (figura 4), y algunos de estos incluyen acción diferencial de co-reguladores de ER $\alpha$  debido a modificaciones post-traduccionales tanto del receptor como de proteínas coactivadoras.

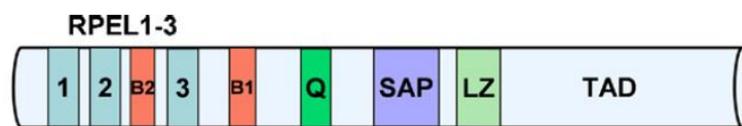


**Figura 4. Mecanismos involucrados en la modulación de la expresión y actividad del ER $\alpha$  durante la progresión tumoral.** Tomado de Kerdivel et al., 2013.

Se ha encontrado que una de las causas de estas modificaciones post-traduccionales es la activación de distintas vías de señalización de factores de crecimiento por lo cual es clave comprender los cambios a nivel conformacional de ER $\alpha$  en el fenómeno de pérdida de respuesta a estrógenos. Dichos cambios conformacionales serían generados por la activación de vías de señalización de receptores de crecimiento, cuyos mensajeros intermediarios se encuentren relacionados con las vías de señalización de ER $\alpha$  (Kerdivel et al., 2013)

## 1.6- Gen MKL-1 y vía de señalización Rho/actina/MKL1

El gen MKL1 (leucemia megacarioblástica 1, también nombrado como MRTF-A, MAL o BSAC) es un factor de transcripción, que primeramente fue descrito como un coactivador transcripcional del factor de respuesta al suero (SRF) en el control de funciones celulares contráctiles o móviles (Cen et al., 2003). El gen MKL1 humano codifica una proteína de 931 aminoácidos, y es miembro de la familia de genes MRTF (factor de transcripción relacionado con miocardina) con los que comparte una homología de más del 60 % en una serie de dominios conservados. Una de las regiones altamente conservadas es el dominio N-terminal. Esta región contiene motivos RPEL cuyo número varía con la isoforma de la proteína. Los motivos RPEL están implicados en la unión a la actina y la importación nuclear de MKL1 dependiente de Rho. MKL1 posee dos regiones básicas, ubicadas en el extremo N-terminal las cuales están involucradas en la localización nuclear de MKL1. Como los demás miembros de la familia MRTF, MKL1 posee un dominio SAP, que consiste en dos hélices anfipáticas de 35 aminoácidos con funciones en la regulación de la organización nuclear, dinámica de la cromatina y apoptosis (Scharenberg et al., 2010). (Figura 5)



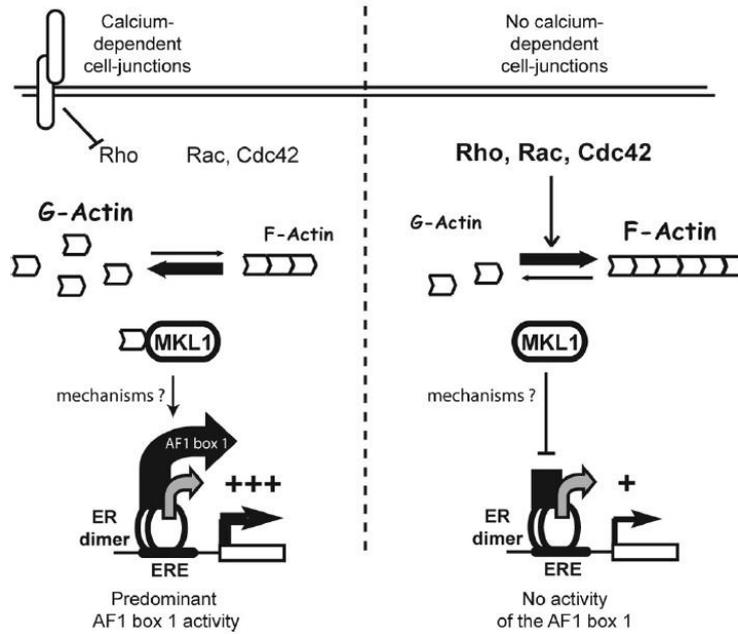
**Figura 5. Estructura de MKL1.** Abreviaturas: RPEL1-3, motivos de unión a la actina; B1 y B2, dominios básicos; Q, dominio rico en glutamina; SAP, dominio SAP; LZ, dominio tipo cremallera de leucina; TAD, dominio de transactivación. Tomado de Scharenberg et al., 2010.

MKL1 media la regulación de la expresión génica en función del estado de polimerización de actina, translocando continuamente desde el citoplasma al núcleo vía un proceso controlado por actina globular (actina-G) que involucra la vía RhoA/MKL1. MKL1 se encuentra secuestrado por actina-G en el citoplasma a través de la interacción con sus motivos RPEL. La activación de la vía RhoA produce un aumento en la tasa de polimerización de actina con la subsecuente acumulación de actina fibrilar (actina-F), liberando a MKL1 de la actina-G y permitiendo su posterior importación al núcleo, en donde coactiva las actividades transcripcionales del factor de respuesta al suero (SRF).

Se ha visto que la vía de señalización Rho/actina/MKL1 también tiene un rol predominante en el control de la actividad transcripcional de ER $\alpha$  a través de la modulación de la contribución relativa de las dos funciones de activación, AF-1 y AF-2 (Figura 6). La contribución de AF-1 o de AF-2 a la actividad del ER $\alpha$  depende tanto del promotor como de la línea celular y del estadio de diferenciación celular, observándose una mayor actividad transcripcional en células diferenciadas (Mérot et al., 2004). Cuando MKL1 es secuestrado por actina-G, la actividad transcripcional de ER $\alpha$  es ejercida principalmente por la función de activación 1 (AF-1). Por otro lado, cuando MKL1 se activa a partir de la disociación de la actina-G, se silencia AF-1 y permite que el ER $\alpha$  actúe a través de la función de activación 2 (AF-2), a la vez que debilita la capacidad de transactivación global de ER $\alpha$ . La AF-1 puede actuar de manera independiente de E2, pero como se ha visto en la línea celular MDA-MB231 de cáncer de mama humano y otras, el AF-1 debe interactuar con el AF-2 para lograr la máxima actividad transactivacional. Muchos factores potencian este efecto sinérgico, incluyendo la presencia de ligandos agonísticos tales como el E2 o el tamoxifeno, los cuales estimulan, directa o indirectamente las interacciones AF-1/AF-2 (Fox et al., 2004)

En este sentido se ha visto que AF-2 es la principal función de activación activa en células que han alcanzado su transición epitelio-mesenquimal (Huet et al., 2009).

La ruptura de las uniones intercelulares mediadas por E-cadherinas, como ya se ha dicho, es un factor clave en la transición epitelio-mesenquimal y se ha correlacionado con una fuerte actividad de RhoA. Así, la activación de vía de señalización Rho/MKL1 que se produce durante la EMT, reduce la eficiencia de la transactivación global de ER $\alpha$  al modular la contribución relativa de las funciones de activación del mismo.



**Figura 6. Esquema del modelo integrativo de la regulación de la actividad transcripcional de ER $\alpha$  por MKL1.** Células epiteliales diferenciadas expresan proteínas involucradas en contactos dependientes de calcio, tales como las E-cadherinas. El establecimiento de estos contactos da lugar a una baja actividad de Rho GTPasas, aumentando así la proporción de actina G libre. Por otro lado, células desdiferenciadas que han sufrido la EMT, presentan una alta actividad de Rho GTPasas la cual activa la polimerización de actina. MKL1, según se halle unido o no a actina, exhibe un control de la actividad transcripcional de ER $\alpha$  diferencial. Tomado de Huet et al., 2009.

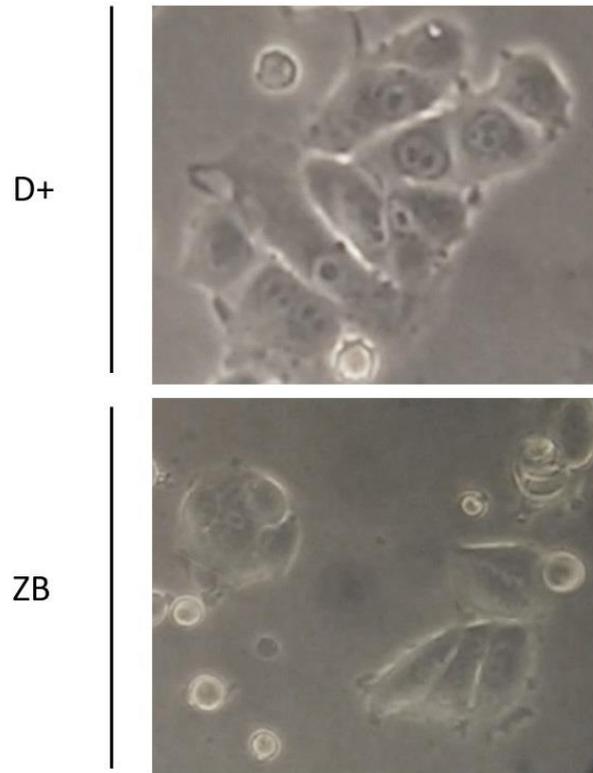
Como ya se ha señalado, la activación de MKL1 en líneas celulares ER $\alpha$  positivas, reprime la expresión de ER $\alpha$  y por ende suprime la estimulación del crecimiento celular dependiente de E2 (Kerdivel et al., 2014)

Estas investigaciones en conjunto, muestran que la acción de MKL1 es clave en el proceso de escape hormonal, y por ende en la pérdida de respuesta a fármacos tales como el tamoxifeno en células de cáncer de mama ER $\alpha$  positivas.

### 1.7- El modelo celular: línea celular MCF 7

Se ha visto que la vía de señalización Rho/actina/MKL1 se encuentra silenciada en líneas celulares de cáncer de mama ER $\alpha$  positivas tales como MCF-7 y T47D y por otro lado activa en líneas celulares ER $\alpha$  negativas como MDA-MB-231, HMT 3522 y T4-2. Éstas últimas tres líneas han experimentado la transición

epitelio-mesenquimal y presentan proliferación independiente de estrógenos (Kerdivel et al., 2014).



**Figura 7.** Imágenes de cultivos celulares de las líneas MCF-7 D+ y ZB.  
Cortesía Marcos Davyt.

Para estudiar el escape al control hormonal que tiene lugar durante una EMT Flouriot y col. generaron sublíneas celulares derivadas de MCF-7 (Flouriot et al., 2014). Este modelo está dirigido por la expresión de variantes del gen MKL1, una línea de este modelo expresa una variante de MKL1 desprovista del extremo amino terminal y por ende con una delección en los motivos RPEL, críticos para la unión a la actina. Esta línea representa la transición epitelio-mesenquimal (MCF-7 - MKL1  $\Delta$ N200, y es nombrada como D+) presentando un fenotipo desdiferenciado. La otra línea, derivada de MCF-7 nombrada como ZB, fue transfectada con el vector vacío y representa el fenotipo epitelial como un control, presentando un fenotipo diferenciado (Figura 7).

Como fue descrito anteriormente, la inducción de la expresión de MKL1  $\Delta$ N200, en la línea D+ produce la reducción de la transactivación global de ER $\alpha$  al modular la contribución relativa de las funciones de activación del mismo. Esta modulación involucraría cambios conformacionales en ER $\alpha$  por lo que sería esperable hallar variantes conformacionales en las líneas celulares del modelo utilizado.

## **2- Objetivos del trabajo**

El objetivo general de este trabajo es analizar la existencia de posibles variantes conformacionales del ER $\alpha$  en un modelo de transición epitelio-mesenquimal de cáncer mamario, dirigido por la expresión de variantes de MKL1.

### **2. 1 - Objetivos específicos**

- Poner a punto las condiciones para visualizar la degradación limitada del ER y la detección del perfil de degradación parcial, en las líneas celulares ZB y D+.
- Comparar el perfil de degradación del receptor de estrógenos alfa en dichas líneas celulares.

### **2. 2 - Estrategia experimental**

Para cumplir con estos objetivos se analizará la proteína de interés en extractos celulares a través de ensayos de proteólisis limitada y western blot.

La proteólisis limitada permite estudiar de forma indirecta las variaciones estructurales de una proteína, gracias a la accesibilidad diferencial que tienen las proteasas a la proteína sustrato en la que se presumen variaciones conformacionales. Dicha acción diferencial dará lugar a distintas cinéticas de degradación de la proteína, las cuales pueden brindar información y sugerir alteraciones conformacionales de la proteína problema. La proteólisis limitada también brinda información a través de la generación de patrones de degradación diferenciales, producto de una fragmentación diferencial, siendo estos patrones dependientes de las características conformacionales de la proteína de interés. Esta técnica puede ser usada para identificar sitios con flexibilidad aumentada o de desnaturalización local de una cadena polipeptídica (Fontana et al., 2004)

En nuestra aproximación experimental se utilizará la quimotripsina, una proteasa que hidroliza los enlaces peptídicos adyacentes a los aminoácidos tirosina, triptófano, fenilalanina y leucina en regiones accesibles. Dicha estrategia experimental ha sido probada en el estudio del ER $\alpha$  en al menos dos estudios

(Horjales et al., 2007; Eng et al., 1997), que fueron utilizados como protocolos de partida.

### **3- Materiales y métodos**

Para estudiar la presencia de variantes conformacionales del ER $\alpha$  se utilizaron sublíneas celulares derivadas de MCF-7 obtenidas por transfección estable del vector de expresión inducible por tetraciclina pcDNA6/TO con el inserto MKL1  $\Delta$ N200 y su correspondiente vector pcDNA6/TR (T-REx<sup>TM</sup>system, Invitrogen) en células D+ y con vector de expresión pcDNA6/TO vacío y pcDNA6/TR en células ZB. El modelo celular fue proporcionado por el Prof. Gilles Flouriot (Universidad de RennesI, Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail, Rennes, France).

#### **3.1 Cultivos celulares**

En colaboración con Marcos Davyt y Karen Perelmuter (IPMon) se realizaron los cultivos celulares en el Instituto Pasteur, Unidad de Biología Celular, siguiendo el siguiente protocolo:

Las células se mantuvieron rutinariamente en DMEM Gibco<sup>TM</sup> GlutaMAX<sup>TM</sup>, conteniendo 4,5 g/L de glucosa y rojo de fenol, suplementado con 10% de suero fetal de ternero (FCS) (Gibco<sup>TM</sup>) y los antibióticos Zeocina (100  $\mu$ g/mL) y Blastidina (5  $\mu$ g/mL), a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Luego las células derivadas de MCF-7 se mantuvieron en DMEM libre de rojo de fenol (Thermo) suplementado con 2,5% de FCS libre de carbón (Capricorn), con piruvato al 1% (Invitrogen) y 1% de L-glutamina (Invitrogen) durante 48 hs. Durante ese tiempo, para inducir la expresión de las formas mutantes de la proteína MKL1 (MKL1  $\Delta$ N200), los cultivos de subclones de MCF7 se trataron con 1  $\mu$ g/ml de tetraciclina.

#### **Preparación de extractos celulares**

Las células se lavaron con buffer fosfato salino (PBS), y se agregó Reporter Lysis Buffer (Promega), 750  $\mu$ l por botella T75. Se congelan a -80°C hasta su utilización.

### **3.2 - Proteólisis limitada**

Se estudió la presencia de poblaciones de receptores de estrógeno alfa en las sublíneas celulares ZB y D+ de MCF-7 y su degradación diferencial en presencia de quimotripsina a través de ensayos de proteólisis limitada. Los ensayos se realizaron directamente en alícuotas de lisado celular. El lisado celular se descongeló en hielo, se raspó con rastrillo y se transfirió a un eppendorf para luego centrifugarse fracciones de 200 µl durante 2 minutos a 6000 g y 4°C. Se añadieron 2 µl de 1M de CaCl<sub>2</sub> al sobrenadante y posteriormente se retiró una muestra de 30 µl (tiempo 0- ). Al volumen restante se le agrega 1,5 ul de quimotripsina 0,5 µg/ml. Para llegar a este valor se llevaron a cabo ensayos de proteólisis con distintas concentraciones finales de quimotripsina con el fin optimizar la cantidad necesaria tal que se observe con claridad un patrón de degradación en el período de tiempo considerado. Se tomó una muestra inmediatamente después de adicionada la quimotripsina (alícuota 0+) y otras alícuotas de 30 µl a distintos tiempos de incubación (3, 10, 20 y 30 minutos), añadiéndosele a cada una 8 µl de buffer de carga de proteínas (ver Anexo I) y deteniéndose la reacción en thermoblock a 96°C durante 5 minutos.

### **3.3 -Western blot**

Para llevar a cabo los análisis mediante western blot las muestras fueron sometidas a electroforesis SDS-PAGE inmediatamente después de realizado el ensayo de proteólisis limitada. Se realizó la electroforesis en geles de acrilamida al 10% y a continuación se procedió a la transferencia a membrana de nitrocelulosa, durante 2 hs a 200 mA. Las membranas fueron bloqueadas a 4°C durante toda la noche en solución de bloqueo (5% leche en polvo descremada en buffer TBST). A continuación, las membranas son incubadas con los anticuerpos primarios (ver anexo) diluidos en TBST (ver anexo) durante 1 hora, a temperatura ambiente. Posteriormente se realizan 5 lavados de 5 minutos en TBST con agitación, para luego incubarlas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa, diluido en TBST, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizan 5 lavados de 5 minutos en TBST con agitación y se procede al revelado con el reactivo comercial ECL (ThermoScientific) según instrucciones del fabricante.

### **3.4 - Densitometría y análisis semi-cuantitativo**

Las imágenes obtenidas del revelado de las membranas se procesaron con el software Image J realizándose una densitometría de las bandas obtenidas en las membranas.

## **4 - Resultados**

Con el objetivo de analizar posibles variantes conformacionales del ER $\alpha$  en dos contextos celulares que representan la transición epitelio mesenquimal, se utilizaron las dos sublíneas celulares derivadas de la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Con el fin de evidenciar posibles diferencias estructurales del ER $\alpha$  dependientes del contexto celular asociado a nuestro modelo celular se utilizó como aproximación experimental la técnica de proteólisis limitada.

### **4.1 - Puesta a punto de obtención de extractos celulares.**

La optimización de la obtención de extractos celulares con concentraciones adecuadas de proteína se llevó a cabo en primera instancia siguiendo las recomendaciones del fabricante del buffer de lisis ReporterLysis Buffer (Promega) utilizando 1 ml por botella T75. Todos los procedimientos de lisis incluyeron un paso de congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y descongelación en hielo de las células para obtener el lisado completo de las mismas. En estas condiciones la concentración de proteínas del extracto obtenido no fue suficiente para la detección por western blot de modo que en ensayos posteriores se procedió a disminuir el volumen de buffer a 750  $\mu\text{l}$  por botella T75, con el fin de obtener una concentración de proteínas mayor, detectable y adecuada para los ensayos subsiguientes. La reducción del volumen del buffer de lisis utilizado podría resultar en una pérdida de eficiencia del proceso de lisis celular con la subsiguiente disminución de la cantidad de proteína total en el extracto. A pesar de esta posibilidad, la reducción del volumen de buffer de lisis utilizado efectivamente permitió un aumento de la concentración total de proteínas del extracto, permitiendo la obtención de patrones de degradación visualizados a través de ensayos de western blot.

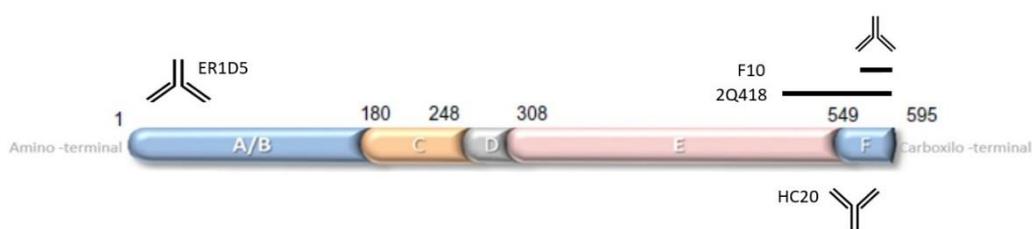
### **4.2 - Puesta a punto de ensayos de proteólisis limitada.**

Se optimizaron las condiciones para la proteólisis limitada en extractos celulares de las líneas celulares ZB y D+. Con el fin de determinar dichas condiciones se procedió a la variación de la concentración de quimotripsina ( $\alpha$ -Chymotrypsin, Sigma C 3142) en una serie de ensayos sobre fracciones de extracto celular y el

posterior revelado de ER $\alpha$  y sus fragmentos derivados a través de western blot. Se partió de una concentración de quimotripsina de 1  $\mu\text{g/ml}$ , observándose una rápida degradación inmediatamente después de su adición a través de ensayos de western blot evidenciándose la proteólisis total del ER $\alpha$  a través de la ausencia de bandas (Figuras no mostradas). Luego se redujo la concentración de proteasa a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , obteniéndose un patrón de degradación parcial satisfactorio sobre algunos de los extractos celulares obtenidos para la comparación de los perfiles entre las células ZB y D+.

### 4.3 - Análisis de resultados de proteólisis limitada.

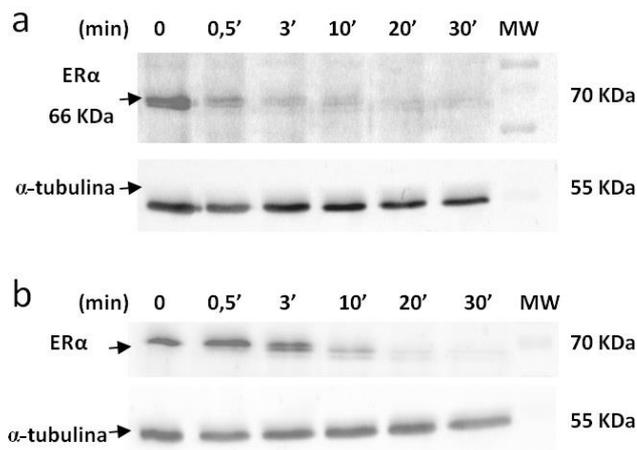
Los patrones de degradación generados por proteólisis se analizaron a través una serie de ensayos de western blot con distintos anticuerpos primarios tanto monoclonales como policlonales contra los extremos amino terminal y carboxilo terminal del ER $\alpha$  (Figura 8). El listado de los mismos se presenta en Anexo I.



**Figura 8. Esquema de sitios de reconocimiento de anticuerpos en ER $\alpha$ .**

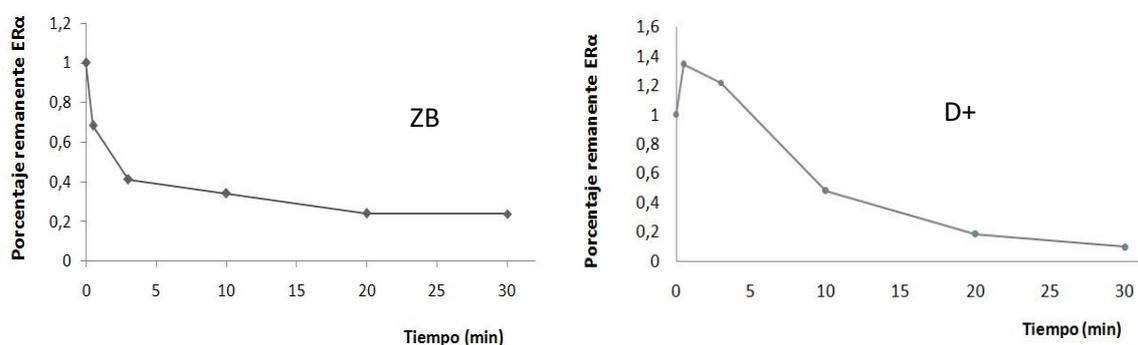
A través de ensayos western blot utilizando distintas concentraciones de anticuerpo anti-carboxilo terminal del ER $\alpha$  2Q418 (Santa Cruz Biotechnology, sc-71064) como anticuerpo primario se reveló la existencia de una banda de aproximadamente 66 kDa, es decir del tamaño de la isoforma más abundante de ER $\alpha$ . El resultado correspondiente al ensayo utilizando una dilución de 1:200 de

anticuerpo 2Q418 muestra una degradación más rápida del ER $\alpha$  en la sublínea celular ZB respecto a la observada en la sublínea D+ (Figuras 9.a y 9.b)



**Figura 9. Proteólisis limitada con quimotripsina (0,5  $\mu$ g/ml) (a) Proteólisis limitada de extracto celular ZB. Arriba:** Western blot realizado con anticuerpo primario anti-ER $\alpha$  2Q418 de ratón, dilución 1:200 en TBST y anticuerpo secundario anti-mouse, dilución 1:2500 en TBST. Revelado con ECL. **Abajo:** Control de carga. Western blot realizado con anticuerpo primario anti- $\alpha$  tubulina AA 4.3 de ratón, dilución 27  $\mu$ l en 2 ml de TBST y anticuerpo secundario anti-mouse dilución 1:2500 en TBST. Revelado con ECL **(b) Proteólisis limitada de extracto celular D+** Western blot realizado bajo las mismas condiciones que para ZB.

El análisis de los resultados de western blot fue llevado a cabo por densitometría a través del software Image J con corrección de ruido y normalizado con el control de carga utilizado, la alfa-tubulina. El curso temporal de la proteólisis es representado como porcentaje remanente de ER $\alpha$  respecto del tiempo en los gráficos de la Figura 10.



**Figura 10. Curso temporal de la proteólisis.** Valores normalizados con  $\alpha$ -tubulina y expresados en fracción de ER $\alpha$  remanente respecto a tiempo 0.

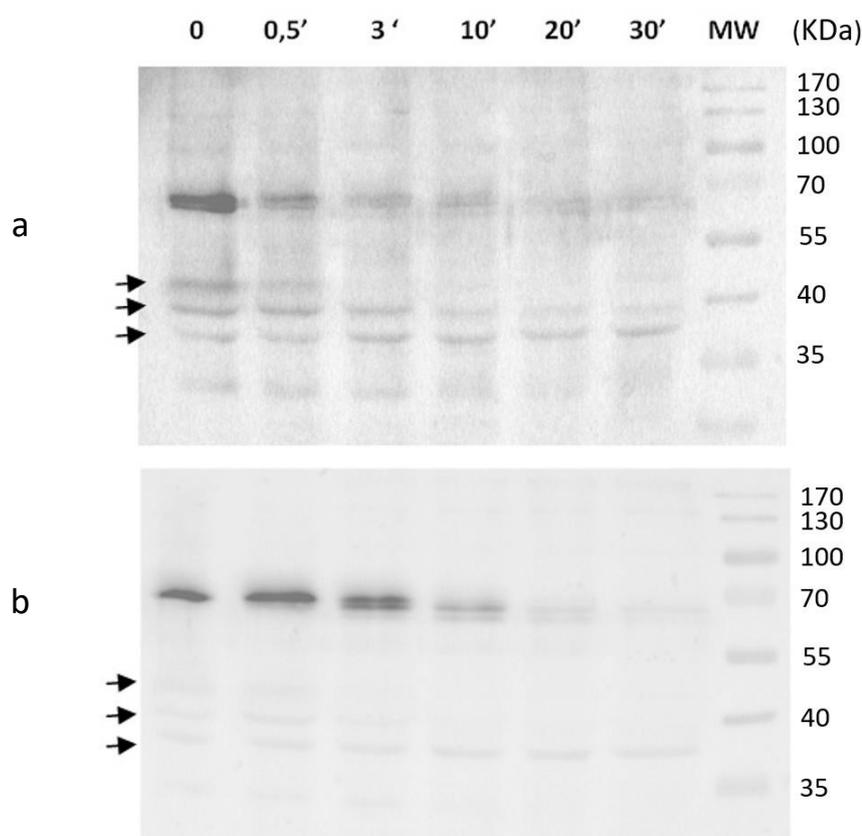
En D+ se observa una primera banda correspondiente al ER $\alpha$  a tiempo cero que presenta menor intensidad que la siguiente banda, luego del inicio de la hidrólisis. Si bien se realizó la normalización con el control de carga, el mismo no presenta el mismo nivel de disminución de intensidad a tiempo 0, lo cual da lugar a un porcentaje inferior de ER $\alpha$  en tiempo cero respecto a tiempo 1. Esta disminución, posiblemente debida a un error en la transferencia en el western blot no permite evaluar la concentración de ER $\alpha$  a tiempo cero en este ensayo. Por otro lado, se puede inferir de la comparación de las figuras 9.a y 9.b y de la representación gráfica que, si bien en las células ZB existe una atenuación más rápida de la banda correspondiente al ER $\alpha$ , se observa la presencia de banda a mayores tiempos (20 minutos) respecto a D+ (10 minutos). Otra diferencia remarcable que surge de la comparación de los patrones de degradación de esta serie de ensayos con el anticuerpo 2Q418 es una leve disminución del tamaño molecular de la banda correspondiente al ER $\alpha$  de la sublínea D+ conforme progresa la proteólisis, a la vez que da lugar a la formación de dos bandas con una sutil diferencia de tamaño molecular, conformando un doblete que se observa claramente a partir del minuto 10. Si bien el control con alfa-tubulina también presenta variación del tamaño aparente de sus bandas a lo largo de la proteólisis, el patrón observado se diferencia con el del ER $\alpha$  lo cual indicaría una causa de trasfondo diferente para ambos patrones (comparar bandas de  $\alpha$ -tubulina y ER $\alpha$  en Figura 9.a)

Este resultado muestra el control de carga utilizado ( $\alpha$ -tubulina) con presencia de bandas definidas en todos los carriles y con intensidad de señal similar a lo largo del tiempo, de forma que no se observa una degradación significativa (Figura 9.a y 9.b). Este patrón hace posible en este caso la normalización de las bandas correspondientes a ER $\alpha$  utilizando como control la  $\alpha$ -tubulina.

En este sentido, otro ensayo de proteólisis y western blot revelado con el anticuerpo 2Q418 con una dilución de 1:500 (Figura 12.b.) mostró la existencia de una banda cercana al marcador correspondiente a 70kDa, que se correspondería con el tamaño del ER $\alpha$  íntegro y también sugiere un patrón de mayor persistencia de intensidad de banda en la sublínea celular D+ con respecto a ZB. Sin embargo, este resultado por sí mismo no resulta concluyente, debido a la baja intensidad de señal de las bandas de interés respecto al ruido

de fondo, especialmente en la membrana correspondiente a ZB, probablemente debido a una baja concentración inicial de proteínas en el extracto celular total y la utilización de una menor concentración de anticuerpo primario (1:200 vs 1:500).

El análisis semi-cuantitativo se realizó a través de densitometría de la banda correspondiente al ER $\alpha$  íntegro (tamaño 66 kDa), revelado con el anticuerpo 2Q418, que puede observarse en la Figura 9. En este ensayo también pudieron observarse bandas de menor tamaño de aproximadamente 46, 41 y 37 kDa en ambas líneas celulares (Figura 11). Estas bandas aparecen desde el tiempo 0, previo a la adición de quimotripsina y también sufren degradación proteolítica.

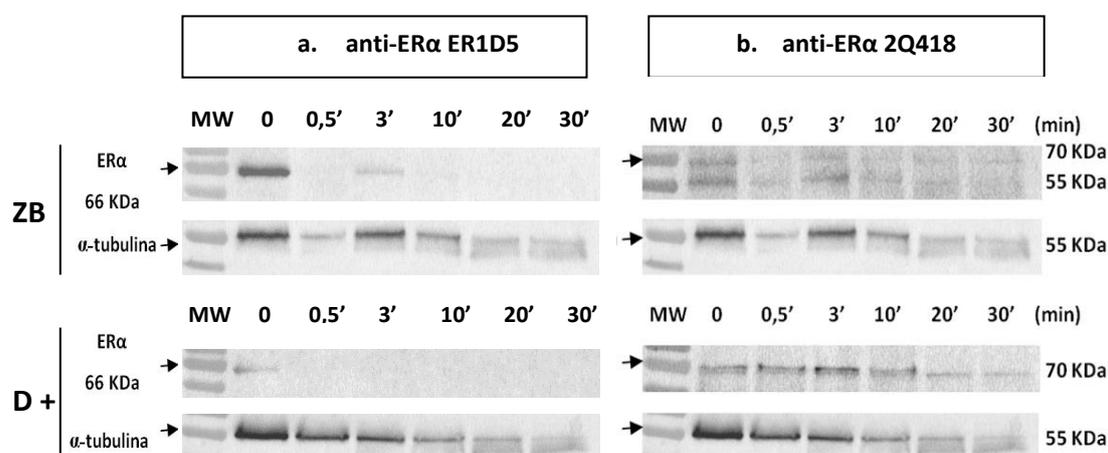


**Figura 11. Proteólisis limitada de extracto celular ZB (a) y D+ (b) con quimotripsina (0,5  $\mu$ g/ml)**  
Western blot realizado con anticuerpo primario anti-ER $\alpha$  2Q418 de ratón, dilución 1:200 en TBST y anticuerpo secundario anti-mouse, dilución 1:2500 en TBST. Revelado con ECL (resultado correspondiente a figura 9). Se indica presencia de bandas en tiempo 0 menores a 55 kDa en ambas membranas.

El revelado con el anticuerpo primario anti-ER $\alpha$  ER1D5 (Santa Cruz Biotechnology, sc-73479) un anticuerpo monoclonal contra el amino terminal de

la proteína, muestra una única fila de bandas próximas a los 70 kDa en ambas membranas que es consistente con el tamaño esperado para el ER $\alpha$  (Figura 12.a.). En este ensayo es posible observar en ZB la presencia de banda hasta los 3 minutos de iniciada la proteólisis, mientras que en D+ existe únicamente una banda de intensidad de señal muy débil en el tiempo 0. Esta membrana es la misma con la que se realizó uno de los revelados con el anticuerpo 2Q418 (Figura 12.b.) por lo que el control de carga mostrado es el mismo. Este mismo ensayo de western blot, pero revelado con el anticuerpo 2Q418 presenta un patrón diferente, observándose una banda correspondiente al ER $\alpha$  más intensa y persistente a lo largo del tiempo en D+.

Respecto a la presencia de una discontinuidad en el patrón de degradación de ER $\alpha$  en el tercer carril de ensayo realizado con anti-ER $\alpha$  ER1D5 (Figura 12.a), la misma coincidiría con una banda correspondiente a la  $\alpha$ -tubulina menos intensa que lo esperado según el patrón de degradación, lo cual explicaría esta disminución de la intensidad de señal.



**Figura 12. Proteólisis limitada de extracto celular ZB y D+ con quimotripsina (0,5  $\mu$ g/ml). Membranas reveladas con los anticuerpos ER1D5 y 2Q418.**

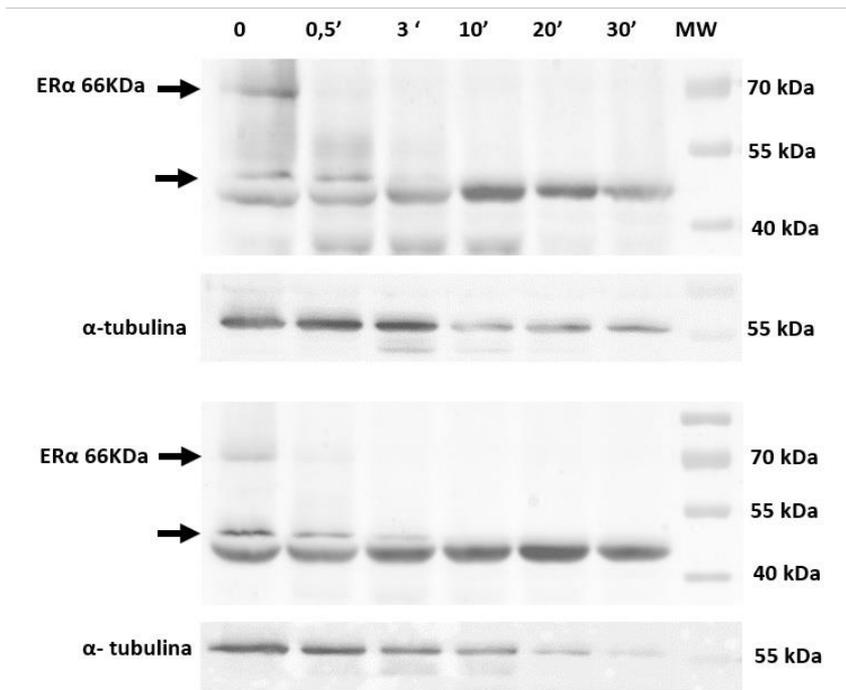
**a.** Western blot realizado con anticuerpo primario anti-ER $\alpha$  ER1D5 de ratón, dilución 1:500 en TBST y anticuerpo secundario anti-mouse, dilución 1:2500 en TBST. Revelado con ECL. Control de carga: Western blot realizado con anticuerpo primario anti- $\alpha$  tubulina AA 4.3 de ratón, dilución 27  $\mu$ l en 2 ml de TBST y anticuerpo secundario anti-mouse dilución 1:2500 en TBST. Revelado con ECL.

**b.** Revelado con anticuerpo primario anti- ER $\alpha$  2Q418 de ratón realizado luego de stripping de las membranas presentadas en a). Dilución de anti- ER $\alpha$  2Q418 1:500 en TBST y anticuerpo secundario anti-mouse, dilución 1:2500 en TBST. Revelado con ECL. Control de carga: Ídem al anterior.

Por otro lado, en los resultados obtenidos por western blot con el anticuerpo primario F10 (Santa Cruz Biotechnology, sc-8002), un anticuerpo monoclonal de ratón con afinidad por el carboxilo terminal del ER $\alpha$ , se observó la banda correspondiente al ER $\alpha$  íntegro con baja intensidad de señal y una rápida degradación del mismo a los 30 segundos en ambos tipos celulares (Figura 13). Este ensayo de proteólisis se realizó en las mismas condiciones que los resultados presentados en la figura 9 en el cual se pudo observar un claro patrón de degradación. Esta diferencia podría deberse a una cantidad inicial insuficiente de proteínas del extracto celular, lo cual es consistente con la baja intensidad de la banda en el tiempo 0. En este ensayo también se observa una menor intensidad de señal de la banda correspondiente al ER $\alpha$  íntegro en D+ respecto a ZB a tiempo cero.

En el mismo también se puede observar una banda cercana a 46-47 kDa que muestra la degradación proteica en ambas líneas celulares, pero con mayor persistencia aparente en D+ (señalada en Figura 13). Otra banda observable, de aproximadamente 42 kDa representaría una banda inespecífica.

Al igual que en ensayos anteriores esta observación no ha sido corroborada en forma semi-cuantitativa debido a la imposibilidad de normalizar los valores de las mediciones por densitometría de manera que se pudiera establecer una comparación entre diferentes membranas de transferencia.



**Figura 13. Proteólisis limitada de extracto celular ZB (a) y D+ (b) con quimotripsina (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) y sus respectivos controles de carga.** Western blot realizado con anticuerpo primario anti-ER $\alpha$  F10 de ratón, dilución 1:200 en TBST y anticuerpo secundario anti-mouse, dilución 1:2500 en TBST. Revelado con ECL. Control de carga: Western blot realizado con anticuerpo primario anti- $\alpha$  tubulina AA 4.3 de ratón, dilución 27  $\mu\text{l}$  en 2 ml de TBST y anticuerpo secundario anti-mouse dilución 1:2500 en TBST. Revelado con ECL.

De manera similar, en resultados obtenidos con el anticuerpo HC20 (Santa Cruz Biotechnology, sc-543) un anticuerpo policlonal de conejo anti-extremo carboxilo terminal de ER $\alpha$ , sólo se observaron bandas tenues de aproximadamente 70 kDa a tiempo cero, observándose a su vez una menor señal de intensidad de la banda en D+ respecto a ZB. Por ser resultados poco informativos debido a la baja calidad de la imagen obtenida luego del stripping de la membrana, las imágenes se muestran en el anexo II.

## 5 - Discusión

En este trabajo se estudió la presencia de poblaciones de receptores de estrógeno, que pudieran mostrar diferencias conformacionales en las sublíneas celulares ZB y D+ derivadas de la línea celular MCF7. Como se ha mencionado anteriormente, este modelo celular representa la EMT, proceso crucial en el entendimiento del cambio fenotípico de pérdida de respuesta a los estrógenos en los cánceres de mama dependientes de estrógenos. Varios mecanismos han sido descritos para explicar el silenciamiento de ER $\alpha$  en células de cáncer de mama (Musgrove and Sutherland, 2009), y la activación de MKL1 durante la progresión tumoral y la EMT, es uno de ellos. De hecho, previamente se ha demostrado que la activación de MKL1 reduce la expresión de ER $\alpha$  y suprime el crecimiento celular dependiente de E2 en células MCF7 (Kerdivel et al., 2014)

La sublínea celular D+ posee una delección en el extremo amino-terminal del gen MKL1 transfectado establemente (MKL1- $\Delta$ N200). Esta delección coincide con los motivos RPEL en el extremo N-terminal, que son críticos para la unión a actina y para la activación de la vía Rho/actina/MKL1. Estudios anteriores han demostrado que, tras la inducción de la expresión de MKL1-  $\Delta$ N200 con tetraciclina, las células D+ presentan en general un fenotipo desdiferenciado, lo cual se ha reflejado en nuestros resultados. La bibliografía describe un incremento de tamaño celular, con formación de fibras de estrés y adicionalmente ruptura de las uniones intercelulares mediadas por E-cadherinas (Flouriot et al., 2014). En cambio, ZB en las cuales no se dispara la activación de MKL1, presenta una alta similitud a la línea MCF7 original respecto a sus propiedades fenotípicas, teniendo un fenotipo diferenciado, similar al epitelial, lo cual es observado en los cultivos utilizados (Figura 7) y a su vez mantiene un nivel de expresión de ER $\alpha$  similar al de la línea original (Flouriot et al., 2014).

La aproximación experimental para evaluar diferencias estructurales utilizadas en este estudio fue la resistencia diferencial a proteasas, a través de la técnica de proteólisis limitada. Existen múltiples antecedentes del uso de esta técnica en la caracterización de variantes conformacionales de proteínas, en principio utilizada para el estudio de enfermedades priónicas y agregados insolubles (revisado en Fontana et al., 2004). Previamente se ha utilizado esta técnica con el objetivo de caracterizar la conformación tridimensional adquirida por el ER $\alpha$

en levaduras en presencia o ausencia de estrógenos (Eng et al., 1997). También se ha utilizado esta aproximación experimental en la caracterización de las diversas variantes conformacionales del ER $\alpha$  generadas luego de su síntesis en diferentes extractos de traducción in vitro (Horjales et al., 2007). Estos antecedentes muestran a la proteólisis limitada como una técnica adecuada para el estudio indirecto de la conformación proteica en distintos contextos celulares. Los patrones de digestión parcial del ER $\alpha$ , observados a través de los ensayos de western blot realizados, utilizando diversos anticuerpos, muestran diferencias en la resistencia a la degradación del ER $\alpha$  por proteasas, en las dos líneas celulares utilizadas que conforman el modelo. Cabe destacar que la presente aproximación experimental no permite revelar todos los fragmentos de degradación resultantes y por tanto no permite evidenciar los dominios más resistentes a la proteólisis. Lo que si posibilita es, por un lado, la visualización de la resistencia a la proteólisis de las regiones evaluadas según el anticuerpo utilizado y el contexto celular considerado, y por otro la visualización de la disminución del tamaño molecular por el efecto de la degradación.

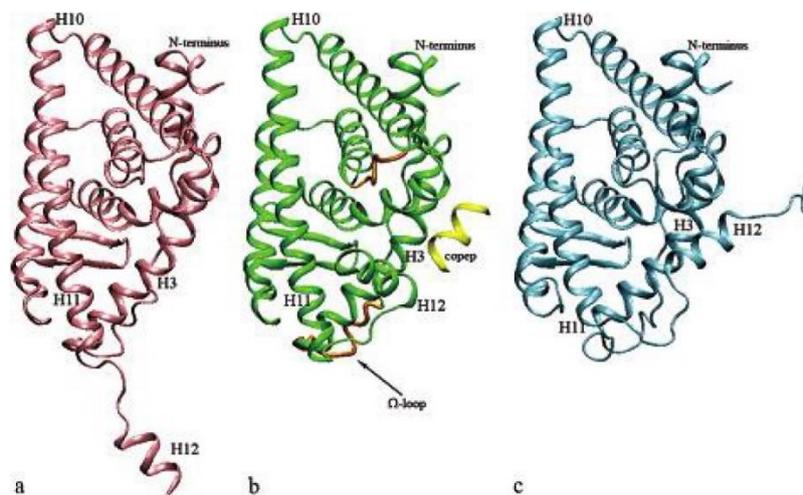
Los ensayos de proteólisis limitada analizados a través de western blot indican una mayor resistencia de ER $\alpha$  a la degradación proteolítica en la línea D+. Este patrón fue observado y semi-cuantificado en un experimento utilizando el anticuerpo 2Q418 (Figura 9) contra el extremo carboxilo-terminal del ER $\alpha$ , donde se observó un claro patrón de degradación de la banda de aproximadamente 66 kDa, que correspondería a la isoforma más abundante de ER $\alpha$ . De la comparación de estos patrones de degradación se desprende una mayor resistencia a la degradación del ER $\alpha$  en la sublínea celular D+ que la observada en la sublínea ZB

Este resultado es parcialmente corroborado de manera cualitativa, por otro experimento, utilizando el mismo anticuerpo 2Q418 (Figura 12. b), resultado al cual no se le realizó la densitometría debido a la baja señal en la membrana correspondiente a ZB.

Como ya se ha comentado, mediante la técnica de western blot, las membranas reveladas con los anticuerpos no muestran todos los fragmentos de degradación resultantes de la proteólisis, por lo que sólo se observan aquellos que preservan el epítipo reconocido por el anticuerpo 2Q418, en este caso.

Evaluar las diferencias estructurales de esta región en distintos tipos celulares es de importancia para la comprensión de la modulación del ER $\alpha$  durante la activación de la vía Rho/MKL, ya que este epítipo comprende los aminoácidos desde el 495 al 595, los cuales además de ser los residuos terminales de la proteína, son parte del dominio de transactivación AF2 del receptor, región que, junto con AF1, determinan la actividad transcripcional global de ER $\alpha$  según el contexto celular. La disminución de la intensidad a lo largo de la proteólisis de esta banda de aproximadamente 66 kDa, que representa al receptor íntegro, junto con la ausencia de bandas de fragmentos de tamaño molecular significativamente menor, indicaría la degradación proteolítica del epítipo ensayado (Figura 9). La resistencia diferencial a la degradación entre las dos sublíneas celulares a su vez sugeriría una accesibilidad diferencial de la proteasa al extremo carboxilo-terminal y por lo tanto una conformación diferente, infiriéndose en D+ una estructura más compacta y resistente que en ZB. Resulta llamativa la ausencia de fragmentos de degradación de menor tamaño molecular. Se han observado previamente, en ensayos de traducción in vitro del ER $\alpha$  y proteólisis limitada con revelado a través de autoradiografía, múltiples bandas correspondientes a las estructuras más resistentes de la proteína (Horjales et al., 2007). Estos patrones de degradación mostraron ser distintos según el sistema de traducción utilizado, por lo que tampoco sería posible la comparación con los patrones de digestión observados en nuestros ensayos. Sin embargo, dado que el ER $\alpha$  se trata de una proteína multidominio con regiones desestructuradas era factible que se generasen en nuestros ensayos de proteólisis limitada múltiples fragmentos de tamaños visiblemente distintos que representaran las estructuras más resistentes, pudiendo ser visualizados en nuestros ensayos de western blot con el anticuerpo 2Q418 aquellos que poseyeran el epítipo en el extremo-carboxilo terminal íntegro. La ausencia de fragmentos múltiples de degradación puede ser explicada por el hecho de que los ensayos de proteólisis fueron llevados a cabo en células sin tratamiento con ligando. En dichos casos, regiones de la AF2 integrante del LBD, concretamente la hélice 12, se encuentra desestructurada, en una posición que le confiere más flexibilidad y exposición que las posiciones adquiridas (Figura 15) en caso de unión a ligandos tanto agonistas, como antagonistas (Celik, 2007) Esto sugiere que esta región del carboxilo terminal podría ser más susceptible a la proteólisis,

generando la pérdida del epítipo e imposibilitando así la detección de fragmentos de degradación de menor tamaño molecular. Según esta interpretación, la mayor persistencia de la banda de ER $\alpha$  en D+ indicaría una conformación más resistente en AF2 y en general del extremo carboxilo-terminal. Esto podría estar vinculado con la modulación diferencial de la actividad transcripcional (respecto a la contribución relativa ejercida por AF1 y AF2) en contextos celulares diferenciales, en este caso, las sublíneas modelo MCF7 D+ y ZB. Como ya se ha explicado, la contribución relativa ejercida por AF1 y AF2 se encuentra vinculada con el estadio de diferenciación celular, siendo la función de activación AF2 la más activa en contextos celulares desdiferenciados (Mérot et al., 2004). De manera consistente con esto, la línea celular MCF7 expresando MKL1- $\Delta$ 200 ha mostrado en estudios previos la activación de la vía Rho/MKL1 con la concomitante expresión de un fenotipo desdiferenciado, la supresión de la actividad transcripcional de AF-1 y la reducción de la actividad transcripcional global de ER $\alpha$ , actuando exclusivamente a través de AF-2 (Flouriot et al., 2014).



**Figura 15. Conformaciones del dominio LBD Er $\alpha$  indicando la posición de la alfa-hélice según el ligando unido. (a) Sin ligando, (b) ligando agonista, (c) ligando antagonista. Extraído de Celik et al., 2007.**

De lo expuesto anteriormente se podría sugerir una vinculación entre la resistencia aumentada a la degradación de la región carboxilo terminal del ER $\alpha$  en células D+ que indica una variación conformacional y contextos celulares

donde la actividad del receptor recae mayormente en la función AF-2, debido a la acción de la activación de la vía Rho/MKL1.

En el marco del ensayo en el que se utilizó el anticuerpo 2Q418, se observa una leve reducción del tamaño molecular de la banda conforme progresa la proteólisis en el caso de la sublínea D+ (ver Figura 9). Esto podría ser explicado por una gradual fragmentación del receptor en el extremo amino-terminal. La observación de fragmentos de tamaño molecular levemente diferentes que conforman dobletes apoyaría esta interpretación. Si bien nuestros datos no son concluyentes al respecto, y serían necesarios otros experimentos para corroborarla, esta observación es consistente con datos anteriores que indican que la región amino-terminal conforma un dominio proteico intrínsecamente desordenado, cuya estructura tridimensional no ha podido ser determinada por cristalografía u otras técnicas espectroscópicas debido a esta característica (Wärnmark et al., 2001; Lavery et al., 2005), pudiendo inferirse que esta región sea una de las más susceptibles a la degradación. Al encontrarse esta región en el extremo opuesto del epítipo del anticuerpo 2Q418, su fragmentación se evidenciaría en este ensayo principalmente a través de una reducción del tamaño molecular aparente de la banda de aproximadamente 66 kDa observada en el ensayo de proteólisis. En el resultado correspondiente a ZB en la figura 9 puede observarse una ausencia de dicha reducción del tamaño de banda conforme progresa la degradación proteolítica. Este fenómeno podría explicarse a través de la presencia de modificaciones post- traduccionales del ER $\alpha$  en D+, que podrían alterar la conformación tridimensional global de la proteína, dejando más expuesta esta región. Este patrón de modificación de la migración en D+ se repite en otro ensayo con el anticuerpo 2Q418 (Figura 12.b). Esta posible modificación también podría explicar la falta de afinidad del anticuerpo ER1D5 en D+ (Figura 12.a).

A través de los ensayos realizados con los anticuerpos ER1D5, F10 y HC20, si bien no de forma cuantitativa, se ha podido observar una menor intensidad de banda correspondiente a ER $\alpha$  en D+ respecto a ZB en el momento previo a la proteólisis (comparar resultados en Figuras 12.a, 13 y Anexo II respectivamente) La baja intensidad de banda en D+ respecto a ZB a tiempo cero observada a través de estos anticuerpos podría estar indicando la ocurrencia de algunos

fenómenos asociados al fenotipo de estas células. Los ensayos realizados con el anticuerpo 2Q418 no son concluyentes al respecto debido a que, por un lado, en el primero de ellos (Figura 9) se observa una primera banda a tiempo 0 de la proteólisis en D+ de menor intensidad que las restantes bandas, indicando una alteración en este carril que hacen dudosas las inferencias que se puedan desprender del mismo. Por otro lado, en el siguiente ensayo con el anticuerpo 2Q418 a menor concentración (Figura 12.b) debido a la baja señal en una de las membranas (la correspondiente a ZB) no se distinguen de forma correcta las bandas del ruido de fondo, imposibilitando una comparación entre membranas de transferencia. Sin embargo, de los ensayos realizados con los anticuerpos F10 y HC20 (Figuras 13 y Anexo II) se pudo inferir una disminución de expresión en D+, siendo consistente con la disminución de la expresión de ER $\alpha$  en D+ respecto a ZB esperada, tal como se describe en la bibliografía (Kerdivel et al., 2014) y podrían sugerir la ocurrencia de este fenómeno en las células estudiadas. El resultado con el anticuerpo ER1D5 también podría apoyar esta hipótesis, si bien se observó otro posible fenómeno de trasfondo que explicaría la presencia de una banda de menor intensidad en tiempo cero en D+, el cual se explica a continuación.

Los resultados arrojados por el anticuerpo ER1D5 (figura 12. a), además podrían reforzar la hipótesis de la existencia de una interferencia en la unión del anticuerpo al extremo amino- terminal del ER $\alpha$  en la línea celular D+ a través de la comparación de dos revelados del mismo experimento de proteólisis y transferencia, con anticuerpos contra los extremos opuestos de la proteína. Las membranas de este ensayo fueron reveladas primero con el anticuerpo ER1D5 y posteriormente 2Q418 en experimentos sucesivos. Previamente al revelado con 2Q418 las membranas fueron sometidas a múltiples stripping. En el revelado con el anticuerpo 2Q418 se observa en D+ una banda a tiempo cero más intensa e incluso la existencia de bandas más definidas y persistentes a lo largo de la proteólisis respecto a aquellas observadas en el ensayo previo realizado con el anticuerpo ER1D5 (comparar bandas correspondientes a ER $\alpha$  en D+ en figuras 12.a y 12.b). Esta diferencia de intensidad, observada en las bandas a tiempo cero, en membranas reveladas con ambos anticuerpos de forma sucesiva, indicaría una baja afinidad del anticuerpo ER1D5 en la línea celular D+,

sugiriendo una posible modificación en el extremo amino terminal de ER $\alpha$ . Así mismo, la existencia de dicha interferencia sería consistente con la gran diferencia de intensidad de banda a tiempo cero de D+ en comparación con ZB observado en la figura 12. a.

Dicha interferencia, del anticuerpo ER1D5 con su epítotope en el extremo amino terminal en D+, podría deberse a las posibles modificaciones post-traduccionales y/o conformacionales en el extremo amino-terminal del ER $\alpha$  ya sugeridas. De hecho, existen evidencias de regulación diferencial del ER $\alpha$  a través de múltiples modificaciones post-traduccionales, tales como la fosforilación, relacionada con el estadio de diferenciación de las células (Lanningan, 2003). Por ejemplo, la interacción física entre el ER $\alpha$  y algunos coactivadores se controla a través de la fosforilación del residuo Ser118 del ER $\alpha$ . La modificación post-traducciona de este residuo u otros puede, por lo tanto, ser un factor determinante en la actividad dependiente del grado de diferenciación celular ejercidas por las AF1 y AF2 del ER $\alpha$ . Es probable que el patrón tejido-específico de modificaciones postraduccionales del ER $\alpha$  y coactivadores, determine las interacciones selectivas del receptor con sus coactivadores (Mérot et al., 2004).

A pesar de que una fosforilación (u otra modificación post-traducciona) ocurrida en el extremo amino terminal del ER $\alpha$  brindaría una explicación para este resultado, no se hace evidente una diferencia en la movilidad electroforética de la banda correspondiente al ER $\alpha$  entre las dos sublíneas celulares ZB y D+. Si bien la masa aportada por un grupo fosfato es de aproximadamente 0,08 kDa, la cual es demasiado pequeña para alterar la movilidad electroforética de la proteína, el efecto de la carga generaría un aumento del tamaño aparente de la proteína, observable en una electroforesis. Sin embargo, existe evidencia de que en algunas proteínas, tras sucesivas fosforilaciones se conserva la misma masa molecular aparente tal como indica en su trabajo Peck (Peck, 2006), por tanto la ausencia de cambio de movilidad electroforética no indicaría necesariamente que no exista diferencia de fosforilación de una proteína. Si bien estos datos no fueron publicados en la investigación referida, esto permitiría sugerir a la fosforilación del ER $\alpha$  como un posible mecanismo presente en las células D+.

Otro aspecto remarcable en nuestros resultados es el patrón de degradación observado en ZB, con persistencia de señal de la banda correspondiente al ER $\alpha$

a mayores tiempos (figura 9). Esto podría estar indicando la presencia de varias poblaciones del receptor con diferencias en su cinética de degradación sugiriendo la existencia en ZB de una población de ER $\alpha$  de degradación rápida y otra población en menor proporción, más resistente a la proteólisis. A su vez esto podría indicar la coexistencia de más de una variante conformacional en la misma célula, o células en distintos estadios de diferenciación celular a partir de la inducción de la expresión por tetraciclina de MKL-1 indicando una heterogeneidad fenotípica en los cultivos.

Por otro lado, las bandas de menor tamaño observadas en ambas membranas de transferencia (indicadas con flechas en la figura 11), de tamaño aproximado de 46, 41 y 37 kDa (valores interpolados), podrían ser isoformas de la proteína existentes en los dos tipos celulares y no ser fragmentos de degradación ya que se observan desde antes de la adición de la quimotripsina. Si fueran efecto de degradación proteolítica previo a la adición de la quimotripsina, no sería probable la coincidencia en tamaño y número de las bandas en los intervalos de tiempo subsiguientes. Un hecho que sostiene que alguna de estas bandas sean isoformas es que el tamaño de las mismas coincide aproximadamente con el tamaño de las isoformas proteicas descritas en la literatura. Considerando cada banda, la isoforma de 46 kDa, descrita previamente en MCF7 (Denger et al., 2001, Flouriot et al., 2000) sería la única plausible de hallarse en los presentes resultados revelados con el anticuerpo 2Q418. La isoforma de 36 kDa observada también a través de western blot en MCF7 (Wang et al., 2005) quedaría descartada debido que el anticuerpo 2Q418 reconoce el extremo carboxilo-terminal y esta isoforma carece tanto de los dominios de transactivación AF-1 y AF-2 (carboxilo-terminal). Esta isoforma fue detectada a través del anticuerpo H222, que reconoce el LBD de ER $\alpha$ . Por otro lado, la isoforma de 39 kDa solamente ha sido sugerida como una posible isoforma, resultado de ensayos de inmunoprecipitación aunque aún no fue caracterizada ni confirmada (Denger et al., 2001).

La presencia de bandas que sugerirían isoformas del receptor también se evidencia en los resultados obtenidos a través del anticuerpo F10 (Figura 13). Como ya fue descrito, tanto en ZB como en D+ se observan bandas de entre 46 a 47 kDa, que coincidirían con una de las isoformas conocidas para ER $\alpha$ . En

estas bandas existe un patrón de degradación claro, que indica mayor resistencia en D+. Estas observaciones requerirían de otros ensayos para verificar si se trata de isoformas del ER $\alpha$  presentes en nuestro modelo celular.

En resumen, los ensayos de proteólisis limitada de extractos celulares de las líneas D+ y ZB revelados con distintos anticuerpos anti-carboxilo y anti-amino terminales permitieron mostrar la existencia de poblaciones de ER $\alpha$  con estructura conformacional diferencial entre dichas líneas celulares. Como ya se ha dicho, si bien esta aproximación experimental no permitió revelar todos los fragmentos de proteólisis resultantes, sí posibilitó la evaluación de la resistencia a la proteólisis de los epítopes ensayados. Los western blot obtenidos en el transcurso de los ensayos que evaluaron el carboxilo terminal de ER $\alpha$ -66 kDa muestran la degradación del epítipo ensayado a través de la desaparición de la banda correspondiente a la isoforma del receptor completo, con o sin disminución del peso molecular de la banda. En D+ a través del uso del anticuerpo 2Q418 se evidenció una mayor resistencia a la proteólisis respecto a ZB lo cual implica una accesibilidad diferencial de la proteasa al carboxilo terminal, sugiriendo la presencia de una variante conformacional en D+ con un extremo carboxilo terminal más compacto, que impide parcialmente la digestión del epítipo. Dicho estudio a la vez sugiere una degradación del extremo amino terminal, a través de la observación de una reducción del peso molecular de la banda correspondiente al ER $\alpha$ -66 kDa y la aparición de una banda de un leve menor peso molecular a lo largo de la proteólisis. Esto implicaría la existencia de una conformación diferencial también en el amino terminal del ER $\alpha$  en D+ y ZB, siendo más susceptible a la degradación el extremo amino-terminal de ER $\alpha$  en D+.

A su vez, del estudio contra el carboxilo terminal del ER $\alpha$  en ZB se desprende la posible coexistencia de distintas poblaciones del receptor con diferentes cinéticas de degradación en la misma célula o en células en diferentes estadios de diferenciación al presentar una persistencia de intensidad de banda del ER $\alpha$  a tiempos mayores que en D+.

Por otro lado, el estudio del extremo amino terminal a través del anticuerpo ER1D5 en la línea D+ evidenció la existencia de una pérdida de afinidad del anticuerpo contra el epítipo que podría deberse a una modificación post-traducciona y/o conformación distinta en la línea D+, en concordancia con los resultados arrojados con el anticuerpo 2Q418.

En conjunto, este trabajo aporta algunas observaciones cualitativas sobre el efecto de inducción de cambios conformacionales en ER $\alpha$  a partir de la activación de la vía Rho/MKL1 en células MCF-7 MKL1- $\Delta$ N200, observándose una resistencia diferencial del ER $\alpha$  entre D+ y ZB. Al ser la activación de la vía Rho/MKL un fenómeno clave en la EMT y en la pérdida de respuesta a estrógenos sería interesante evaluar los efectos de la misma sobre la estructura de ER $\alpha$  a través de la utilización de otros anticuerpos, así como verificar las posibles modificaciones post-traduccionales sugeridas, por ejemplo, a través de la realización de western blot con anticuerpos fosfoespecíficos, o citometría de flujo.

## Bibliografía

- Barone, I., Brusco, L., Fuqua, S.A.W. (2010). Estrogen receptor mutations and changes in downstream gene expression and signaling. *Clin.Cancer Res.* 16, 2702–2708.
- Basharov, M. A. (2003). Protein folding. *Journal of cellular and molecular medicine*, 7(3), 223-237.
- Celik, L., Lund, J. D. D., & Schiøtt, B. (2007). Conformational dynamics of the estrogen receptor  $\alpha$ : molecular dynamics simulations of the influence of binding site structure on protein dynamics. *Biochemistry*, 46(7), 1743-1758.
- 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.
- Cheung, E., Schwabish, M. A., & Kraus, W. L. (2003). Chromatin exposes intrinsic differences in the transcriptional activities of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *The EMBO journal*, 22(3), 600-611.
- Denger, S., Reid, G., Koš, M., Flouriot, G., Parsch, D., Brand, H., Korach, K.S., Sonntag-Buck, V. & Gannon, F. (2001). ER $\alpha$  gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Molecular Endocrinology*, 15(12), 2064-2077
- Deuerling, E., & Bukau, B. (2004). Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 39(5-6), 261-277.
- Eng, F. C., Lee, H. S., Ferrara, J., Willson, T. M., & White, J. H. (1997). Probing the structure and function of the estrogen receptor ligand binding domain by analysis of mutants with altered transactivation characteristics. *Molecular and cellular biology*, 17(8), 4644-4653.
- Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., & Gannon, F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER- $\alpha$ ) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- $\alpha$  activation function 1. *The EMBO journal*, 19(17), 4688-4700.
- 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. *Biochemical Journal*, 461(2), 257-268.
- Fontana, A., de Laureto, P. P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., & Zambonin, M. (2004). Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochimica Polonica- English Edition-*, 51, 299-322.

- Fox, J. E., Liu, H., & Jordan, V. C. (2004). Estrogen Action and Breast Cancer. *Principles of Molecular Oncology*, 317–358.
- 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. *Archives of biochemistry and biophysics*, 467(2), 139-143.
- Huet, G., Mérot, Y., Percevault, F., Tiffocche, C., Arnal, J. F., Boujrad, N., Pakdel, F., Mètivier, R., & Flouriot, G. (2009). Repression of the estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the Rho/megakaryoblastic leukemia 1 signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M109.
- Kerdivel, G., Boudot, A., Habauzit, D., Percevault, F., Demay, F., Pakdel, F., & Flouriot, G. (2014). Molecular and Cellular Endocrinology Activation of the MKL1 / actin signaling pathway induces hormonal escape in estrogen-responsive breast cancer cell lines. *Molecular and cellular endocrinology*, 390(1-2), 34–44.
- Kerdivel, G., Flouriot, G., & Pakdel, F. (2013). Modulation of estrogen receptor alpha activity and expression during breast cancer progression. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 93, pp. 135-160). Academic Press.
- Klinge, C. M., Riggs, K. A., Wickramasinghe, N. S., Emberts, C. G., McConda, D. B., Barry, P. N., & Magnusen, J. E. (2010). Estrogen receptor alpha 46 is reduced in tamoxifen resistant breast cancer cells and re-expression inhibits cell proliferation and estrogen receptor alpha 66-regulated target gene transcription. *Molecular and cellular endocrinology*, 323(2), 268-276.
- 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. *Nature structural & molecular biology*, 16(6), 589.
- Lannigan, D. A. (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*, 68(1), 1-9.
- Lavery, D. N., & Mcewan, I. J. (2005). Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochemical Journal*, 391(3), 449-464.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704-715.
- May, C. D., Sphyris, N., Evans, K. W., Werden, S. J., Guo, W., & Mani, S. A. (2011). Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, 13(1), 202.
- May, F. E. (2014). Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: their therapeutic potential in breast cancer. *Cancer management and research*, 6, 225.

- 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  $\alpha$  transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26184-26191.
- Musgrove, E. A., & Sutherland, R. L. (2009). Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(9), 631.
- Peck, S. C. (2006). Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. *The plant journal*, 45(4), 512-522.
- Pike, A. C. (2006). Lessons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 20(1), 1-14.
- 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 Research*, 2(5), 353.
- 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. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(12), 1911-1914.
- Thanaraj, T. A., & Argos, P. (1996). Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA. *Protein science*, 5(10), 1973-1983.
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B. W., Chang, Y., & Deuel, T. F. (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66. *Biochemical and biophysical research communications*, 336(4), 1023-1027.
- Wang, Z. Y., & Yin, L. (2015). Estrogen receptor alpha-36 (ER- $\alpha$ 36): A new player in human breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 418, 193-206.
- Wärnmark, A., Wikström, A., Wright, A. P., Gustafsson, J. Å., & Härd, T. (2001). The N-terminal regions of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  are unstructured in vitro and show different TBP binding properties. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 45939-45944.
- Zhang, G., Hubalewska, M., & Ignatova, Z. (2009). Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding. *Nature structural & molecular biology*, 16(3), 274.

## Anexo I

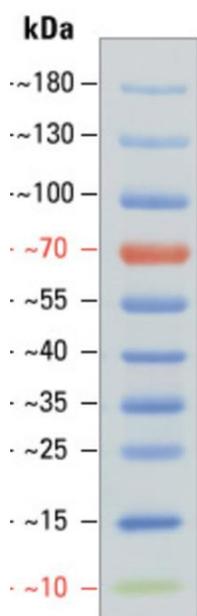
### Anticuerpos utilizados

Anticuerpos anti-ER $\alpha$	
ER alfa HC-20 sc-543 Rabbit policlonal IgG	C- terminal de ER alfa
ER alfa F-10 sc-8002 mouse monoclonal IgG2a	C- terminal aac's del 570 - 595
ER alfa 2Q418 IgG2a mouse monoclonal	C- terminal
ER alfa ER1D5 IgG1 mouse monoclonal	N- terminal

Otros anticuerpos
Anti- $\alpha$ -tubulina mouse monoclonal (DSHB HybridomaProduct AA4.3)
Anti rabbit policlonal HRP conjugate IgG W4018 Promega
Goat Anti mouse IgG

### Marcador de peso molecular

El marcador de peso molecular de proteínas usado fue el marcador preteñido PageRuler Prestained Ladder Thermo Scientific.



## **TBST**

Tris-HCl pH 7.5 – 10 mM

Tween 20 – 0.1%

NaCl – 75 mM

## **Buffer de carga de proteínas Laemmli simple buffer (2x)**

SDS – 4%

Glicerol – 20%

Tris- HCl pH 6.8 – 0.02%

Azul de bromofenol – 0.02%

DTT – 30 mM

## **Stripping de membranas**

625 ul TRIS-HCL 1M pH= 4,8

2 ml SDS 10%

72 ul  $\beta$ - mercaptoetanol

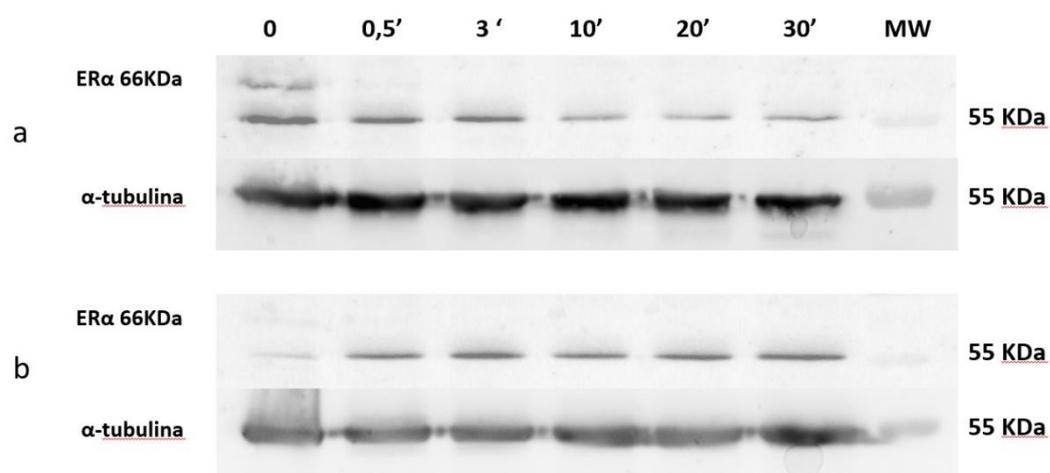
Agua mQ csp 10 ml

Durante 30 minutos a 50°C.

## Anexo II

### Resultados de ensayo de western blot revelados con anticuerpo policlonal de conejo HC20 anti-carboxilo terminal.

La membrana fue sometida a stripping 3 veces, luego de la utilización del anticuerpo anti  $\alpha$ -tubulina de ratón y su secundario anti-mouse. Debido a la imposibilidad de desplazar completamente los anticuerpos de ratón se utilizó un anticuerpo de conejo con su correspondiente secundario. La banda observada a nivel de 55 kDa no corresponde con ninguna isoforma conocida. Dado que los anticuerpos utilizados son de conejo se descarta que estas bandas sean las correspondientes a la  $\alpha$ -tubulina a pesar de la coincidencia en el tamaño molecular. De esto se infiere que estas bandas corresponderían a unión inespecífica. Cercano a los 70 kDa se puede observar las bandas correspondientes al receptor, siendo en D+ (b) apenas apreciable.



Este ensayo muestra una banda de intensidad menor a lo esperado en ZB a los 30 segundos (a), resultado que coincide con una reducción en la intensidad de la banda asociada al patrón de degradación de la alfa-tubulina. Si bien la misma presenta una intensidad no nula, el patrón de degradación de la alfa-tubulina no es gradual, como sí puede observarse en el caso de la figura b. También puede observarse en la figura a, la presencia de bandas de aproximadamente 55 KDa posiblemente correspondientes al control de carga, debido a la persistencia del anticuerpo anti- $\alpha$  tubulina, incluso después de la realización de varios stripping de esta membrana.