



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

TÍTULO:

**“CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS QUE REGULAN LA ACTIVIDAD
DE BCAS2 COMO COACTIVADOR DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS α EN
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. ÁNGEL SALMERÓN HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO. SEPTIEMBRE DE 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente estudio se realizó bajo la dirección de la Dra. Elizabeth Langley McCarron, en el Laboratorio de Cáncer Hormono-regulado del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Ciudad de México.

El comité tutorial estuvo integrado por la Dra. Elizabeth Langley McCarron (Instituto Nacional de Cancerología), el Dr. Alejandro García Carrancá (Instituto Nacional de Cancerología e Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) y el Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes (Instituto Nacional de Medicina Genómica).

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Cancerología, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 182189), y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM.

Durante la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Índice

Contenido	Página
I. Resumen	1
II. Abstract	2
III. Introducción	3
IV. Antecedentes	20
V. Planteamiento del problema	22
VI. Hipótesis	22
VII. Objetivos	23
VIII. Material y Métodos	24
IX. Esquema metodológico	28
X. Resultados	29
XI. Discusión	39
XII. Conclusión	43
XIII. Perspectivas	43
XIV. Modelo de la actividad de BCAS2	44
XV. Referencias	45
XVI. Artículo publicado	56

Resumen

Los estrógenos son hormonas esteroideas que participan en procesos celulares como proliferación, diferenciación, migración e importantemente en funciones reproductivas. Adicionalmente, se ha reportado una firme asociación entre la actividad del receptor de estrógenos (ER) y el desarrollo de cáncer de mama. La activación transcripcional del receptor de estrógenos es un proceso de múltiples pasos modulado por proteínas coactivadoras y correpresores. La interacción del receptor de estrógenos con coactivadores promueve la actividad transcripcional. La secuencia amplificada de cáncer de mama 2 (BCAS2) es un coactivador de ER α que ha sido poco estudiado. Las investigaciones sobre el receptor de estrógenos y su asociación con coactivadores han resultado de suma importancia, ya que se ha observado que participan en procesos carcinogénicos, e incluso se sugiere que los coactivadores podrían participar en mecanismos de resistencia al tratamiento con tamoxifén en pacientes con cáncer de mama. En nuestro laboratorio, se ha encontrado que BCAS2 activa directamente la región de transactivación 1 (AF-1) del receptor de estrógenos e indirectamente la región de transactivación 2. En este trabajo, caracterizamos algunos de los mecanismos a través de los cuales esta proteína aumenta la actividad de ER α y su asociación con algunos procesos carcinogénicos en células de cáncer de mama. Usando ensayos de luciferasa, mostramos que BCAS2 aumenta la activación transcripcional de ER α en conjunto con SRC-1, CBP y TIF2, que son coactivadores que principalmente actúan a través del dominio AF-2 del ER α . Observamos que la sobreexpresión de BCAS2 afecta positivamente la formación de colonias y migración de las células de cáncer de mama, lo que plantea un importante papel en el crecimiento y progresión del tumor. Finalmente, utilizamos inhibidores de las vías de señalización HER2 (trastuzumab), MAPK (PD98059) y AKT (wortmanina) para dilucidar como se regula BCAS2 en estas células, y observamos que BCAS2 está regulado preferentemente por la vía de PI3K/AKT. En conclusión, BCAS2 es un coactivador del dominio AF-1 del ER α , y la sobreexpresión de este coactivador promueve procesos carcinogénicos, lo que sugiere un papel importante en el desarrollo de cáncer de mama positivo a ER α .

Abstract

Estrogens are steroid hormones that participate in cellular processes such as proliferation, differentiation, migration, and importantly, in reproductive function. Additionally, a strong association between estrogen receptor (ER) activity and breast cancer development has been reported. Transcriptional activation by estrogen receptor is a multistep process modulated by coactivator and corepressor proteins. Estrogen receptor interaction with coactivators promotes transcriptional activity. Breast Cancer Amplified Sequence 2 (BCAS2), is a poorly studied ER α coactivator. Research about estrogen receptor coactivators has been very important, since it has been shown that they participate in carcinogenesis and may be involved in mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer treatment. In our laboratory, BCAS2 was shown to activate the transactivation function 1 (AF1) directly and transactivation function 2 (AF2) indirectly. In this work, we characterize some of the mechanisms through which this protein increases ER α activity and how this promotes carcinogenic processes in breast cancer cells. Using luciferase assays we show that BCAS2 upregulates transcriptional activation of ER α , acting in concert with AF-2 interacting coactivators (SRC1, CBP and TIF2). Elevated expression of BCAS2 positively affects colony formation and migration of breast cancer cells, suggesting it plays a role in tumor growth and progression. Finally, we used signal transduction pathway inhibitors (Trastuzumab, PD98059 and wortmannin) to elucidate how BCAS2 is regulated in these cells and observed that BCAS2 is preferentially regulated by the PI3K/AKT signaling pathway. In conclusion, BCAS2 is an AF-1 coactivator of ER α whose overexpression promotes carcinogenic processes, suggesting an important role in the development of estrogen-receptor positive breast cancer.

Introducción

Anatomía de la glándula mamaria

El desarrollo de la glándula mamaria humana es un proceso progresivo que se inicia durante la vida embrionaria (Macias *et al.*, 2012; Huebner *et al.*, 2014). Esta glándula consiste en una red altamente ramificada de tubos epiteliales, incrustados dentro del estroma (Figura 1). Al nacimiento, los componentes mamarios son entre 10-12 elementos ductales primitivos localizados debajo del complejo areola-pezón (Macias *et al.*, 2012). La glándula mamaria experimenta cambios drásticos en tamaño, forma y función en relación con la pubertad, el embarazo y la lactancia, en respuesta a la señalización de hormonas esteroideas y a receptores a factores de crecimiento (Huebner *et al.*, 2014). Una de las principales hormonas esteroideas que impactan en la anatomía y fisiología de la glándula mamaria son los estrógenos.

Anatomía de la glándula mamaria

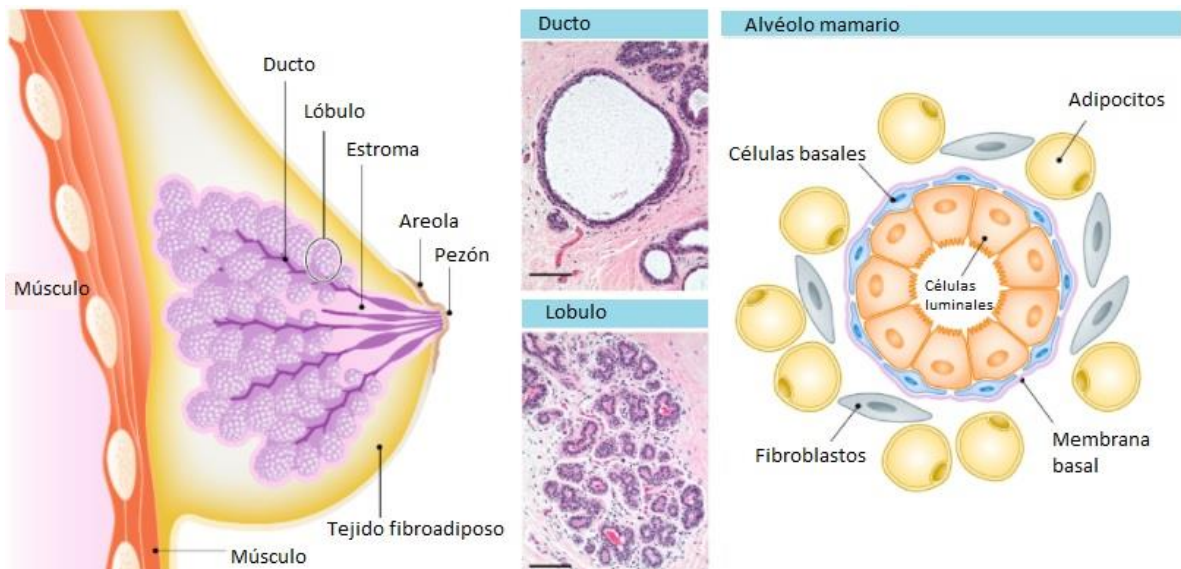


Figura 1: Anatomía de la glándula mamaria. Se compone principalmente por músculo, tejido fibroadiposo, lóbulos donde se secreta leche y conductos que conectan al complejo pezón-areola (Modificado de Pellacani *et al.*, 2019)

La biosíntesis de los estrógenos es iniciada por la síntesis de la hormona esteroidea pregnenolona a partir del colesterol. Este componente es convertido a testosterona y después a los tipos estrogénicos Estrona (E1) y 17β-estradiol (E2). La biosíntesis de los estrógenos es catalizada por la enzima aromatasa, un miembro de la superfamilia citocromo p450 que introduce el anillo fenólico característico (Figura 2). En mujeres premenopáusicas, los ovarios son la principal fuente de 17β-estradiol, el cual funciona como una hormona circulante para actuar en tejidos diana distantes. En mujeres posmenopáusicas, cuando los ovarios cesan la producción de estrógenos, 17β-estradiol es producido en varios sitios extragonadales, como glándulas adrenales y tejido adiposo, y actúa localmente como factor paracrino (Cignarella *et al.*, 2010).

Biosíntesis de los estrógenos

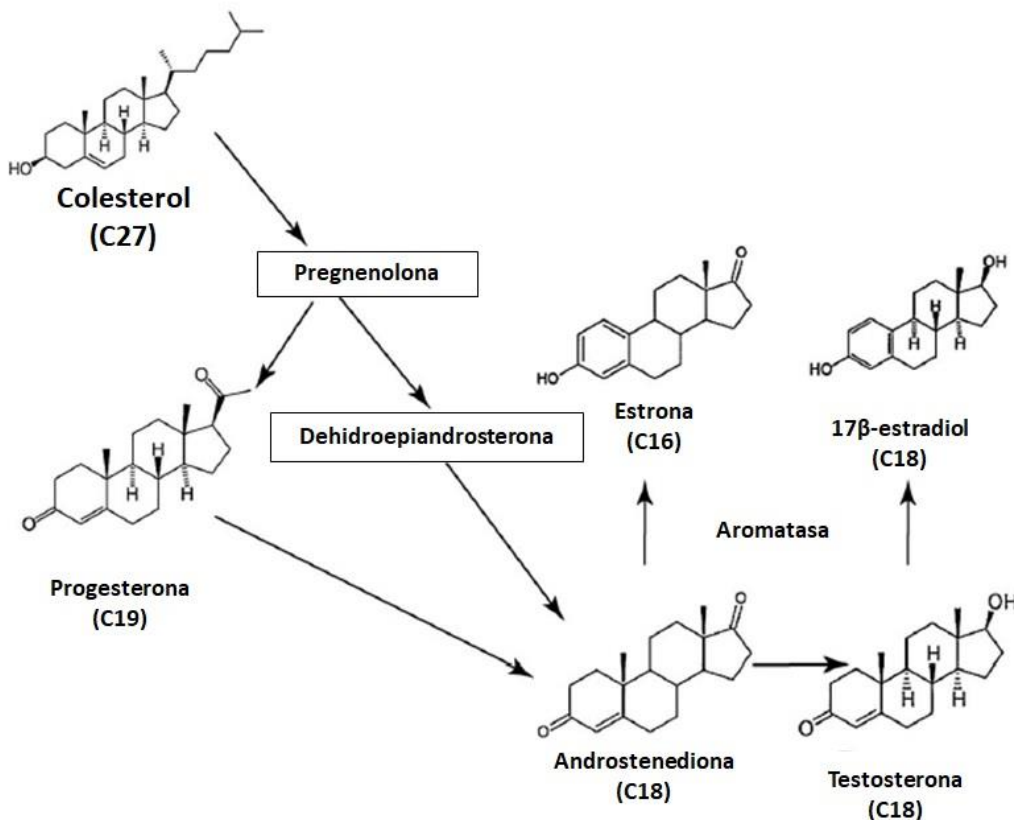


Figura 2. La vía metabólica de los estrógenos. Los estrógenos y otras hormonas esteroideas son derivadas del colesterol, iniciando con la formación de la pregnenolona a partir del colesterol a través de la actividad del citocromo p450 y la posterior conversión a

dehidroepiandrosterona, continuando con la conversión de progesterona a androstenediona. La 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa cataliza diversas reacciones en la vía de los andrógenos, favoreciendo la producción de androstenediona y testosterona. La enzima aromatasa cataliza el paso final para la conversión de esteroides con 18 carbonos a estrógenos (Modificado de Cignarella *et al.*, 2010)

Las hormonas esteroideas, como el 17β -estradiol (E2) y la progesterona (P4) tienen un papel fundamental en el desarrollo de la glándula mamaria e impactan esencialmente en cambios morfológicos al inducir alargamiento ductal, ramificación lateral, formación de la yema terminal y la alveologénesis (Briskin *et al.*, 2010). El 17β -estradiol participa en diversos procesos celulares como proliferación, diferenciación, migración y apoptosis, así como importantes funciones durante la reproducción (Manavathi *et al.*, 2014). Adicionalmente, diversos reportes exponen una firme asociación entre la actividad del 17β -estradiol y su receptor como factor etiológico para el desarrollo de cáncer de mama (Yue *et al.*, 2010; Germain, 2011; Hernández-Silva *et al.*, 2020; Valko-Rokytovska *et al.*, 2021)

Cáncer de mama

El cáncer de mama representa uno de los principales problemas de salud pública, los datos estadísticos destacan a dicha neoplasia como la de mayor incidencia y mortalidad en mujeres. En 2020, a nivel mundial se estimaron 2, 261, 419 nuevos casos y 684, 996 muertes. En México, las estadísticas indican un panorama similar al observado en los reportes mundiales, siendo el tipo de cáncer de mayor prevalencia y mortalidad en mujeres (Sung *et al.*, 2021).

Se ha documentado que comúnmente los tumores mamarios inician con la proliferación acelerada y descontrolada de células pertenecientes a dos principales formas histológicas, clasificados como ductal y lobular (Figura 3). El carcinoma ductal invasivo es la forma más común con alrededor del 80% de los casos y hace referencia a la neoplasia originada en el tejido de los conductos que transportan la leche y que ha invadido los tejidos de la mama (Figura 4). El carcinoma lobular invasivo es el segundo más diagnosticado con una frecuencia de 10-15% de los

casos y se inicia en las células de los lóbulos mamarios, además de que tienen la capacidad de invadir tejido cercano y distante del organismo (Veronesi *et al.*, 2005; Polyak, 2007; Allison, 2012; Colditz *et al.*, 2012).

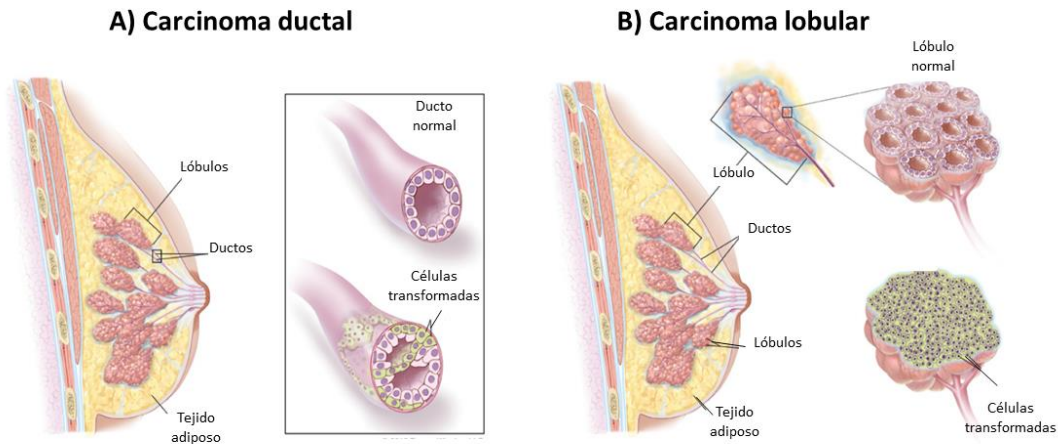


Figura 3. Principales tipos de cáncer de mama. Se muestran las dos principales formas histológicas de cáncer de mama, (A) carcinoma ductal invasivo. (B) Carcinoma lobular invasivo (Modificado de Winslow, 2012)

En estudios basados en perfiles de expresión de genes se han identificado varios subtipos como Luminal A, que está caracterizado por la expresión de receptor de estrógenos α ($ER\alpha$) y receptor de progesterona (PR), y que se ha documentado que tiene buen pronóstico dado que es el que mejor responde a la terapia endocrina. Un segundo subtipo es el Luminal B, que además de ser $ER\alpha$ y/o PR positivo, también puede o no expresar el receptor de membrana HER2 y muestra alta expresión de Ki-67. Estas dos moléculas están asociadas al aumento de la proliferación celular y se ha observado que pacientes con este subtipo tumoral tienen menor tiempo de supervivencia en comparación con los de tipo luminal A. Un tercer subtipo es el conocido como HER2 positivo, este tipo de tumores son negativos a la expresión de receptores hormonales y sobreexpresan el receptor a factor de crecimiento epidérmico tipo 2 conocido como HER2, además de que se asocia con un peor

pronóstico en comparación con los que expresan receptores hormonales. Un cuarto subtipo es conocido como Triple negativo, que es llamado así por ser negativo a la expresión de ER α , PR y HER2, son los tumores de peor pronóstico por no tener terapia dirigida (Veronesi *et al.*, 2005; Polyak, 2007; Allison, 2012; Colditz *et al.*, 2012).

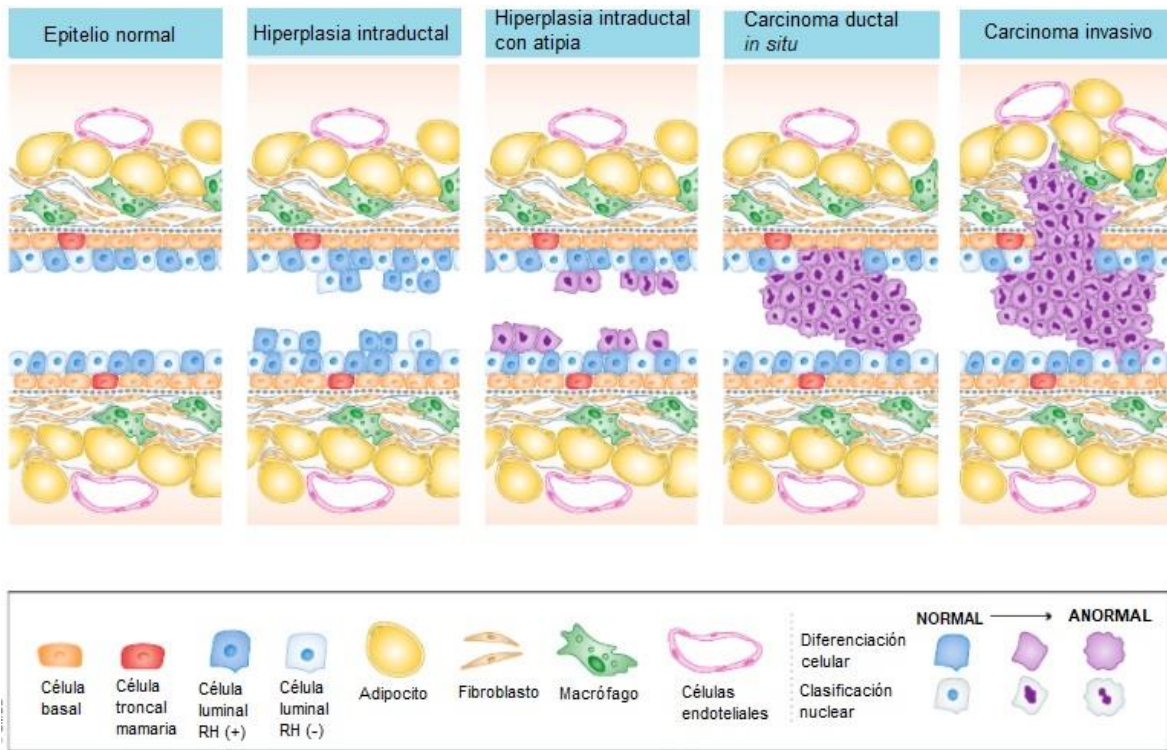


Figura 4. Esquema de un corte transversal ductal, que representa la progresión del cáncer de mama; desde el epitelio normal a hiperplasia, hiperplasia con atipia, carcinoma ductal y la forma invasiva de la enfermedad (Tharmapalan *et al.*, 2019)

Factores de riesgo

Se han descrito diversos factores que influyen en el desarrollo de cáncer de mama. La incidencia de esta neoplasia es altamente relacionada con la edad, los reportes indican que es significativamente menos frecuente en mujeres menores de 45 años de edad (Ban *et al.*, 2014). Otro de los factores intrínsecos está asociado al sexo

del paciente, esta neoplasia es diagnosticada predominantemente en mujeres y solo esporádicamente en hombres, se ha determinado que el cáncer de mama en hombres constituye menos del 1% de todas las neoplasias mamarias diagnosticadas (Gnerlich *et al.*, 2011). Sin embargo, los datos epidemiológicos han mostrado notable aumento del cáncer de mama en hombres en las últimas décadas (Speirs *et al.*, 2009; Stang *et al.*, 2008; Abdelwahab, 2017).

El cáncer de mama asociado a la historia familiar representa alrededor del 10-15% de todos los casos diagnosticados (Francken *et al.*, 2013), principalmente se han identificado mutaciones en los genes supresores de tumor BRCA1 y BRCA2, que han sido asociadas hasta con un incremento del 65% en riesgo para desarrollar esta neoplasia (Antoniou *et al.*, 2003). Alrededor del 85% de los casos de cáncer de mama ocurren en mujeres sin aparente historia familiar de este tipo de cáncer, en estos casos la neoplasia es asociada a mutaciones genéticas adquiridas y a factores de riesgo relacionados con el estilo de vida (Feng *et al.*, 2018).

Se ha estimado que alrededor de 20 % de los casos de cáncer de mama en todo el mundo pueden atribuirse a factores de riesgo modificables, como la obesidad, la inactividad física y el consumo de alcohol (Danaei *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011). El sedentarismo y dieta alta en grasas, especialmente la grasa saturada, están asociados a mal pronóstico y mayor mortalidad en pacientes con cáncer de mama (Makarem *et al.*, 2013).

Factores reproductivos como menarca temprana, menopausia tardía, primer embarazo después de los 30 años y nuliparidad pueden incrementar el riesgo de cáncer de mama. Por cada año de retraso de la menopausia se incrementa alrededor del 3% de riesgo de desarrollar cáncer de mama y por cada año de retraso en la menarca o cada parto adicional, se reduce el riesgo de cáncer de mama en 5% y 10%, respectivamente (Washbrook *et al.*, 2006; Horn *et al.*, 2017; Dall *et al.*, 2017).

Tanto los estrógenos endógenos como los exógenos son asociados con el riesgo de cáncer de mama (Key *et al.*, 2013). La principal forma de exposición a estrógenos

endógenos implica una menarca temprana y menopausia tardía (Barnett *et al.*, 2008). En el caso de la exposición a estrógenos exógenos, la principal fuente es la terapia de reemplazo hormonal en mujeres menopaúsicas y postmenopáusicas (Beral *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2016).

Los mecanismos más importantes que se han estudiado para explicar el desarrollo de cáncer de mama es la señalización desencadenada por los estrógenos, en este sentido, uno de los blancos moleculares en la patogénesis del cáncer de mama que han sido identificados es el receptor de estrógenos α , que se expresa en aproximadamente el 70 % de los casos de cáncer de mama invasivos (Waks *et al.*, 2019).

Receptor de estrógenos

Las funciones biológicas de los estrógenos son mediadas por el receptor de estrógenos (ER), que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y es un factor de transcripción dependiente de ligando que modula la transcripción de genes. Los dos principales tipos de receptor de estrógenos son ER α y ER β (Aranda *et al.*, 2001; Gibson *et al.*, 2012; Hewitt *et al.*, 2016). Tanto ER α como ER β contienen seis dominios funcionales (Figura 5) (Gibson *et al.*, 2012; Hewitt *et al.*, 2016; McEwan, 2016; Fuentes *et al.*, 2019).

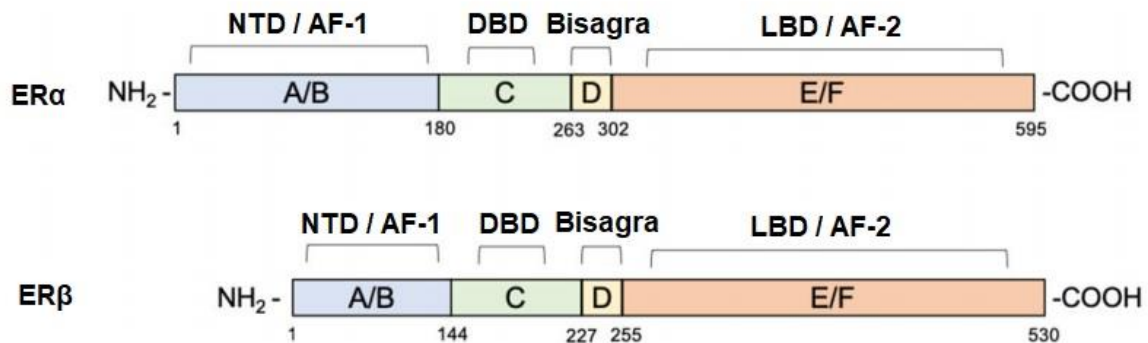


Figura 5. Representación esquemática de las regiones estructurales de ER α y ER β . El receptor de estrógenos α está compuesto por 595 aminoácidos, mientras que el receptor de estrógenos β contiene 530 aminoácidos. En el dominio A/B se encuentra la función de

activación independiente de ligando conocida como AF-1. La región más conservada es el dominio C, conocido como dominio de unión a ADN. La región D o bisagra contiene una señal de localización nuclear. En la región E/F se encuentra la función de activación dependiente de ligando conocida AF-2 (Modificado de Fuentes *et al.*, 2019).

El dominio A/B o amino terminal es el más largo e incluye la función de activación transcripcional AF-1, el cual interactúa con correguladores transcripcionales y su actividad es ligando-independiente, además de que se han identificado varios sitios de fosforilación en el dominio A/B que son importantes para la actividad transcripcional del ER. El dominio C, conocido como dominio de unión a ADN (DBD), contiene dos estructuras de dedos de zinc, cada uno formado por la quelación de cationes de zinc y cuatro residuos de cisteína. Los aminoácidos en la base del dedo de zinc más cercano al amino terminal son llamados “caja proximal”, o caja P, y son esenciales para el reconocimiento de la secuencia de ADN de los elementos de respuesta a estrógenos (EREs), 5'-GGTCAnnnTGACC-3' (Helsen *et al.*, 2012). Los aminoácidos de la base del segundo dedo de zinc son llamados “caja distal”, o caja D, y son importantes en el reconocimiento del espacio entre los brazos del palíndromo de los elementos de respuesta a estrógenos. Adicionalmente, la caja D contribuye a la formación del dímero del receptor de estrógenos. El dominio D, también conocido como región bisagra, contiene importantes secuencias para la localización nuclear del receptor, además de que modificaciones postraduccionales como la sumoilación de esta región o la acetilación mediada por proteínas correguladoras, como p300, han mostrado tener impacto positivo en la actividad transcripcional (Wang *et al.*, 2001; Sentis *et al.*, 2005; Le Romancer *et al.*, 2011). El dominio E, también llamado dominio de unión a ligando, es capaz de doblarse dentro de un complejo de estructuras de alfa hélices, creando un sitio de interacción de alta afinidad con E2 (Kumar *et al.*, 2012). Estudios realizados acerca de las funciones del dominio F del ER sugieren participación en la actividad agonista del 4-hidroxitamoxifen (TAM), así como contribución a la funcionalidad diferencial para la transcripción mediada por E2 y TAM, sin embargo, las funciones del dominio F aún son poco claras (Arao *et al.*, 2018). La región de transactivación AF-2 se

encuentra en la región carboxilo-terminal y promueve la expresión de genes blanco en respuesta a la estimulación por el ligando (Fuentes *et al.*, 2019).

Correguladores del receptor de estrógenos

Los receptores nucleares, como el receptor de estrógenos, regulan la transcripción de sus genes blanco mediante el reclutamiento de correguladores transcripcionales a través de sus dominios de transactivación AF-1 y AF-2. Los correguladores, los cuales incluyen coactivadores y correpresores, generalmente exhiben actividad enzimática intrínseca involucrada en el remodelamiento de la cromatina y modificaciones postraduccionales de histonas. Los coactivadores promueven la transcripción, promoviendo la apertura del ADN y regulando iniciación de la transcripción, elongación de ARN, splicing de ARN o terminación transcripcional. Algunos de estos coactivadores funcionan como un mecanismo que facilita el reclutamiento de otros cofactores o componentes de la maquinaria basal de la transcripción (Lonard *et al.*, 2007).

Los correpresores son proteínas que se unen a receptores nucleares de manera independiente de la unión a ligando o en presencia de ligandos antagonistas, principalmente a través de la secuencia conocida como caja CoRNR que consiste de los motivos LxxxI/HlxxxI (Donde “x” es cualquier aminoácido) (Manavathi *et al.*, 2014). Después de la unión con el ligando agonista, los correpresores se disocian de los receptores nucleares y permiten la asociación con coactivadores para estimular la expresión de genes blanco (Smith *et al.*, 2004). Los correpresores funcionan como parte de un gran complejo de proteínas, se incluyen desacetilasas de histonas que favorecen la unión estrecha entre el ADN y el nucleosoma, lo que permite la inhibición de la unión de factores de transcripción y la expresión de genes (Smith *et al.*, 2004).

Aunque los correpresores se unen muy bien a algunos receptores nucleares en ausencia de sus ligandos, esa interacción es menor para algunos receptores

hormonales como receptor de estrógenos, receptor de progesterona y receptor de andrógenos. En estos casos, los correpresores se unen a estos receptores en presencia de sus antagonistas respectivos (Smith *et al.*, 2004; Dotzlaw *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2002). La base molecular del efecto de las interacciones de los correpresores y los receptores a hormonas esteroideas no está bien definida, sin embargo, se ha observado que correpresores, como NCoR y SMRT, pueden reprimir selectivamente la actividad agonista del tamoxifén (TAM) en ER. Además, se demostró que anticuerpos inhibidores de NCoR o SMRT promovían la actividad agonista del tamoxifén (Smith *et al.*, 2004) y que el TAM funcionó como un agonista relativamente potente del receptor de estrógenos en fibroblastos derivados de ratones nulos a la expresión de NCoR (Jepsen *et al.*, 2000). Los datos anteriores indican que SMRT y NCoR son correpresores con capacidad de inhibir el potencial agonista de la actividad del ER ligada a moléculas antiestrogénicas (Smith *et al.*, 2004).

Estructuralmente, la interacción de ERs con coactivadores ocurre principalmente a través de la interacción con una superficie hidrofóbica creada dentro de los dominios carboxilo terminal del ER por modificaciones estructurales provocadas por la unión de su ligando. Esta superficie permite la unión de los motivos "LxxLL" (donde "x" es cualquier aminoácido) llamados "Cajas NR" (McKenna *et al.*, 2002), los cuales se encuentran, por ejemplo, en los coactivadores de la familia p160 que incluyen a SRC-1, TIF2 y AIB1 (Voegel *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 1997; York *et al.*, 2010). Otros cofactores que contienen cajas NR son los coactivadores CBP y p300 (Manavathi *et al.*, 2014).

Una vez que los coactivadores son reclutados al promotor, favorecen la actividad transcripcional a través de una combinación de mecanismos, incluyendo el eficiente reclutamiento de la maquinaria basal de la transcripción. Adicionalmente, los coactivadores que interactúan con receptores nucleares poseen actividad enzimática crucial para la eficiente expresión de genes, o reclutan proteínas que las posean. Principalmente, se puede destacar al complejo SWI-SNF que participa en el remodelado de la cromatina, proteínas con actividad acetiltransferasa de histonas

como CBP/p300, pCAF y p160s, así mismo algunas proteínas con actividad de metil-transferasas y ubiquitin-ligasas (Smith *et al.*, 2004). Importantemente, se ha observado que algunos coactivadores, como las proteínas de la familia p160, además de interactuar con la región carboxilo terminal también lo hacen con la región amino terminal de ER α (Onate *et al.*, 1998; Métivier *et al.*, 2001) y en el caso de las proteínas CBP / p300 se mostraron involucradas en una sinergia entre ambas funciones de activación, AF-1 y AF-2 (Kobayashi *et al.*, 2000).

Los coactivadores parecen tener capacidad de responder a señales fisiológicas y participar en la activación de una variedad de genes, por lo tanto, tienen el potencial de proporcionar a las células tumorales una ventaja en la supervivencia, el crecimiento y metástasis (O'Malley *et al.*, 2006; O'Malley *et al.*, 2007).

Activación del receptor de estrógenos

La señalización dependiente de los estrógenos se puede dividir en genómica y no-genómica, basado en los eventos celulares que provoca, por ejemplo, la modulación directa de expresión de genes o la activación de cascadas de señalización, respectivamente. Además, la unión del complejo ER-estrógenos al ADN puede ser de forma directa e indirecta (Vrtačnik *et al.*, 2014). Los diferentes mecanismos de la señalización de los estrógenos son representados en la figura 6.

Señalización genómica directa

Es considerada como el mecanismo clásico de la señalización estrogénica. La unión de estrógenos a ER α o ER β en el citoplasma de células blanco causa cambios conformacionales que conducen a la dimerización del receptor, translocación al núcleo y unión a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) localizados en o cerca de los promotores de genes blanco. La unión del ligando a los receptores también potencializa el reclutamiento de una variedad de corre reguladores en un complejo que altera la estructura de la cromatina y facilita el reclutamiento de la ARN polimerasa II y la maquinaria basal de la transcripción. En esta vía, el complejo

E2-ER actúa como un activador transcripcional que promueve la expresión de genes (Lodish *et al.*, 2008).

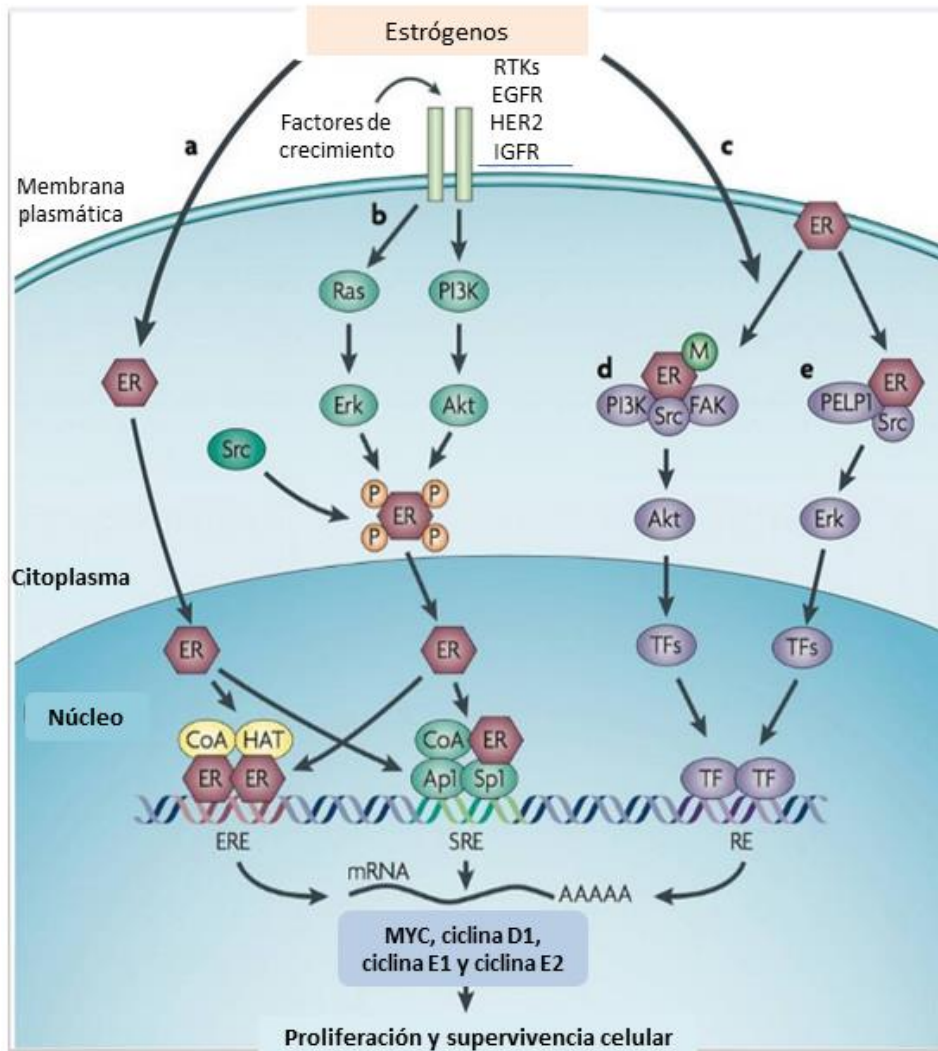


Figura 6. Activación del receptor de estrógenos. (a) La señalización clásica del receptor de estrógenos conduce a la función genómica. Posterior a la unión del receptor con E2 el receptor se dimeriza y forma complejos con coactivadores que le permiten la unión a secuencias específicas en el ADN conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (EREs) y el cual permite la expresión de genes blanco. El ER unido a E2 también se puede unir a otros factores de transcripción como Ap1 y Sp1 funcionando como corregulador de estos, facilita la unión a sus elementos respuesta que permiten la activación de la transcripción. (b) El receptor de estrógenos también puede ser activado a través de cascadas de señalización en el que se involucran receptores tirosina cinasa (RTK), receptor a factor de crecimiento epidermal (EGFR), receptor a factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2) y mediante este mecanismo se permite la activación de ER

independiente de ligando. (c) Las funciones no genómicas de ER pueden ser mediadas a través de la asociación con diversas proteínas para la activación de otras cascadas de señalización que conducen a la transcripción génica de una forma independiente de la unión de ER al ADN. Estas vías de transducción de señales pueden regular procesos celulares a través de la interacción con varias vías de señalización entre las que se incluyen (d) el complejo que participa en la activación de AKT donde se observa interacción de ER con PI3K, Src y la cinasa de adhesión focal (FAK), así como también el complejo que participa en la activación de ERK (e), en donde ER interactúa con Src y la proteína rica en leucina (PELP1) (Modificado de AlFakheh *et al.*, 2018).

Señalización genómica indirecta

El 17 β -estradiol puede influenciar la expresión de genes que no contengan EREs en su promotor. De hecho, alrededor de un tercio de los genes responsivos a estrógenos carecen de secuencias tipo EREs. En el caso de la señalización genómica independiente de EREs, los receptores de estrógenos activados por ligando no se unen directamente al ADN, lo hacen a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción y ejercen efecto mediante sus propios elementos de respuesta. Este modo de acción habilita la activación o represión de genes blanco e incrementa significativamente la influencia regulatoria de los estrógenos. Uno de los ejemplos mejor descritos involucra la interacción del complejo E2-ER con proteínas como Fos y Jun para la activación del factor de transcripción AP-1, favoreciendo la expresión de ovoalbúmina, factor de crecimiento tipo insulina, colagenasa, ciclina D1 y acetiltransferasa de colina. Otros factores de transcripción que facilitan la señalización de los estrógenos incluyen el factor de transcripción Sp1, factor nuclear κ B (NF κ B), proteína de unión a GATA y STAT5 (Bjornstrom *et al.*, 2005).

Señalización no genómica

Las acciones no genómicas son comunes en la actividad de las hormonas y son usualmente asociadas con la activación de cascadas de señalización de proteínas cinasas que pueden eventualmente conducir de forma indirecta a cambios en la expresión de genes debido a la fosforilación de factores de transcripción. La

señalización estrogénica no genómica es generalmente asociada a un subconjunto de ERs unidos a la membrana, por ejemplo, el receptor de estrógenos transmembranal GPER1 y ciertas variantes de ER α y ER β que podrían anclarse a la membrana mediante proteínas asociadas. La unión de E2 a ERs localizados en la superficie celular pueden causar movilización de calcio intracelular, estimulación de la actividad adenilato ciclasa y la producción de Adenosin Monofosfato cíclico (cAMP), activación de vías de señalización de proteínas cinasa activadas por mitógeno (MAPK), activación de la vía fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) y activación de receptores tirosina cinasa de membrana (Bjornstrom *et al.*, 2005; Ajj *et al.*, 2013). GPER1 es específicamente asociado con la estimulación del adenilato ciclasa y la activación de EGFR (Filardo *et al.*, 2012).

Los mecanismos moleculares fundamentales de la señalización estrogénica no genómica son diversos y dependen de una variedad de condiciones, como la disponibilidad de las moléculas transductoras de señal y blancos río abajo, sugiriendo un mecanismo dependiente del tipo celular (Vrtačnik *et al.*, 2014).

Señalización independiente de ligando

Los receptores de estrógenos también pueden ser activados en ausencia de 17 β -estradiol o algún otro ligando. La fosforilación de los receptores en ciertos residuos o en sus correguladores asociados pueden causar activación de ER α independiente de ligando. Los dos aminoácidos que comúnmente son blancos de fosforilación son serina y tirosina. Las vías de señalización responsables de esta modulación incluyen reguladores del estado general de la fosforilación celular, como la proteína cinasa A (PKA) o la proteína cinasa C (PKC), señales extracelulares como factores de crecimiento, citosinas y reguladores del ciclo celular.

Los factores de crecimiento representan un grupo especialmente importante de activadores de ER independiente de estrógenos, que incluyen el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), insulina y Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β). Los principales intermediarios entre factores de crecimiento y ERs son la Proteína de Unión a Nucleótidos de Guanina p21ras y la cascada de fosforilación

de MAPK, entre otros. Las señales extracelulares adicionales que modulan la actividad de ER α incluyen heregulina, interleucina-2 y dopamina, así como también proteínas regulatorias como ciclina A y ciclina D1 (Nilsson *et al.*, 2001).

Terapia antiestrogénica en cáncer de mama

La disminución de la señalización molecular del receptor de estrógenos se ha convertido en uno de los blancos más importantes para el tratamiento del cáncer de mama. La terapia dirigida al ER α se utilizó por primera vez hace más de un siglo en forma de ooforectomía y ha evolucionado hasta convertirse en la terapia sistémica más eficaz y menos tóxica para el cáncer de mama positivo al ER α (Love *et al.*, 2002).

Las estrategias que se basan en el bloqueo endocrino incluyen el uso de moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM, por sus siglas en inglés) como el tamoxifén, antagonistas como el fulvestrant, inhibidores de la aromatasa, además de la supresión o ablación ovárica, que previene la producción endógena de estrógenos (Gaughan *et al.*, 2012). En el caso de la terapia dirigida al receptor de progesterona, se ha observado que hay menor eficacia clínica, así como mayor toxicidad y efectos secundarios. Sin embargo, el receptor a progesterona tiene gran importancia como marcador de sensibilidad endocrina; entre mayor sea la expresión de PR sugiere mayor sensibilidad al uso de inhibidores de la actividad del receptor de estrógenos α (Jonat *et al.*, 2013).

En el caso del uso de inhibidores de aromatasa, en la práctica clínica se ha observado que existe beneficio adicional en términos de supervivencia libre de enfermedad, además de perfiles de tolerabilidad favorables a la terapia con tamoxifén a largo plazo (Forbes *et al.*, 2008; Mouridsen *et al.*, 2009). Si bien existe un desafío clave para predecir el grado de sensibilidad hormonal y la capacidad de respuesta al fármaco dentro del tumor de cada individuo, el tamoxifén sigue siendo el fármaco de elección para pacientes con cáncer de mama positivos al ER α . Incluso en pacientes con tumores metastásicos en donde el tamoxifén es utilizado como adyuvante, se han observado resultados positivos (Anderson *et al.*, 2002)

Resistencia a tamoxifén en cáncer de mama

El tamoxifén es el agente endocrino más usado para bloquear los efectos de los estrógenos en todas las etapas de cáncer de mama, particularmente en pacientes post menopaúsicas. La actividad anti proliferativa del tamoxifén, es debido principalmente a su habilidad para competir con los estrógenos por la unión al receptor de estrógenos α en el tejido tumoral mamario. A pesar de que el estatus de ER α ha sido usado para identificar pacientes con cáncer de mama con probabilidad para responder al tamoxifén, se ha observado resistencia en alrededor del 30-50% de pacientes con cáncer de mama ER α positivos, o desarrollan resistencia durante la terapia, conocida como resistencia adquirida al tamoxifén (Ali *et al.*, 2016)

Uno de los principales mecanismos que se han asociado a la resistencia al tamoxifén es la expresión desregulada de los correguladores del receptor de estrógenos. Particularmente, se ha observado que la sobreexpresión de coactivadores y la expresión reducida de correpresores en tumores mamarios elimina el efecto antiestrogénico del tamoxifén, incluso se ha observado que podría intercambiar el efecto antiestrogénico a estrogénico. SRC-1 es uno de los primeros coactivadores asociados con respuesta desfavorable al tamoxifén, es decir, la sobreexpresión de este coactivador se relaciona con aumento de la actividad agonista del tamoxifén (Girault *et al.*, 2006).

Otro mecanismo que también se ha asociado a la resistencia al tamoxifén es el efecto no genómico del ER α , donde hay interacción directa con varias vías de transducción de señales (Osborne *et al.*, 2003; Kirkegaard *et al.*, 2005), entre las que se incluye la señalización desencadenada por HER2; en donde se ha observado que favorece un incremento en la activación de ER α y sus coactivadores.

HER2 es un receptor tipo tirosina cinasa que pertenece a la familia de receptores a factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), se ha observado que la activación de la señalización de HER2 ocurre en aproximadamente el 20 % de los

casos de cáncer de mama, como resultado de la sobreexpresión de dicho receptor (Oh *et al.*, 2020). La señalización que promueve se asocia a la activación de las vías PI3K/AKT y MAPK. Interesantemente, se ha observado que la sobreexpresión de HER2 también promueve el reclutamiento independiente de ligando de ER α y un complejo de coactivadores a promotores de respuesta a E2, lo que indica que tiene un papel considerable en el desarrollo de resistencia a terapia endocrina (Shin *et al.*, 2006).

La relevancia de la señalización cruzada entre receptores a factores de crecimiento y coactivadores del receptor de estrógenos se ha expuesto en estudios donde la expresión de SRC-1 fue investigada en tumores mamarios positivos a la expresión de ER α conforme al estatus de HER2 de pacientes tratados con quimioterapia y tamoxifén. En este estudio, se observó que la expresión de SRC-1 fue asociada con recurrencia de la enfermedad, solamente en el subgrupo de tumores mamarios positivos a HER2 (Fleming *et al.*, 2004).

Antecedentes

BCAS2

En 1999, un grupo de investigadores identificaron por primera vez una proteína de 26kD que se encontraba sobre expresada en dos líneas celulares de cáncer de mama. Inicialmente fue identificada como DAM1 (ADN amplificado en carcinoma mamario) y que posteriormente fue nombrada como BCAS2 (Secuencia amplificada en cáncer de mama 2). Este primer estudio mostró que la sobreexpresión de la proteína en las células MCF7 y BT-20 estaba asociada a la amplificación de los genes en estas líneas celulares de cáncer de mama (Nagasaki *et al.*, 1999). Posteriormente, también se demostró que el gen de BCAS2 se encontraba amplificado en tejido mamario tumoral y que era una proteína con localización subcelular predominantemente en el núcleo de células MCF7 (Maass *et al.*, 2002).

En 2005, se observó que BCAS2 interactuaba con el receptor de estrógenos alfa y otros receptores hormonales como ER β , receptor a hormona tiroidea β , receptor a progesterona y PPAR γ . Adicionalmente, mostraron que la sobreexpresión de BCAS2 favorecía la actividad transcripcional del ER α a través de su región de transactivación AF-2, pero no observaron efecto mediante la unión a AF-1. Estos datos representaron la primera evidencia del efecto de BCAS2 como activador de ER α , sugiriendo una importante participación en el desarrollo de cáncer de mama (Qi *et al.*, 2005). Sin embargo, en estudios previos en nuestro laboratorio, utilizando un ensayo de doble híbrido en levaduras, se detectó a BCAS2 como una proteína que interactúa con los primeros 180 aminoácidos del ER α , sugiriendo una interacción con la región AF-1 (Salmerón-Hernández *et al.*, 2019).

En otro estudio sobre la participación de BCAS2 en procesos asociados a cáncer, observaron que interactuaba con p53; una proteína ampliamente conocida como supresora de tumor, con capacidad de regular el ciclo celular e inducir apoptosis en presencia de daño al ADN. Esta investigación mostró a BCAS2 como un regulador negativo de p53, lo cual se asoció a la disminución de la apoptosis y protección

contra un fármaco que es utilizado en la quimioterapia, la doxorubicina (Kuo *et al.*, 2009).

La expresión de BCAS2 se incrementa en células MCF7 resistentes a tamoxifén. Adicionalmente, la sobreexpresión de BCAS2 aumenta la expresión de metaloproteinasa 7. Lo que sugiere la participación de BCAS2 en la resistencia endocrina y motilidad celular, respectivamente (Sengupta *et al.*, 2014). Aparte del cáncer de mama, BCAS2 también se ha estudiado en otras neoplasias. Los reportes indican que en etapas avanzadas de tumores de próstata hay mayor expresión de BCAS2. Asimismo, se mostró que BCAS2 interactúa con el receptor de andrógenos y aumenta la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata (Kuo *et al.*, 2015)

Los trabajos de investigación enfocados al estudio de coactivadores resultan muy importantes y necesarios, debido a que se ha sugerido que pueden estar participando en la resistencia al tratamiento con tamoxifén en pacientes con cáncer de mama. Adicionalmente, comienzan a mostrar un valor predictivo para la progresión y tratamiento de la enfermedad (Manavathi *et al.*, 2014; Kirkegaard *et al.*, 2007). Los mecanismos por los cuales BCAS2 podría estar regulando la función del receptor de estrógenos en carcinoma mamario han sido poco estudiados, y hasta el momento permanecen pobremente entendidos. Por lo anterior proponemos caracterizar los mecanismos que regulan la actividad de BCAS2 como coactivador del receptor de estrógenos α en células de cáncer de mama.

En estudios preliminares de nuestro grupo de trabajo, hemos observado que BCAS2 se une directamente con la región amino terminal del ER α , activando directamente a la región de transactivación AF-1 e indirectamente a la región de transactivación AF-2.

Planteamiento del problema:

Se sabe que los coactivadores, como BCAS2, desarrollan un papel importante en el aumento de la actividad transcripcional mediada por el receptor de estrógenos. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales activa al ER α y el papel que puede jugar BCAS2 en cáncer de mama aún no han sido elucidados. Realizar investigaciones que nos permitan entender las vías de señalización que afectan tanto a la actividad del receptor de estrógenos α como al coactivador BCAS2 proporcionará información útil que nos permitirá en un futuro mejorar las estrategias terapéuticas, principalmente en respuesta a la resistencia observada con Tamoxifén. Por lo anterior nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

¿Qué mecanismos regulan la actividad de BCAS2 como coactivador del receptor de estrógenos α en células de cáncer de mama?

¿Qué efectos tendrá la sobreexpresión de BCAS2 sobre mecanismos de carcinogénesis, como la migración y la formación de colonias?

Hipótesis

BCAS2, al ser un coactivador del receptor de estrógenos α podrá colaborar con los coactivadores SRC-1, CBP y TIF2 de dicho receptor y promover procesos como la migración y formación de colonias, en células de cáncer de mama.

Objetivo general:

Caracterizar los mecanismos que regulan a BCAS2 como coactivador del receptor de estrógenos α y determinar su efecto sobre procesos relacionados con el desarrollo de cáncer mamario hormono-regulado.

Objetivos específicos:

1. Evidenciar el efecto de BCAS2 sobre la activación transcripcional en presencia de ligandos del receptor de estrógenos α en células de cáncer de mama.
2. Determinar la participación de BCAS2 con correguladores del AF-2 como SRC-1, CBP y TIF2 en la activación transcripcional de ER α .
3. Evaluar el efecto de BCAS2 sobre la migración de células de cáncer de mama.
4. Analizar la capacidad de BCAS2 para promover la formación de colonias en células de cáncer de mama.
5. Elucidar la regulación de BCAS2 por las vías de señalización HER2, PI3K y MAPK y sus efectos sobre la activación transcripcional de ER α .

Material y métodos

Cultivo celular

Todas las líneas celulares fueron obtenidas de ATCC y fueron analizadas por PCR para descartar contaminación por micoplasma. Las células fueron cultivadas para su mantenimiento en medio como sugiere ATCC y suplementado con 5-10% con suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin), e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Las líneas celulares de cáncer de mama: MCF7, MDA-MB-231 y SK-BR-3 fueron cultivadas en EMEM con 0.01 mg/mL de insulina recombinante humana, medio Leibovitz L-15 y medio McCoy's 5A, respectivamente. Para los experimentos en presencia de hormona se utilizó medio DMEM/F12 libre de rojo de fenol y suero fetal bovino (SFB) tratado con carbón activado-dextran para reducir la presencia de hormonas. Las características de las líneas celulares utilizadas son las siguientes: MCF7 expresan el receptor de estrógenos, MDA-MB-231 no expresan ER, PR y HER2, células SK-BR-3 sobreexpresan HER2.

Plásmidos

El plásmido de BCAS2 fue clonado dentro del vector pcDNA 3.1/His (Invitrogen) para la obtención de pcDNA-BCAS2. El vector utilizado para el receptor de estrógenos fue pSG5-ER α y que se recibió en donación por parte del Dr. Pierre Chambon (INSERM, France). El vector reportero, 3X-ERE-Luc, fue proporcionado por el Dr. Donald McDonnell (Duke University, USA). pSG5-SRC-1, pSG5-TIF2 y pSG5-CBP fueron donados por el Dr. Edwin Milgrom (INSERM, France).

Transfección transitoria y ensayos de luciferasa

Para determinar el efecto de BCAS2 en la actividad transcripcional las células MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 se sembraron en placas de 24 pozos y fueron transfectadas con 200 ng de 3xERE-Luc, 50 ng del plásmido de expresión del

receptor de estrógenos en células que no lo expresan, de 50 a 100 ng del plásmido de expresión del corregulador o vector vacío, y 10 ng de pCMV- β -galactosidasa (Promega), como control de la transfección por 6 horas, usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), como lo indica el fabricante. Las células fueron incubadas por 48 horas en presencia o ausencia de ligando. Los ligandos que se usaron para ER fueron 17 β -estradiol (E2) o Tamoxifén (TAM). Para determinar si BCAS2 puede colaborar con otros coactivadores para incrementar la actividad transcripcional de ER α , se sembraron 7×10^4 células de MCF7, MDA-MB-231 y SK-BR-3 y fueron transfectadas como previamente se ha descrito. Se utilizaron 50 ng de SRC-1, CBP o TIF2 junto con 50 ng de plásmido BCAS2.

Finalmente, para determinar el impacto de las vías de señalización de HER2, PI3K y MEK-1 en la activación de BCAS2, las células MCF7 y SK-BR-3 fueron transfectadas como previamente se ha descrito, en presencia del vehículo etanol (EtOH), E2 o TAM y 50 μ g Trastuzumab (inhibidor de HER2), 10 μ M PD98059 (inhibidor de MEK1) o 100 nM Wortmanina (inhibidor de Akt) por 48 horas. En todos los casos, después de 48 horas de tratamiento, las células se lisaron en 50 μ l de buffer de lisis (Fosfato de Potasio 0.1 M, pH 7.8, 0.2 % Triton X-100, 1 mM DTT) y se utilizaron 30 μ l de extracto celular para medir la actividad luciferasa y β -galactosidasa (en un mismo tubo) usando un luminómetro para microplacas de 96 pozos GloMax (Promega). Se realizaron al menos tres experimentos de forma independiente y cada uno de ellos por triplicado. Los resultados se muestran como unidades relativas de luz (URL) calculadas como una proporción de las actividades de luciferasa y β -galactosidasa.

Ensayos de formación de colonias

Para realizar los ensayos de formación de colonias, las células MCF7 fueron transfectadas con BCAS2 o vector vacío (VV) y fueron sembradas 1000 células por pozo en placas de 6 pozos. Los tratamientos incluyeron E2, TAM o etanol (EtOH) por 12 días. Posteriormente, las células se tiñeron con cristal violeta al 0.05 % y se

contaron las colonias formadas. El número de colonias fue evaluado visualmente y se tomaron en cuenta las colonias que contenían en apariencia >50 células. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital. El número de colonias se reportó como % de colonias (PE), donde $PE = (\# \text{ de colonias formadas} / \# \text{ de células sembradas}) \times 100$. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayos de migración por cierre de herida.

Para evaluar la motilidad celular, se realizaron ensayos de cierre de herida. Las células MCF7 fueron transfectadas con BCAS2 o vector vacío y se sembraron 500,000 células por pozo en placas de 6 pozos. Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 90 %, sobre la superficie de la caja se realizó una ralladura con una punta de micropipeta de 200 μl y las células fueron tratadas con EtOH o E2 por 48 horas. Los experimentos se realizaron en presencia de un inhibidor de proliferación, AraC (20 nM), por 48 horas. Se tomaron fotografías a las 48 horas de tratamiento, y el porcentaje de la abertura de la herida fue calculado.

Western Blot

Posterior a los tratamientos con ligandos del receptor de estrógenos e inhibidores de las vías HER2, PI3K y MAPK, las células fueron lisadas y sometidas a electroforesis SDS-PAGE al 10 %. Las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore Co, Massachusetts) durante 2 horas a 80 volts. Para minimizar uniones inespecíficas, las membranas fueron bloqueadas con 10 % de leche en polvo libre de grasa resuspendida en TBS al 1 % de Tween (TBS-T) por una hora.

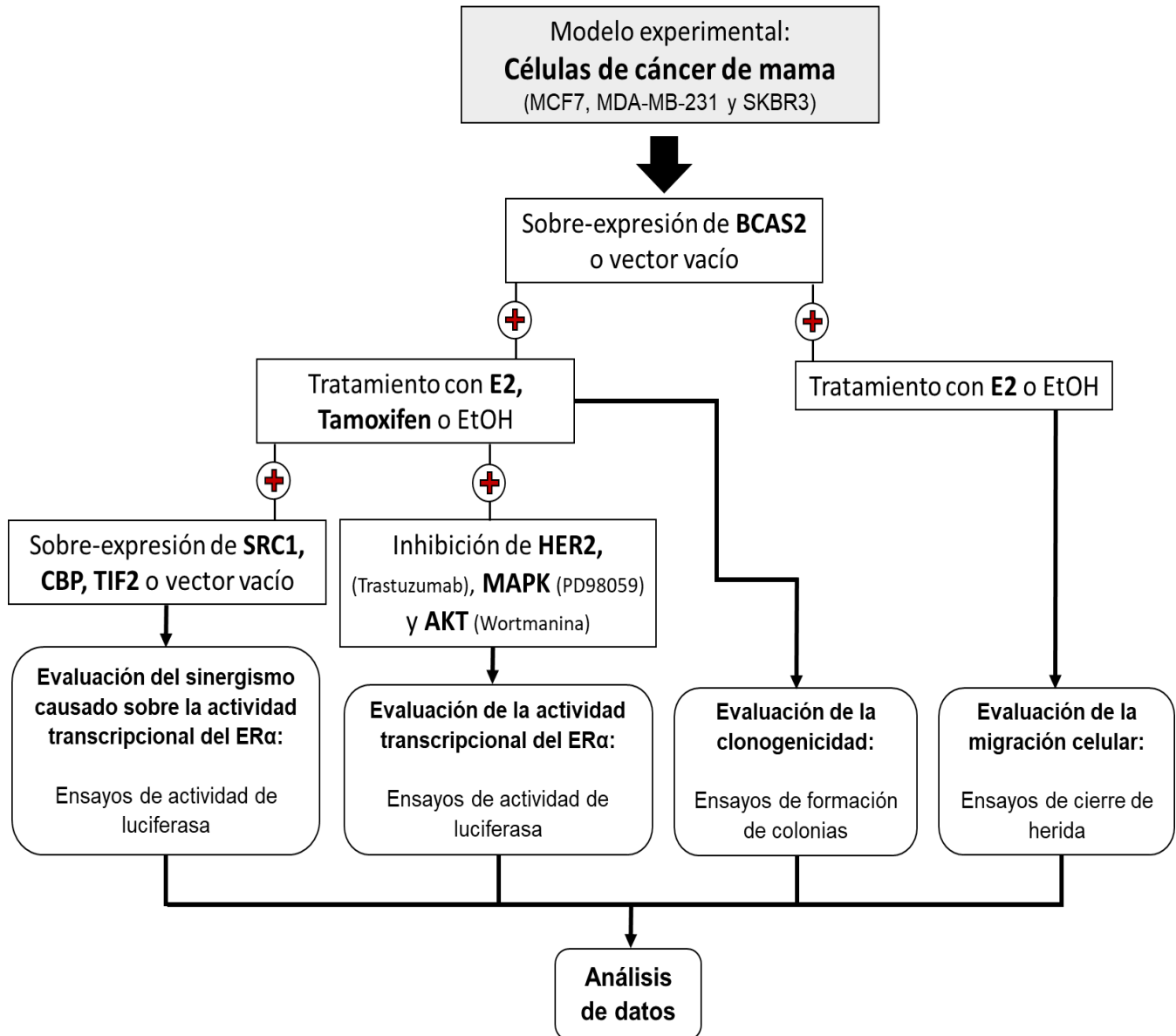
Posteriormente, las membranas fueron incubadas por 2 horas con anticuerpos para la detección de las proteínas HER2, AKT, pAKT, ERK, pERK y GAPDH, según las necesidades del experimento, en una dilución 1:5,000. Las membranas fueron lavadas por 10 minutos con TBS-T en 3 ocasiones, en agitación suave y constante. El siguiente paso fue incubar las membranas con anticuerpo secundario anti-ratón

o anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, CA) en una dilución 1:10,000 por una hora en agitación constante. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia (Amersham Biosciences, Fairfield CT).

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado de forma independiente, y los datos se muestran como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico para los ensayos de luciferasa se llevó a cabo usando la prueba T de student o ANOVA de una vía, seguido por la prueba de Dunnet y Bonferroni, respectivamente.

Esquema metodológico



Resultados

BCAS2 aumenta la actividad transcripcional de ER α

Previamente se demostró que BCAS2 era capaz de incrementar la actividad transcripcional mediada por ER α en células de riñón de mono CV-1 (Qi *et al.*, 2005). En nuestro grupo de trabajo, investigamos si BCAS2 aumentaba la actividad transcripcional en células de cáncer de mama. Mediante ensayos de luciferasa observamos que la sobreexpresión de BCAS2 es capaz de aumentar la actividad transcripcional de ER α a un nivel similar a SRC-1, un coactivador conocido de ER α , en células MCF7 positivas al receptor de estrógenos (Figura 7A) o en células MDA-MB-231 transfectadas con ER α en presencia de E2 (Figura 7B).

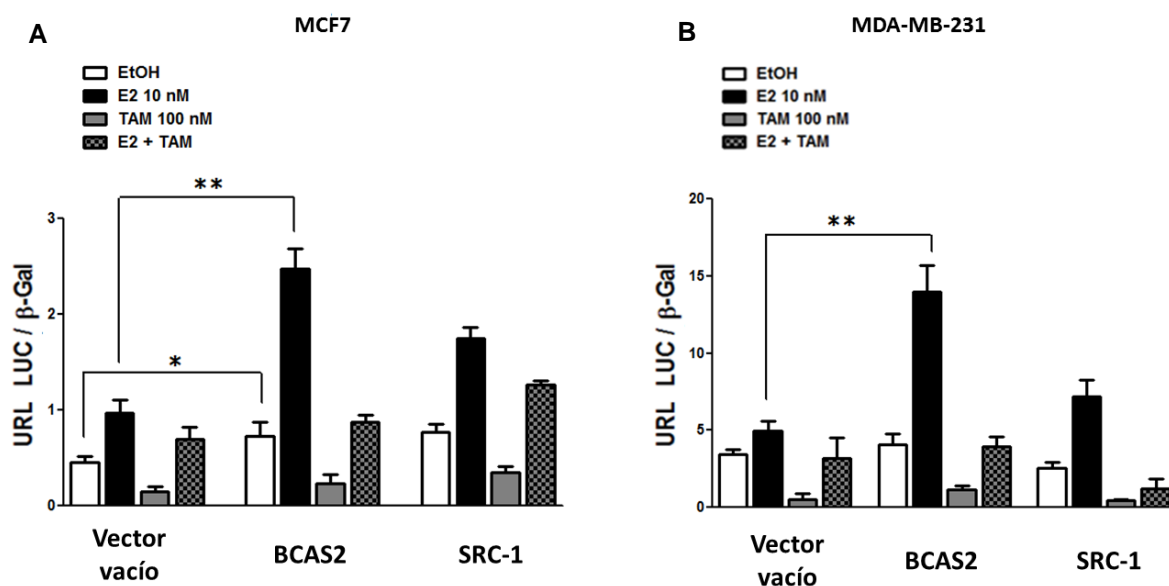


Figura 7. BCAS2 aumenta la actividad transcripcional mediada por ER α . (A, B) Se muestra la actividad de luciferasa inducida por la sobreexpresión de BCAS2 en presencia del vehículo etanol (EtOH), 10 nM de E2 o 100 nM de TAM. (A) Las células MCF7 fueron transfectadas transitoriamente con el vector reportero 3x-ERE-luciferasa (200 ng), β -galactosidasa (10 ng) y BCAS2 (100 ng). Vector vacío pcDNA3.1 (100 ng) y SRC-1 (100 ng) fueron transfectados como control negativo y positivo, respectivamente. (B) Las células MDA-MB-231 fueron transfectadas con los mismos plásmidos y adicionalmente con 50 ng de ER α . La actividad relativa de luciferasa (URL LUC / β -gal) se muestra como la media \pm desviación estándar de un ensayo representativo realizado por triplicado. El

análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student comparando la activación entre BCAS2 y el vector vacío (transfectado a la misma concentración) en presencia o ausencia de E2 o EtOH, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

BCAS2 actúa en conjunto con otros coactivadores para aumentar la actividad de ER α

Datos previos de nuestro laboratorio demostraron que BCAS2 interactúa con la región N-terminal del ER α , que contiene el dominio de transactivación AF-1. Para profundizar en los mecanismos moleculares del coactivador BCAS2 en la activación transcripcional, evaluamos la capacidad de BCAS2 de afectar la actividad de coactivadores que preferencialmente son reclutados a través del dominio AF-2. Utilizamos SRC-1, TIF2 y CBP. Todos contienen motivos LXXLL a través de los cuales se unen al AF-2 del receptor. Analizamos tres diferentes líneas celulares de cáncer de mama MCF7, MDA-MB-231 y SK-BR-3.

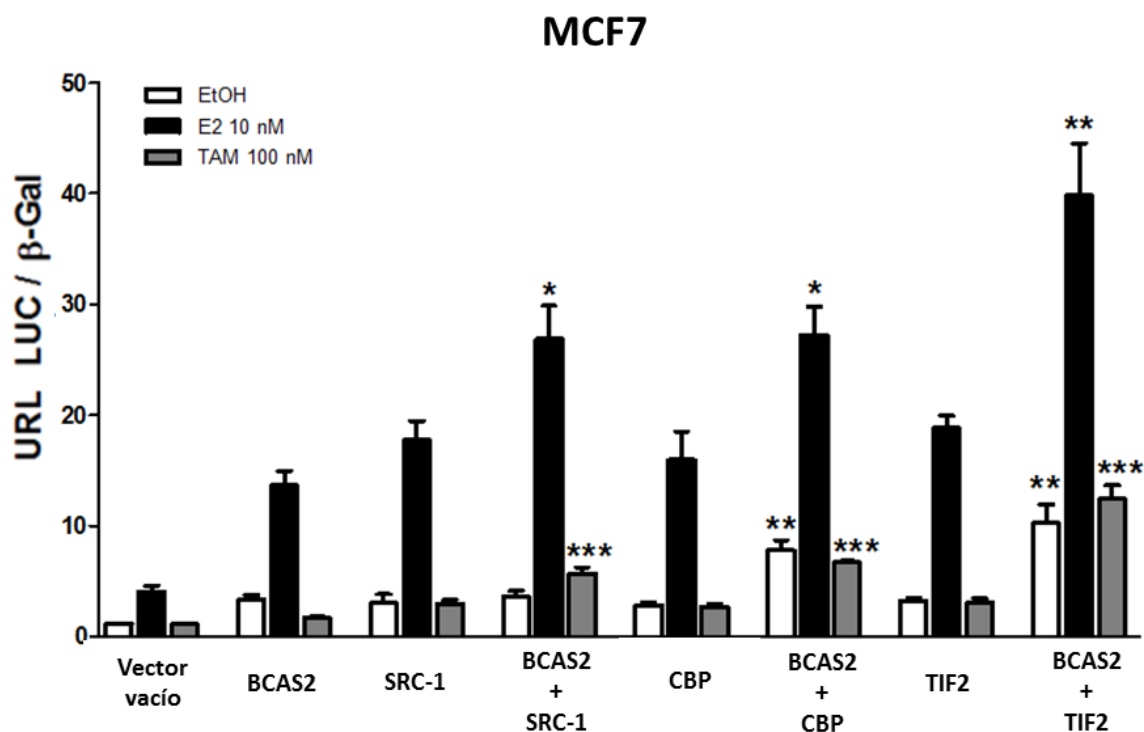


Figura 8. BCAS2 actúa con los coactivadores de AF-2 para aumentar la actividad de ER α en células MCF7. Los ensayos de luciferasa se realizaron con pcDNA-BCAS2 o vector

vacío, transfectados con y sin los coactivadores SRC-1, CBP, TIF2 y tratados con EtOH o 10 nM de E2 o 100 nM de TAM en células MCF7. La actividad relativa de luciferasa (URL LUC / β -gal) se muestra como la media \pm desviación estándar de un ensayo representativo realizado por triplicado. Se comparó la actividad de BCAS2 + otro coactivador contra la actividad de cada coactivador por separado en presencia de EtOH, E2 y TAM. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía con una prueba posterior de Bonferroni, * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

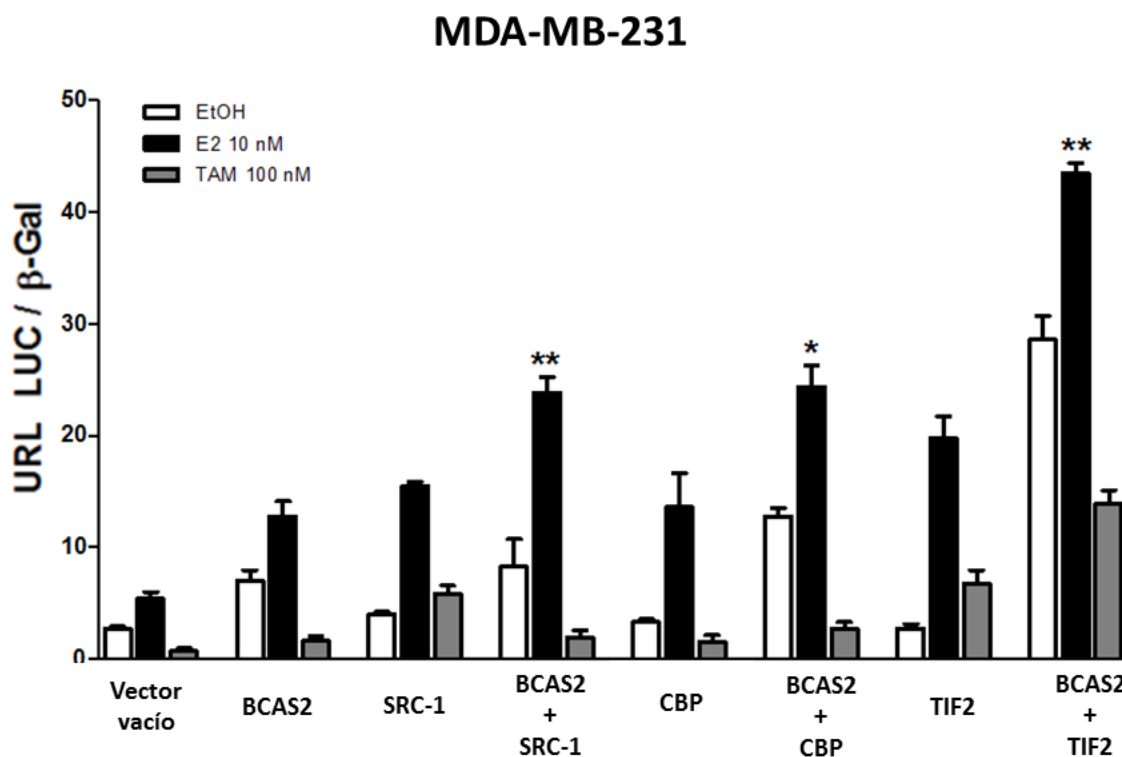


Figura 9. BCAS2 actúa con los coactivadores de AF-2 para aumentar la actividad de ER α en células MDA-MB-231. Los ensayos de luciferasa se realizaron con pcDNA-BCAS2 o vector vacío, transfectados con y sin los coactivadores SRC-1, CBP, TIF2 y tratados con EtOH o 10 nM de E2 o 100 nM de TAM. La actividad relativa de luciferasa (URL LUC / β -gal) se muestra como la media \pm desviación estándar de un ensayo representativo realizado por triplicado. Se comparó la actividad de BCAS2 + otro coactivador contra la actividad de cada coactivador por separado en presencia de E2. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía con una prueba posterior de Bonferroni, * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$.

Nuestros resultados mostraron que BCAS2 en conjunto con alguno de los tres coactivadores en presencia de E2 incrementó la actividad transcripcional comparada con la actividad de BCAS2 solo o la de alguno de los otros coactivadores solos (Figura 8-10). Interesantemente, en células MCF7 (Figura 8), la combinación de BCAS2 con algunos de los otros tres coactivadores de AF-2 también incrementó la actividad transcripcional en presencia de TAM, lo cual no es observado en líneas celulares negativas al receptor de estrógenos MDA-MB-231 (Figura 9) y SK-BR-3 (Figura 10). Esto sugiere que BCAS2 tal vez tenga un papel en la resistencia a tamoxifén en un ambiente celular donde hay expresión endógena del ER α .

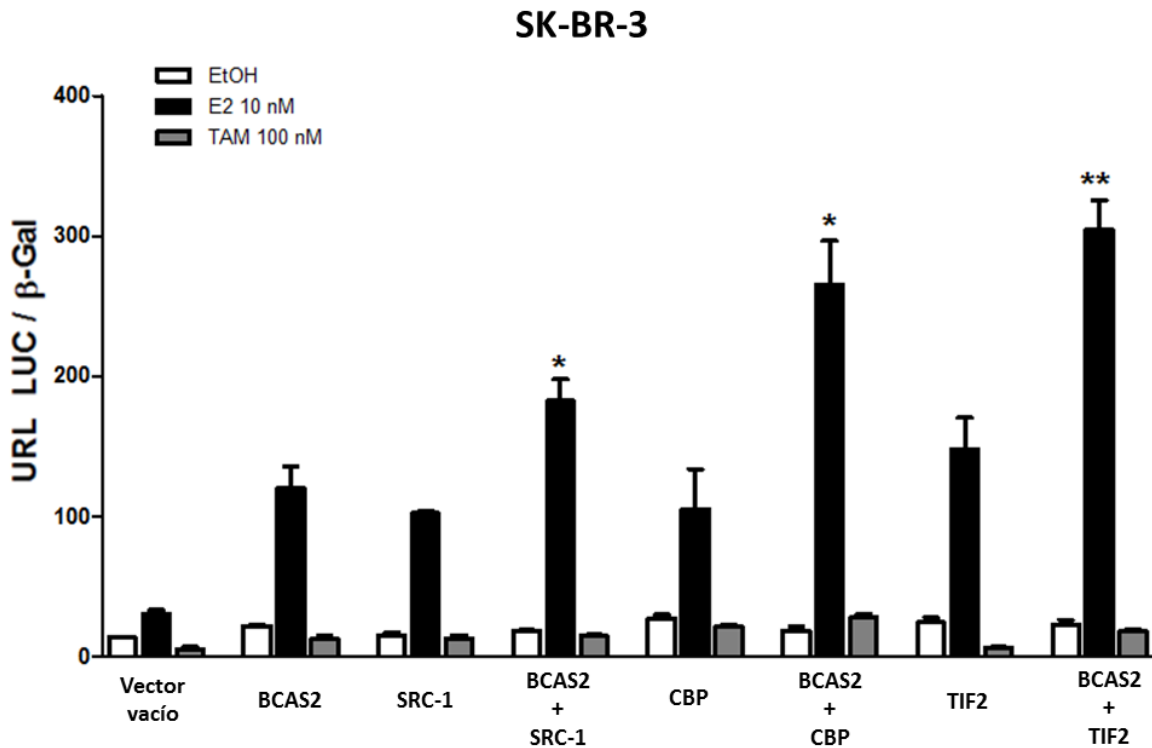


Figura 10. BCAS2 actúa en conjunto con coactivadores de AF-2 para aumentar la actividad de ER α en células SK-BR-3. Los ensayos de luciferasa se realizaron con pcDNA-BCAS2 o vector vacío, transfectados con y sin los coactivadores SRC-1, CBP, TIF2 y tratados con EtOH o 10 nM de E2 o 100 nM de TAM. La actividad relativa de luciferasa (URL LUC / β -gal) se muestra como la media \pm desviación estándar de un ensayo representativo realizado por triplicado. Se comparó la actividad de BCAS2 + otro

coactivador contra la actividad de cada coactivador por separado en presencia de E2. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía con una prueba posterior de Bonferroni, * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$.

BCAS2 promueve la formación de colonias y la migración dependiente de estradiol en células de cáncer de mama.

Para analizar el efecto de BCAS2 en el desarrollo de cáncer de mama, utilizamos células MCF7 para demostrar su efecto en la migración y formación de colonias. Realizamos ensayos de formación de colonias y observamos que la sobreexpresión de BCAS2 causó un aumento significativo en la formación de colonias de células tratadas con E2 (Figura 11)

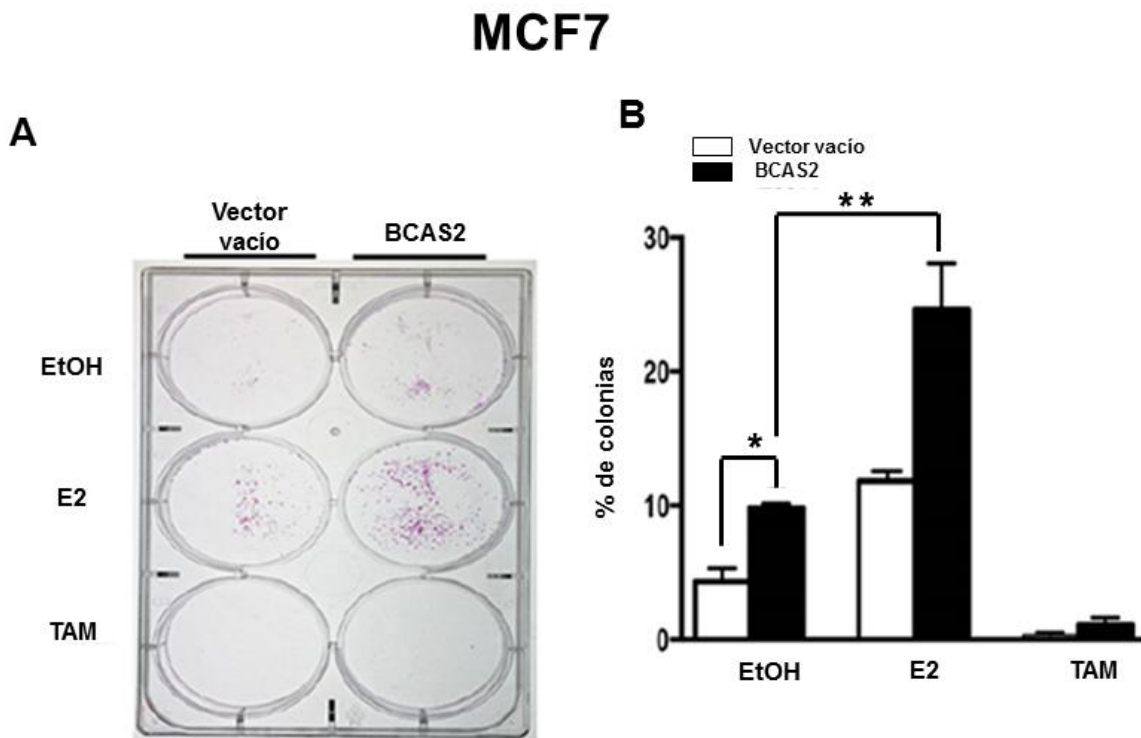


Figura 11. BCAS2 aumenta la formación de colonias. (A) Se transfectaron células MCF7 con 100 ng de BCAS2 o vector vacío, posterior la transfección se utilizaron placas de 6 pozos para sembrar 1000 células por pozo y fueron tratadas con E2 o TAM cada 48 horas por 12 días. Las colonias fueron teñidas y contadas. (B) Se muestra la representación

gráfica del número de colonias contadas con respecto al número de células sembradas en la placa. Los datos representan tres ensayos independientes, el análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student, * $p < 0.05$ comparación de BCAS2 con vector vacío en presencia de EtOH y ** $p < 0.001$ comparación de BCAS2 en presencia de E2 con vector vacío en presencia de EtOH.

También analizamos en papel de BCAS2 en la migración de células MCF7 por medio de ensayos de cierre de herida. Nuestros resultados muestran mayor migración de células que sobreexpresan BCAS2 y que fueron tratadas con E2 en comparación con las células transfectadas con el vector vacío a las 48 horas de tratamiento (Figura 12).

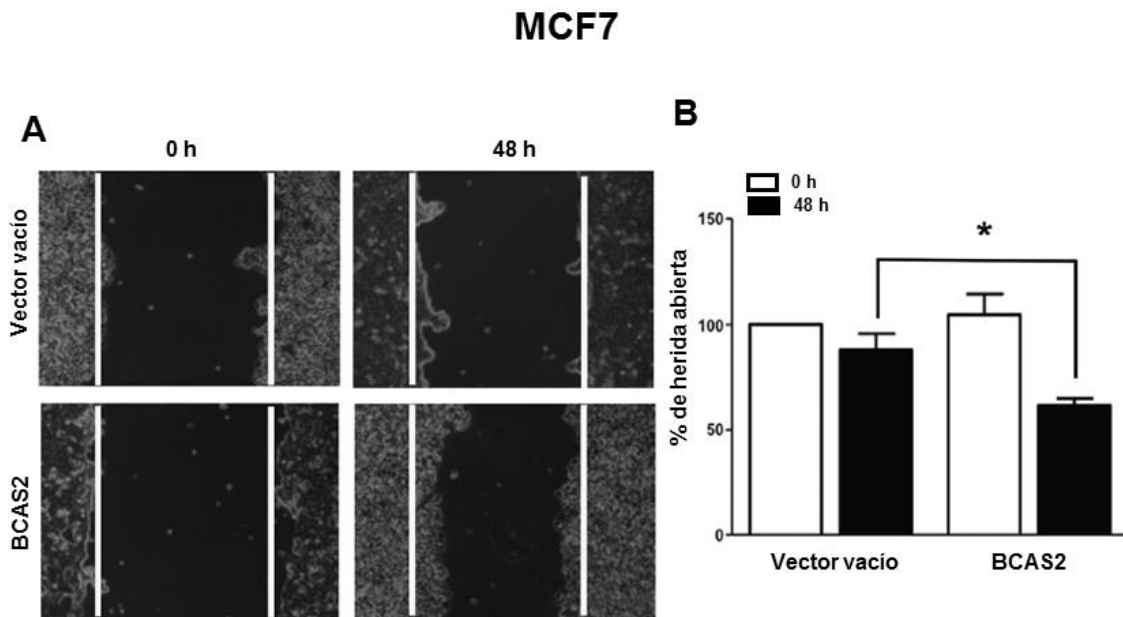


Figura 12. BCAS2 aumenta significativamente la migración celular. El efecto de la sobreexpresión de BCAS2 en la migración de células MCF7 fue determinado usando ensayo por cierre de herida. El cierre de la herida de células transfectadas con BCAS2 fue más rápido en comparación con las células transfectadas con vector vacío en presencia de E2. El área de la herida abierta a las cero horas fue considerada como el 100 %. Los valores representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos por triplicado. * $p < 0.05$ compara al grupo del vector vacío con BCAS2 a las 48 horas de tratamiento con E2. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo 10X.

Participación de HER2, MAPK y AKT en la activación de BCAS2 y ER α .

Se sabe que el entrecruzamiento de las vías de transducción de señales entre MAPK y/o PI3K/AKT y el receptor de estrógenos en células de cáncer de mama puede promover aumento en la señalización mediada por estrógenos y favorece el reclutamiento de coactivadores como SRC-1 y SRC-3. Adicionalmente, la activación de estas vías de señalización por HER2 ha sido ampliamente implicada en cáncer de mama y se ha observado que promueve la resistencia endocrina (Takimoto *et al.*, 1999; Osborne *et al.*, 2005).

Con estos antecedentes nosotros nos interesamos en determinar si estas vías de transducción de señales tenían la capacidad de afectar la actividad de ER α mediada por BCAS2. Realizamos ensayos de actividad transcripcional comparando dos líneas celulares de cáncer de mama usando inhibidores de HER2, MEK-1 y PI3K. Las células MCF7 son positivas a ER α con baja expresión de HER2, mientras que SK-BR-3 es negativa a la expresión de ER α y sobreexpresa HER2, en estas células ER α fue transfectado. Nuestros resultados muestran que el inhibidor de HER2, Trastuzumab, tiene poco efecto en la inhibición de la activación de ER α en nuestro sistema. Sin embargo, causa la inhibición completa del incremento en la actividad transcripcional inducida por BCAS2 en presencia de E2 (Figura 13).

El inhibidor de MEK-1, PD98059, causa inhibición más marcada en la disminución de la actividad, inhibiendo tanto la actividad inducida por ER α solo, como la de BCAS2 (Figura 14). Este efecto es mucho más evidente en células SK-BR-3, en donde la actividad de ER α se suprime casi por completo (Figura 14B). Estos hallazgos se respaldan en lo mostrado anteriormente, donde se observa que la activación de MEK aumenta la señalización de ER α y esto sugiere que el efecto es probablemente causado por la inhibición de ER α y no como un efecto sobre BCAS2.

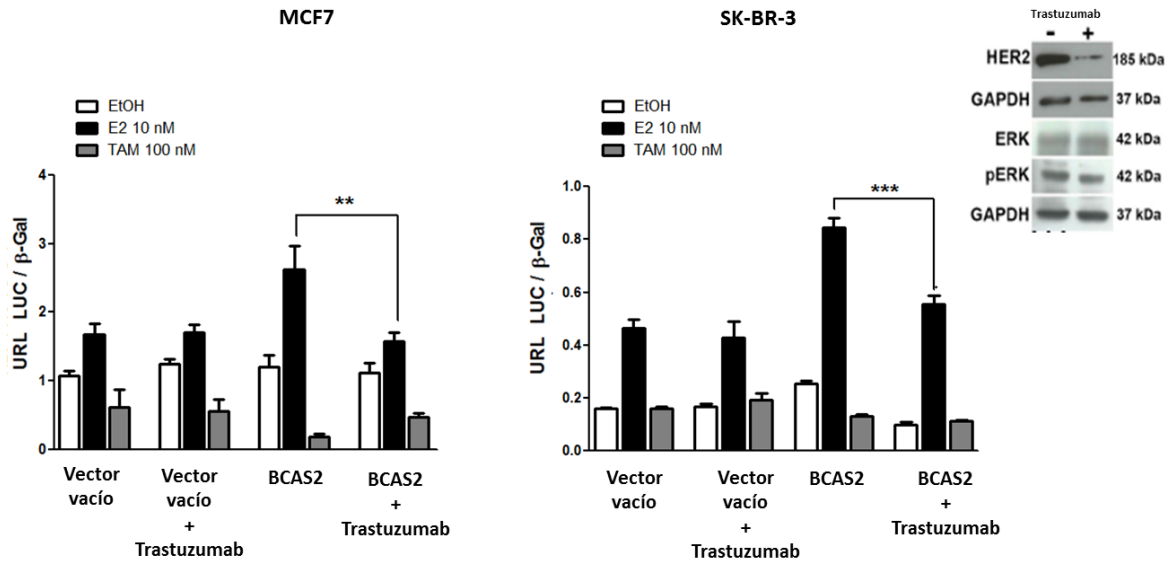


Figura 13. La vía de transducción de señales de HER2 modula la activación de BCAS2. Las células MCF7 fueron transfectadas transitoriamente con vector reportero ERE-Luciferasa (200 ng) y BCAS2 (100 ng) en presencia de EtOH, o 10 nM de E2 o 100 nM de TAM adicionado con 50 µg de Trastuzumab por 48 horas. Se utilizaron 100 ng de vector vacío como control negativo. (B) Las células SK-BR-3 fueron transfectadas y tratadas de la misma manera que las MCF7, excepto que también fueron transfectadas con 50 ng de ERα. La actividad relativa de luciferasa (URL LUC / β-gal) se muestra como media ± desviación estándar de un ensayo representativo realizado por triplicado. En las figuras A y B se comparó a BCAS2 en presencia y ausencia de Trastuzumab + E2. El análisis estadístico fue realizado usando la prueba t de Student, ** p < 0.005, *** p < 0.001. Adicionalmente, se muestra un western blot representativo de HER2, ERK y ERK fosforilado (pERK) después de 48 horas de tratamiento con Trastuzumab. GAPDH fue usado como control de expresión constitutiva.

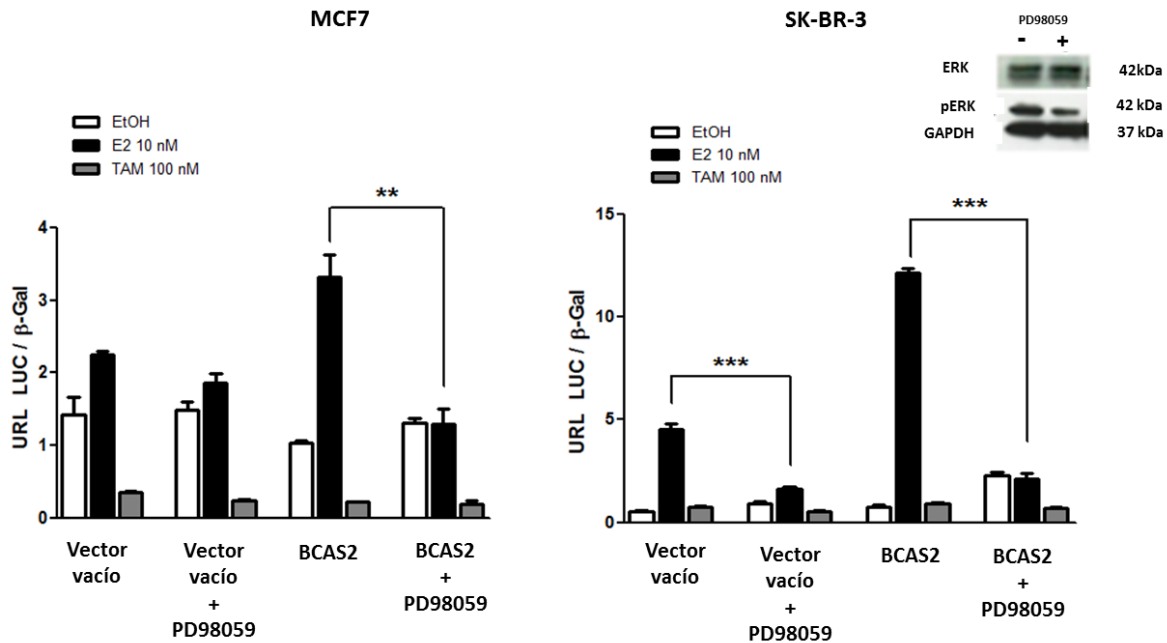


Figura 14. La vía de transducción de señales de MAPK está involucrada en la activación de BCAS2. (A) Las células MCF7 fueron transfectadas transitoriamente con vector reportero ERE-Luciferasa (200 ng) y BCAS2 (100 ng) en presencia de EtOH, o 10 nM de E2 o 100 nM de TAM adicionado con 10 mM de PD98059 por 48 horas. Se utilizaron 100 ng de vector vacío como control negativo. (B) Las células SK-BR-3 fueron transfectadas y tratadas de la misma manera que las MCF7, excepto que también fueron transfectadas con 50 ng de ER α . La actividad relativa de luciferasa (URL LUC / β -gal) se muestra como media \pm desviación estándar de un ensayo representativo realizado por triplicado. En la figura A se comparó a BCAS2 en presencia y ausencia del inhibidor de MEK, PD98059, + E2, en la figura B se comparó al vector vacío en presencia y ausencia de PD98059 + E2 y a BCAS2 en presencia y ausencia de PD98059 + E2. El análisis estadístico fue realizado usando la prueba t-Student, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. Adicionalmente, se muestra western blot representativo de ERK y ERK fosforilado (pERK) después de 48 horas de tratamiento con PD98059 (inhibidor de la vía MAPK). GAPDH fue usado como control de carga para proteínas.

Inversamente, el bloqueo de la señalización de PI3K/AKT (wortmanina) muestra poco o nulo efecto sobre la actividad de ER α solo, pero muestra un importante efecto en la actividad de BCAS2, inhibiendo su habilidad para promover la transactivación de ER α (Figura 15).

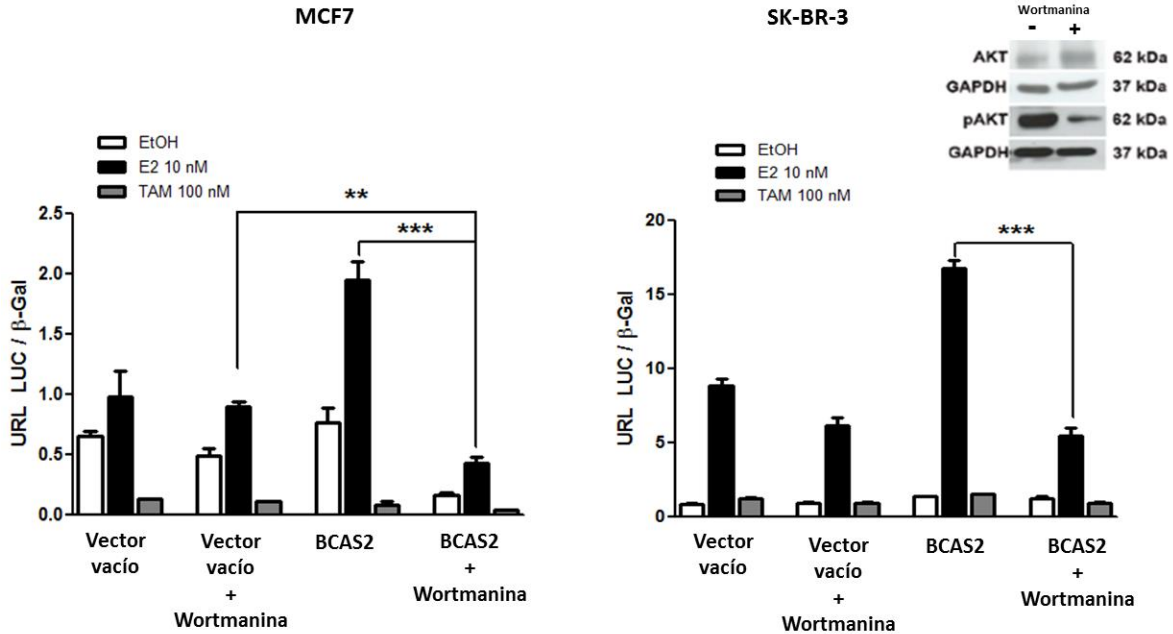


Figura 15. La vía de transducción de señales de PI3K / AKT modula la activación de BCAS2. (A) Las células MCF7 fueron transfectadas transitoriamente con vector reportero ERE-Luciferasa (200 ng) y BCAS2 (100 ng) en presencia de EtOH, o 10 nM de E2 o 100 nM de TAM adicionado con 100 nM de Wortmanina por 48 horas. Se utilizaron 100 ng de vector vacío como control negativo. (B) Las células SK-BR-3 fueron transfectadas y tratadas de la misma manera que las MCF7, excepto que también fueron transfectadas con 50 ng de ER α . La actividad relativa de luciferasa (URL LUC / gal) se muestra como media \pm desviación estándar de un ensayo representativo realizado por triplicado. En la figura A se comparó al vector vacío en presencia de Wortmanina + E2 contra la sobreexpresión de BCAS2 en presencia de Wortmanina + E2 (**). En la figura B se comparó el efecto de BCAS2 en presencia y ausencia de Wortmanina + E2 (***). El análisis estadístico fue realizado usando la prueba t de Student, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. Adicionalmente, se muestra western blot representativo de AKT y AKT fosforilado (pAKT) después de 48 horas de tratamiento con Wortmanina. GAPDH fue usado como control de carga para proteínas.

Discusión

La identificación y caracterización de correguladores que modulan la actividad de ER α es un paso crucial para entender los mecanismos que controlan la expresión de genes regulados por estrógenos, además de contribuir al entendimiento de la iniciación y progresión del cáncer de mama. En este estudio, contribuimos al conocimiento acerca del papel de BCAS2 como coactivador del receptor de estrógenos α y su regulación en células de cáncer de mama. BCAS2 había sido propuesto como coactivador de ER α al mostrar aumento en su actividad transcripcional (Qi *et al.*, 2005). Sin embargo, el grupo de Qi y colaboradores, propuso que la actividad sucedía únicamente a través del dominio de activación AF-2.

En nuestro grupo de trabajo, se observó que hay interacción directa de BCAS2 con el dominio N-terminal del ER α *in vitro*, sin encontrar interacción con el dominio C-terminal. Sin embargo, en ensayos de luciferasa se detectó que BCAS2 era capaz de incrementar la actividad transcripcional de AF-1 y AF-2 de manera independiente. Adicionalmente, se observó interacción del ER α completo tanto en presencia y ausencia de E2 y TAM (Salmerón-Hernández *et al.*, 2019). El hecho de que haya interacción de BCAS2 con el ER α en presencia de TAM apoya la unión al dominio AF-1, ya que el cambio conformacional causado al LBD no elimina la unión de BCAS2. Sin embargo, se han documentado algunos sitios en los que se llevan a cabo modificaciones postraduccionales involucradas en la activación del ER α , tanto en la región de la bisagra como en el LBD (Le Romancer *et al.*, 2011), lo que sugiere que se podría requerir alguna modificación postraduccional para la unión de BCAS2 al AF-2 o la presencia de algún otro corregulador que actúe como puente para esta interacción.

En este trabajo, confirmamos por ensayos de luciferasa realizados en células de cáncer de mama que BCAS2 aumenta la actividad transcripcional mediada por ER α en presencia de E2. Por otra parte, basado en nuestros datos previos que apoyan

la idea de que BCAS2 podría estar involucrado en la promoción del sinergismo entre los dominios de transactivación AF-1 y AF-2, como se ha mostrado que puede suceder con SRC-1 y p300 (Tzukerman *et al.*, 1994; Métivier *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2000), analizamos el efecto de BCAS2 en la actividad de tres coactivadores que preferencialmente se unen al dominio AF-2 a través de secuencias LxxLL, aunque también se ha demostrado que se pueden unir al dominio N-terminal. Nuestros resultados mostraron que la combinación de BCAS2 con SRC-1, TIF2 o CBP aumentó la actividad transcripcional de ER α comparado con cualquiera de estos coactivadores solos. Lo anterior implica que BCAS2 no compite con estos coactivadores para la unión al receptor. Otros grupos han encontrado resultados similares con otros coactivadores, por ejemplo, Tip60, el cual sinergiza con TIF2 para aumentar la transactivación de ER β (Lee *et al.*, 2013). Además, en células MCF7, la combinación de BCAS2 con cualquiera de los coactivadores analizados, especialmente TIF2, también aumenta la actividad transcripcional en presencia de TAM, y en algunos casos en ausencia de ligando (Figura 8). La combinación de coactivadores puede ser necesaria para promover la actividad agonista de TAM a través del AF-1. Esto no es consistentemente observado en líneas celulares negativas a ER α transfectadas con ER α exógeno (Figura 9 y 10) sugiriendo que BCAS2 tal vez juega un papel en la resistencia a tamoxifén en un ambiente celular ER α positivo. Adicionalmente, se ha observado que BCAS2 aumenta su expresión en células MCF7 resistentes a tamoxifén y que este aumento en su expresión se asocia a tiempo más corto de recurrencia de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama (Nagasaki *et al.*, 1999; Sengupta *et al.*, 2014).

Está bien documentado que la expresión y actividad de algunos coactivadores del receptor de estrógenos se aumenta durante la carcinogénesis y progresión. Sin embargo, el papel que puede jugar BCAS2 en cáncer ha sido pobremente elucidado. Varios estudios han mostrado que está amplificado o sobreexpresado en tumores mamarios (Nagasaki *et al.*, 1999; Worsham *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2014) y sugieren que pudiera estar implicado en el desarrollo de resistencia endocrina, como se ha observado con otros coactivadores (Shiff *et al.*, 2003; Zhao

et al., 2009; Nagalingam *et al.*, 2012; Redmond *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha observado que BCAS2 se sobreexpresa en cáncer de próstata y regula el receptor de andrógenos aumentando la expresión de su ARNm y estabilización de la proteína (Kuo *et al.*, 2015). Por lo tanto, nosotros esperábamos que la sobreexpresión de BCAS2 impactara en el ambiente fisiológico de las células de cáncer de mama y en procesos carcinogénicos.

Estudiamos el efecto de la sobreexpresión de BCAS en la formación de colonias y migración celular (Figura 11 y 12), encontrando que se favorecían estos procesos celulares en presencia de E2. Estos resultados apoyan el papel de BCAS2 en la progresión del cáncer de mama, tanto antes como después de que se establezca la resistencia endocrina. Existen estudios con otros coactivadores, como SRC-1, que han mostrado capacidad para aumentar la proliferación y la migración celular (Qin *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2012), así como también se observó asociado al aumento en la expresión de Twist y a la metástasis (Qin *et al.*, 2009). Los coactivadores CBP y p300, también se han mostrado con capacidad para promover migración celular asociado al aumento en la expresión de metaloproteinasas 2 y 9 (Santer *et al.*, 2011). Por lo tanto, estos coactivadores han sido propuestos como marcadores de progresión y agresividad del cáncer de mama. Nuestros resultados muestran que BCAS2 sinergiza con estos coactivadores, que promueve procesos carcinogénicos y que tiene importantes implicaciones en cáncer de mama. Sin embargo, son necesarios otros estudios para determinar si se une directamente con otros coactivadores y para definir su secuencia de interacción específica con ER α .

Se ha demostrado previamente que hay interacciones entre ER α y varias vías de transducción de señales, incluyendo la señalización de HER2, la cual es capaz de activar tanto a las vías de MAPK como la de PI3K/AKT (Shou *et al.*, 2004). La sobreexpresión de HER2 se ha observado en alrededor de 20-30 % de las pacientes con cáncer de mama y ha sido implicada en la resistencia a TAM, tanto adquirida como de novo (Kurokawa *et al.*, 2000; Arpino *et al.*, 2004).

Adicionalmente, varios estudios clínicos también indican que la sobreexpresión de HER2 está asociada con baja respuesta al tratamiento con tamoxifén. Además, la expresión ectópica de HER2 en células MCF7 es suficiente para conferir resistencia a TAM en estas células (Benz *et al.*, 1992). En nuestros estudios, la inhibición de MAPK y PI3K/AKT resulta en la inhibición de la actividad de ER α . Sin embargo, el impacto de la inhibición de estas vías parece ser diferente. Por un lado, el bloqueo de la actividad de MEK-1 abate completamente la actividad de ER α (Figura 14). Por otro lado, la inhibición de PI3K solamente inhibe el aumento en la actividad promovida por BCAS2, sin afectar fuertemente la actividad intrínseca de ER α (Figura 15). Esto resalta la importancia de estas vías de transducción de señales en la regulación de ER α y la progresión del cáncer de mama regulado por estrógenos. La reducción en la actividad de BCAS2 probablemente se deba a una reducción en la fosforilación del receptor de estrógenos α , como previamente ya se había reportado (Osborne *et al.*, 2003; Osborne *et al.*, 2005), así como también de BCAS2. Sin embargo, el efecto directo sobre BCAS2 aún debe ser estudiado.

Conclusión

Este trabajo muestra que BCAS2 es un coactivador que colabora con coactivadores de la región AF-2 del receptor de estrógenos α , como SRC1, CBP y TIF2 en líneas celulares de cáncer de mama, desempeñando un papel en la actividad independiente y sinérgica en la activación transcripcional. Adicionalmente, BCAS2 es asociado a varios procesos de la carcinogénesis, tanto en presencia como en ausencia de estradiol. Lo que indica la importancia de la sobreexpresión de BCAS2 en un ambiente reducido de estradiol, como es el caso de las pacientes con tratamiento para el cáncer de mama. Los resultados mostraron que el bloqueo de la vía de señalización de PI3K/AKT disminuyó la actividad de BCAS2 (Figura 16), sin embargo, los mecanismos involucrados deberán ser estudiados a mayor detalle.

Perspectivas

- Analizar la participación de BCAS2 en la actividad de ER β y sus efectos en cáncer de mama.
- Determinar el efecto BCAS2 en la resistencia a tamoxifén en células de cáncer de mama.
- Dilucidar la actividad de BCAS2 sobre la transición epitelio mesénquima y la invasión de células de cáncer de mama.
- Establecer el efecto de la sobreexpresión de HER2 endógeno sobre la actividad de BCAS2 en células de cáncer de mama.
- Precisar el efecto de la vía de señalización de PI3K/AKT sobre la fosforilación de BCAS2 en células de cáncer de mama.

Células de cáncer de mama

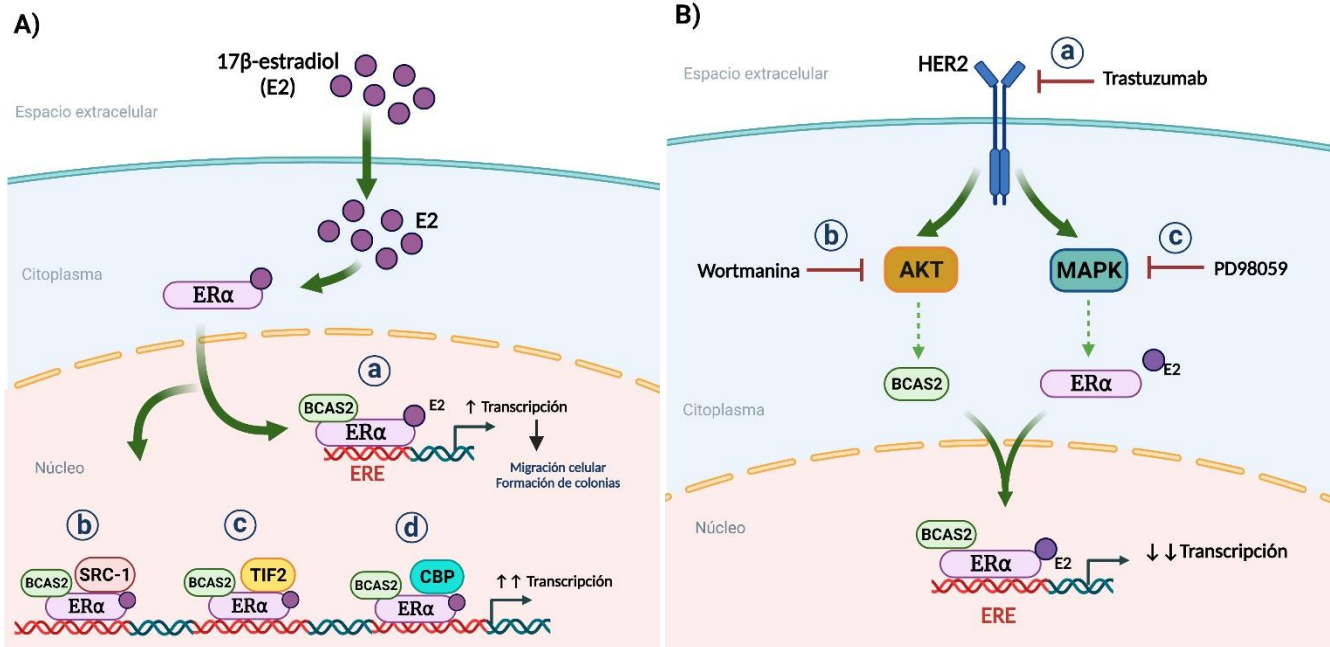


Figura 16. Modelo de la actividad de BCAS2 como coactivador del receptor de estrógenos α en células de cáncer de mama. A) BCAS2 es un coactivador del receptor de estrógenos α que colabora con los coactivadores SRC-1, CBP y TIF2 de dicho receptor en presencia de estradiol (b-d) y promueve procesos como la migración y formación de colonias en células de cáncer de mama (a). B) El bloqueo de las vías de señalización de HER2, MAPK y AKT/PI3K disminuyen la actividad transcripcional mediada por el complejo de $ER\alpha$ con su coactivador BCAS2 (a-c), sin embargo, el efecto de la inhibición de la vía de las MAPK se observa mayoritariamente sobre $ER\alpha$ (c), mientras que la inhibición de la vía de AKT, solo inhibe el incremento en transcripción mediado por BCAS2 (b), sugiriendo un efecto sobre este coactivador.

Referencias

- * Abdelwahab Y., Ali J. (2017). Male Breast Cancer: Epidemiology and Risk Factors, Seminars in Oncology.
- * Anderson W., Chatterjee N., Ershler W., Brawley O. (2002) Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res. Treat.* 76, 27-36.
- * AlFakeeh A., Brezden C. (2018). Overcoming endocrine resistance in hormone receptor–positive breast cancer. *Current Oncology*, Vol. 25, Supp. 1
- * Ali S., Rasool M., Chaoudhry H., Pushparaj PN., Jha P., et al. (2016). Molecular mechanism and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation* 12(3): 135-139.
- * Allison K. (2012). Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. *Am J Clin Pathol*; 138 (6): 770e780.
- * Ajj H., Chesnel A., Pinel S., Plenat F., Flament S., Dumond H. (2013). An alkylphenol mix promotes seminoma derived cell proliferation through an ERalpha36-mediated mechanism. *PLoS One.* 8(4): e61758.
- * Antoniou A., Pharoah PD., Narod S., et al. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*; 72: 1117-1130.
- * Aranda A., Pascual A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 81(3): 1269–1304.
- * Arao Y., Korach KS. (2018). The F domain of estrogen receptor alpha is involved in species-specific, tamoxifen mediated transactivation. *J Biol Chem*; 293(22): 8495–8507.
- * Arpino G., Green SJ., Allred D., Lew D., Martino S., Osborne C., Elledge R. (2004). HER-2 amplification, HER-1 expression and tamoxifen response in

estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: A southwest oncology group study. *Clin. Cancer Res.*, 10, 5670–5676.

- * Ban K., Godellas C. (2014). Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 23: 409-422.
- * Barnett G., Shah M., Redman K., Easton D., Ponder B., Pharoah P. (2008). Risk factors for the incidence of breast cancer: do they affect survival from the disease. *J ClinOncol*, 26, 3310-6.
- * Benz C., Scott G., Sarup J., Johnson R., Tripathy D., Coronado E., Shepard H., Osborne C. (1992). Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res. Treat.*, 24, 85–95.
- * Beral V. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*; 362: 419-427.
- * Bjornstrom L, Sjoberg M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and non-genomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.*19:833-42.
- * Brisken C., O' Malley B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2
- * Chen W., Rosner B., Hankinson S., Colditz G., Willett W. (2011). Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA* 306, 1884.
- * Cignarella A., Kratz M., Bolego C. (2010). Emerging role of estrogen in the control of cardiometabolic disease. *Trends in Pharmacological Sciences.* Vol.31 No.4
- * Colditz G., Kaphingst K., Hankinson S., Rosner B. (2012). Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast Cancer Res Treat*; 133 (3):1097e1104.
- * Dall G., Britt K. (2017). Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Front Oncol*; 7: 110.

- * Danaei G., Vander Hoorn S., Lopez A., Murray C., Ezzati, M. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 366, 1784–1793.
- * Dotzlaw H., Moehren U., Mink S., Cato A., Lluhi J., Baniahmad A. (2002). The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. *Mol Endocrinol* 16: 661–673
- * Feng Y., Spezia M., Huang S., Yuan C., et al. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes and diseases* 5, 77-106
- * Filardo E., Thomas P. (2012). Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology*. 153(7):2953-62.
- * Fleming F., Myers E., Kelly G., et al. (2004). Expression of SRC- 1, AIB1 and PEA3 in HER2 mediated endocrine resistant breast cancer; a predictive role for SRC-1. *J Clin Pathol*; 57:1069–74.
- * Forbes J., Cuzick J., Buzdar A., Howell A., Tobias J., Baum M. (2008) Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*. 9, 45-53.
- * Francken A., Schouten P., Bleiker E., et al. (2013). Breast cancer in women at high risk: the role of rapid genetic testing for BRCA1 and -2 mutations and the consequences for treatment strategies. *Breast*; 22: 561-568.
- * Fuentes N., Silveyra P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 116: 135–170.
- * Gaughan E., Come S. (2012). Optimizing endocrine therapy for metastatic breast cancer. *Curr Breast Cancer Rep*; 4:30–8.
- * Germain D. (2011). Estrogen Carcinogenesis in breast cancer. *Endocrinol Metab Clin N Am* 40, 473-484.

- * Gibson D., Saunders P. (2012). Estrogen dependent signaling in reproductive tissues—a role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Mol Cell Endocrinol*;348(2):361–372.
- * Girault I., Bieche I., Lidereau R. (2006). Role of estrogen receptor α transcriptional coregulators in tamoxifén resistance in breast cancer. *Maturitas*, 54 342-351.
- * Gnerlich J., Deshpande A., Jeffe D., et al. (2011). Poorer survival outcomes for male breast cancer compared with female breast cancer may be attributable to in-stage migration. *Ann Surg Oncol*; 18: 1837-1844.
- * Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D, Claessens F. (2012). Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol Cell Endocrinol*; 348(2):411–417.
- * Hernández-Silva C., Villegas-Pineda J., Pereira-Suárez A. (2020). Expression and Role of the G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPR30/GPER) in the Development and Immune Response in Female Reproductive. *Cancers. Front. Endocrinol.* 11:544. doi: 10.3389/fendo.2020.00544
- * Hewitt S., Winuthayanon W., Korach K. (2016) What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. *J Mol Endocrinol*; 56(2): R55–R71.
- * Hong H., Kohli K., Garabedian M., Stallcup M. (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol* 17: 2735–2744.
- * Horn J., and Vatten L. (2017). Reproductive and hormonal risk factors of breast cancer: a historical perspective. *International journal of women's health*; 9: 265-272.
- * Huebner R., Ewald A. (2014). Cellular foundations of mammary tubulogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 31:124e131.
- * Jepsen K., Hermanson O., Onami T., Gleiberman A., Lunnyak V., McEvilly R., Kurokawa R., Kumar V., Liu F., Seto E., Hedrick S., Mandel G., Glass C.,

- Rose D., Rosenfeld MG. (2000). Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* 102:753–763
- * Jonat W., Bachelot T., Ruhstaller T., Kuss I., Reimann U., Robertson J. (2013). Randomized phase ii study of Ionaprisan as second-line therapy for progesterone receptor–positive breast cancer. *Ann Oncol*; 24:2543–8.
 - * Key T., Appleby P. (2013). Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol*; 14: 1009-1019.
 - * Kirkegaard T., Witton C., McGlynn L., et al. (2005). AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol*; 207:139–46.
 - * Kobayashi Y., Kitamoto T., Masuhiro Y., Watanabe M., Kase T., Metzger D., Yanagisawa J., Kato S. (2000). p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J Biol Chem* 275: 15645–15651.
 - * Kumar R., McEwan I. (2012). Allosteric modulators of steroid hormone receptors: structural dynamics and gene regulation. *Endocr Rev*; 33 (2):271–299.
 - * Kuo P., Tsao Y., Chang H., Chen P., Huang C., Lin S., Weng Y., Tsai T., Shieh S., Chen S. (2009). Breast Cancer Amplified Sequence 2, a Novel Negative Regulator of the p53 Tumor Suppressor. *Cancer Res*; 69: (23).
 - * Kuo P., Huang C., Lee C., Chang H., Hsieh S., Chung Y., Lee M., Huang C., Tsao L., Tsao Y., Chen S. (2015). BCAS2 promotes prostate cancer cells proliferation by enhancing AR mRNA transcription and protein stability. *British Journal of Cancer*. 112, 391–402
 - * Kurokawa H., Lenferink A., Simpson J., Pisacane P., Sliwkowski M., Forbes J., Arteaga C. (2000). Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-over-expressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.*, 60, 5887–5894.

- * Le Romancer M., Poulard C., Cohen P., Sentis S., Renoir J., Corbo L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev*; 32(5):597–622.
- * Lee M., Leung Y., Chung I., Tarapore P., Ho S. (2013). Estrogen Receptor β (ER β) Transactivation Is Differentially Modulated by the Transcriptional Coregulator Tip60 in a cis-Acting Element-dependent Manner. *J. Biol. Chem.*, 288, 25038–25052.
- * Liu J., Chen T., Hwang S. (2016). The Risk of Breast Cancer in Women Using Menopausal Hormone Replacement Therapy in Taiwan. *International journal of environmental research and public health*; 13: 482.
- * Lodish H., Berk A., Kaiser C., Krieger M., Scott M., Bretscher A., et al. (2008). *Molecular cell biology*. 6th ed. New York: W.H. Freeman and Company.
- * Lonard D., O'malley B. (2007). Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol Cell* 27: 691–700.
- * Love R., Philips J. (2002) Oophorectomy for breast cancer: history revisited. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1433-1434.
- * Maass N., Rösel F., Schem C., Hitomi J., Jonat W., Nagasaki K. (2002). Amplification of the BCAS2 gene at chromosome 1p13.3-21 in human primary breast cancer. *Cancer letters* 185, 219-223.
- * Macias H., Hinck L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.*1(4):533e557
- * Makarem N., Chandran U., Bandera E., et al. (2013). Dietary fat in breast cancer survival. *Annu Rev Nutr*; 33: 319-348.
- * Manavathi B., Samanthapudi V., Reddy G. (2014). Estrogen receptor coregulators and pioneer factors: the orchestrators of mammary gland cell fate and development. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2, Article 34
- * McKenna N., O'Malley B. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108: 465–474.

- * McEwan I. (2016). The nuclear receptor superfamily at thirty. *Methods Mol Biol*; 1443:3–9.
- * Métivier R., Penot G., Flouriot G., Pakdel F. (2001). Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 α -helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol Endocrinol* 15: 1953–1970.
- * Mouridse H., Giobbie-Hurder A., Goldhirsch A., Thürlimann B., Paridaens R., Smith I., Mauriac L., Forbes J. F., Price K. N., Regan M. M., Gelber R. D., Coates A. S.; BIG 1-98 Collaborative Group. (2009) Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 766-776.
- * Nagalingam A., Tighiouart M., Ryden L., Joseph L., Landberg G., Saxena N., Sharma D. (2012). Med1 plays a critical role in the development of tamoxifen resistance. *Carcinogenesis*, 33, 918–930.
- * Nagasaki K., Maass N., Manabe T., Hanzawa H., Tsukada T., Kikuchi K., Yamaguchi K. (1999). Identification of a novel gene, DAM1, amplified at chromosome 1p13.3-21 region in human breast cancer cell lines. *Cancer Letters* 140. 219-226.
- * Nilsson S., Makela S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., et al. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*;81:1535-65.
- * Oh D., Bang Y. (2020). HER2 -targeted therapies- a role beyond breast cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*.
- * Onate S., Boonyaratanakornkit V., Spencer T., Tsai S., Tsai M., Edwards D., O'Malley B. (1998). The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 273: 12101–12108.
- * Osborne C., Bardou V., Hopp T., Chamness G. Hilsenbeck S., Fuqua S., Wong J., Allred D., Clark G., Schiff R. (2003). Role of the estrogen receptor

- coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst*, 95, 353–361.
- * Osborne C., Schiff R. (2003). Growth factor receptor cross-talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast*; 12:362–7.
 - * Osborne C., Shou J., Massarweh S., Schiff R. (2005). Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11, 865s–870s.
 - * O'Malley B. (2006). Little Molecules with Big Goals *Molecular Biology Science* 22 September 2006: Vol. 313 no. 5794 pp. 1749-1750 DOI: 10.1126/science.1132509
 - * O'Malley B. (2007). Coregulators: From Whence Came These “Master Genes” *Molecular Endocrinology* 21(5):1009–1013.
 - * Pellacani D., Tan S., Lefort S., Eaves C. (2019). Transcriptional regulation of normal human mammary cell heterogeneity and its perturbation in breast cancer. *The EMBO Journal*. 38: e 100330
 - * Polyak K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*; 117 (11):3155e3163.
 - * Qi C., Zhu Y., Chang J., Yeldandi A., Rao M., Zhu Y. (2005). Potentiation of estrogen receptor transcriptional activity by breast cancer amplified sequence 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328, 393–398.
 - * Qin L., Chen X., Wu Y., Feng Z., He T., Wang L., Liao L., Xu J. (2011). Steroid receptor coactivator-1 upregulates Integrin α 5 expression to promote breast cancer cell adhesion and migration. *Cancer Res.*, 71, 1742–1751.
 - * Qin L., Liu Z., Chen H., Xu J. (2009). The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer Res.*, 69, 3819–3827
 - * Redmond A., Byrne C., Bane F., Brown G., Tibbitts P., O'Brien K., Hill A., Carroll J., Young L. (2015). Genomic interaction between ER and HMGB2

identifies DDX18 as a novel driver of endocrine resistance in breast cancer cells. *Oncogene*, 34, 3871–3880.

- * Salmerón-Hernández A., Noriega-Reyes Y., Jordan A., Baranda-Avila N., Langley E. (2019). BCAS2 Enhances Carcinogenic Effects of Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 966
- * Santer F., Höschele P., OH S., Erb H., Bouchal J., Cavarretta I., Parson W., Meyers D., Cole P., Culig Z. (2011). Inhibition of the Acetyltransferases p300 and CBP Reveals a Targetable Function for p300 in the Survival and Invasion Pathways of Prostate Cancer Cell Lines. *Mol. Cancer Ther.* 10, 1644–1655.
- * Schiff R., Massarweh S., Shou J., Osborne C. (2003). Breast cancer endocrine resistance: How growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin. Cancer Res.* 9, 447S–454S.
- * Schulz M., Eggert M., Baniahmad A., Dostert A., Heinzel T., Renkawitz R. (2002). RU486-induced glucocorticoid receptor agonism is controlled by the receptor N terminus and by corepressor binding. *J Biol Chem* 277:26238–26243
- * Sengupta D., Bhargava D., Dixit A., Sahoo B., Biswas S., Biswas G., Mishra S. (2014). ERR β signalling through FST and BCAS2 inhibits cellular proliferation in breast cancer cells. *British Journal of Cancer.* 110, 2144–2158
- * Sentis S., Le Romancer M., Bianchin C., Rostan M., Corbo L. (2005). Sumoylation of the estrogen receptor a hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol*; 19 (11):2671–2684.
- * Shin I., Miller Todd., Arteaga C. (2006). ErbB Receptor Signaling and Therapeutic Resistance to Aromatase Inhibitors. *Clin Cancer Res*; 12: 1008s-1012s.
- * Shou J., Massarweh S., Osborne C., Wakeling A.E., Ali S., Weiss H., Schiff R. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 96, 926–935

- * Smith C., O'malley B. (2004). Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators. *Endocrine Reviews* 25(1):45–71
- * Speirs V., Shaaban A. (2009). The rising incidence of male breast cancer. *Breast Cancer Res Treatment*; 115: 429-430.
- * Stang A., Thomssen C. (2008). Decline in breast cancer incidence in the United States: what about male breast cancer? *Breast Cancer Res Treatment*; 112: 595-596.
- * Sung H., Ferlay J., et al. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN*; 0:1–41
- * Takimoto G., Graham J., Jackson T., et al. (1999) Tamoxifen resistant breast cancer: coregulators determine the direction of transcription by antagonist-occupied steroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 69:45–50.
- * Tharmapalan P., Mahendralingam M., Berman H., Khokha R. (2019). Mammary stem cells and progenitors: targeting the roots of breast cancer for prevention. *The EMBO Journal* 38: e 100852
- * Tzukerman M., Esty A., Santiso-Mere D., Danielian P., Parker M., Stein R., Pike J., McDonnell D. (1994). Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol. Endocrinol.*, 8, 21–30.
- * Valko-Rokytovská M., O'cenáš P., Salayová A., Kostecká Z. (2021) Breast Cancer: Targeting of Steroid Hormones in Cancerogenesis and Diagnostics. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5878.
- * Veronesi U., Boyle P., Goldhirsch A., Orecchia R., Viale G. (2005). Breast cancer. *Lancet*; 365 (9472):1727e1741.
- * Voegel J., Heine M., Zechel C., Chambon P., Gronemeyer H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J* 15: 3667–3675.

- * Vrtačnik P., Ostanek B., Mencej-Bedrač S., Marc J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochemia Medica*. 24(3):329–42
- * Walsh C., Qin L., Tien J., Young L., Xu J. (2012). The function of steroid receptor coactivator-1 in normal tissues and cancer. *Int. J. Biol. Sci.*, 8, 470–485.
- * Waks A., Winer E. (2019). Breast cancer treatment. *JAMA. Clinical Review & Education*. January 22, volume 321, Number 3.
- * Wang C., Fu M., Angeletti R., Siconolfi-Baez L., Reutens A., Albanese C., Lisanti M., Katzenellenbogen B., Kato S., Hopp T., Fuqua SAW., Lopez G., Kushner P., Pestell R. (2001). Direct acetylation of the estrogen receptor a hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem.*;276(21): 18375–18383.
- * Washbrook E. (2006). Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Health Medicine*; 3: 8-14.
- * Winslow T. (2012). Medical and scientific illustration. Disponible en: <https://www.teresewinslow.com/#/breast/>
- * Worsham M., Pals G., Schouten J., Miller F., Tiwari N., Van S., Wolman S.R. (2006). High-resolution mapping of molecular events associated with immortalization, transformation and progression to breast cancer in the MCF10 model. *Breast Cancer Res. Treat.*, 96, 177–186.
- * York B., O'Malley B. (2010). Steroid receptor coactivator (SRC) family: masters of systems biology. *J Biol Chem* 285: 38743–38750.
- * Yue W., Wang J., Li Y., et al. (2010). Effects of estrogen on breast cancer development: role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int J Cancer*. October 15; 127(8): 1748-1757
- * Zhao W., Zhang Q., Kang X., Jin S., Lou C. (2009). AIB1 is required for the acquisition of epithelial growth factor receptor-mediated tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380, 699–704.



Article

BCAS2 Enhances Carcinogenic Effects of Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer Cells

Ángel Salmerón-Hernández ^{1,2}, María Yamilet Noriega-Reyes ^{1,2}, Albert Jordan ³,
Noemi Baranda-Avila ¹ and Elizabeth Langley ^{1,*}

¹ Departamento de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, 14080 Mexico City, Mexico; angel.salher@yahoo.com.mx (A.S.-H.); yamilet_noriega@hotmail.com (M.Y.N.-R.); mimi19481@yahoo.com.mx (N.B.-A.)

² Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

³ Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC) Parc Científic de Barcelona, Barcelona, 08028 Catalunya, Spain; ajvbm@ibmb.csic.es

* Correspondence: langleyemx@gmail.com; Tel.: +(55)-5628-0400 (ext. 32075)

Received: 17 January 2019; Accepted: 21 February 2019; Published: 22 February 2019



Abstract: Estrogen receptor alpha (ER α) has an established role in breast cancer biology. Transcriptional activation by ER α is a multistep process modulated by coactivator and corepressor proteins. Breast Cancer Amplified Sequence 2 (BCAS2), is a poorly studied ER α coactivator. In this work, we characterize some of the mechanisms through which this protein increases ER α activity and how this promotes carcinogenic processes in breast cancer cells. Using protein-protein interaction and luciferase assays we show that BCAS2 interacts with ER α both in vitro and in vivo and upregulates transcriptional activation of ER α directly through its N-terminal region (AF-1) and indirectly through its C-terminal (AF-2) region, acting in concert with AF-2 interacting coactivators. Elevated expression of BCAS2 positively affects proliferation, clonogenicity and migration of breast cancer cells and directly activates ER α regulated genes which have been shown to play a role in tumor growth and progression. Finally, we used signal transduction pathway inhibitors to elucidate how BCAS2 is regulated in these cells and observed that BCAS2 is preferentially regulated by the PI3K/AKT signaling pathway. BCAS2 is an AF-1 coactivator of ER α whose overexpression promotes carcinogenic processes, suggesting an important role in the development of estrogen-receptor positive breast cancer.

Keywords: estrogen receptor; breast cancer; BCAS2; coactivators

1. Introduction

ER α is the primary therapeutic target in breast cancer and is expressed in close to 70% of cases. These tumors can respond to endocrine therapy and be growth inhibited by pharmacologic blockade of estrogen production or ER. The selective ER modulator, Tamoxifen (TAM), is the most widely used hormonal therapy. However, prolonged treatment often derives in endocrine resistance and tumor recurrence [1], through mechanisms which have not been completely elucidated. Some of these mechanisms include ER α loss or mutations, changes in coregulatory proteins, increased cross-talk with other signal transduction pathways resulting in aberrant or ligand independent activation of ER or its coregulators and alternative downstream signaling pathways activating different gene expression programs [2–6]. The transcriptional activity of ER α is dependent on several coregulatory proteins called coactivators and corepressors [7,8]. Coactivators do not usually bind DNA directly but are recruited to target gene promoters through protein-protein interactions with nuclear receptors (NRs). Thus, Ligand binding promotes the formation of multiprotein complexes containing the nuclear

receptor (NR), coactivators and basal transcription factors acting in concert to activate transcription [8]. Structural analysis of coactivators has identified a five amino acid (aa) motif, LXXLL (where X is any amino acid), which is sufficient to mediate coregulator binding to the liganded NRs at their AF-2 domain [9]. However, a number of coactivators have recently been discovered that bind to the N-terminus of NRs and activate the AF-1 transcriptional activation function. In general, coactivators increase transcriptional activity through chromatin remodeling, histone acetylation or methylation, as well as recruitment of other coregulators and of the basal transcriptional machinery [10,11]. In contrast, corepressors associate with histone deacetylases to repress transcription and promote a closed chromatin configuration [12]. Besides modulating chromatin structure to activate or repress transcription, coactivators and corepressors can have many other functions including control of splicing and protein degradation through ubiquitination. [13]. Additionally, expression of different coregulators has been implicated in differential tissue and cell type-specific responses to various hormones; however, more research is required to fully understand these mechanisms.

Using a yeast two-hybrid assay, we detected BCAS2 as an ER α binding protein, interacting with its N-terminal domain. BCAS2 was previously determined to be a coactivator protein that increases ER α transcriptional activity through its AF-2 domain [14] and has been found to associate with the tumor suppressor p53 protein [15]. In this work, we identified BCAS2 as a protein that interacts with ER α both in vitro and in vivo and regulates the transcriptional activation of ER α through its N-terminal region (AF-1) and indirectly via the C-terminal (AF-2) region. The enhanced expression of BCAS2 in human mammary cancer cell lines increases their proliferation, migration and colony formation. Furthermore, it regulates the expression of genes that have a role in breast cancer tumorigenesis. This suggests that BCAS2 regulates AF-1 activity on the ER α N-terminus and may play a role in regulating estrogen dependent growth in breast cancer.

2. Results

2.1. BCAS2 Interacts Directly with the N-Terminal Region of ER α

Using the yeast two-hybrid system to identify proteins that interact with the N-terminal domain of ER α (aa 1-180), we obtained several sequences that encode for proteins that interact with this region, including BCAS2. To verify this interaction and the involvement of the different domains in BCAS2 binding, we performed pull-down assays in vitro using full-length ER α (Full) as well as its N- and C-terminal domains separately, fused to GST (Figure 1A). Assays were carried out in the presence and absence of E2 and interaction was tested with in vitro labeled BCAS2. We observed that BCAS2 interacts with full-length ER α , both in the presence and absence of E2 and that this interaction takes place via the N-terminal domain of ER α and not through its C-terminal domain, even in the presence of ligand (Figure 1B). Additionally, we determined interaction with ER β and also found that BCAS2 interacts via its N-terminal region (data not shown). This supports our two-hybrid interaction assay but contrasts previous findings where BCAS2 was found to activate ER α only through its C-terminal domain [14].

Coimmunoprecipitation assays in both, transfected monkey kidney COS7 cells and breast cancer MCF7 cells, confirmed interaction between BCAS2 and ER α (Figure 1C,D) in the absence and presence of E2. Additionally, TAM treatment in MCF7 cells did not abrogate BCAS2 binding to ER α . Thus, indicating a fruitful in vivo interaction between these proteins and suggesting that BCAS2 plays a role in directly regulating ER α activity.

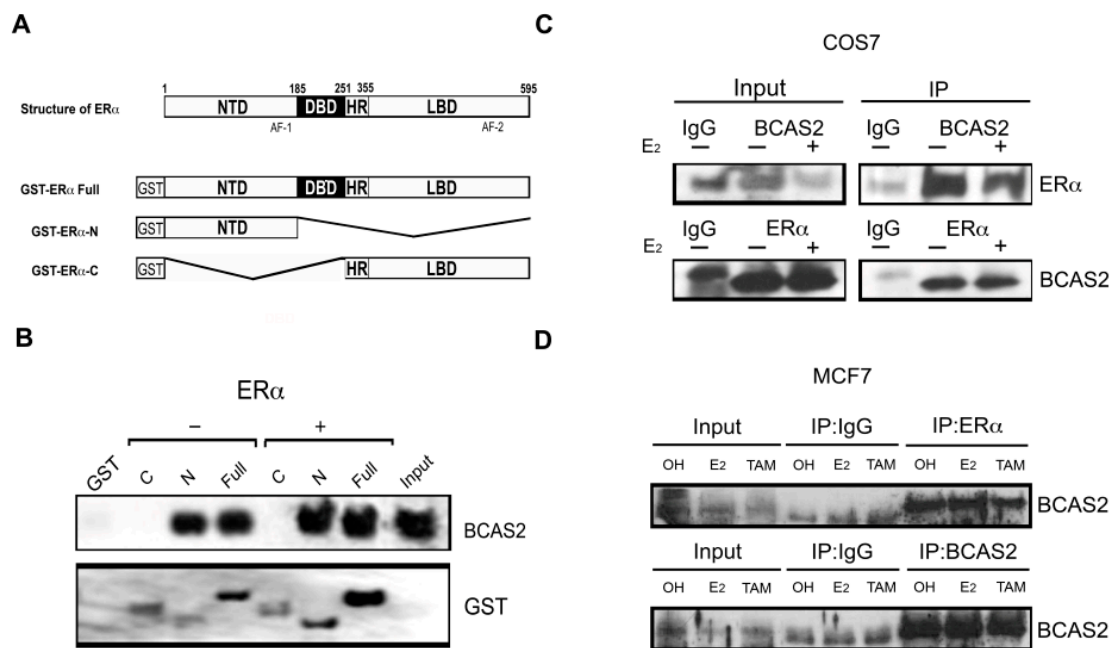


Figure 1. BCAS2 interacts with ER α in vivo and in vitro. **(A)** Structure of ER α and its N and C domains used for Glutathione sepharose affinity matrix assays. NTD, amino terminal domain; DBD, DNA binding domain; HR, hinge region; LBD, ligand binding domain. **(B)** GST pull-down assays of biotin labeled in vitro translated BCAS2 with GST alone, GST-ER α -Full (full-length aa 1-595), GST-ER α -N (aa 1-180) GST-ER α -C (aa 264-595). Western blot analysis was carried out using anti-biotin or anti-GST antibodies. Binding was assayed in the presence (+) or absence (–) of 100 nM E₂. **(C)** Coimmunoprecipitation of ER α and BCAS2. COS7 cells were transfected with plasmids expressing ER α and BCAS2 in the presence (+) or absence (–) of 10 nM E₂. Immunoprecipitation of whole cell protein extracts was carried out with antibodies against BCAS2 or ER α and IgG as negative control. Shown are immunoblots probed with antibodies against both proteins. **(D)** Coimmunoprecipitation assays in MCF7 cells in the presence of ethanol (OH), E₂ (10 nM) or TAM (100 nM) showing interaction in the presence or absence of ligand. Full blots can be found in supplementary Figure S1.

2.2. BCAS2 Enhances ER α Transcriptional Activity

It was previously shown that BCAS2 could increase ER α transcriptional activity in CV-1 monkey kidney cells [14]. Thus, we were interested in confirming whether BCAS2 could promote increased ER α transcriptional activity in breast cancer cells. Luciferase reporter gene assays showed that overexpression of BCAS2 is able to enhance ER α transcriptional activity to an extent similar or greater than that found for the SRC-1 coactivator in ER positive (MCF7) (Figure 2A) or ER negative (MDA-MB-231) breast cancer cell lines in the presence of E₂ (Figure 2B). Since ER α contains two transcriptional activation functions, which can act independently or cooperatively, we were interested in determining whether BCAS2 could activate both domains. Thus, transcriptional activity assays were performed using the AF-1 and AF-2 domains separately in HEPG2 cells, where it was previously shown that the AF-1 domain can promote independent transcriptional activity [16]. Results show that BCAS2 increases both AF-1 and AF-2 mediated transcriptional activity, in a dose dependent manner (Figure 2C,D). This compares with the activity of SRC-1, which also enhances both transcriptional activation functions [17].

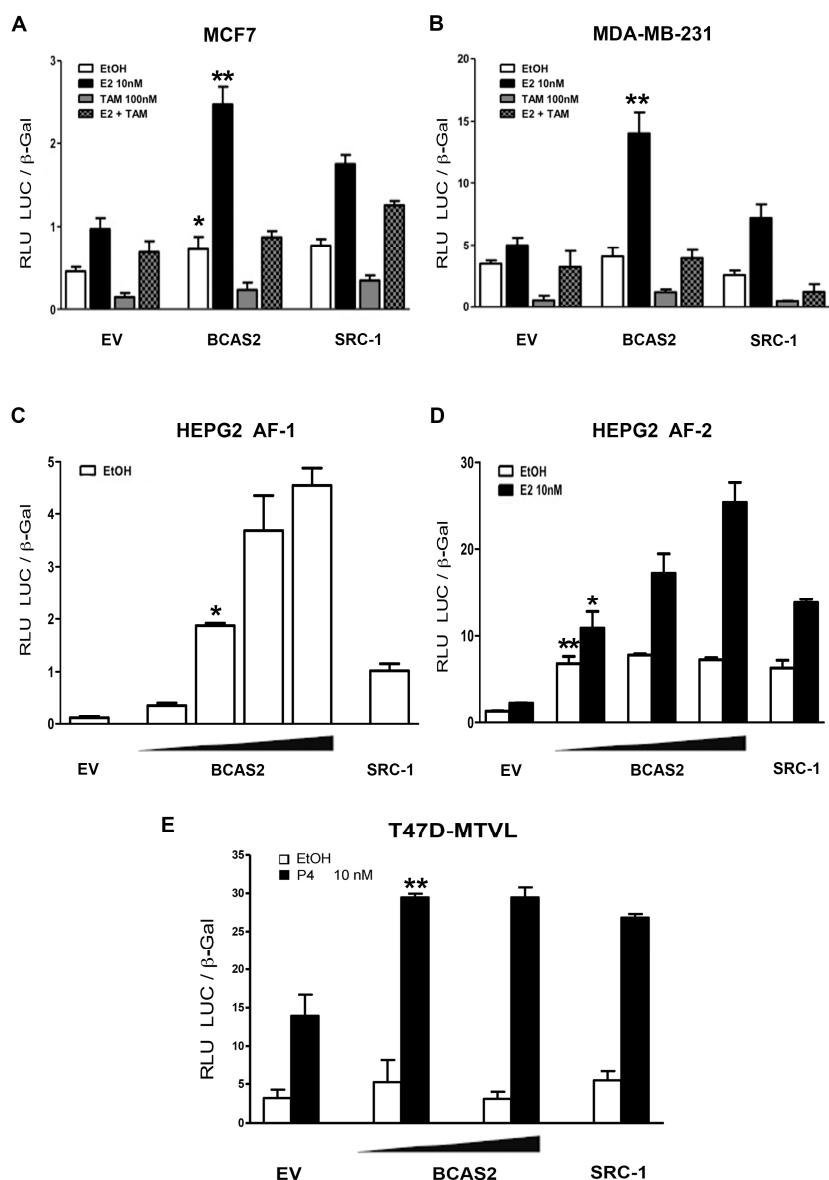


Figure 2. BCAS2 enhances ER α transcriptional activity. Luciferase activity induced by the overexpression of BCAS2 in the presence of ethanol (EtOH), 10 nM E2 or 100 nM TAM (A,B). MCF7 cells were transiently transfected with an ERE-luciferase reporter vector (200 ng) and BCAS2 (100 ng). Empty pcDNA3.1 vector (EV) (100 ng) and SRC-1 (100 ng) were transfected as negative and positive controls, respectively. (B) MDA-MB-231 cells were transfected with the same plasmids as well as 50 ng of ER α . (C,D) BCAS2 enhances AF-1 (aa 1-282) and AF-2 (aa 144-595) transcriptional activation functions, independently. Each plasmid was transfected into HEPG2 cells along with empty vector (EV) or increasing concentrations of BCAS2 (50-200 ng), ERE-luc and β -galactosidase in the presence or absence of 10 nM E2. Transfected SRC-1 coactivator is used as positive control for transcriptional activation. (E) BCAS2 activates PR transcriptional activity. Increasing concentrations of BCAS2 (100 and 200 ng), as well as β -galactosidase vector, were transfected into breast cancer T47D cells stably transfected with a luciferase reporter vector for PR activity and treated in the absence (EtOH) or presence of 10 nM P4. SRC-1 is used as positive control. Relative luciferase activity (RLU LUC/ β -gal) is shown as the mean \pm SE of a representative assay carried out in triplicate, at least three times. Statistical analysis is carried out by Student's t-test comparing activation between BCAS2 and empty vector (transfected at the same concentration) in the presence and absence of E2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

2.3. BCAS2 Has a Positive Effect on the Transcriptional Activity of PR

It is known that many coregulators can function on different SHRs. BCAS2 has previously been found to interact with PR *in vitro*, however, the effect of this interaction was not determined [14]. Therefore, we tested the effect of BCAS2 on the transcriptional activity of PR in a breast cancer cell line (T-47D-MTVL) harboring a PR-dependent luciferase reporter gene [18]. BCAS2 showed a positive effect on PR transcriptional activity in the presence of progesterone (P4) (Figure 2E). Furthermore, AR activity as determined by luciferase reporter assays is also increased by BCAS2 in prostate and breast cancer cells (data not shown and [19]). This suggests that BCAS2 is a coactivator that can be shared between steroid hormone receptors and activates important growth modulators in breast cancer cells.

2.4. BCAS2 Is Recruited to ER Target Gene Promoters and Increases Target Gene Expression

In order to determine whether BCAS2 is a bona fide coactivator, acting on estrogen responsive promoters, we carried out ChIP assays to determine whether ER α and BCAS2 could be tethered to the pS2 [20] and WISP2 [21], promoters after different times of induction with E2. We found BCAS2 is recruited to these promoters and that its presence on the promoter begins to show in as little as 30 min after exposure to E2 and increases over time (Figure 3A,B). Additionally, we used a marker of open chromatin, H3K4me3, which also shows enrichment after E2 treatment. Thus, we can conclude that BCAS2 is a true coactivator of ER α exerting its effect directly on E2 regulated promoters and that the length of exposure to E2 directly influences this interaction.

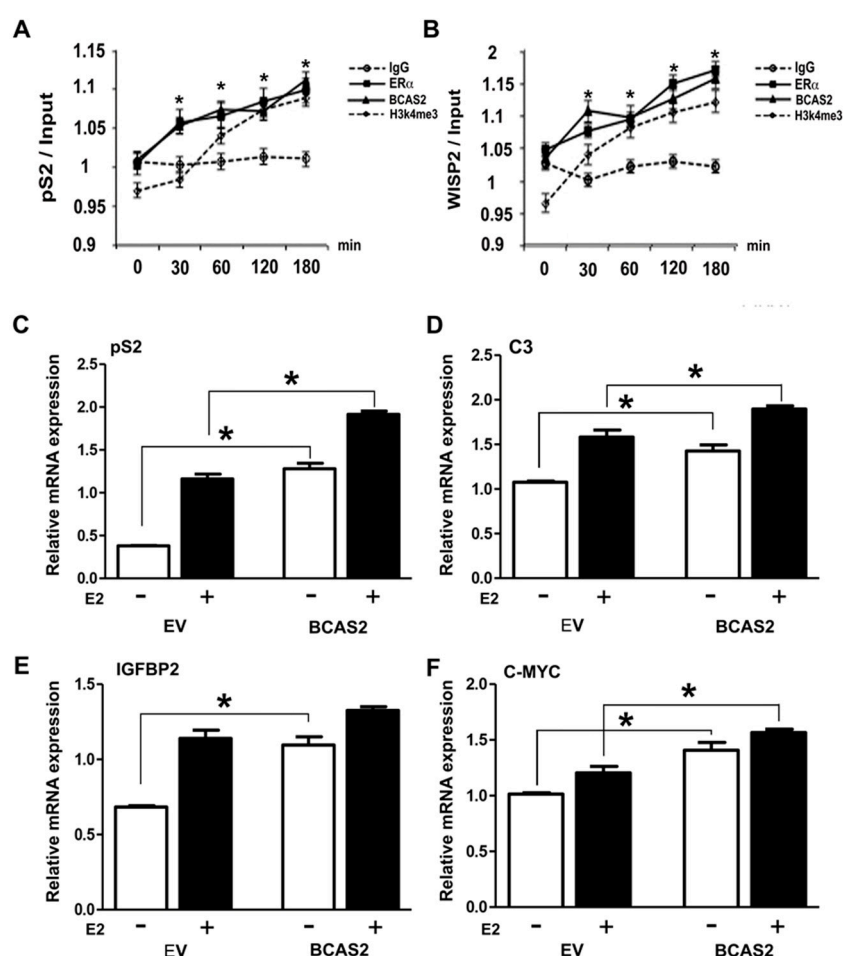


Figure 3. BCAS2 colocalizes with ER α on estrogen regulated promoters upon incubation with E2 and promotes increased estrogen-regulated gene expression. (A,B) Chromatin immunoprecipitation was

performed in MCF7 cells after different times of exposure to E2 (10 nM) treatment (30–180 min). Statistical analysis was carried out comparing ER or BCAS2 with IgG control using by one-way ANOVA, * $p < 0.001$. We carried out qRT-PCR of precipitated DNA showing endogenous ER α and BCAS2 localization at promoter regions of *pS2* and *WISP2* genes. Additionally, Histone 3 methylation (H3k4me3) is shown as a marker for open chromatin. (C–F) MCF7 cells transfected with pcDNA-BCAS2 or empty vector (EV) and incubated in the presence (+) or absence (–) of 10nM E2 for 24h. RTqPCR was used to determine mRNA expression of *pS2*, *C3*, insulin-like growth factor binding protein 2 (*IGFBP2*) and *C-MYC* and the results were normalized against human GAPDH mRNA amplification. * $p < 0.05$ compared to the EV group at 24 h in the absence (–) or presence of E2, as indicated in the figure.

We then used RT-PCR to observe transcription of a number of ER regulated genes in MCF7 cells. Overexpression of BCAS2, both in the absence and presence of E2, affects the expression of some genes containing response elements for ER receptors, as shown in Figure 3C–F. We see an increase in mRNA expression for the *pS2*, *C3*, *IGFBP2* and *C-MYC* genes, suggesting BCAS2 can activate a subset of genes depending on the promoter context.

2.5. BCAS2 Acts Together with Other Coactivators to Enhance ER α Activity

In order to delve further into the molecular mechanisms of the BCAS2 coactivator on ER α transcriptional activation, we evaluated whether BCAS2 was capable of affecting the activity of other ER α coactivators preferentially recruited through the AF-2 domain. We tested SRC-1, TIF2 and CBP. All contain LxxLL motifs through which they bind to AF-2. We tested three different cancer cell lines, MCF7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells. All of our results show that when BCAS2 is combined with any of the three coactivators in the presence of E2, transcriptional activation is enhanced compared to BCAS2 or the coactivator alone (Figure 4A–C). Interestingly, in MCF7 cells (Figure 4A), the combination of BCAS2 with any of the three AF-2 coactivators, also consistently increases transcription in the presence of TAM, which is not observed in the ER $^-$ SK-BR-3 (Figure 4C) or in the MDA-MD-231 cell lines (Figure 4B). This suggests that BCAS2 may play a role in TAM resistance in an ER $^+$ cellular environment.

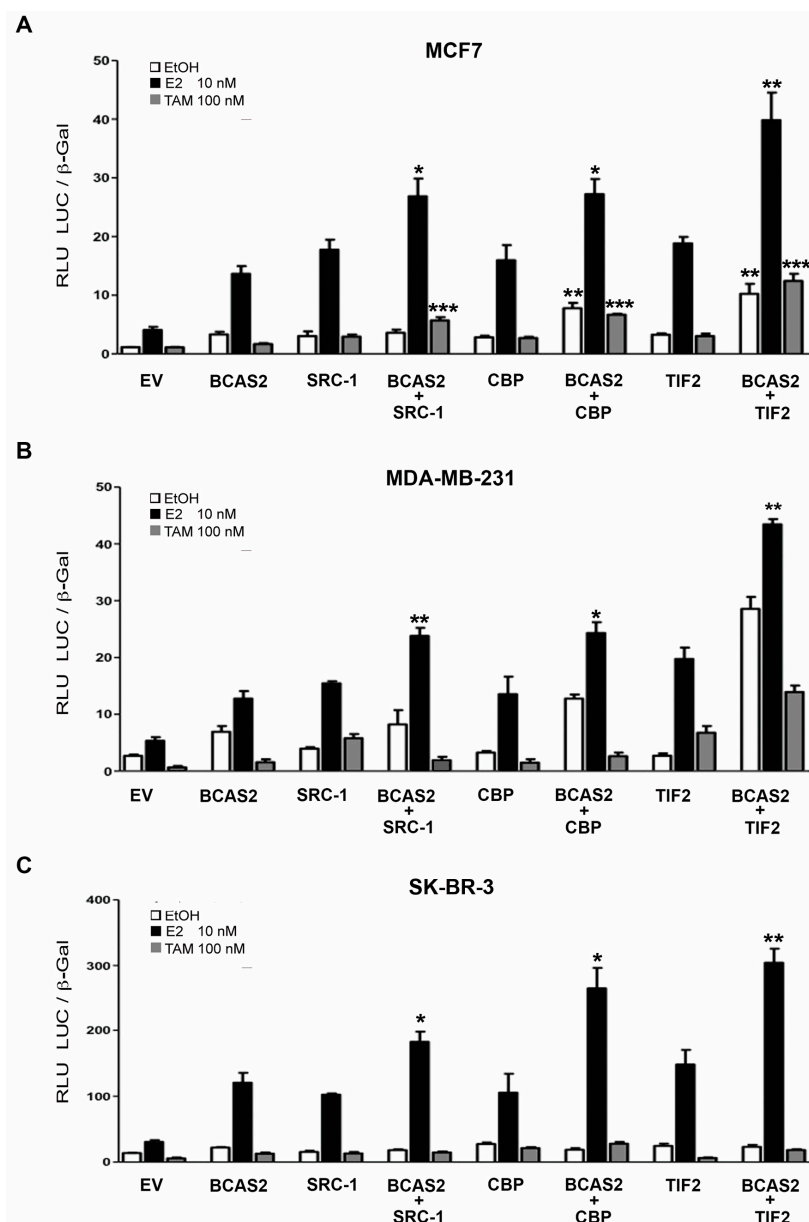


Figure 4. BCAS2 acts together with AF-2 coactivators to increase ER α activity. (A) Luciferase assays were carried out with pcDNA-BCAS2 or empty vector (EV), transfected with and without coactivators SRC-1, CBP or TIF2 and treated in the absence (EtOH) or presence of 10 nM of E2 or 100 nM of TAM in MCF7 cells. Similar assays were carried out in MDA-MB-231 (B) and SK-BR-3 (C) cells with the addition of transfected pSG5-ER. Statistical analysis was carried out using one-way ANOVA with Bonferroni posttest; * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

2.6. BCAS2 Promotes Cell Proliferation and Colony Formation in Breast Cancer Cells

In order to determine the effect that BCAS2 may have on breast cancer development, we used MCF7 breast cancer cells to determine its effect on proliferation and clonogenicity. Overexpression of BCAS2 caused a significant increase in estrogen dependent and independent cell proliferation (Figure 5A). Conversely, BCAS2 knockdown reduces cell viability in the presence of E2 compared to cells transfected with control shRNA (shE1) (Figure 5B).

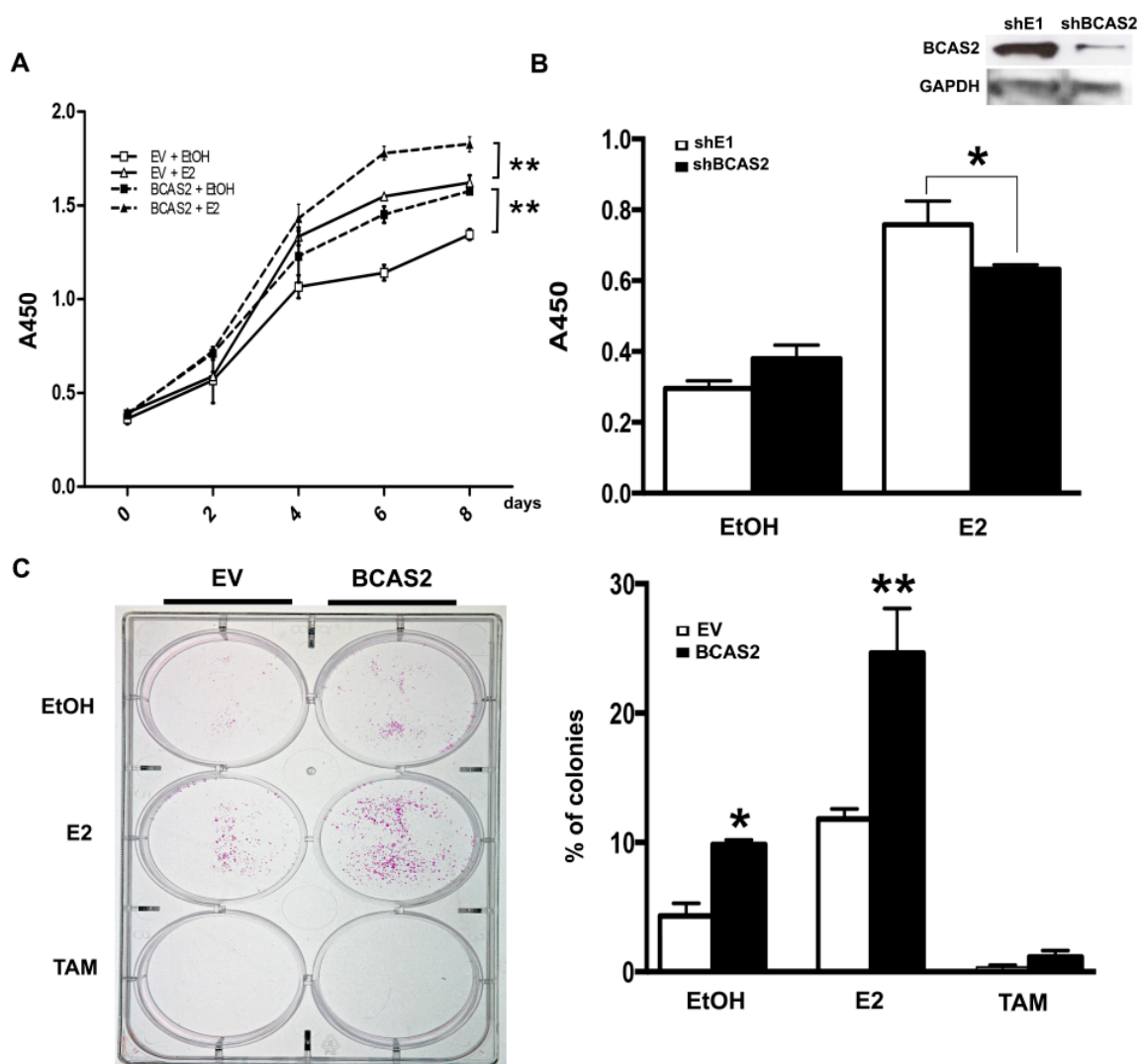


Figure 5. BCAS2 enhances breast cancer cell growth and colony formation. (A) Cell proliferation assays were carried out on MCF7 cells transfected with BCAS2 or empty vector (EV) and treated in the absence (EtOH) or presence of E2 for 8 days. Cell viability was assayed every 2 days, as described in materials and methods. BCAS2 overexpression caused a significant increase in proliferation both in the presence and absence of ligand (** $p < 0.001$) (B) Cell viability assays were carried out on MCF7 cells transfected with shBCAS2 or unrelated shE1 in the absence (EtOH) or presence of E2 and assayed after 96 h. Inhibition of BCAS2 caused a significant reduction in cell growth in the presence (* $p < 0.05$) of E2. (C) Colony formation of MCF7 cells transfected with BCAS2 or empty vector. 1000 transfected cells were plated per well and treated with E2 or TAM every 48 h for 12 days. Colonies were then stained and counted. Graphical representation of the number of colonies counted with respect to the number of cells plated is shown on right. Data represent three independent assays, * $p < 0.05$ compared to EV in the presence of EtOH and ** $p < 0.001$ compared to BCAS2 in the presence of EtOH.

We then carried out colony formation assays in MCF7 cells and observed a significant increase in clonogenicity upon BCAS2 overexpression and E2 treatment (Figure 5C).

2.7. BCAS2 Promotes Estradiol Dependent Cell Migration

We analyzed the role of BCAS2 in cellular migration using wound-healing assays. Our data shows greater migration of cells overexpressing BCAS2 as compared to those transfected with EV after 48 h of E2 treatment (Figure 6).

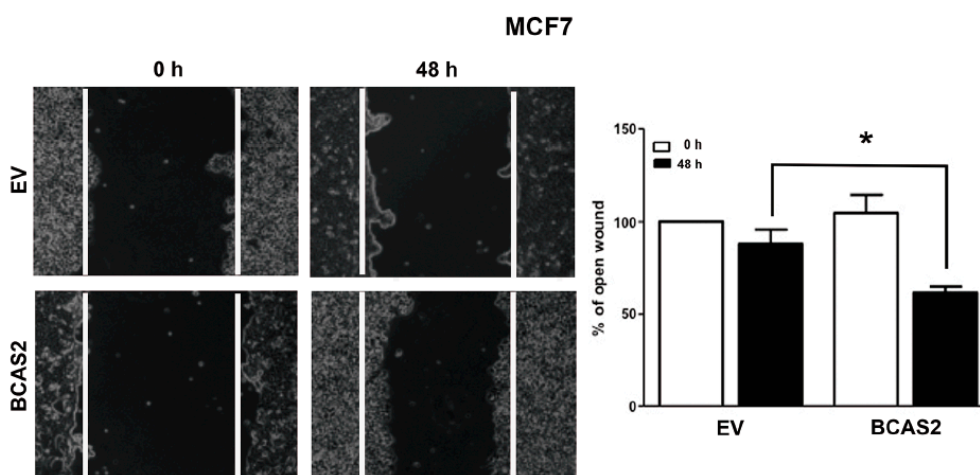


Figure 6. BCAS2 significantly increases cell migration. The effect of BCAS2 overexpression on MCF7 cell migration was determined using a wound healing assay. The wound healing rate of BCAS2 transfected cells was faster than empty vector (EV) in presence of E2. The open wound area at 0h was regarded as 100%. Values represent mean \pm SD of three replicates. * $p < 0.05$ compared to the EV group at 48 h of E2 treatment. 10 \times magnification.

2.8. Various Signal Transduction Pathways Are Involved in BCAS2 Activation

It is well known that there is cross-talk between MAP kinase and/or PI3K/AKT signal transduction pathways and ER α in breast cancer cells, which promotes an increase in estrogen-mediated signaling and favors recruitment of coactivators, such as SRC-1 and SRC-3 [22,23]. Additionally, activation of these pathways by HER2, has been highly implicated in breast cancer and is known to promote endocrine resistance [24,25]. Therefore, we were interested in determining whether these signal transduction pathways were capable of impacting BCAS2 activation of ER α . We carried out transcriptional activation studies comparing two breast cancer cell lines using HER2, MEK-1 and PI3K inhibitors. MCF7 is an ER α positive cell line with low HER2 expression, while SK-BR-3 is ER α negative and overexpresses HER2 and thus, ER α was transfected. Our results show that the HER2 inhibitor, trastuzumab, has little effect on inhibiting ER α activation in our system. However, it causes complete abrogation of the BCAS2 induced increase in transcriptional activity in the presence of E2 (Figure 7A,B). The MEK-1 inhibitor, PD98059, further downstream in the MAPK signaling pathway, causes a more marked decrease in activity, inhibiting both ER α activity alone and the BCAS2 induced increase (Figure 7C). This effect is much more evident in SK-BR-3 cells, where ER α activity is almost completely abrogated (Figure 7D). This supports previous findings showing that MEK activation increases ER signaling [22] and thus suggests that this effect is probably caused by inhibiting ER and not as a direct effect on BCAS2.

Conversely, blocking the PI3K/AKT (Wortmannin) signal transduction pathway shows little or no effect on ER α activity alone but shows an important effect on BCAS2 activity, inhibiting its ability to promote ER α transactivation (Figure 7E,F).

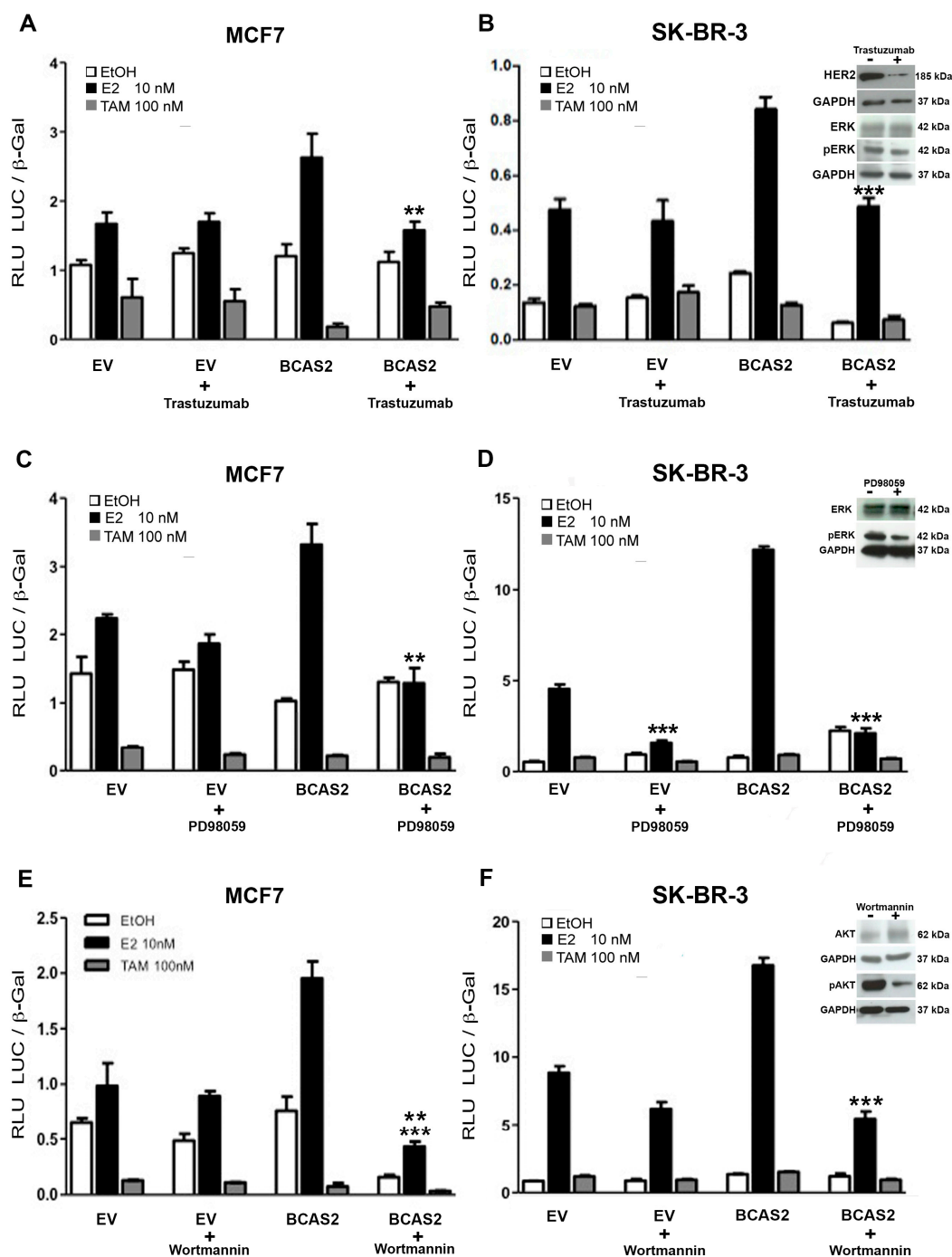


Figure 7. Signal transduction pathways involved in BCAS2 activation. (A, C and E) MCF7 cells were transiently transfected with an ERE-luciferase reporter vector (200 ng) and BCAS2 (100 ng) in the absence (EtOH) or presence of 10 nM E2 or 100 nM TAM along with 50 μ g of Trastuzumab or 10 mM of PD98059 or 100 nM of Wortmannin, as indicated, for 48h. Empty vector (EV) (100 ng) was used as negative control. (B, D and F) SK-BR-3 cells were transfected and treated in the same manner as MCF7 cells, except that 50 ng of pSG-ER α were also transfected. Relative luciferase activity (RLU LUC/ β -gal) is shown as the mean \pm SE of a representative assay carried out in triplicate, at least three times. Representative western blots show HER2 after 48 h of Trastuzumab treatment, ERK and ERK phosphorylation (pERK) after 48 h of Trastuzumab or PD98059 treatment, AKT and AKT phosphorylation (pAKT) after 48 h of Wortmannin treatment, each performed in triplicate or duplicate (Figure S2). GAPDH is used as control for protein loading. Statistical analysis was carried out using Student's *t*-test; ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

3. Discussion

The identification and characterization of coregulators that modulate ER α activity is a crucial step in understanding the mechanisms that control, not only the expression of estrogen regulated genes but also the initiation and progression of breast cancer. In this study, we have reinforced and enhanced our knowledge about the role of BCAS2 as an ER α coactivator and its regulation in breast cancer cells. BCAS2 had previously been proposed as an ER α coactivator and had been shown to increase its transcriptional activity [14]. However, this group proposed that this activity was carried out solely through the AF-2 transcriptional activation domain. In this study, we confirmed direct interaction with the N-terminal domain of ER α in vitro, without finding interaction via de C-terminal domain (Figure 1B). Additionally, interaction with full-length ER α was observed both in the presence and absence of E2 and TAM (Figure 1C). The fact that there is interaction of BCAS with ER α in the presence of TAM further supports binding to the AF-1 domain, as the conformational change caused to the LBD does not abrogate BCAS2 binding. However, since there have been many sites known to harbor post transcriptional modifications involved in ER α activation in both the hinge and the LBD regions [26], we cannot rule out that some post translational modification is necessary for BCAS2 binding to the AF-2 region and that by using an in vitro GST-pulldown assay we are unable to observe this interaction. Additionally, our construct is lacking a small portion of the hinge region, so this may be a possible binding site for BCAS2. In this respect, there are a number of coactivator proteins that bind the hinge region, such as calmodulin, which promotes ER α dimerization [27].

Luciferase assays, carried out in breast cancer cell lines, confirmed that BCAS2 increases ER α transcriptional activity (Figure 2A,B). However, we also determined that BCAS2 increases transcription through both the AF-1 domain and the AF-2 domain, independently (Figure 2C,D). This is in contrast to data published by Qi et al. [14], who did not observe AF-1 activation by BCAS2 in CV-1 cells. It is likely that this cellular context does not support independent activation through the AF-1 domain alone while in HEPG2 cells both AFs have been found to function independently [16]. Thus, combined with our protein interaction data, this suggests that the effect on the AF-1 domain was carried out through its direct interaction with ER α while the positive effect on the AF-2 domain may require interaction with other coactivators that can interact directly with AF-2. This supports the idea that BCAS2 may be involved in promoting synergism between the AF-1 and AF-2 transactivation functions, as has been suggested for SRC-1 [16]. Thus, we tested the effect of BCAS2 on the activity of three coactivators that preferentially bind to AF-2 through their LxxLL sequences, although it has been shown that they can also bind to the N-terminal domain. We observed that the combination of BCAS2 with SRC-1, TIF2 or CBP increases the transcriptional activity of ER α compared to any of these coactivators alone (Figure 4). This implies that BCAS2 does not compete with these coactivators for receptor binding. This has been observed with other coactivators such as Tip60, which synergizes with TIF2 to increase ER β transactivation [28]. Moreover, in MCF7 cells, the combination of BCAS2 with any of the coactivators tested, especially TIF2, also increases transcription in the presence of TAM and in some cases in the absence of ligand (Figure 4A). The combination of coactivators may be necessary to promote the agonist activity of TAM through AF-1, even though it abrogates their binding to AF-2. This is not consistently observed in the ER negative cell lines transfected with exogenous ER α (Figure 4C), suggesting that BCAS2 may play a role in TAM resistance in an ER+ cellular environment. Additionally, BCAS2 has been shown to be overexpressed in TAM resistant MCF7 cells and increased expression is associated to shorter relapse-free survival of breast cancer patients [29].

In order to ensure that BCAS2 is a bona fide coactivator, we demonstrated its existence on ER target promoter DNA and show that target gene expression is increased by BCAS2, at least for pS2, IGFBP2 and C3, both in the presence and absence of ligand (Figure 3).

It is well known that the activity or expression of many ER coactivators increases during breast carcinogenesis and progression. However, the role that BCAS2 may play in cancer has been poorly elucidated. A number of studies have shown that it is amplified or overexpressed in breast tumors [29–31] and have suggested that this could influence the development of endocrine resistance,

as has been observed for other coactivators [32–35]. Additionally, it has been found to be overexpressed in prostate cancer and to regulate the androgen receptor by increasing its mRNA expression and stabilizing AR protein [19]. Thus, we would expect that overexpression of BCAS2 can impact the physiologic environment of estrogen dependent breast cancer cells and be involved in carcinogenic processes. We studied the effect of overexpressing BCAS2 on cellular proliferation, clonogenicity and cell migration (Figures 5 and 6). In all cases we observed that overexpression of BCAS2 enhances all of these processes. Additionally, this is also observed in the absence of ligand. This supports a role for BCAS2 in the progression of breast cancer, both before and after endocrine resistance sets in. Studies on other coactivators, such as SRC-1 have also shown that they have a role in increasing cell migration and proliferation in breast cancer [36,37], as well as increasing the expression of Twist and promoting metastasis [38]. The coactivators, CBP and p300, have also been shown to have the capacity to promote cell migration by increasing expression of metalloproteinases 2 and 9 [39]. Thus, these coactivators have been proposed as markers for breast cancer aggressiveness and malignancy. Our data showing that BCAS2 can synergize with these coactivators, as well as promote carcinogenic processes, shows it has important implications in breast cancer. Further studies need to be carried out to determine whether BCAS2 binds directly to other coactivators and to define its target interaction sequence on ER α . Additionally, assays that block these interactions, for example by using synthetic peptides [40], would greatly help to dissect its functions in ER transactivation, metastatic processes and endocrine resistance. In this regard, BCAS2 expression has also been shown to be upregulated by Estrogen Related Receptor β (ERR β and both ER α and ER β in the absence of E2, however addition of ligand inhibited its expression [31]. This work also showed that increased BCAS2 led to expression of MMP7 and cleavage of E-cadherin, supporting a role for BCAS2 in epithelial-mesenchymal transition. Conversely, BCAS2 seems to be involved in downregulating β -catenin resulting in a decrease of the pro-apoptotic protein FST. However, the inhibition of β -catenin observed after BCAS2 overexpression also derives in cyclin D1 downregulation, suggesting that proliferation may be inhibited when ERR β is present.

It has been previously demonstrated that there is cross-talk between ER α and various signal transduction pathways, including HER2, which is capable of activating both the MAPK and PI3K/AKT pathways [41]. HER2 overexpression has been observed in 20–30% of patients with breast cancer and has been implicated in TAM resistance, both acquired and de novo [42,43]. Additionally, various clinical studies have also indicated that HER2 overexpression is associated with a lower response to TAM treatment. Moreover, ectopic expression of HER2 in MCF7 cells is sufficient to confer resistance to TAM in these cells [44]. In our results, we show that inhibition of the MAPK and PI3K/AKT result in inhibition of ER α activity. However, the targets seem to be different. On one hand, blocking MEK-1 activity almost completely abrogates ER α activity (Figure 7C,D). On the other hand, inhibition of PI3K only inhibits the increase in activity promoted by BCAS2, without strongly affecting intrinsic ER α activity (Figure 7E,F). This highlights the importance of these signal transduction pathways in ER α regulation and the progression of estrogen-regulated breast cancer. The reduction in BCAS2 activity can probably be explained by a reduction in phosphorylation of both the receptor, as previously reported [25,45] and BCAS2. However, the direct effect on BCAS2 must still be determined.

4. Materials and Methods

4.1. Yeast Two-Hybrid Screen

A yeast two-hybrid assay was carried out using the Matchmaker two-hybrid system 3 kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA), following manufacturer's instructions and as previously described [46]. Briefly, the N-terminal domain of ER α , amino acids (aa) 1–180, was used as bait to screen a human recurrent prostate carcinoma CWR-R1 cell line cDNA library. Positive clones were selected at high stringency in media lacking histidine, leucine, tryptophan and adenine, supplemented with 5 mM 3-Aminotriazole (3-AT) and X-Gal, to detect blue colonies. The resulting colonies were

assayed for β -galactosidase activity. cDNAs from galactosidase positive yeast colonies were sequenced and analyzed using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analysis. Full-length BCAS2 was recovered from the pACTII plasmid.

4.2. Cell Culture

All cell lines were obtained from ATCC (authenticated using STRS analysis) and tested for mycoplasma. Cell lines were cultured in media as suggested by ATCC, supplemented 5–10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin) and incubated at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere, for maintenance. The cell lines Hep-G2 and COS-7 were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Human breast cancer cell lines: MCF7, MDA-MB-231 and SK-BR-3, were cultured in EMEM with 0.01 mg/mL human recombinant insulin, Leibovitz's L-15 Medium and McCoy's 5a Medium, respectively. T-47D 3.17 (transfected to carry one stably integrated copy of a luciferase reporter gene driven by the MMTV promoter) [18] were cultured in RPMI 1640 with 0.2 units/mL bovine insulin. All media were supplemented with 5–10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin) incubated at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere, for maintenance. For studies with hormone treatments, phenol red-free media was used with charcoal-dextran treated serum (sFBS) to reduce the presence of hormones.

4.3. Plasmids

Full-length BCAS2, as obtained in the yeast two-hybrid screen, was amplified from pACTII-BCAS2 and cloned into pcDNA3.1/His (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to make pcDNA-BCAS2. All glutathione-S-transferase (GST) fusion constructs were generated in a pDEST15 vector, as previously described [42]. Estrogen and progesterone receptor vectors (pSG5-ER α and pSG5-PR) were donated by Dr. Pierre Chambon (INSERM, France). ER activation domain expression vectors, pER α -AF1 (aa 1-283) and pER α -AF2 (aa 144-595), as well as 3X-ERE-Luc were provided by Dr. Donald McDonnell (Duke University, USA) [17]. pSG5-SRC-1, pSG5-CBP and pSG5-TIF2 were obtained from Dr. Edwin Milgrom (INSERM, France).

4.4. Glutathione-S-Transferase (GST) Pull-Down Assays

GST fusion proteins: pGST-ER α Full (aa 1-595), pGST-ER α N (aa 1-180), pGST-ER α LBD (aa 264-595) were expressed in *E. coli* strain BL21, induced with 0.2% L-arabinose and purified with glutathione-Sepharose beads, according to manufacturer's instructions (GE Healthcare). Biotin labeling and in vitro translation of BCAS2 was performed using the TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Madison, WI, USA). 30 μ L of bound GST fusion proteins was incubated with 10 μ L of BCAS2 and incubated for 2 h in 500 μ L of sonication buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 0.7 mM EDTA, 0.05% Nonidet P-40, with protease inhibitors) in the presence or absence of 100 nM estradiol (E2). Beads were washed 5 times and eluted by boiling in 50 μ L of 2 \times Laemmli loading buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE followed by immunoblot using antibodies against GST (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and biotin (Promega, Madison, WI, USA) and chemiluminescent detection (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

4.5. Coimmunoprecipitation

COS-7 cells (1.5×10^6 cells per 10 cm dish) were transfected with 3 μ g pSG5-ER α and 3 μ g pcDNA-BCAS2 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) for 5 h. Cells were then treated for 48 h in the absence (ethanol) or presence of 10 nM E2 and then harvested in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Cell debris was precipitated by centrifugation and the supernatant was incubated with protein A/G-Sepharose (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) at 4 °C for 30 min to remove nonspecific interactions. The pre-cleared lysate was precipitated with antibodies against ER α (Santa Cruz Biotechnology) or BCAS2 (Abcam, Cambridge, UK) at 4 °C for

2 h and incubated overnight with protein A/G-Sepharose. After washing 4 times, the precipitates were eluted in loading buffer, separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblot was performed with anti-ER α and anti-BCAS2. Coimmunoprecipitation in MCF7 cells was carried out in the same manner, except incubations were carried out with EtOH, 10 nM E2 and 100 nM TAM.

4.6. Transient Transfection and Luciferase Assays

To determine the transcriptional activity effect of BCAS2 on SHRs, 7×10^4 MCF7, T-47D 3.17 (T-47D-MTVL), SK-BR-3, MDA-MB-231 or Hep-G2 cells were seeded in 24-well plates and transfected with 200 ng of 3xERE-Luc or MMTV-Luc, 50 ng of receptor expressing plasmid, as required, 50 to 300 ng of the appropriate coregulator expression plasmid or empty vector (EV) and 10 ng of pCMV- β -galactosidase (Promega), as transfection control, for 6 h, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as indicated by the manufacturer. Additionally, these experiments were performed using constructs expressing only the ER α AF-1 or ER α AF-2 in Hep-G2 cells, to determine whether the activity of BCAS2 requires one or both transcriptional activation sites. Cells were incubated for 48 h in the presence or absence of ligand. Ligands used for ER α were E2 or TAM and progesterone (P4) was used to activate the PR. To determine the effect of BCAS2 on the transcriptional activity of other ER α coactivators, 7×10^4 MCF7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells were transfected, as previously described, along with 50 ng of SRC-1, CBP or TIF2. Finally, to determine the impact of HER2, PI3K and MEK-1 signaling pathways in BCAS2 activation, MCF7 and SK-BR-3 cells were transfected, as previously described, in presence of ethanol (EtOH), E2 or TAM along with Trastuzumab, PD98059 or Wortmannin for 48 h. Cell extracts were assayed for luciferase and β -galactosidase activities using a GloMax[®] 96 microplate Luminometer (Promega). At least three independent transfections were performed in triplicate for each trial. Results are shown as relative light units (RLU) calculated as a ratio of luciferase and β -galactosidase activities.

4.7. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

ChIP assays were performed as previously described [46]. Briefly, 3×10^6 MCF7 cells were grown in 10 cm dishes in phenol red-free medium with 2% sFBS for 2 days before treatment with vehicle (EtOH) or 10 nM E2 for 30 min – 2 h, as indicated. Cells were crosslinked and harvested in cold PBS and protease inhibitor cocktail (Roche) plus 1mM DTT. The cell button was processed using a ChIP Kit (Upstate) following the manufacturer's instructions. Immunoprecipitation was performed overnight at 4 °C with the addition of 3 g normal rabbit IgG, rabbit anti-ER α (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-BCAS2 (Abcam) or methyl histone H3 antibody (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA). Real-time PCR was carried out to amplify promoter regions from the pS2 (TFF1) [20] and WISP2 [21] genes. Oligonucleotides used were: pS2: fwd 5'-CCATGTTGGCCAGGCTAGTC-3', rev 5'-ACAACAGTGGCTCACGGGCT-3'; WISP2: fwd 5'-TGTTGTGCCTCCAGCTCCTG-3', rev 5'-GGTTTCTGGCAGGCAGATT-3'.

4.8. Real-Time Quantitative PCR

Real-time PCR was carried out using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's protocol, using a LightCycler 480 (Roche Indianapolis, IN, USA).

4.9. Expression of Endogenous Genes

To monitor endogenous expression of estrogen-responsive genes, we used MCF7 cells transfected, as described above, with pcDNA-BCAS2 and treated with E2 for 24 h. The effect of overexpression of BCAS2 on the endogenous expression of E2-dependent genes was determined by RTqPCR. Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen), following manufacturer's instructions. We measured mRNA levels of pS2, C3, IGFBP2 and c-Myc. The cDNA was

obtained from 100 ng of total RNA using SuperScript Vilo cDNA synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (human GAPDH) mRNA amplification was used for assay normalization and relative units are reported. Oligonucleotides used were: pS2 fwd 5'-CACCATGGAGAACAAGGTGA-3', rev 5'-TGACACCAGGAAAACCACAA-3'; C3: fwd 5'-ACCAGCAGACCGTAACCATC-3', rev 5'-GCAGCCTTGACTTCCACTTC-3'; IGFBP2: fwd 5'-CCTCAAGTCGGGTATGAAGG-3', rev 5'-ACCTGGTCCAGTTCCTGTTG-3'; c-MYC: fwd 5'-AGAGAAGCTGGCCTCCTACC-3', rev 5'-CGTCGAGGAGAGCAGAGAAT-3'; GAPDH: fwd 5'-CCTCAACGACCACTTTGTCA-3'; rev: 5'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT-3'. The data shown were performed three times in triplicate.

4.10. shRNA Transfection

Lentivirus stocks were produced in HEK 293T cells by transfection with pLKO.1-BCAS2 siRNA constructs or control siRNA (shRNAs; Sigma Aldrich), packaging plasmid (pCMV R8.91) and envelope plasmid (pVSVG) using Calcium phosphate. Viruses were harvested and concentrated as previously described [42] 3×10^5 MCF7 cells were infected by spin inoculation system [47] centrifuging the virus particles with the cells at 1200 rpm for 2h at room temperature. Cells infected with vectors expressing shRNA-BCAS2 or shRNA-E1 (negative control) pLKO.1 and were selected with 2 g/mL of puromycin (Sigma-Aldrich) 24 h after infection.

4.11. Cell Viability Assays

Cell viability was assessed using a tetrazolium salt WST-1 assay (Quick Cell Proliferation, BioVision, Milpitas CA, USA). MCF7 cells (5×10^5) were seeded in 6-well plates and transfected with 3 μ g pcDNA-BCAS2 or EV, as described previously and left for 48 h. Cells were then seeded in 96-well plates and treated in the absence (EtOH) or presence of E2 and incubated for up to 8 days. Cell viability measurements were taken every 48 h. After incubation, 10 μ L of 5 mg/mL WST was added to the cells and the reaction was incubated for 3 h at 37 °C. The assay was read at an absorbance of 450 nm using a microplate reader (BioTek Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader) and survival of cells was calculated by dividing the absorbance of the transfected cells by that of the non-transfected. All tests were performed in quadruplicate. Additionally, cell viability was assayed in the same manner after transfecting BCAS2 shRNA constructs, as described previously. Cells were seeded in 96 well plates and allowed to grow for 96 h before determining cell viability. All tests were performed in quadruplicate.

4.12. Colony Formation and Wound Healing Assays

To perform clonogenicity assays, MCF7 cells were BCAS2 or EV transfected and 1000 cells/well were seeded in 6-well plates. Treatments were carried out with E2, TAM or vehicle (EtOH) for 12 days. Cells were then dyed with crystal violet 0.05% and the number of colonies was counted. Colony numbers were assessed visually and colonies containing >50 normal-appearing cells were counted. Pictures were taken using a digital camera. Number of colonies is reported as % of colonies (PE), where $PE = (\# \text{ colonies formed} / \# \text{ cells plated}) \times 100$ [48]. Experiments were performed three times.

To assess cell motility, wound healing assays were carried out. MCF7 cells were BCAS2 or EV transfected and 500,000 cells/well were plated in 6-well plates. Once cells were 90% confluent, the surface was scratched with a 200 μ L tip and cells were treated with E2 for 48 h. Experiments were carried out in the presence of a proliferation inhibitor, AraC (20nM), for 48 h. Pictures were taken every 24 h for 48 h and the % of open wound was calculated.

4.13. Statistical Analysis

All experiments were repeated at least three times and data are expressed as the mean \pm standard deviation. Statistical analysis of the proliferation results was carried out by two-way ANOVA followed

by Bonferroni post tests using Graph Pad Prism 6.0 for Mac. Statistical analysis for luciferase assays was carried out using Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Dunnett port test.

5. Conclusions

We have shown that BCAS2 is a bona fide coactivator of ER α in breast cancer cell lines, being recruited to target gene promoters and increasing expression of a subset of E2 regulated genes. BCAS2 functions primarily through its interaction with AF-1 and collaborates with AF-2 coactivators, having a role in both independent and synergistic activity of these two transcriptional activation functions. Additionally, BCAS2 is involved in promoting various processes of carcinogenesis both in the presence and absence of estradiol. This suggests a role for BCAS2 overexpression in promoting ER α activity in a reduced estrogen environment, as is found during hormonal treatment for breast cancer. Finally, BCAS2 is regulated by the PI3K/AKT signaling pathway. However, the mechanisms involved in this regulation must be studied further.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/4/966/s1>. Supplementary Figure S1. Coimmunoprecipitation assays in MCF7 cells in the presence of ethanol (OH), E₂ (10nM) or TAM (100nM) showing interaction in the presence or absence of ligand. Input refers to pre-clear protein extracts. Supplementary Figure S2. Raw western blot data studies using inhibitors of signal transduction pathways. (A) Three independent assays showing HER2 expression in SK-BR-3 cells in the presence or absence of the HER 2 inhibitor trastuzumab. (B) Two independent assays showing AKT and pAKT expression in MCF7 cells in the presence and absence of Trastuzumab and AKT activation inhibitor wortmannin. (C) Two independent assays showing ERK and pERK expression in MCF7 cells in the presence or absence of MEK inhibitor PD98059.

Author Contributions: A.S.-H. and M.Y.N.-R. carried out the experimental procedures. A.J. supervised the R.T.-PCR assays and those involving progesterone receptor. A.S.H., N.B.-A. and E.L. analyzed the data and wrote the article. E.L. conceived the study and was in charge of overall direction and planning. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: This work was supported by funding from the Instituto Nacional de Cancerología and grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) numbers 33831-M and 182189 and from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. ASH and MYNR were PhD students in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and funded by scholarships from CONACyT. The funders had no role in the study design, data collection, analysis or preparation of this manuscript.

Acknowledgments: We thank Instituto Nacional de Cancerología for financial support.

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

Abbreviations

ER α	Estrogen Receptor alpha
BCAS2	Breast Cancer Amplified Sequence 2
TAM	Tamoxifen
E2	Estradiol
P4	Progesterone
EtOH	Ethanol
aa	amino acids
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
SRC-1	Steroid Receptor coactivator-1
TIF2	Transcriptional Intermediary Factor 2
CBP	CREB Binding Protein

References

1. Sommer, S.; Fuqua, S.A. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2001**, *11*, 339–352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Bender, L.M.; Nahta, R. Her2 cross talk and therapeutic resistance in breast cancer. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 3906–3912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Hurvitz, S.A.; Pietras, R.J. Rational management of endocrine resistance in breast cancer: A comprehensive review of estrogen receptor biology, treatment options and future directions. *Cancer* **2008**, *113*, 2385–2397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Santen, R.; Cavalieri, E.; Rogan, E.; Russo, J.; Guttenplan, J.; Ingle, J.; Yue, W. Estrogen mediation of breast tumor formation involves estrogen receptor-dependent, as well as independent, genotoxic effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1155*, 132–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Robinson, D.R.; Wu, Y.M.; Vats, P.; Su, F.; Lonigro, R.J.; Cao, X.; Kalyana-Sundaram, S.; Wang, R.; Ning, Y.; Hodges, L.; et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1446–1451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Thomas, C.; Gustafsson, J.Å. Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer. *Trends Endocrinol. Metab.* **2015**, *26*, 467–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 121–141. [[PubMed](#)]
8. McKenna, N.J.; O'Malley, B.W. Combinatorial Control of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators. *Cell* **2002**, *108*, 465–474. [[CrossRef](#)]
9. Heery, D.M.; Kalkhoven, E.; Hoare, S.; Parker, M.G. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **1997**, *387*, 733–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Torchia, J.; Glass, C.; Rosenfeld, M.G. Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 373–383. [[CrossRef](#)]
11. Xu, J.; Wu, R.C.; O'Malley, B.W. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 615–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Perissi, V.; Jepsen, K.; Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G. Deconstructing repression: Evolving models of co-repressor action. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 109–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Xu, L.; Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1999**, *9*, 140–147. [[CrossRef](#)]
14. Qi, C.; Zhu, Y.T.; Chang, J.; Yeldandi, A.V.; Rao, M.S.; Zhu, Y.J. Potentiation of estrogen receptor transcriptional activity by breast cancer amplified sequence 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *328*, 393–398. [[CrossRef](#)]
15. Kuo, P.C.; Tsao, Y.P.; Chang, H.W.; Chen, P.H.; Huang, C.W.; Lin, S.T.; Weng, Y.T.; Tsai, T.C.; Shieh, S.Y.; Chen, S.L. Breast cancer amplified sequence 2, a novel negative regulator of the p53 tumor suppressor. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8877–8885. [[CrossRef](#)]
16. Tzukerman, M.T.; Esty, A.; Santiso-Mere, D.; Danielian, P.; Parker, M.G.; Stein, R.B.; Pike, J.W.; McDonnell, D.P. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol. Endocrinol.* **1994**, *8*, 21–30. [[CrossRef](#)]
17. Métivier, R.; Penot, G.; Flouriot, G.; Pakdel, F. Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: Requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol. Endocrinol.* **2001**, *15*, 1953–1970. [[CrossRef](#)]
18. Truss, M.; Bartsch, J.; Schelbert, A.; Hache, R.J.; Beato, M. Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J.* **1995**, *14*, 1737–1751. [[CrossRef](#)]
19. Kuo, P.C.; Huang, C.W.; Lee, C.I.; Chang, H.W.; Hsieh, S.W.; Chung, Y.P.; Lee, M.S.; Huang, C.S.; Tsao, L.P.; Tsao, Y.P.; et al. BCAS2 promotes prostate cancer cells proliferation by enhancing AR mRNA transcription and protein stability. *Br. J. Cancer* **2015**, *12*, 391–402. [[CrossRef](#)]
20. Merrell, K.W.; Crofts, J.D.; Smith, R.L.; Sin, J.H.; Kmetzsch, K.E.; Merrell, A.; Miguel, R.O.; Candelaria, N.R.; Lin, C.Y. Differential recruitment of nuclear receptor coregulators in ligand-dependent transcriptional repression by estrogen receptor- α . *Oncogene* **2011**, *30*, 1608–1614. [[CrossRef](#)]
21. Fritah, A.; Redeuilh, G.; Sabbah, M. Molecular cloning and characterization of the human WISP-2/CCN5 gene promoter reveal its upregulation by oestrogens. *J. Endocrinol.* **2006**, *191*, 613–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Atanaskova, N.; Keshamouni, V.G.; Krueger, J.S.; Schwartz, J.A.; Miller, F.; Reddy, K.B. MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance. *Oncogene* **2002**, *21*, 4000–4008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Wu, V.S.; Kanaya, N.; Lo, C.; Mortimer, J.; Chen, S. From bench to bedside: What do we know about hormone receptor-positive and human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *153*, 45–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Takimoto, G.S.; Graham, J.D.; Jackson, T.A.; Tung, L.; Powell, R.L.; Horwitz, L.D.; Horwitz, K.B. Tamoxifen resistant breast cancer: Coregulators determine the direction of transcription by antagonist-occupied steroid receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *69*, 45–50. [[CrossRef](#)]
25. Osborne, C.K.; Shou, J.; Massarweh, S.; Schiff, R. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 865s–870s. [[PubMed](#)]
26. Le Romancer, M.; Poulard, C.; Cohen, P.; Sentis, S.; Renoir, J.-M.; Corbo, L. Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors. *Endoc. Rev.* **2011**, *32*, 597–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Li, Z.; Zhang, Y.; Hedman, A.C.; Ames, J.B.; Sacks, D.B. Calmodulin Lobes Facilitate Dimerization and Activation of Estrogen Receptor- α . *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 4614–4622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lee, M.T.; Leung, Y.K.; Chung, I.; Tarapore, P.; Ho, S.M. Estrogen Receptor b (ERb1) Transactivation Is Differentially Modulated by the Transcriptional Coregulator Tip60 in a cis-Acting Element-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 25038–25052. [[CrossRef](#)]
29. Nagasaki, K.; Maass, N.; Manabe, T.; Hanzawa, H.; Tsukada, T.; Kikuchi, K.; Yamaguchi, K. Identification of a novel gene, DAM1, amplified at chromosome 1p13.3-21 region in human breast cancer cell lines. *Cancer Lett.* **1999**, *140*, 219–226. [[CrossRef](#)]
30. Worsham, M.J.; Pals, G.; Schouten, J.P.; Miller, F.; Tiwari, N.; van Spaendonk, R.; Wolman, S.R. High-resolution mapping of molecular events associated with immortalization, transformation and progression to breast cancer in the MCF10 model. *Breast Cancer Res. Treat.* **2006**, *96*, 177–186. [[CrossRef](#)]
31. Sengupta, D.; Bhargava, D.K.; Dixit, A.; Sahoo, B.S.; Biswas, S.; Biswas, G.; Mishra, S.K. ERR β signaling through FST and BCAS2 inhibits cellular proliferation in breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **2014**, *110*, 2144–2158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Schiff, R.; Massarweh, S.; Shou, J.; Osborne, C.K. Breast cancer endocrine resistance: How growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 447S–454S. [[PubMed](#)]
33. Zhao, W.; Zhang, Q.; Kang, X.; Jin, S.; Lou, C. AIB1 is required for the acquisition of epithelial growth factor receptor-mediated tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *380*, 699–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nagalingam, A.; Tighiouart, M.; Ryden, L.; Joseph, L.; Landberg, G.; Saxena, N.K.; Sharma, D. Med1 plays a critical role in the development of tamoxifen resistance. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 918–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Redmond, A.M.; Byrne, C.; Bane, F.T.; Brown, G.D.; Tibbitts, P.; O'Brien, K.; Hill, A.D.; Carroll, J.S.; Young, L.S. Genomic interaction between ER and HMGB2 identifies DDX18 as a novel driver of endocrine resistance in breast cancer cells. *Oncogene* **2015**, *34*, 3871–3880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Qin, L.; Chen, X.; Wu, Y.; Feng, Z.; He, T.; Wang, L.; Liao, L.; Xu, J. Steroid receptor coactivator-1 upregulates integrin α_5 expression to promote breast cancer cell adhesion and migration. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1742–1751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Walsh, C.A.; Qin, L.; Tien, J.C.; Young, L.S.; Xu, J. The function of steroid receptor coactivator-1 in normal tissues and cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2012**, *8*, 470–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Qin, L.; Liu, Z.; Chen, H.; Xu, J. The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3819–3827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Santer, F.R.; Höschele, P.S.; OH, S.J.; Erb, H.H.; Bouchal, J.; Cavarretta, I.T.; Parson, W.; Meyers, D.J.; Cole, P.A.; Cullig, Z. Inhibition of the Acetyltransferases p300 and CBP Reveals a Targetable Function for p300 in the Survival and Invasion Pathways of Prostate Cancer Cell Lines. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1644–1655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Leclercq, G.; Gallo, D.; Cossy, J.; Laïos, I.; Larsimont, D.; Laurent, G.; Jacquot, Y. Peptides Targeting Estrogen Receptor Alpha-Potential Applications for Breast Cancer Treatment. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 2632–2653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. Shou, J.; Massarweh, S.; Osborne, C.K.; Wakeling, A.E.; Ali, S.; Weiss, H.; Schiff, R. Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 926–935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kurokawa, H.; Lenferink, A.E.; Simpson, J.F.; Pisacane, P.I.; Sliwkowski, M.X.; Forbes, J.T.; Arteaga, C.L. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-over-expressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 5887–5894. [[PubMed](#)]
43. Arpino, G.; Green, S.J.; Allred, D.C.; Lew, D.; Martino, S.; Osborne, C.K.; Elledge, R.M. HER-2 amplification, HER-1 expression and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: A southwest oncology group study. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 5670–5676. [[CrossRef](#)]
44. Benz, C.C.; Scott, G.K.; Sarup, J.C.; Johnson, R.M.; Tripathy, D.; Coronado, E.; Shepard, H.M.; Osborne, C.K. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res. Treat.* **1992**, *24*, 85–95. [[CrossRef](#)]
45. Osborne, C.K.; Bardou, V.; Hopp, T.A.; Chamness, G.C.; Hilsenbeck, S.G.; Fuqua, S.A.; Wong, J.; Allred, D.C.; Clark, G.M.; Schiff, R. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2003**, *95*, 353–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Noriega-Reyes, M.Y.; Rivas-Torres, M.A.; Oñate-Ocaña, L.F.; Vallés, A.J.; Baranda-Avila, N.; Langley, E. Novel role for PINX1 as a coregulator of nuclear hormone receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *15*, 9–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wiznerowicz, M.; Trono, D. Conditional suppression of cellular genes: Lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J. Virol.* **2003**, *77*, 8957–8961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Franken, N.A.; Rodermond, H.M.; Stap, J.; Haveman, J.; Van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2315–2319. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).