



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TÍTULO DEL PROYECTO:

Caracterización del complejo Tristetraprolina- Receptor de estrógenos alfa como supresor de tumores en células de cáncer mamario

PRESENTA:

M.C. Gabriel Miguel Rodríguez Gómez

TUTOR: Dr. Alfonso León Del Río, IIB

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Lorena Aguilar Arnal, IIB

Dra. Aurea Orozco Rivas, INB

Ciudad de México, Enero 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

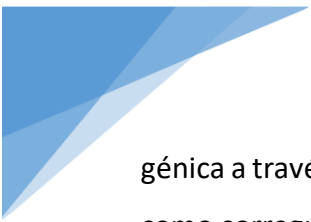
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.



RESUMEN

La tristetraprolina (TTP) es una proteína nucleocitoplasmática de 326 aminoácidos cuya secuencia se caracteriza por la presencia de dos dominios dedos de zinc del tipo CCCH. En el citoplasma, la función de TTP es promover la degradación de mRNAs que contienen elementos ricos en adenilato/uridilato (AREs). Mecánicamente TTP promueve el reclutamiento de deadenilasas específicas de la cola poliA y exoribonucleasas. A través de la reducción de la vida media de aproximadamente 10% de todos los transcritos en la célula, TTP ha demostrado participar en múltiples procesos celulares que incluyen la regulación de la expresión génica, proliferación celular, homeostasis metabólica y control de la respuesta inflamatoria e inmune. Sin embargo, mas allá de su participación en la regulación del mRNA; en el núcleo, TTP actúa como un corregulador a través de la interacción con enzimas modificadoras de la cromatina. TTP ha demostrado reprimir la transactivación del receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$) sugiriendo su posible participación en la regulación de un gran número de genes en la célula humana y su posible involucramiento en la progresión del cáncer mamario. En este trabajo, mediante análisis de secuenciación masiva de regiones accesibles a la cromatina, identificamos diferentes genes que pueden estar siendo regulados por el complejo TTP- $RE\alpha$, como por ejemplo PAK2, PIN1 y FOXK1, los cuales juegan un papel importante en la progresión y resistencia a terapia hormonal en cáncer mamario de tipo luminal. Por otro lado, a través de análisis de bases de datos de tumores de pacientes con cáncer mamario positivos al receptor de estrógenos, se encontró una correlación positiva entre los niveles de expresión de transcrito de TTP y el tiempo libre de reincidencia. Estos hallazgos sugieren que TTP, a través de su función en núcleo como corregulador del $RE\alpha$ está modulando diferentes mecanismos celulares que participan en la progresión y resistencia a terapia hormonal en cáncer mamario de tipo luminal. Adicionalmente, encontramos que TTP también se une al promotor de CMAS, un gen que no es regulado por el $RE\alpha$, lo cual apoya la premisa de que TTP juega un rol global en la regulación del transcriptoma humano a través de actuar sobre diversos factores de transcripción. Nosotros proponemos que TTP puede ser clasificada como una proteína “moonlighting” (subset de proteínas multifuncionales que exhiben dos funciones fisiológicas relevantes) que regula la expresión



génica a través de dos diferentes mecanismos: por la degradación de mRNAs-ARE y por su función como corregulador transcripcional.




SUMMARY

Tristetraprolin (TTP) is a nucleocytoplasmic 326 amino acid protein whose sequence is characterized by possessing two CCCH-type zinc finger domains. In the cytoplasm, TTP function is to promote the degradation of mRNAs that contain adenylate/uridylate-rich elements (AREs). Mechanistically, TTP promotes the recruitment of poly(A)-specific deadenylases and exoribonucleases. By reducing the half-life of about 10% of all the transcripts in the cell, TTP has been shown to participate in multiple cellular processes that include regulation of gene expression, cell proliferation, metabolic homeostasis and control of inflammation and immune responses. However, beyond its role in mRNA decay, in the cell nucleus TTP acts as a transcriptional coregulator by interacting with chromatin modifying enzymes. TTP has been shown to repress the transactivation of estrogen receptor Alpha (ER α) suggesting that it participates in the transcriptional regulation of hundreds of genes in human cells and is possibly involved in breast cancer progression. In this work, through next generation sequencing of accessible chromatin regions, we identified several genes that can be regulated by the TTP-ER α complex, like PAK2, PIN1 and FOXK1, which play an important role in progression and resistance to hormone therapy in luminal breast cancer. Furthermore, through database analysis of patients with breast cancer tumors positive for the ER α , a positive correlation between TTP-transcript expression levels and relapse-free survival was found. These findings suggest that TTP through its function in nucleus as ER α coregulators, modulates several cell mechanisms which participate in progress and resistance to hormone therapy in luminal breast cancer. Additionally, we found that TTP also binds to the CMAS promoter, a gene that is not regulated by ER α , supporting the premise that TTP plays a global role in the regulation of the human transcriptome by acting on various transcription factors. We suggest that TTP may be classified as a moonlighting tumor suppressor protein (subset of multifunctional proteins that exhibit more than one physiological function) that regulates gene expression through two different mechanisms: the decay of ARE-mRNAs and a transcriptional coregulator function.



ÍNDICE

I.	Introducción.....	1
II.	Antecedentes.....	3
	2.1 Cáncer mamario.....	3
	2.2 RE α	4
	2.3 TTP.....	6
	2.3.1 Estructura de TTP.....	6
	2.3.2 Localización de TTP.....	7
	2.3.3 Función citoplasmática de TTP.....	9
	2.3.4 Función nuclear de TTP.....	10
	2.3.5 TTP como supresor de tumores.....	11
III.	Justificación.....	13
IV.	Hipótesis.....	13
V.	Objetivos.....	13
	5.1 Objetivo general.....	13
	5.2 Objetivos específicos.....	13
VI.	Estrategia experimental y métodos.....	14
	6.1 Material biológico.....	14
	6.2 Cultivos celulares.....	14
	6.3 Generación de una clona T47D sobreexpresante de TTP.....	14
	6.4 Western blot.....	15
	6.5 Ensayo de viabilidad y proliferación celular.....	15
	6.6 ATAC-Seq.....	15
	6.7 Ensayo de co-inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	16
	6.8 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	17
	6.9 PCR tiempo real.....	17
	6.10 Niveles de expresión de TTP en tumores de cáncer mamario y tejido mamario normal y análisis de Kaplan-Meier.....	18




6.11 Análisis estadísticos.....	19
VII. RESULTADOS.....	20
7.1 Sobreexpresión de TTP en células T47D.....	20
7.2 Análisis de la accesibilidad a la cromatina mediante ATAC-Seq	23
7.2.1 Calidad de las secuencia y mapeo con el genoma de referencia.....	24
7.2.2 Identificación de regiones accesibles.....	26
7.2.3 Análisis diferencial de picos.....	28
7.2.4 Análisis de enriquecimiento GO de los genes asociado a los picos diferencialmente disminuidos en la región promotora.....	30
7.2.5 Genes regulados por el complejo TTP-RE α	31
7.2.5 Análisis de motivos.....	35
7.3 Correlación entre los niveles de expresión de mRNA de TTP y el tiempo libre de recaída.....	36
VIII. Discusión.....	38
IX. Conclusiones.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45
Índice de figuras.....	54
índice de tablas.....	56
ANEXO1 (Artículo).....	57



I. Introducción

El receptor de estrógenos alfa (RE α) es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la familia de receptores de hormonas esteroides y que se ha reportado estar involucrado en diferentes procesos tanto fisiológicos como patológicos (Achour et al., 2015). El RE α se caracteriza por la presencia de cuatro dominios funcionales independientes que incluyen un dominio de unión al DNA, un dominio de unión al ligando y dos dominios de transactivación denominados AF1 y AF2. Estos últimos sirven como sitios de unión para proteínas coactivadoras y correpresoras que regulan la actividad transcripcional del RE α a través de modificar el estado de la cromatina, de un estado laxo y activo a un estado compacto e inactivo (Fuentes et al., 2019).

Diferentes grupos de investigación han demostrado que cambios en los niveles de expresión de algunas proteínas correguladores del RE α pueden ser responsables del desarrollo de algunos tumores mamarios (Jordan et al., 1995). Uno de estos correguladores es la tristetraprolina (TTP) la cual es una proteína de 326 aminoácidos que contiene un dominio doble de dedos de zinc y que ha sido caracterizado por su capacidad para interactuar con secuencias específicas de RNAm en el citoplasma y promover su degradación (Rodriguez-Gómez et al., 2021, Ciais et al., 2013). Sin embargo, recientemente se ha reportado que TTP, cuando está localizado en el núcleo, puede funcionar como correpresor de algunos factores de transcripción como el factor nuclear kappa beta (NF- κ β) y receptores de hormonas esteroides incluyendo el RE α (Liang et al., 2009; Schichl et al., 2009; Barrios-García et al., 2016; Barrios-García et al., 2014). Estudios previos han demostrado que TTP, a través de su dominio doble de dedos de zinc, es capaz de interactuar con el dominio AF1 del RE α . Esta interacción reprime la actividad transcripcional del receptor a través de disminuir el reclutamiento de proteínas coactivadoras como SRC1 y SRC3 y favorecer el reclutamiento de correpresores como HDACs (Barrios-García et al., 2014). Por otro lado, estudios en líneas celulares MCF-7, las cuales representan un modelo de cáncer mamario positivo para el RE α , han demostrado que la sobreexpresión de TTP es suficiente para disminuir la proliferación celular y su capacidad para formar tumores en ratones inmunodeprimidos (Barrios-García et al., 2014). Más aún, estudios clínicos han reportado que los niveles de expresión de TTP se



correlacionan negativamente en tumores de pacientes con cáncer de mama, por lo que se ha propuesto que TTP pudiera estar funcionando como una proteína supresora de tumores (Brennan et al., 2009). En este trabajo mediante análisis de secuenciación masiva de regiones accesibles a la cromatina, se pudieron identificar diferentes genes posiblemente regulados por el complejo TTP-RE α , los cuales juegan un papel importante en la progresión y resistencia a la terapia hormonal en cáncer mamario de tipo luminal. Por otro lado, a través de análisis de bases de datos de tumores de pacientes con cáncer mamario, se encontró una correlación positiva entre los niveles de expresión de transcrito de TTP y el tiempo libre de reincidencia en pacientes con tumores positivos para el RE α , mientras que en pacientes con tumores negativos al RE α , no se observó una asociación significativa entre los niveles de expresión de TTP y el tiempo libre de recaída. Estos hallazgos sugieren que TTP a través de su función en núcleo como corregulador del RE α está modulando diferentes mecanismos celulares que participan en la progresión y resistencia a terapia hormonal en cáncer mamario de tipo luminal.

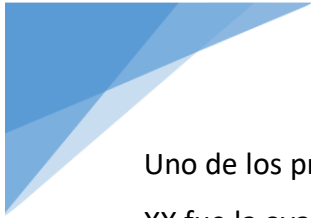


II. Antecedentes

2.1 Cáncer mamario

El cáncer mamario es una tumoración maligna desarrollada en las células de la glándula mamaria. Estudios epidemiológicos indican que el cáncer mamario es la neoplasia maligna de mayor incidencia a nivel mundial, el de mayor mortalidad en mujeres y la primera causa de muerte en mujeres de edad reproductiva (Bray et al., 2018). Los carcinomas mamaros se pueden clasificar de acuerdo a los patrones de genes expresados en tres grandes grupos:

- Luminal; Este grupo comprende aproximadamente el 70 % de los carcinomas mamaros y están caracterizados por la presencia de genes que normalmente son expresados en el epitelio mamario luminal. Comprende la mayoría de los carcinomas positivos para el receptor a estrógenos alfa (RE α) y puede ser dividido en dos subtipos; luminal A y luminal B. Los tumores del tipo luminal A son comúnmente caracterizados por la alta expresión del RE α , baja expresión del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y genes asociados a la proliferación celular. En contraste, los tumores de tipo luminal B están caracterizados por una baja expresión del RE α , variable expresión del HER2 y altos niveles de expresión de genes asociados a la proliferación celular (De Vita *et al.*, 2015).
- Enriquecidos en HER2: Este grupo comprende entre el 10% y 15% de todos los carcinomas mamaros. Estos carcinomas sobreexpresan tanto HER2 como genes asociados a la proliferación celular y tienen una baja expresión de RE α (De Vita *et al.*, 2015).
- Basal o negativo a RE: Este grupo comprende un grupo heterogéneo de tumores que clínicamente son definidos como triples negativos debido a que típicamente carecen de RE, HER2 y de receptores a progesterona (RP). Sin embargo, no todos los tumores del tipo basal son triples negativos y viceversa. Los carcinomas basales fueron primeramente identificados por una alta expresión de citoqueratinas basales y de genes asociados a la proliferación y por una pérdida de genes relacionados a la regulación del ciclo celular lo que les confiere un pobre pronóstico. Los carcinomas de tipo basal comprenden entre el 15% y 20% de todos los casos de cáncer mamario (De Vita *et al.*, 2015).




Uno de los primeros tratamientos desarrollados para tratar el cáncer de mama a inicios del siglo XX fue la ovariectomía, la cual inducía regresión del tumor primario y prevenía la recurrencia del tumor, lo cual indicaba que las hormonas esteroideas eran un factor determinante en el cáncer mamario. Los efectos de las hormonas esteroideas son mediados por sus respectivos receptores los cuales funcionan como factores de transcripción. Entre los receptores de hormonas esteroides, el RE α es de especial interés en cáncer mamario, debido a que sus niveles de expresión se encuentran elevados en lesiones mamarias premalignas y malignas con respecto al tejido mamario normal. Adicionalmente, el RE α ha demostrado ser de valor predictivo y pronóstico en el manejo clínico de esta enfermedad (Sommer and Fuqua, 2001).

2.2 RE α


El RE α es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la súperfamilia de receptores nucleares y que ha sido caracterizado por participar en diversos procesos fisiológicos como el desarrollo, el funcionamiento de tejidos reproductivos y la regulación de su ciclo (Achour et al., 2014). Por otro lado, alteraciones en la función del RE α han sido asociadas al desarrollo y progresión de algunas patologías, como los carcinomas mamarios (Jordan et al., 1995). Estructuralmente, al igual que el resto de la súperfamilia de receptores nucleares, el RE α está organizado en cinco dominios funcionales independientes que son: una bisagra, un dominio de unión al DNA, un dominio de unión al ligando y dos dominios de transactivación (AF1 y AF2) los cuales sirven como sitios de unión para proteínas coactivadoras y correpresoras que regulan la actividad transcripcional del receptor a través de modificar el estado de la cromatina (Fuentes et al., 2019).

El mecanismo canónico por el cual funciona el RE α , es a través de su activación dada por la interacción del receptor con el estradiol (E₂) en el citoplasma, lo cual induce cambios conformacionales en el receptor que permiten su dimerización y posterior translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, el RE α ligado interactúa con secuencias específicas de DNA conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (EREs) localizadas en las regiones promotoras de los genes blanco de este receptor. Indirectamente, el RE α ligado puede



interaccionar con otros factores de transcripción, para posteriormente regular la transcripción de diversos genes (Yasar et al., 2016). Se sabe que en el citoplasma el RE α no ligado recluta complejos de proteínas de choque térmico que bloquean algunos péptido señal de localización nuclear promoviendo su localización citoplasmática (Yasar et al., 2016). Mediante el uso de técnicas de secuenciación masiva de nueva generación se han identificado alrededor de 10205 sitios putativos de unión del RE α a la cromatina en respuesta a su ligando endógeno E₂, y se ha observado que este receptor regula la transcripción de aproximadamente 596 genes (Welboren et al., 2009).

En las últimas décadas se ha podido profundizar en la dinámica de la actividad transcripcional del RE α (Metiver et al., 2003). Se ha observado que el RE α actúa de una manera cíclica y se han descrito tres diferentes ciclos que ocurren en presencia de E₂. En el primer ciclo no hay actividad transcripcional, pero se promueve un estado permisivo de la cromatina para su posterior transcripción, y los dos ciclos adicionales son transcripcionalmente productivos. Así durante el ciclo inicial, la unión de RE α a su ERE favorece el reclutamiento del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, el cual induce la relocalización del nucleosoma asociado con la caja TATA dejando expuesta esta secuencia. Adicionalmente, hay un reclutamiento de proteínas coactivadoras como metilasas y acetilasas de histonas que promueven un estado laxo de la cromatina. Durante los ciclos subsecuentes la transcripción es iniciada por el RE α el cual recluta secuencialmente factores intermediarios de la transcripción y de la maquinaria basal de transcripción, como la proteína de unión a la secuencia TATA (TBP), para posteriormente reclutar y activar la RNA polimerasa II (RNAPOLII). La presencia de ciertos factores y modificaciones postraduccionales como la asociación de la proteína TBP y la dimetilación de la arginina 3 de la histona 4, se mantienen durante los dos ciclos activos. La activación de la RNAPOLII induce el reclutamiento de complejos correpresores que definen la culminación de cada ciclo. Al final de todos los ciclos activos, hay un reclutamiento de la desacetilasas de histonas (HDACs) y del complejo SWI/SNF, los cuales promueven un estado compacto de la cromatina y reprimen la secuencia ERE dentro del nucleosoma. Por otro lado, se recluta la proteína E3 ligasa y algunos componentes del proteosoma que promueven la ubiquitinación y posterior degradación del complejo transcripcional activo. Mientras, que al final del segundo ciclo se recluta otro complejo



remodelador de la cromatina dependiente de ATP, NuRD, que reposiciona el nucleosoma asociado con la caja TATA, resultando en su oclusión y exclusión de factores como TBP (Metiver et., al 2003).

En síntesis, se puede decir que el intercambio entre proteínas correpresoras y coactivadoras del RE α forma las bases del sofisticado mecanismo de regulación de la actividad transcripcional del receptor. Es por esto, que algunos estudios han sugerido que alteraciones en los niveles de expresión de algunas de estas proteínas correguladoras, podrían ser las causantes de originar algunos tumores mamarios de tipo luminal (Jordan et al., 1995). Un ejemplo de estos correguladores es la proteína TTP, la cual recientemente ha sido reportado que funciona como un correpresor de algunos factores de transcripción como NF- κ B y otros receptores de hormonas esteroides como el de andrógenos, glucocorticoides y estrógenos (Liang et al., 2009; Schichl et al., 2009 ; Barrios-García et al., 2014; Barrios-García et al., 2016).

2.3 TTP

2.3.1 Estructura de TTP

TTP también conocida como GOS24 es una proteína de 326 aminoácidos con un peso molecular de 34 KDa y que es codificada por el gen ZFP36 el cual se localiza en el cromosoma 19q13.1 (Taylor et al., 1991). TTP fue identificada por primera vez entre un grupo de genes inducidos por la lectina concanavalina A y caracterizada por estar involucrada en promover la entrada de la fase G0 a la fase G1 del ciclo celular de células linfocíticas (Forsdyke et al., 1985). El nombre TTP deriva de la presencia de tres dominios ricos en prolina localizados en las posiciones 71, 97 y 119 de su secuencia proteica. TTP pertenece a una pequeña familia de proteínas conocida como TTP/TIS11 que en células humanas incluye otras dos proteínas BRF1 y BRF2 (Ciais et al., 2013; Blackshear et al., 2002). Estructuralmente, TTP se caracteriza por la presencia de dos dominios dedos de zinc del tipo CCCH localizados en tándem y separados por 13 aminoácidos. TTP también presenta un motivo de 14 aminoácidos en su extremo C-terminal que contiene una secuencia funcional de exporte nuclear (NES) y una secuencia de localización nuclear (NLS) ubicada entre los dos

dominios dedos de zinc (**Figura 1**) (Murata et al., 2002; Phillips et al., 2002; Ciaia et al., 2013). Las secuencias NES y NLS son responsables de la localización y relocalización de TTP entre el núcleo celular y el citoplasma en respuesta a la activación de diferentes vías de señalización activadas por factores de crecimiento (Rodríguez-Gómez et al., 2021).

A

```

1  mdltaiyesl lslspdvvpv sdhggteessp gwgssgpwsl spsdsspsgv tsrlpgrsts
61  lvegrscgww ppppgfapla prlgpelsps ptsptatstt psryktelcr tfsesgrcry
121 gakcqhahgl gelrqanrhp kyktelchkf ylqgrcpygs rchfihnpse dlaapghppv
181 lrqsisfsgl psgrrts pppglagpslss ssfspsss pp ppgdplpsps afsaapgtpl
241 arrdptpvcc pscrratpis vwgplgglvr tpsvqslgsd pdeyassgss lggsdspvfe
301 agvfappqpv aaprllpifn risvse

```

B

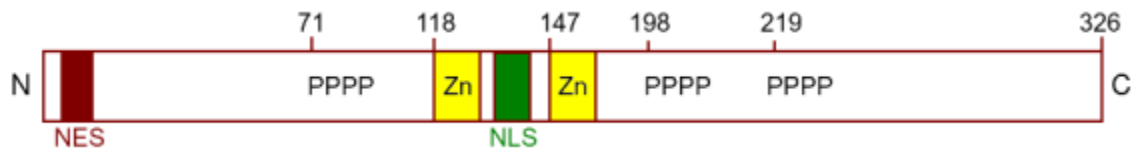



Figura 1. Estructura de TTP. **A)** Secuencia de aminoácidos de TTP. Las secuencias tetra prolina son mostradas en cajas y los dominios de dedos de zinc se muestran subrayados. **B)** Representación esquemática de la estructura de TTP indicando la localización de la secuencia de exporte nuclear (NES), la señal de localización nuclear (NLS), los dominios ricos en prolina (pppp) y los dominios dedos de zinc (Zn). Imagen tomada de Rodríguez-Gómez et al., 2021.

2.3.2 Localización de TTP

TTP es una proteína que se puede localizar tanto en el núcleo como en citoplasma. Haciendo uso de inhibidores de proteínas de exportación nuclear, se ha observado que el extremo N-terminal puede interactuar con el receptor de exportación nuclear CRM1 (Phillips et al., 2002; Murata et al., 2002), una proteína que facilita el transporte de grandes moléculas, incluyendo RNA y proteínas, a través de la membrana nuclear al citoplasma (Nguyen et al., 2012) y con NUP214, la



cual es una nucleoporina que forma parte del poro nuclear y es requerida para el transporte nucleocitoplasmático (**Figura 2**) (Carman et al., 2004).

Por otro lado, se ha demostrado que la localización subcelular de TTP depende de su estatus de fosforilación. Se ha observado que la continua actividad de la vía p38 MAPK y MK2 es requerida para mantener el estatus de fosforilación, localización citoplasmática y estabilidad de TTP, mientras que al usar un inhibidor de esta vía, TTP se desfosforilaba y se relocizaba del citoplasma al núcleo. Interesantemente, la fosforilación de TTP disminuye su función citoplasmática (Brook et al., 2006). Las vías de MAPK y MK2 fosforilan a TTP en dos residuos críticos, ser52 y ser178 lo cual crea un sitio funcional para la unión de proteínas adaptadoras 14-3-3 (Chrestensen et al., 2004; Stoecklin et al., 2004), las cuales reducen la afinidad de TTP por transcritos con AREs (Hitti et al., 2006). TTP también puede interactuar con la fosfatasa PP2A, la cual compete directamente con proteínas 14-3-3 por la unión a TTP. PP2A desfosforila a TTP lo cual activa la función de degradación de transcritos con AREs de TTP (Sun et al., 2007). Con todas estas observaciones, se ha sugerido que la fosforilación de TTP permite su acumulación en el citoplasma en un estado inactivo, para posteriormente ser activado por fosfatasas a través de su desfosforilación y llevar a cabo su función citoplasmática (Sandler & Stoecklin, 2008). En cuanto a su función nuclear, no está claro cómo el estatus de fosforilación puede afectar su papel como proteína correpresora.

La localización celular de TTP es un factor clave en su funcionamiento, ya que dependiendo de esta localización es capaz de regular diferentes procesos celulares a través de diferentes mecanismos. En el citoplasma, regula la expresión de diferentes proteínas a nivel postranscripcional a través de interactuar con transcritos que contienen secuencias específicas ricas en adenina y uracilo, conocidas como elementos AREs, mientras que en el núcleo puede regular la expresión de diferentes proteínas a nivel transcripcional a través de promover el reclutamiento de correpresores de diferentes factores de transcripción.

2.3.3 Función citoplasmática de TTP

Después de la transcripción del DNA, el mRNA generado es transportado del núcleo al citoplasma, en donde sufre una serie de regulaciones y modificaciones antes de la traducción, las cuales incluyen: adición de cap, poliadenilación y remoción de los intrones. En el citoplasma, la estabilidad de ciertos mRNAs depende de su degradación y esto determina sus niveles de expresión y almacenamiento (Guo et al., 2017). Los elementos ricos en adenina y uracilo son considerados un potente regulador en *CIS* de la degradación del mRNA citoplasmático en células eucariotas. Los AREs son secuencias específicas localizadas en la región 3'UTR del mRNA y presentes en el 8-10% del transcriptoma humano (Gruber et al., 2011).

Se ha reportado que el mecanismo por el cual TTP ejerce sus efectos de degradación de mRNA es a través de la interacción con elementos AREs por medio de sus dos dominios dedos de zinc, lo cual favorece el reclutamiento de enzimas reguladoras del mRNA (**Figura 2**) (Lykke-Andersen & Wagner 2005). La mayor deadenilasa en células eucariotas es el complejo CCR4-NOT1, el cual está compuesto de dos subunidades catalíticas: CCR4 y CAF1, y la proteína de andamiaje NOT1 que permite el reclutamiento de otras subunidades del complejo (Nousch et al., 2013). En el citoplasma, NOT1 puede interaccionar con el dominio C-terminal de TTP. NOT1 provee una plataforma que permite que TTP reclute la deadenilasa CAF1 y así desencadenando la degradación de sus mRNAs blanco. (Sandler et al., 2011). Por otro lado, TTP también puede promover la deadenilación de mRNAs conteniendo AREs, a través del reclutamiento de la deadenilasa PARN (Lai et al., 2003). Sin embargo, no se ha identificado una interacción directa entre TTP y PARN, por lo que se ha sugerido que la unión de TTP al AREs-mRNA induce cambios en la conformación del transcrito favoreciendo el reclutamiento de PARN (Rodríguez-Gómez et al., 2021; Ciaís et al., 2013).



2.3.4 Función nuclear de TTP

Como se ha mencionado, TTP ha sido mayormente estudiada por su función en citoplasma de promover la degradación de mRNAs. Sin embargo, se ha reportado que TTP puede funcionar en el núcleo como una proteína correpresora de algunos factores de transcripción incluyendo NF- κ B y algunos receptores nucleares de hormonas esteroideas (**Figura 2**) (Liang et al., 2009; Schichl et al., 2009; Barrios-García et al., 2014; Barrios-García et al., 2016). Estudios realizados con la línea celular MCF-7, la cual representa un modelo de cáncer mamario positivo para el RE α , han mostrado que TTP y RE α pueden interactuar en el núcleo. Más aún, se ha reportado que TTP, a través de sus dos dominios dedos de zinc es capaz de interactuar con el dominio AF1 del RE α y esta interacción promueve el reclutamiento de proteínas con actividad de deacetilación de histonas como HDAC1,2,3 y 7, y disminuye el reclutamiento de proteínas con actividad de acetilación de histonas como SRC-1 y 3, reprimiendo así la actividad transcripcional del RE α (Barrios-García et al., 2014). Consistentemente, se ha reportado que TTP puede suprimir la actividad transcripcional del factor de transcripción NF- κ B de una manera independiente de su propiedad desestabilizadora de mRNA (Schichl et al., 2009; Liang et al., 2009). En fibroblastos embrionarios de ratón TTP (-/-), la carencia de TTP incrementa la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B, lo cual resulta en la sobrerregulación específica de genes blanco carentes de ARES (Schichl et al., 2009). Similarmente a la función correpresora reportada por Barrios-García y colaboradores (2014), TTP a través de la interacción con la subunidad p65 favorece el reclutamiento de las deacetilasas HDAC1, 3 y 7. El tratamiento con inhibidores de histonas deacetilasas o el knockdown de HDAC1 y 3 inducido mediante RNA de interferencia, suprime la actividad inhibitoria de TTP sobre NF- κ B. Consistentemente, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina se encontró una disminución en el reclutamiento de HDACs y un incremento en el reclutamiento de la acetilasa CBP en el promotor de MCP1, un gen regulado por NF- κ B, en células TTP (-/-). En contraste, la sobreexpresión de TTP bloqueó la acetilación de NF- κ B inducida por CBP (Liang et al., 2009). Sin embargo, en la actualidad hace falta elucidar las vías de señalización que están siendo reguladas por TTP a través de su función nuclear y su

participación en algunas patologías en donde estos receptores nucleares tienen un papel importante (Rodríguez-Gómez et al., 2021).

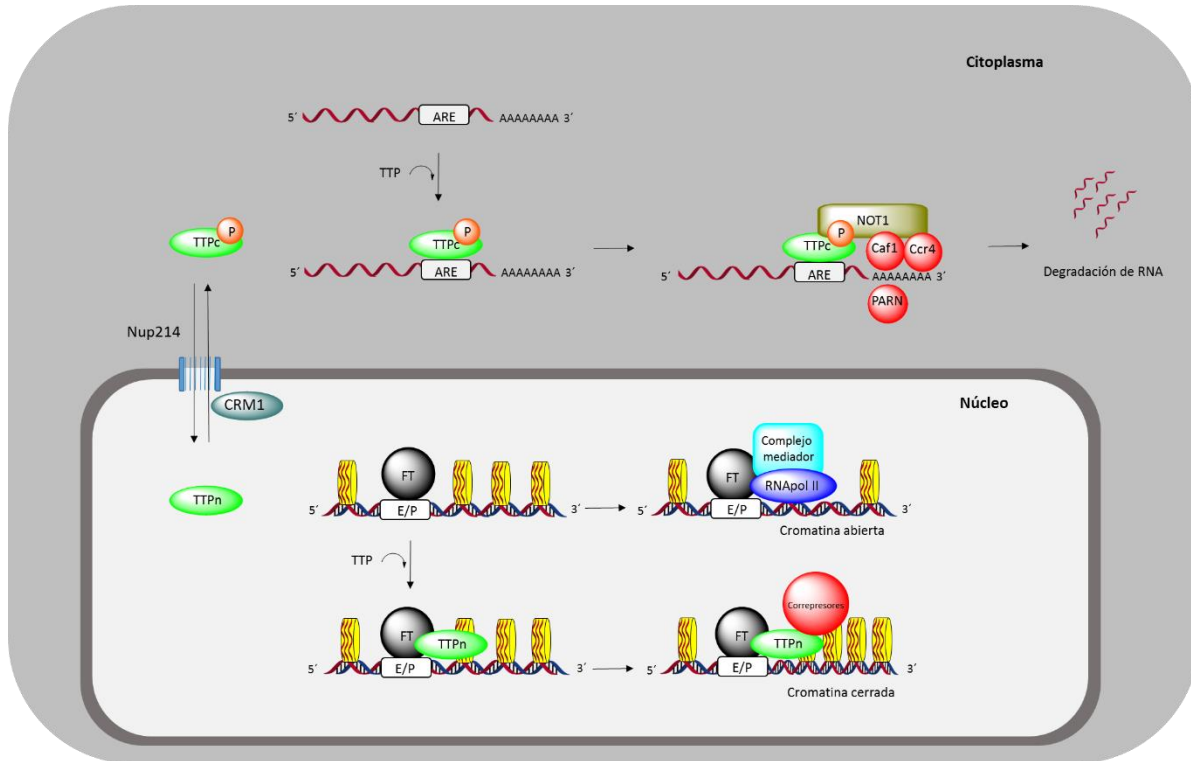



Figura 2. Función citoplasmática y nuclear de TTP. TTP puede localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma dependiendo de su estatus de fosforilación, y cuyo transporte es mediado por Nup214 y CRM1. En el citoplasma, TTP interactúa con elementos AREs favoreciendo el reclutamiento del complejo deadenilasa Not1/Caf1/Ccr4 y PARN, lo cual promueve la degradación del mRNA. En el núcleo, TTP interactúa con factores de transcripción y facilita el reclutamiento de correpresores que promueven un estado compacto de la cromatina. TTPc: Tristetraprolina citoplasmática; TTPn: Tristetraprolina nuclear; FT factor de transcripción; E/P: enhancer/promotor; ARE: elemento rico en adenina y uracilo en la región 3' no traducible. Imagen tomada de Rodríguez-Gómez et al 2021.

2.3.5 TTP como supresor de tumores

La viabilidad celular es un proceso finamente controlado por una serie de redes de señalización proteicas. En contraste, en la tumorigénesis ocurre una desregulación de estas vías de señalización proteicas, lo cual conduce al crecimiento anormal y malignidad de las células



cancerosas. La síntesis de estas proteínas es fuertemente regulada tanto por sus tasas de transcripción en núcleo, como la regulación de las concentraciones citoplasmáticas de sus respectivos mRNAs. Por tal motivo, se ha hipotetizado que TTP a través tanto de su función citoplasmática como nuclear, podría estar actuando como un supresor tumoral regulando múltiples vías celulares que impactan en el desarrollo de tumores (Ross et al., 2012). Apoyando esta premisa, se han realizado diversos estudios en donde se ha encontrado que los niveles de expresión de TTP en tejido tumoral se correlacionan negativamente con los niveles de expresión en tejido periférico no transformado para diversos tipos de cáncer como: mamario, de tiroides y de pulmón (Brennan et al., 2009; Fallahi et al., 2014; Barrios-García et al., 2016; Rodríguez-Gómez et al., 2021). Más aún, en las últimas décadas se han reportado diversos estudios en donde se ha demostrado la participación de TTP en la regulación de diversos procesos importantes para la formación y progresión del cáncer como: proliferación celular, apoptosis, migración, invasión y metástasis. Cabe mencionar que en la gran mayoría de estos estudios solo se ha evaluado la función citoplasmática de TTP y no su función nuclear como correpressor.



III. Justificación

En años recientes, se ha sugerido que TTP funciona como una proteína supresora de tumores, lo cual ha sido asociado a su capacidad de promover la degradación de ciertos mRNA; sin embargo, se ha demostrado que este efecto también podría estar vinculado con su función nuclear de correpressor del RE α . Por lo tanto, en este proyecto se pretende caracterizar el efecto correpressor de TTP en un modelo de cáncer mamario para identificar los procesos fisiológicos en los cuales TTP participa mediante la represión de la transactivación del RE α , así como las posibles vías de señalización reguladas por el complejo TTP-RE α .

IV. Hipótesis

TTP a través de su función como correpressor del RE α , regula genes/vías de señalización relacionadas al control de la proliferación celular que le confieren una función como supresor de tumores en cáncer mamario.

V. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Identificar los mecanismos responsables de la función como supresor tumoral del complejo TTP-RE α en cáncer mamario.

5.2 Objetivos específicos

- Generar una clona de células de cáncer mamario que sobreexpresa TTP.
- Identificar genes regulados por el complejo TTP-RE α en células de cancer mamario mediante la técnica de ATAC-Seq.



VI. Estrategia experimental y métodos

6.1 Material biológico

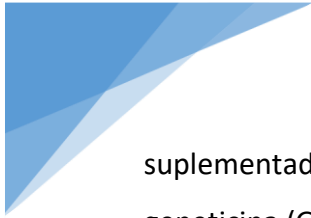
La línea celular de cáncer mamario parental T47D (RE α +) se utilizó en este estudio.

6.2 Cultivos celulares

Las células fueron cultivadas en placas Petri con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 2% de penicilina/estreptomicina e incubados a 37°C con 5% de CO₂. El medio fue renovado cada tercer día.

6.3 Generación de una clona T47D sobreexpresante de TTP

Para la sobreexpresión de TTP, el mRNA de TTP fue amplificado mediante RT-qPCR y clonado en el vector de expresión pCMV 3Tag-1 (Invitrogen). La secuencia de la construcción fue verificada mediante secuenciación de DNA en LARAGEN Inc. (Culver City, CA). La transfección fue realizada mediante el reactivo Transfection Superfect (Qiagen). Las células T47D fueron cultivadas en placas de 6 pozos hasta alcanzar un 40 - 60% de confluencia. El DNA plasmídico (1 μ g) fue diluido en 75 μ L de DMEM y posteriormente se añadió el Superfect (3 μ L/ μ g de DNA). Después de incubar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente, el complejo fue diluido con 500 μ L de DMEM suplementado con 10 % de SFB y adicionado a las células en cultivo. Después de 12 horas de incubación a 37°C y 5 % CO₂ el complejo fue retirado y remplazado por 1 mL de DMEM



suplementado con 10 % de SFB. Las células transfectadas establemente fueron seleccionadas con geneticina (Gibco) y posteriormente se aislaron clones individuales.

6.4 Western blot

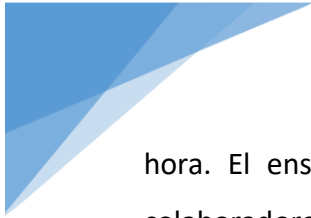
Las células fueron lisadas con buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % Deoxicolato de sodio, 0.1 % SDS, Inhibidor de proteasas). Posteriormente, las células fueron separadas por SDS-PAGE y detectadas por western blot con anticuerpo monoclonal anti-TTP, o anti-RE α . Las proteínas fueron visualizadas por incubación con anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón HRP (Thermo Scientific) y usando un ensayo de quimioluminiscencia (Thermo Scientific).

6.5 Ensayo de viabilidad y proliferación celular

La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de PrestoBlue (Invitrogen). 1×10^5 células fueron sembradas en placas de 12 pozos, e incubadas durante 72 horas a 37°C y 5% CO₂. 10 μ L de solución de Prestoblue fue añadida a cada pozo y las placas fueron incubadas durante 4 horas. Posteriormente, se midió la fluorescencia en un lector de placas Synergy H1 (Biotek) con una longitud de onda Excitación / Emisión 560/590 nm. Para evaluar la proliferación celular las células fueron cuantificadas por el método de Neubauer, verificando viabilidad celular con azul de tripano 0.4 %.

6.6 ATAC-Seq

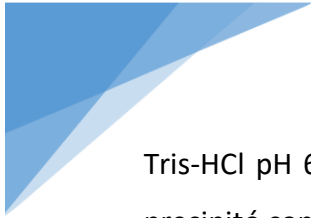
Las células fueron sembradas en DMEM con 10% SFB a 37°C y mantenidas en DMEM sin rojo fenol con 10% SFB tratado con carbón y dextran para eliminar los esteroides propios del SFB, por 72 horas antes del tratamiento. Posteriormente, fueron tratadas con 10 nM de 17 β -E₂ durante 1



hora. El ensayo de ATAC-Seq se realizó mediante el protocolo descrito por Buenrostro y colaboradores, 2013. Los núcleos fueron extraídos a partir de 50 000 células y resuspendidos en el mix de reacción de la transposasa (FC - 121-1020; Illumina). La reacción de transposición se realizó a 37°C durante 30 minutos, y las muestras fueron purificadas usando el kit Qiagen PCR MiniElute (28006; Quiagen). Los fragmentos de la biblioteca se amplificaron usando PCR primers Nextera (FC – 121-1011; Illumina) y NEBnext PCR master mix (0541; New England Lab) durante 6-8 ciclos. Las bibliotecas fueron purificadas y seleccionadas de acuerdo al tamaño (100-450 pb) usando Agencourt AMPure XP (A63880; Beckman Coulter). Las bibliotecas seleccionadas fueron cuantificadas usando el Agilent Bioanalyzer. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a secuenciación de siguiente generación.

6.7 Ensayo de co-inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Las células fueron sembradas en DMEM con 10 % SFB a 37 °C y mantenidas en DMEM sin rojo fenol con 10 % SFB deslipidado por 72 horas antes del tratamiento. Posteriormente, fueron tratadas con 10 nM de 17β-E₂ o vehículo (etanol) durante 1 hora. Se realizó el crosslink de las células con 1 % de formaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 0.125 M de glicina y fueron lavadas tres veces con PBS. Las células fueron resuspendidas en buffer de lisis (1 % SDS, 50 mM, Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1X complete) y la cromatina fue fragmentada mediante sonicación (Diagenode's Biorruptor). La cromatina fue centrifugada por 5 minutos y se incubó durante toda la noche con perlas previamente acopladas a proteína G o anticuerpo anti TTP (SIGMA Aldrich T5452). Las perlas fueron lavadas utilizando cuatro buffers diferentes: Buffer bajo en sales (0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl), Buffer alto en sales (0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl), Buffer LiCl (0.25 mM LiCl, 1 % NP-40, 1 % deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl pH 8) y Buffer TE (10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA). Después de los lavados, se hicieron dos eluciones de las perlas, cada una con 185 µL de buffer de elución (1 % SDS, .01 M Na₂HCO₃) incubando a 65 °C durante 20 minutos y 1300 rpm. Las muestras eluidas se incubaron a 65° C durante 4 horas en presencia de 200 mM de NaCl, 10 mM EDTA y 40 mM de



Tris-HCl pH 6.5, para revertir el crosslink. Se realizó una extracción con fenol-cloroformo y se precipitó con 20 μg de glicógeno a -20°C durante toda la noche.

6.8 Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La extracción de RNA se realizó con el método de TRIzol (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del proveedor. Posteriormente el RNA fue tratado con DNAsa (Invitrogen). Se sintetizó cDNA mediante transcripción reversa utilizando los reactivos que se muestran en la tabla 1. La mezcla final se inactiva a 75°C durante 15 minutos y las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

Tabla 1. Reactivos utilizados para la síntesis de cDNA

Reactivo	Volumen
Oligo dt 500 ng/ μl	1 μL
dNTPs mix 10 mM	1 μl
RNA	2 μg
*calentar a 65°C durante 5 minutos	
Buffer 5x (fsb)	4 μL
DTT 0.1 M	2 μL
*calentar a 45°C durante 2 minutos	
Super Script II (200u/ μL) (Invitrogen)	1 μL
*calentar a 45°C durante 45 minutos	

6.9 PCR tiempo real

La reacción de PCR en tiempo real se realizó en un termociclador LightCycler 96 de Roche, bajo las condiciones de 30 ciclos con una temperatura de 95°C de fusión, $55-60^{\circ}\text{C}$ de alineamiento y 72°C de extensión y se preparó como se indica a continuación: 5 μL de SYBR Green (thermoscientific), 0.2 μL oligonucleótido 10 μM (sentido + antisentido), 3.8 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL de cDNA (muestra). La expresión génica relativa se calculó usando el método de $\Delta\Delta\text{C}_T$ y se normalizó con la expresión de GAPDH. Los oligonucleótidos de las secuencias evaluadas se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en ensayos de RTqPCR y ChIP qPCR

Gen		Oligonucleotido	Tamaño (Pb)
ZFP36 (CDS)	RTqPCR	Fw 5' ACCTTCCACTGTCACCCTCTGC 3' Rv 5' CGCTGCTGGCATATTCATCAGG 3'	192
PAK2 (CDS)	RTqPCR	Fw 5' CGACTCCAACACAGTGAAGCAG 3' Rv 5' TCACTACTGCGGGTCTTCTGT 3'	116
PIN1 (CDS)	RTqPCR	Fw 5' AGGACTTTGAGTCTCTGGCCTCAC 3' Rv 5' AGGCGTCTCAAATGGCTTCTG 3'	111
FOXK1 (CDS)	RTqPCR	Rv 5' ACACGCTGGAGGAGACAGC 3' Fw 5' GAGAGGTTGTGCCGGATAGA 3'	196
CMAS (CDS)	RTqPCR	Fw 5' CCTGTGCTGGAAAGAAGTGGCA 3' Rv 5' ATCCAACAGCCTTCTGGGCAGT 3'	122
GAPDH (CDS)	RTqPCR	Fw 5' ACATCAAGAAGGTGGTGAAG 3' Rv 5' CTGTTGCTGTAGCCAAATTC 3'	199
PAK2 (Promotor)	ChIP qPCR	Fw 5' TCAGGAGCAAGACTAGCCTGGC 3' Rv 5' ATCTCCGCTCCCAGGTTCAAG 3'	197
PIN1 (Promotor)	ChIP qPCR	Fw 5' AGAGCAGAGCTTTCGGGTGTGA 3' Rv 5' GCATCTCTGGGAATGGCAGCAG 3'	117
FOXK1 (Promotor)	ChIP qPCR	Fw 5' ACCGTGCTGAAAGGTGTGCATT 3' Rv 5' AATGGCCCCAAACGGAGAGAGT 3'	127
CMAS (Promotor)	ChIP qPCR	Fw 5' AGGCGTGGGAGGAAGATGGACT 3' Rv 5' TTCAGGGGGATGCCTTTGCTGC 3'	197

6.10 Niveles de expresión de TTP en tumores de cáncer mamario y tejido mamario normal y análisis de Kaplan-Meier

Para comparar los niveles de expresión de TTP en tumores de cáncer mamario y en tejido normal se utilizó la base de datos “Breast Cancer Gene-Expression Miner” (<http://bcgenex.ico.unicancer.fr/BC-GEM/GEM-Accueil.php?js=1>). Los resultados son mostrados como una gráfica de violín del log2 de la expresión de mRNA de TTP (P=0.0001, prueba de Dunnett-Tukey-Kramer). Las gráficas de tiempo libre de recaída (RFS) fueron generadas utilizando la base de datos de mRNA de la plataforma Kaplan-Meier plotter (<https://kmpplot.com>). Los análisis de supervivencia fueron restringidos al estatus de RE α y tratamiento con tamoxifeno. P<0.05 se consideró como significancia estadística.



6.11 Análisis estadísticos

Los experimentos fueron realizados por triplicado y se presentan como graficas de media \pm DE. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando la prueba T-Student con el software GraphPad Prism 8. $P < 0.05$ se consideró como significancia estadística.



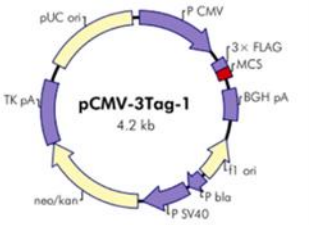
VII. Resultados

7.1 Sobreexpresión de TTP en células T47D

Para la sobreexpresión de TTP, la región codificante de TTP fue amplificada mediante RT-qPCR y clonada en el vector de expresión pCMV-3Tag1 (**Figura 3 A**). Mediante secuenciación de DNA se confirmó que la secuencia correspondiente a la región codificante de TTP fue clonada en el vector adecuadamente (**Figura 3 B**). Posteriormente, tanto el vector vacío (pCMV ctrl) como el vector conteniendo la región codificante de TTP (pCMV-TTP) fueron transfectados en las células T47D. Mediante la resistencia a geneticina conferida por el plásmido, se generó un pool de células resistentes a este antibiótico y posteriormente se corroboró que efectivamente las células transfectadas con el vector pCMV-TTP presentaban una sobreexpresión de TTP así como la etiqueta FLAG en el peso molecular correspondiente a TTP (37 Kda) conferida por el vector (**Figura 3 C**).

A partir del pool de células transfectadas con el vector pCMV-TTP se realizó una selección clonal, para aislar y propagar clones individuales. Esto con el fin de obtener poblaciones con una sobreexpresión constante de TTP. Se lograron aislar cinco clones de las cuales tres presentaban una evidente sobreexpresión de TTP con respecto al control (**Figura 4 A**). De ellas se seleccionó la clona 5, la cual era la que presentaba una mayor sobreexpresión de TTP (a partir de aquí T47D TTP+) (**Figura 4 B**). Posteriormente, evaluamos los niveles de expresión del RE α , para verificar que la sobreexpresión de TTP no modificaba su expresión (**Figura 4 B**).

A



B

pCMVctf 03

```

NNNNNNCTCCNCGNCGGCGGCGCCNCCATGGATTAACAAGGATGACGACGATAAGGACTATAAGGACGATGATGACAGGAGACTACAAGGATGATGACGATAAAGCCCGGGC
GGATCCCGCCGGGCTCCGATGATATATCAAGGATTAACAAGGATGACGACGATAAGGACTATAAGGACGATGATGACAGGAGACTACAAGGATGATGACGATAAAGCCCGGGC
CCTATAGTGAATCGATATTAAGATTGATCGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
CTGGAGAGGTGACATCCCGGCTGCTCTTCTTCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
GGATGATGATGAGACACATCTCCCGGATCCTCGGAAAGAGAAATTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TTNAAAGAAATAAAATAAATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
CNAAANNNNNANACTACTCTTCAAGGATTAACAAGGATGACGACGATAAGGACTATAAGGACGATGATGATGACAGGAGACTACAAGGATGATGACGATAAAGCCCGGGC
GAGGACTGNNNNNANNNNNNGGNDACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

```

pCMVtpp 13

```

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
CGGATCCCGCCGGGCTCCGATGATATATCAAGGATTAACAAGGATGACGACGATAAGGACTATAAGGACGATGATGATGACAGGAGACTACAAGGATGATGACGATAAAGCCCGGGC
CGGATCCCGCCGGGCTCCGATGATATATCAAGGATTAACAAGGATGACGACGATAAGGACTATAAGGACGATGATGATGACAGGAGACTACAAGGATGATGACGATAAAGCCCGGGC
CTTATAGTGAATCGATATTAAGATTGATCGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
CTGGAGAGGTGACATCCCGGCTGCTCTTCTTCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
GGATGATGATGAGACACATCTCCCGGATCCTCGGAAAGAGAAATTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TTNAAAGAAATAAAATAAATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
CNAAANNNNNANACTACTCTTCAAGGATTAACAAGGATGACGACGATAAGGACTATAAGGACGATGATGATGACAGGAGACTACAAGGATGATGACGATAAAGCCCGGGC
GAGGACTGNNNNNANNNNNNGGNDACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

```

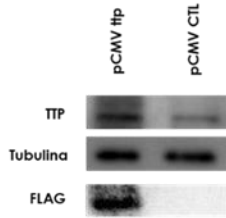
pCMVtpp 17

```

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
CGGATCCCGCCGGGCTCCGATGATATATCAAGGATTAACAAGGATGACGACGATAAGGACTATAAGGACGATGATGATGACAGGAGACTACAAGGATGATGACGATAAAGCCCGGGC
CGGATCCCGCCGGGCTCCGATGATATATCAAGGATTAACAAGGATGACGACGATAAGGACTATAAGGACGATGATGATGACAGGAGACTACAAGGATGATGACGATAAAGCCCGGGC
CTTATAGTGAATCGATATTAAGATTGATCGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
CTGGAGAGGTGACATCCCGGCTGCTCTTCTTCAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
GGATGATGATGAGACACATCTCCCGGATCCTCGGAAAGAGAAATTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TTNAAAGAAATAAAATAAATCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
CNAAANNNNNANACTACTCTTCAAGGATTAACAAGGATGACGACGATAAGGACTATAAGGACGATGATGATGACAGGAGACTACAAGGATGATGACGATAAAGCCCGGGC
GAGGACTGNNNNNANNNNNNGGNDACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

```

D



C

Selección de estables
750 µg/ml Geneticina ; 7 días

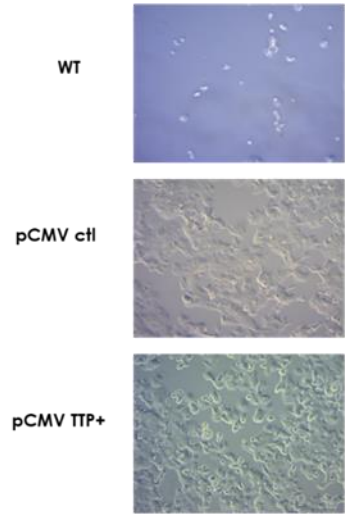


Figura 3. Sobreexpresión de TTP en células T47D. A) Para la sobreexpresión de TTP, el RNAm de TTP (999 pb) fue amplificado mediante RT-qPCR y clonado en el vector pCMV -3Tag-1. La secuencia de la construcción fue verificada mediante **B)** secuenciación de DNA. **C)** Las células T47D con expresión estable del plásmido pCMV-ctl (vector vacío) ó pCMV-TTP fueron seleccionadas mediante la resistencia a geneticina conferida por el plásmido. **D)** Western blot de los niveles de expresión de TTP, FLAG y Tubulina en los pools de células transfectadas con pCMV-ctl y pCMV-TTP.

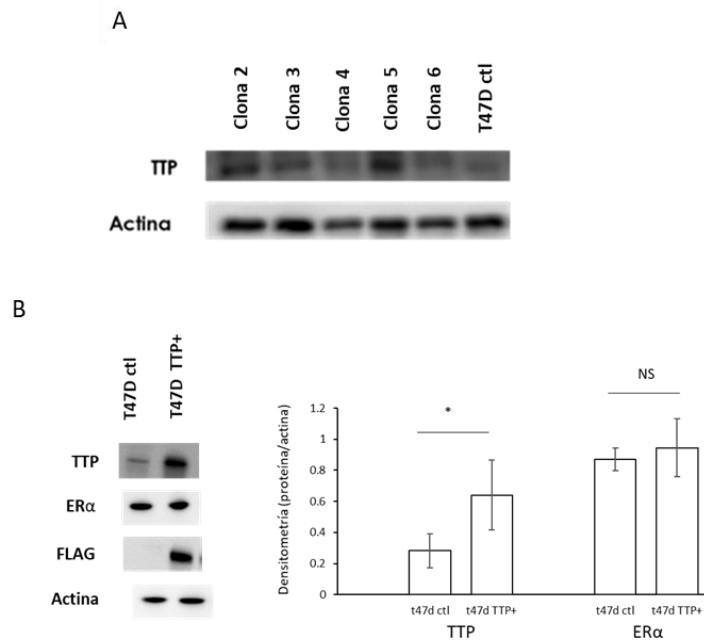


Figura 4. Aislamiento y propagación de células T47D sobreexpresantes de TTP. A) Western Blot de TTP en las cinco clonas aisladas de células T47D sobreexpresantes de TTP. **B)** Western blot de TTP, RE α , FLAG y Actina de la clona 5 sobreexpresante de TTP (T47DTTP+) y en las clonas aisladas de las líneas. * denota diferencias estadísticamente significativas (t de Student; $p < 0.05$).

Diversos estudios han demostrado que el RE α , en células cancerosas mamarias, juega un rol importante en promover la proliferación celular (Jordan et al., 1995); por lo cual, se evaluó si la línea T47D TTP+ presentaba este fenotipo. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de TTP fue acompañada por una disminución en la proliferación (**Figura 5 A**) y viabilidad celular (**Figura 5 B**) con respecto a T47D wt y T47D ctl. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las líneas T47D wt y T47D ctl. En la **Figura 5 B** se muestran las microfotografías de cada línea celular, en donde se puede observar la evidente disminución en la densidad celular cuando las células sobreexpresan a TTP.

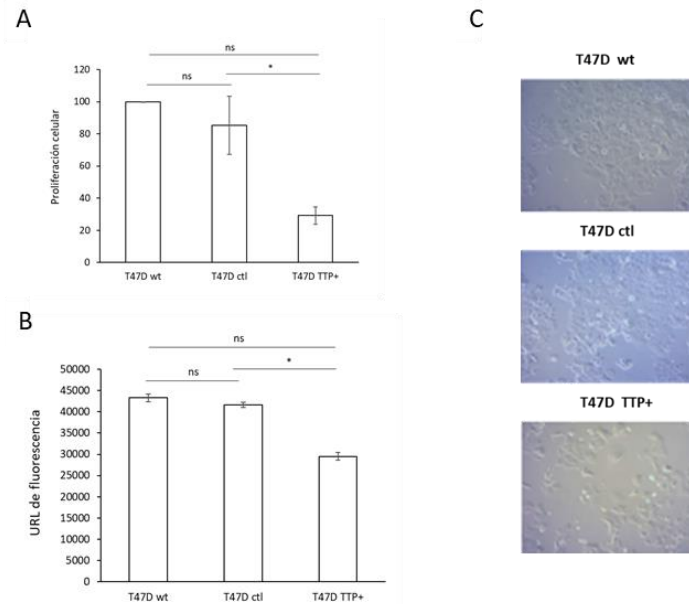


Figura 5. La sobreexpresión de TTP disminuye la proliferación y viabilidad celular. A) Ensayo de proliferación celular y B) viabilidad celular de las líneas T47D wt, T47D ctl y T47D TTP+ a los 8 días de cultivo. C) Micrografías (4x) de las líneas T47D wt, T47D ctl y T47D TTP+. * denota diferencias estadísticamente significativas (t de Student; $p < 0.05$). ns denota diferencias estadísticamente no significativas (t de Student; $p < 0.05$).

7.2 Análisis de la accesibilidad a la cromatina mediante ATAC-Seq

El ensayo de cromatina accesible a la transposasa seguido por secuenciación de alta resolución (ATAC-Seq) es un ensayo que permite evaluar la accesibilidad a la cromatina en todo el genoma e inferir las posibles regiones de la cromatina que están siendo reguladas por una proteína. Se basa en utilizar una transposasa hiperactiva conocida como Tn5 que puede interaccionar con las regiones de cromatina en estado accesible y generar cortes en el DNA, y al mismo tiempo ligar adaptadores de la secuenciación, los cuales permiten generar bibliotecas de todas las regiones con cromatina accesible para posteriormente secuenciarlas (Buenrostro et al 2013). Se realizó ATAC-Seq en células T47D control y sobreexpresante de TTP tratadas con E2 para identificar las posibles regiones que están siendo reguladas por TTP.

7.2.1 Calidad de la secuencia y mapeo con el genoma de referencia

Los datos crudos de la secuenciación fueron filtrados para obtener datos de secuenciación de alta calidad para su posterior análisis. En la **Tabla 3** se muestran las estadísticas de las lecturas crudas. Posteriormente usando el software Bowtie2 se mapearon las lecturas de alta calidad secuenciadas de cada muestra al genoma de referencia y se calculó la tasa de mapeo, la cual es el porcentaje de lectura limpias que pueden ser mapeadas al genoma de referencia con respecto al número total de lecturas limpias. Los resultados del mapeo se muestran en la **Tabla 4**, donde se puede observar que se obtuvo una tasa de mapeo de 51.84 % y 51.97 % en células control y sobreexpresantes de TTP respectivamente, así como 24 y 35 millones de lecturas únicas mapeadas respectivamente. Después del alineamiento, las lecturas que se parearon incorrectamente o con baja calidad de mapeo fueron eliminadas. De igual manera las lecturas mitocondriales, las cuales son más accesibles debido a la carencia de empaquetamiento, y las lecturas duplicadas, las cuales son artefactos de la amplificación por PCR, fueron removidas para mejorar la detección de regiones con cromatina abierta y reducir el número de falsos positivos (Yan et al 2020).

Tabla 3. Estadísticas de las lecturas crudas

Muestra	Lecturas crudas	Bases crudas	GC(%)	Q20	Q30	Calidad promedio
CTL.E2	80669784	12.181	37.855	96.155	90.605	35.335
TTP.E2	72231536	10.907	34.7	96.395	90.82	35.395

Tabla 4. Estadísticas de las lecturas mapeadas

Muestra	Lecturas totales	Lecturas mapeadas	Lecturas únicas mapeadas	DNA mitocondrial	Duplicaciones
CTL.E2	73414676	38055221 (51.84%)	24315014 (33.12%)	10549081.0 (14.37%)	51282 (0.07%)
TTP.E2	107885650	56066791 (51.97%)	35612416 (33.01%)	15137419.0 (14.03%)	51909 (0.05%)

Posteriormente, se calculó el grado de dispersión de longitud del inserto, el cual puede reflejar directamente la purificación durante la preparación de la biblioteca. La longitud del inserto es

calculada a través de la distancia entre el inicio y el final de la lectura en ambos extremos del inserto en el genoma de referencia. En la **Figura 6 A y B** se muestran las gráficas de dispersión de longitud del inserto para ambas muestras en donde se pueden observar picos decrecientes y periódicos correspondientes a las regiones libres de nucleosomas (NFR) (<100pb) y mono-, di- y trinucleosomas (~200, 400 y 600 respectivamente). Posteriormente, usando el software deepTools v2.07 se graficó la distribución de las lecturas secuenciadas en una ventana de 3 kb río arriba y río abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de cada gen (**Figura 7 A**). Se puede observar que los datos se encuentran enriquecidos cerca del TSS probando que los datos son buena calidad.

Utilizamos el método de “sliding window “para contar el enriquecimiento de lecturas en todo el genoma. Este método consiste en dividir los cromosomas en pequeñas ventanas de 10 kb de longitud y posteriormente contar las lecturas mapeadas en cada ventana y calcular el coeficiente de correlación de Pearson del valor normalizado de lecturas mapeadas. En la **Figura 7 B** se muestra el heatmap de correlación entre las muestras en donde se puede observar que no hay correlación entre las células control y las células sobreexpresantes de TTP.

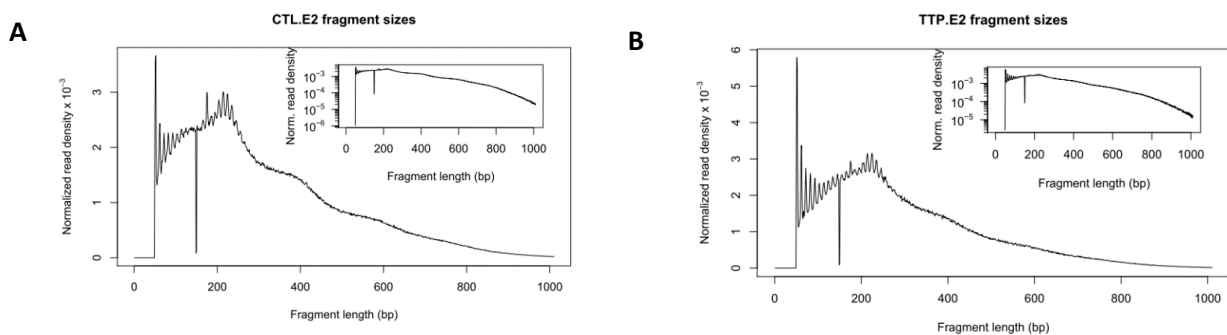


Figura 6. Distribución del tamaño del inserto. Graficas de dispersión del inserto de las **A)** células control y **B)** células sobreexpresantes de TTP.

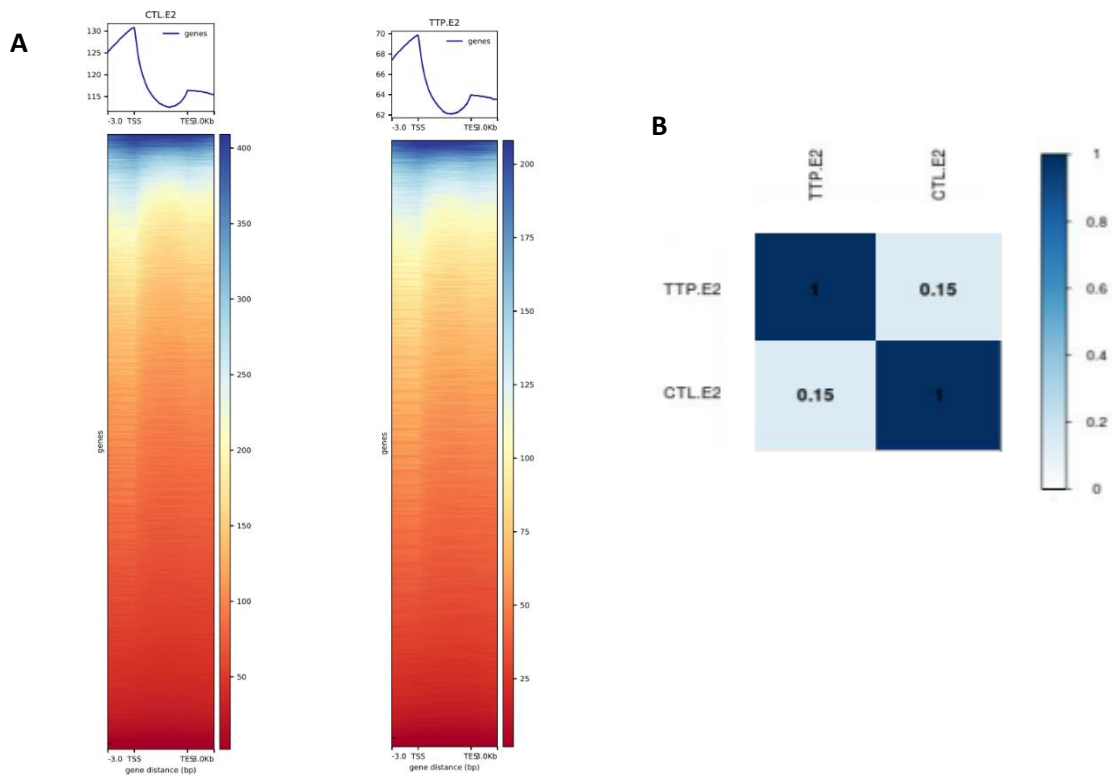
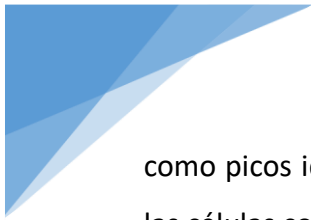


Figura7. Enriquecimiento de las lecturas cercas del sitio de inicio de la transcripción (TSS). A) Gráficas y heatmap de la distribución de las lecturas secuenciadas en una ventana de 3kb río arriba y río abajo del TSS de cada gen. **B)** Heatmap de correlación de las lecturas secuenciadas entre las células control y las células sobreexpresantes de TTP.

7.2.2 Identificación de regiones accesibles

Una vez que se han mapeado las lecturas con el genoma de referencia, el siguiente paso es identificar las regiones accesibles (también referidas como picos), lo cual es la base para los análisis subsiguientes (Yan et al., 2020). En nuestro proceso de análisis se utilizó el software MACS2 v2.1.1 para el llamado de picos. MACS2 incluye cuatro pasos: remover las lecturas redundantes, ajustar la posición de las lecturas, calcular el enriquecimiento de los picos y estimar el FDR (false discovery rate, que se define como la relación entre número de picos control con respecto al número de picos del ATAC-Seq). Finalmente, se seleccionaron los picos con $FDR < 0.05$



como picos identificados. En la **Tabla 5** se muestra la estadística de los picos identificados para las células control y sobreexpresantes de TTP.

Tabla 5. Estadísticas de las regiones accesibles

Sample	Number	Min_lenght	1st quarter lenght	Median	Mean	3rd quarter lenght	Max lenght
Ctl E2	87540	314	375	455	517.141615	588	3149
TTP E2	69960	303	358	429	473.289837	541	3271

Por otro lado, en la **Figura 8** se muestran las gráficas de “fold enrichment” y de “FDR distribution” que nos indican el grado de confiabilidad de los picos. El “fold enrichment” nos indica cuántas veces más sucedió algo de lo que cabría esperar por casualidad aleatoria, entre más grande el valor, mayor el número de lecturas que caen en ese pico. En la **Figura 8 A y C** se observa que todos los picos presentan un “fold enrichment” de por lo menos 2. Así mismo, la distribución FDR nos indica el grado de confiabilidad de cada pico, entre más grande el valor de $-\log_{10}(\text{FDR})$ más significativo el pico y menor probabilidad de que sea un falso positivo. En las **Figuras 8 B y D** se puede observar que solo se consideraron picos con un $\text{FDR} > 0.05$ para ambas líneas celulares.

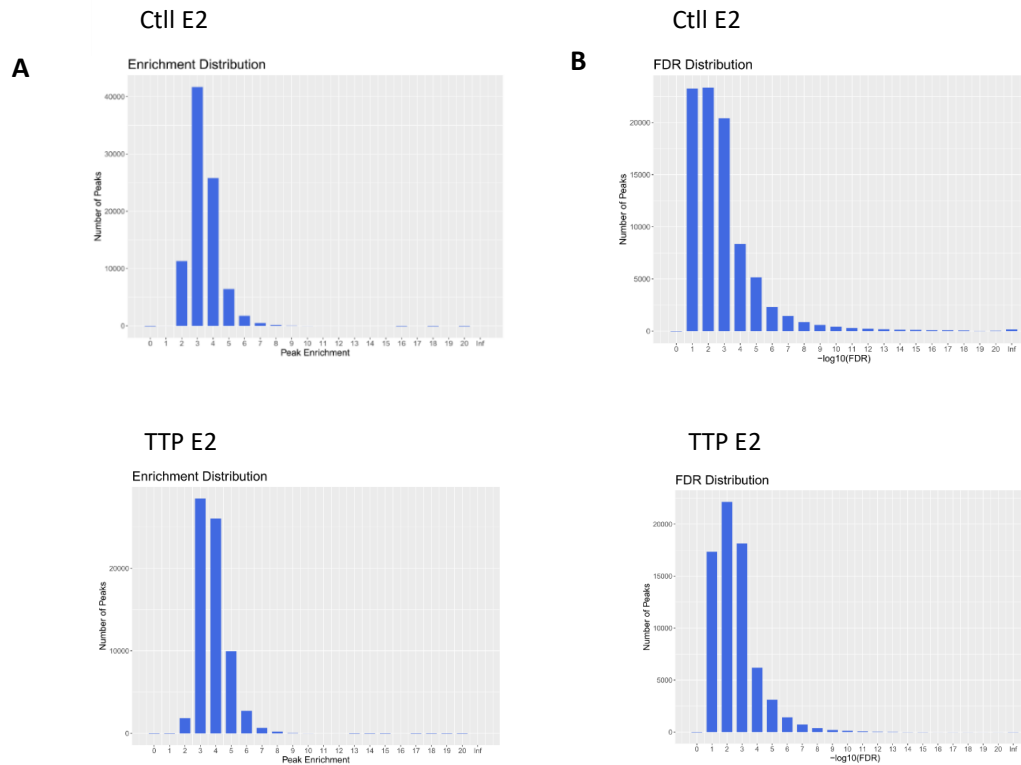


Figura 8. Grado de confiabilidad del llamado de picos. A) Graficas de fold enrichment y **B)** FDR distribución en células control y células sobreexpresantes de TTP.

7.2.3 Análisis diferencial de picos

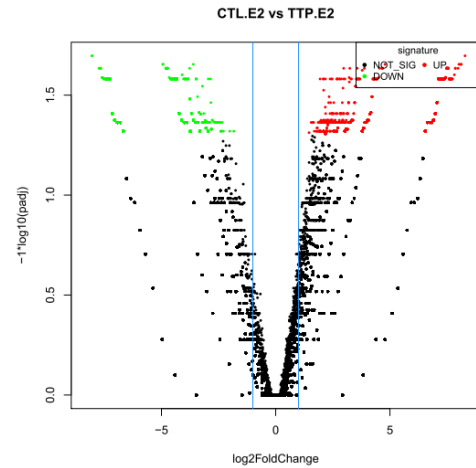
Para el análisis diferencial de picos, también conocido como análisis diferencial de regiones accesibles (DAR), utilizamos el “Diffbind package”, el cual nos permite encontrar los picos que se han incrementado o disminuido entre nuestras células que sobreexpresan a TTP con respecto a las células control. En la **Figura 9 A y B** se muestran los resultados del análisis diferencial de picos en donde se puede observar que al sobreexpresar a TTP hay un cambio en 7782 regiones de cromatina accesibles, de los cuales 4327 y 3455 disminuyeron y aumentaron su accesibilidad, respectivamente. Al analizar las regiones correspondientes a estos picos, podemos observar que la mayor parte de estos picos cayeron en regiones distales intergénicas (31.47 %). Interesantemente, un gran número de regiones cayeron en regiones promotoras (≤ 1 kb; 14.57%) (**Figura 9C**). Así mismo, se calculó la frecuencia de picos que caen en una ventana de 3000

pb río arriba y río abajo del TSS, encontrando que el enriquecimiento de picos se encuentra en el TSS (**Figura 9D**).

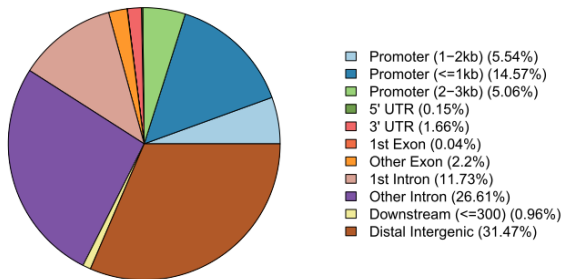
A

Grupo	Total DARs	DARs incrementados	DARs disminuidos
Ctl E2 vs TTP E2	7782	3455	4327

B



C



D

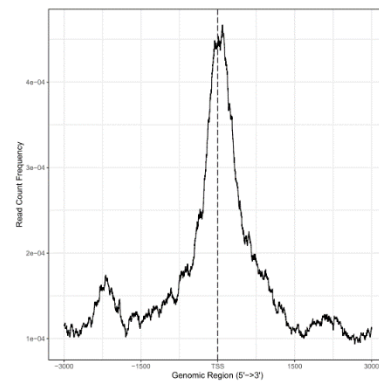


Figura 9. Análisis diferencial de picos entre células control y células sobreexpresantes de TTP. A) Estadísticas de las regiones diferencialmente accesibles identificadas (DARs). **B)** Grafica de volcán indicando las DARs (rojo: disminución de accesibilidad; verde: aumento de accesibilidad). **C)** Anotación de los picos diferenciales de acuerdo con cada elemento funcional del genoma. **D)** Frecuencia de lecturas de los picos diferenciales en una ventana de 3 kb río arriba y río abajo del TSS.

7.2.4 Análisis de enriquecimiento GO de los genes asociado a los picos diferencialmente disminuidos en la región promotora.

Gene Ontology (GO) es un sistema de clasificación internacional estandarizado de la función génica. El sistema de GO es dividido en tres principales categorías: 1) Componentes celulares, describe la localización de estructuras subcelulares y complejos macromoleculares. 2) Función molecular, describe funciones como actividad catalítica o de unión. 3) Procesos biológicos, describe los productos codificados por genes involucrados en procesos biológicos como mitosis o metabolismo de purinas (Gene ontology consortium 2004). En la **Figura 10** se muestra la distribución de la anotación del GO de los genes asociados a los picos diferencialmente disminuidos en la región promotora. Se puede observar que la sobreexpresión de TTP disminuye principalmente, la accesibilidad de promotores de genes relacionados a componentes celulares del citoplasma, del citosol y de los organelos unidos a membrana intracelular y proteínas de unión.

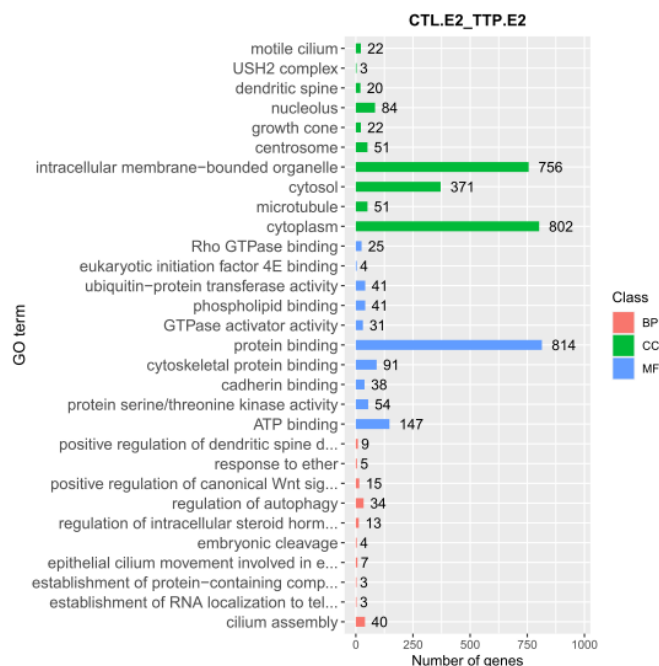


Figura 10. Análisis GO de enriquecimiento de genes asociados a picos diferenciales enriquecidos en la región promotora. BP denota proteínas relacionadas a Procesos biológicos, CC a componentes celulares y MF a función molecular.



7.2.5 Genes regulados por el complejo TTP-RE α

Utilizando bases de datos de CHIP seq del RE α y de diferentes marcas de histonas asociadas a promotores y “enhancers” activos (H3K27ac, H3K4me3) y reprimidos (H3K27me3), analizamos los picos diferencialmente expresados entre las células control y las células sobreexpresantes de TTP. Los resultados mostraron regiones de cromatina que disminuyeron al sobreexpresar a TTP y que caen dentro del locus de genes como cinasa 2 activada por (PAK2), peptidil-prolil cis-trans isomerasa que interactua con NIMA (PIN1) y el represor transcripcional de la unión a GATA 1 (FOXK1), las cuales coinciden con sitios de unión del RE α y de las marcas histonas H3K27ac y H3K4me3 (**Figura 11 A**), lo cual los sugiere como genes posiblemente regulados por el complejo TTP-RE α .

Para verificar que efectivamente estos genes están siendo regulados por el complejo TTP-RE α , realizamos CHIP-qPCR, evaluando si TTP se está reclutando en el promotor de estos genes. Para esto, la cromatina de las células T47D TTP+ tratadas con vehículo o E₂, fue inmunoprecipitada utilizando el anticuerpo contra TTP. Posteriormente, mediante qPCR se amplificaron fragmentos de la región promotora de los genes PAK2, PIN1 y FOXK1 (**Figura 11 B**). Los resultados mostraron un enriquecimiento de TTP en la región promotora de los tres genes con respecto al control (IgG) cuando las células fueron tratadas con vehículo y este enriquecimiento se incrementó cuando las células fueron tratadas con E₂.

Posteriormente se evaluó si este reclutamiento de TTP estaba asociado a una disminución en la expresión de transcrito de estos genes (**Figura 11 C**). Los resultados mostraron una disminución significativa en los niveles de mRNA de los genes PAK2 y PIN1 al sobreexpresar a TTP con respecto a las células control, tanto en células tratadas con vehículo como con E₂, mientras que en el gen FOXK1 no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados nos sugieren que los genes PAK2 y PIN1 están siendo regulados por el complejo TTP-RE α .

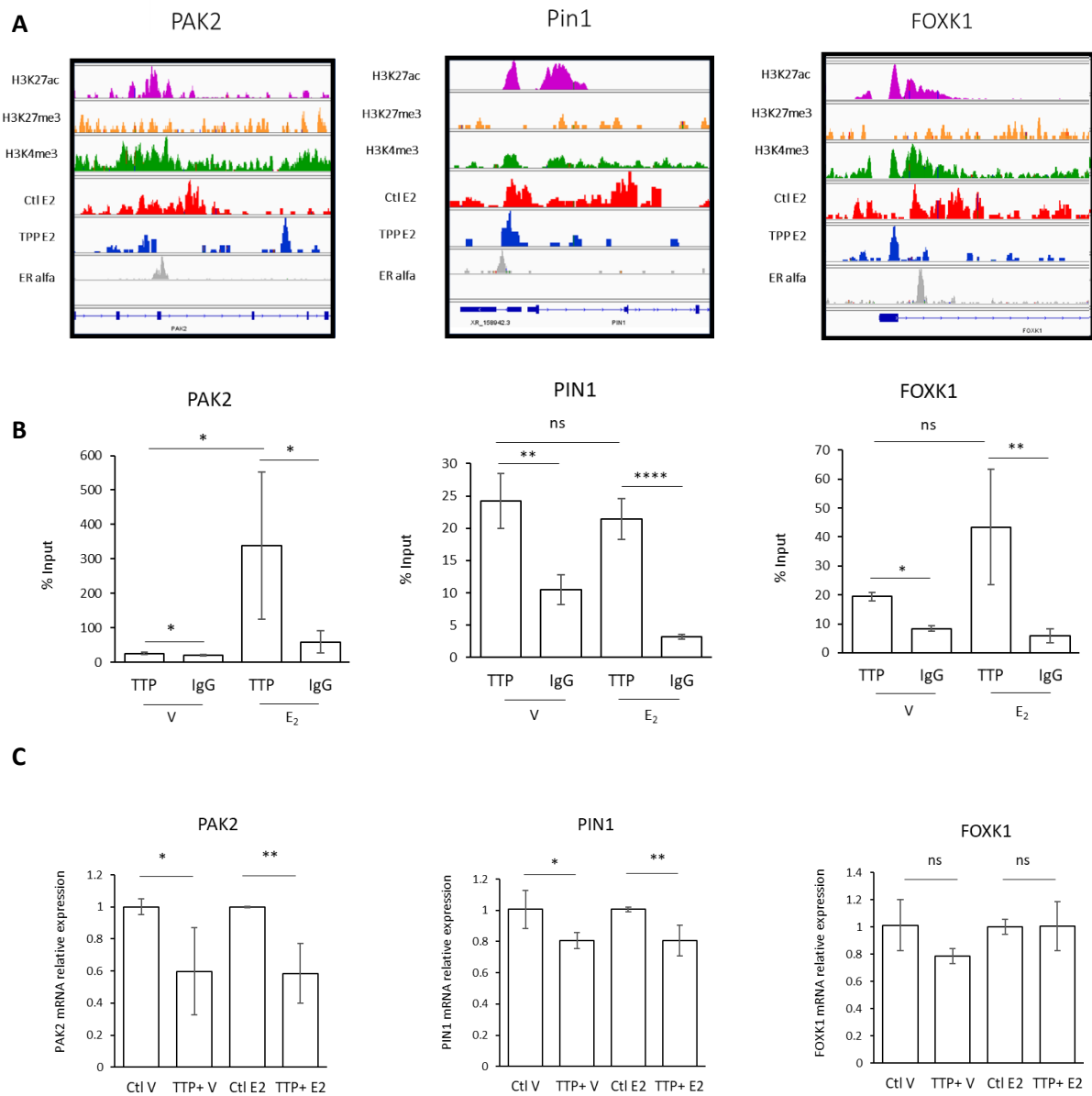
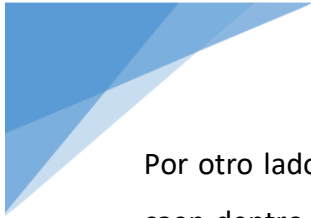


Figura 11. Genes candidatos regulados por el complejo TTP-RE α . **A)** Tracks representativos de los genes PAK2, PIN1 y FOXK1 (se indica los picos de CHIP-Seq de H3K27AC, H3K4me3, H3K27me3 y RE α , así como los picos de ATAC-Seq de células control (CTLE2) y células sobreexpresantes de TTP (TTPE2). **B)** Enriquecimiento de TTP en regiones promotoras en células sobreexpresantes de TTP evaluado mediante ChIP-qPCR. **C)** Niveles de transcritos de los genes PAK2, PIN1 y FOXK1 en células control (CTL) y sobreexpresantes de TTP (TTP+) tratadas con vehículo (V) o con estradiol (E₂).



Por otro lado, los análisis también arrojaron un gran número de regiones de la cromatina que caen dentro del locus de genes como CMAS, WNT5b, ATM, Inc0090, las cuales disminuyen su accesibilidad en región promotora al sobreexpresar a TTP, pero que no están asociadas a sitios de unión del RE α , pero si sobrelapan con sitios de unión de marcas de histonas asociados a promotores y enhancers (**Figura 12A**). Al evaluar uno de estos genes, la sintetasa de ácido N-Acetilneuramínico Citidina Monofosfato (CMAS), se encontró un reclutamiento de TTP en su región promotora y disminución en la expresión de su transcrito al sobreexpresar a TTP. (**Figura 12 A y B**). Estos resultados sugieren que TTP, no solo tienen efecto correpresor sobre el RE α , si no que, como se ha reportado previamente (Schichl et al., 2009; Liang et al., 2009; Barrios-García et al., 2016), también está reprimiendo la actividad transcripcional de otros factores de transcripción.

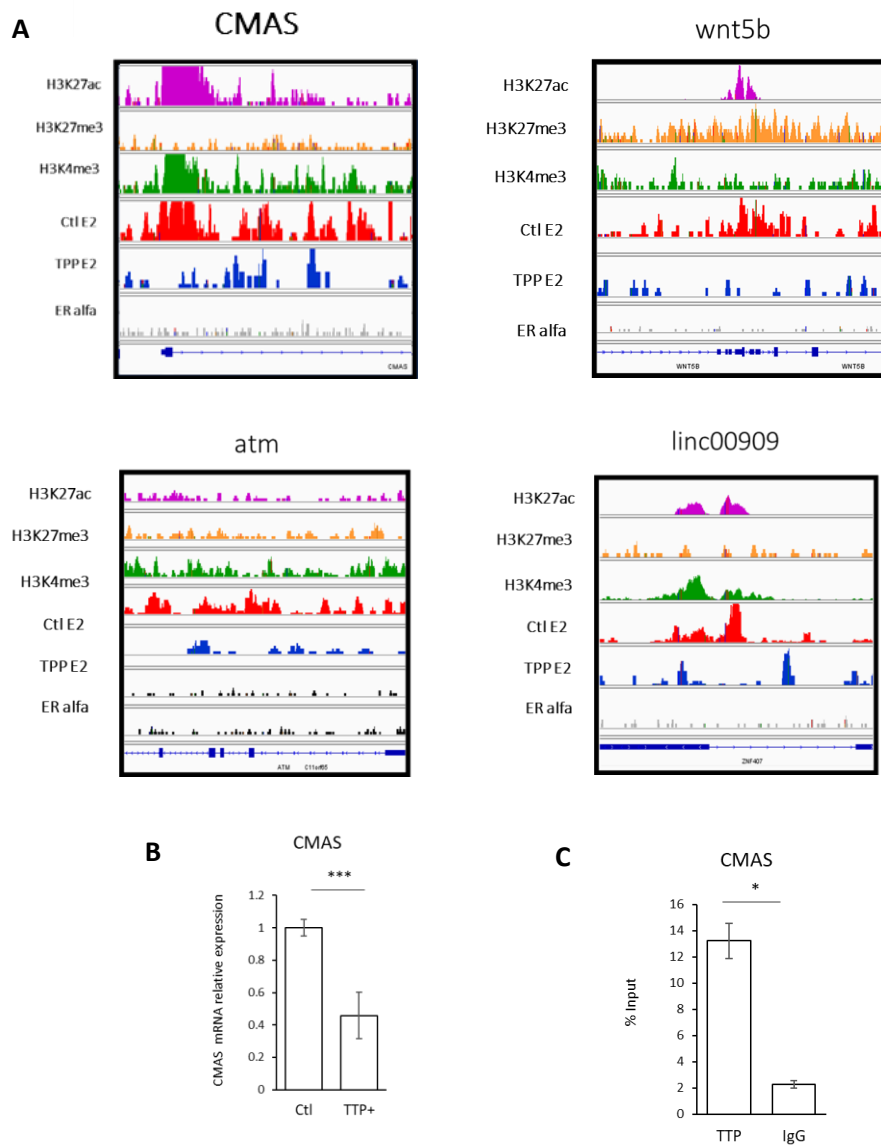


Figura 12. Genes candidatos regulados por TTP pero no por el RE α . **A)** Tracks representativos de los genes CMAS, WNT5 y LINC00909 (se indica los picos de ChIP-Seq de H3K27AC, H3K4me3, H3K27me3 y RE α , así como los picos de ATAC-Seq de células control (CTLE2) y células sobreexpresantes de TTP (TPPE2). **B)** Enriquecimiento de TTP en región promotora del gen CMAS en células T47D sobreexpresantes de TTP, evaluado mediante ChIP-qPCR. **C)** Niveles de transcrito del gen CMAS en células T47D control (CTL) y sobreexpresantes de TTP (TTP+) tratadas con vehículo (V) o con estradiol (E $_2$).

7.2.5 Análisis de motivos

Los picos identificados en el ATAC-Seq, son regiones de cromatina abierta que pueden contener sitios de unión de factores de transcripción, conocidos como motivos. Estos motivos juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica mediada por factores de transcripción (Yan et al 2020). Por lo anterior, identificamos los motivos enriquecidos en los picos diferencialmente expresados entre células control y sobreexpresantes de TTP. Para esto, utilizamos el software MEME -ChIP 4.11.2 el cual utiliza dos herramientas, MEME y Dreme, para la identificación de motivos y posteriormente utiliza la herramienta Tomtom para alinearlos con la base de datos JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>). Finalmente utiliza la herramienta FIMO para anotar los motivos identificados. En la **Tabla 6** se muestran los motivos identificados en donde se puede observar que los motivos más representados en las regiones que disminuyen su accesibilidad a la cromatina al sobreexpresar a TTP fueron los motivos reconocidos por los factores de transcripción: transductor de señales y activador de la transcripción (STAT2) y proteína 1 del dedo de zinc del dominio PR (PRDM1).

Tabla 6. Motivos enriquecidos en los picos diferencialmente expresado entre células control y sobreexpresantes de TTP

Ctl E2 vs TTP E2

#Query ID	Target ID	Factor	Optimal offs	p-value	E-value	q-value	Overlap	Query conse	Target conse	Orientation
1	MA1623.1	Stat2	2	0.00015544	0.115957	0.231914	11	TCTCTGTCTC	AGTTTCTGTT	-
1	MA0508.3	PRDM1	-1	0.00095535	0.712694	0.598948	10	TCTCTGTCTC	TTCTTCTCT	+
2	MA1619.1	Ptf1a(var.2)	6	0.00018766	0.139996	0.132164	6	CTGTGC	GCACAGCTG	+
2	MA1620.1	Ptf1a(var.3)	6	0.00029989	0.223719	0.132164	6	CTGTGC	ACACACCTG	+
2	MA1629.1	Zic2	7	0.00038556	0.287627	0.132164	6	CTGTGC	CCCCCTGCTC	-
2	MA1646.1	OSR2	6	0.00044457	0.331649	0.132164	6	CTGTGC	CTGCTTCTGT	-
2	MA1618.1	Ptf1a	7	0.00070516	0.526046	0.174694	6	CTGTGC	TAAACATCTC	-
2	MA1641.1	MYF5	6	0.00106065	0.791246	0.197073	6	CTGTGC	GAAACAGCTG	+
2	MA1621.1	Rbpjl	7	0.00120273	0.897236	0.197212	6	CTGTGC	CGAACACCT+	+
2	MA1600.1	ZNF684	12	0.00132675	0.989754	0.197212	6	CTGTGC	TAAAGGGGT-	-
4	MA1125.1	ZNF384	6	0.00103708	0.77366	0.971402	6	AAAAAA	TTTAAAAAA	+
5	MA1643.1	NFIB	0	0.00034584	0.257995	0.46811	6	TACCTG	TGCCTGGCA	+
5	MA1628.1	Zic1::Zic2	0	0.00062966	0.469726	0.46811	6	TACCTG	CCCCTGCTGT	-
5	MA0744.2	SCRT2	3	0.00115366	0.860627	0.470563	6	TACCTG	AACCACCTG	-
5	MA1629.1	Zic2	1	0.00126592	0.944374	0.470563	6	TACCTG	CCCCCTGCTC	-
6	MA1597.1	ZNF528	4	0.00085146	0.635187	0.694676	6	TGGCTT	GAAATGGCT-	-
6	MA0092.1	Hand1::Tcf3	4	0.00093154	0.694929	0.694676	6	TGGCTT	GGTCTGGCA	+
8	MA0520.1	Stat6	6	0.00096265	0.718134		1	CAGAGA	CATTCCTGA	+
13	MA0140.2	GATA1::TAL1	4	2.76E-06	0.00205756	0.00411086	6	CTTTGA	CTGCTCCTCA	-
13	MA0615.1	Gmeb1	0	0.0006705	0.500195	0.333118	6	CTTTGA	CCATCGTACC	-
14	MA0140.2	GATA1::TAL1	8	5.88E-06	0.00438648	0.00875205	6	AAAAAA	CTTATCTGTG	+
14	MA0615.1	Gmeb1	11	0.00028176	0.210194	0.134151	6	AAAAAA	GAGGTGACG	+
14	MA1579.1	ZBTB26	9	0.00045066	0.336195	0.134151	6	AAAAAA	TACTCCAGA	+
14	MA1149.1	RARA::RXRG	7	0.00053656	0.400272	0.134151	6	AAAAAA	GAGGTCATG	+



7.3 Correlación entre los niveles de expresión de mRNA de TTP y el tiempo libre de recaída

El análisis de bases de datos de proteínas y mRNA de tumores mamarios nos permite estudiar el impacto de los niveles de expresión de TTP en los niveles de progresión tumoral, enfermedad metastásica y respuesta al tratamiento. Por tal motivo, los niveles de mRNA de TTP en tumores, tejido tumoral adyacente y tejido normal de pacientes se compararon utilizando la base de datos “Breast Cancer Gene-Expression Miner”. Los resultados confirman que en promedio los tumores de cáncer mamario exhiben una reducción de 6 veces los niveles de mRNA comparado con tejido tumoral adyacente o tejido saludable ($p=0.0001$, Dunnett-Tukey-Kramer’s test) (**Figura 13 A**).

Para explorar el efecto de la reducción en los niveles de expresión de TTP en el pronóstico de los pacientes con cáncer mamario utilizamos el estimador de Kaplan-Meier para comparar el tiempo de libre de recaída (RFS) entre pacientes con tumores con baja y alta expresión de mRNA de TTP. Los resultados mostraron que los pacientes con tumores positivos para el RE α y con baja expresión de transcrito de TTP tienen significativamente menor RFS que los pacientes con altos niveles de expresión de TTP (**Figura 13 B**). Adicionalmente, se puede observar que, en pacientes con tumores negativos para el RE α , la RFS no mostró una asociación significativa con los niveles de expresión de TTP (**Figura 13 C**).

Interesantemente, al comparar los datos de RFS de pacientes con cáncer mamario que recibieron el modulador selectivo del RE α tamoxifeno como parte de su tratamiento, reveló que los individuos con bajos niveles de expresión de mRNA de TTP tienen significativamente menor RFS que pacientes con tumores con altos niveles de TTP (**Figura 13 D**).

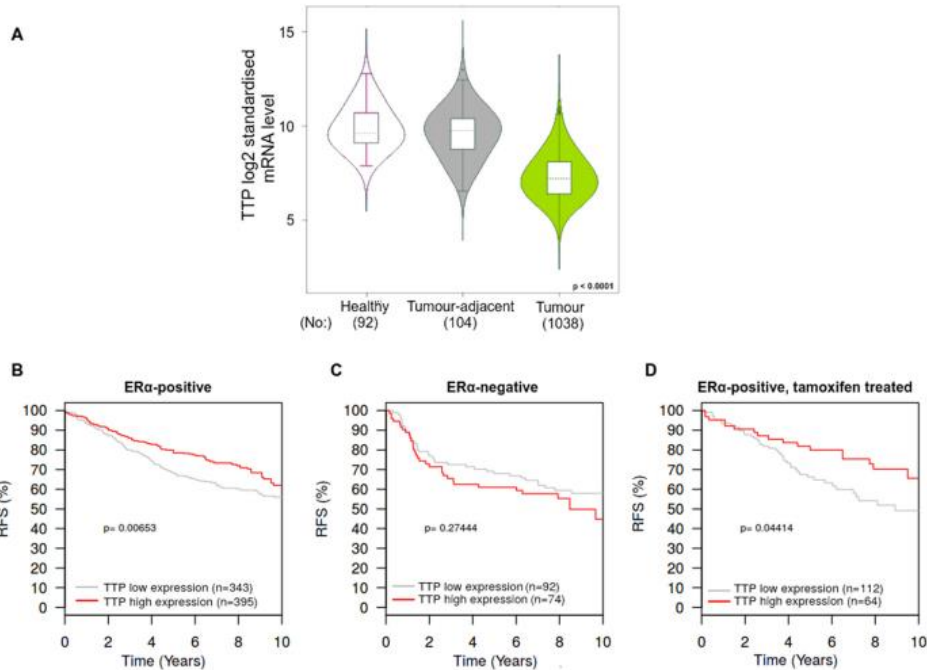


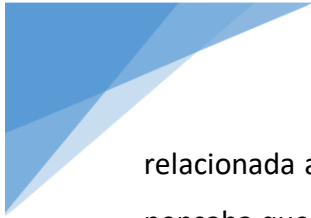
Figura 13. Expresión de TTP en tumores de cáncer mamario y análisis de Kaplan-Meier de la asociación entre la expresión de TTP y el tiempo libre de recaída (RFS) en pacientes de cáncer mamario. A) Grafica de violín del log₂ de los niveles de expresión de TTP usando la base de datos “Breast Cancer Gene-Expression Miner Data Base” ($p=0.0001$, prueba de Dunnet-Tukey-Kramer). Graficas de tiempo libre de recaída con relación a los niveles de expresión de TTP en **B) pacientes con cáncer mamario REα+, **C)** pacientes con cáncer mamario REα y **D)** pacientes con cáncer mamario REα+ y que fueron tratadas con tamoxifeno ($p<0.05$).**



VIII. Discusión

La caracterización inicial de la secuencia de aminoácidos de TTP, reveló la presencia de un dominio doble de dedos de zinc en su estructura proteica; esta característica, aunado a su localización nuclear y habilidad para promover la transcripción de un gen reportero en células humanas (Murata et al., 2000), llevaron a proponer que TTP era un factor de transcripción. La función de TTP como factor regulador de la transcripción, fue reportado por primera vez por Dudziak y colaboradores (Dudziak et al., 2008) cuando encontraron que TTP se une a la proteína HNF1b (hepatocyte nuclear factor 1b), un factor de transcripción tejido-específico asociado a la diabetes tipo MODY5 y anomalías congénitas del riñón y el tracto urinario. En cultivos celulares la unión de TTP a HNF1b redujo su actividad transcripcional mientras que la sobreexpresión de TTP dañó la nefrogénesis en embriones de *Xenopus* (Dudziak et al 2008). Ellos concluyeron que TTP regula a HNF1b de una manera independiente de su función desestabilizadora de mRNA. Sin embargo, el mecanismo responsable permaneció desconocido. Posteriormente, en 2009, Liang y colaboradores, mientras reexaminaban el rol de TNF- α en el síndrome inflamatorio desarrollado por ratones TTP-KO, encontraron que la expresión de TTP inhibe la actividad promotora de TNF α (Liang et al 2009). Mientras exploraban el mecanismo responsable, ellos transfectaron a TTP en células embrionarias de riñón humano HEK293 y encontraron que se reprimía la activación génica de TNF- α dependiente de NF- κ B. Mecánicamente, TTP mostró interactuar con la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B en la región promotora de sus genes blanco. La unión de TTP promovió el reclutamiento de las histonas deacetilasas HDAC1, HDAC3 y HDAC7 (Liang et al., 2009; Chen et al., 2004; Pejanovic et al 2012), sugiriendo que TTP controla la respuesta inflamatoria a través de actuar como correpresor transcripcional de NF- κ B. Más recientemente, Barrios García y colaboradores demostraron que TTP reduce la transactivación del RE α a través de interactuar con su dominio AF1 y su dominio de unión al DNA y promoviendo el reclutamiento de deacetilasas de histonas, particularmente de HDAC1 (Barrios-García et al., 2014).


TTP es una proteína que ha sido reportada como un supresor de tumores cuya expresión es reducida en cáncer mamario, la forma más frecuente de neoplasia y la segunda causa de muerte



relacionada a cáncer en mujeres en todo el mundo (Bray et al., 2018). Hasta recientemente, se pensaba que el efecto anti-proliferativo de TTP en células de cáncer mamario RE α positivas, era mediado por la desestabilización y degradación de mRNAs codificando factores celulares involucrados en la proliferación celular, metástasis e invasión (Milke et al., 2013). Sin embargo, el descubrimiento de que TTP en el núcleo de las células actúa como un corregulador transcripcional sugiere que TTP puede afectar el desarrollo tumoral no solo por su función citoplasmática, sino también por la nuclear.


En este trabajo, mediante ensayos de secuenciación masiva de accesibilidad a la cromatina, se identificaron algunos genes que pueden estar siendo regulados a través de la función nuclear de TTP en células de cáncer mamario. Los resultados de ATAC-Seq permitieron identificar diferentes regiones de la cromatina cuya accesibilidad disminuye al sobreexpresar a TTP y de las cuales un gran número corresponden a regiones reguladoras como promotores y enhancers, demostrando la relevancia que tiene TTP en la regulación de la transcripción génica en células de cáncer mamario positivo al RE α . Mediante análisis de GO pudimos observar que la sobreexpresión de TTP afecta la accesibilidad a la cromatina principalmente de genes relacionados a componentes celulares del citoplasma, del citosol y de organelos unidos a la membrana intracelular y a proteínas de unión. Interesantemente, también se encontró un gran número de regiones de la cromatina cuya accesibilidad se incrementó al sobreexpresar a TTP. Sin embargo, es importante señalar que estos cambios en la accesibilidad a la cromatina pueden deberse tanto a la función citoplasmática como nuclear de TTP.

Al analizar los diferentes picos que caían en regiones promotoras al sobreexpresar a TTP, se encontraron algunos picos que se solapaban con picos de unión del RE α , lo cual sugiere que estos locus podrían ser sitios de unión del complejo TTP-RE α . Dentro de estos locus se encuentran promotores de diferentes genes que previamente han sido reportados estar sobreexpresados en modelos celulares y tumores de pacientes con cáncer mamario, como por ejemplo PAK2, PIN1 y FOXK1 (Xiao et al., 2018, Rajbhandari et al., 2012, Garry et al., 2020). Consistentemente con la disminución en la accesibilidad a la cromatina en los promotores de PAK2, PIN1, encontramos una disminución en la expresión de transcrito de estos genes al sobreexpresar a TTP, mientras que en FOXK1 no encontramos ninguna diferencia. Para asegurarnos de que esta disminución tanto




en la accesibilidad de la región promotora como en los niveles de transcrito de estos genes se debía a la función nuclear de TTP como correpressor y no a su función citoplasmática, realizamos CHIP qPCR, inmunoprecipitando a TTP y evaluando las regiones promotoras. Interesantemente, encontramos un enriquecimiento de TTP en el promotor de los tres genes. Los resultados observados con los genes PAK2 y PIN1, aunados al sobrelape con los picos observados en los resultados del ATA-Seq con picos de unión del RE α , nos permiten inferir que estos genes están siendo regulados por el complejo TTP-ER α . Por otro lado, el hecho de que en FOXK1 observamos un reclutamiento de TTP y del RE α en su región promotora, pero no observamos cambios en la transcripción nos sugieren que bajo esas condiciones el complejo TTP se está uniendo a esa región genómica, pero no está teniendo efectos sobre la actividad transcripcional de receptor.

Tanto PAK2 como PIN1 son proteínas que han sido asociadas a la progresión del cáncer mamario u otros tipos de carcinomas (Liu et al., 2021; Xiao et al., 2018; Rajbhandari et al., 2012). La familia de proteínas cinasas activadas por p21 (PAKs) son cinasas de serina treonina que participan en diversos procesos celulares como crecimiento, apoptosis, mitosis, respuesta inmune, motilidad, inflamación y expresión génica y la mayoría de los miembros de esta familia de cinasas tienen efectos oncogénicos en el desarrollo de diversos cánceres (Liu et al 2021). En células de cáncer gástrico se ha observado que PAK2 puede interaccionar con la cinasa dependiente de ciclina 12 (CDK12) para activar la vía de señalización MAPK resultando en una desregulación de la fase G2 del ciclo células (Liu et al 2020). Mientras que, en cánceres mamaros resistentes a la terapia endocrina, se ha visto una sobreexpresión de PAK2 que favorece el crecimiento independiente de estrógenos (Xiao et al., 2018). PIN1 es una proteína que regula al RE α , a través de isomerizar la enlace serina 118-prolina 119 del dominio AF1 del RE α de una conformación cis a trans, lo cual resulta en un aumento en la actividad transcripcional del receptor. Mientras que la sobreexpresión de PIN1 la actividad del RE α independiente de estrógenos (Rajbhandari et al., 2012). Por lo que, los resultados obtenidos en este trabajo, aunado a la disminución en los niveles de TTP reportada previamente en cáncer mamario y otros tipos de carcinomas (Barrios-García et al., 2016; Brennan et al., 2009; Rodríguez-Gómez et al 2021) sugieren que TTP, a través de su función como correpressor del RE α , representan un mecanismo adicional en su función como supresor de tumores.



El análisis de bases de datos de proteínas y mRNA de tumores mamarios nos permite estudiar el impacto de los niveles de expresión de TTP en los niveles de progresión tumoral, enfermedad metastásica y respuesta al tratamiento. Los análisis de la base de datos “Breast Cancer Gene-Expression Miner” realizados aquí, demostraron una disminución en los niveles de transcrito de TTP en tejido tumoral con respecto a los niveles observados en tejido tumoral adyacente o tejido mamario no transformado, lo cual coincide con resultados previamente reportados por otros trabajos (Barrios-García et al 2016; Brennan et al 2009; Rodríguez-Gómez et al., 2021). Interesantemente, los análisis de Kaplan-Meier de pacientes con cáncer mamario demostraron una correlación positiva entre los niveles de expresión de transcrito de TTP y el tiempo libre de recaída en pacientes que presentaban tumores positivos para el RE α mientras que en pacientes con tumores negativos para el RE α no se encontró ninguna asociación significativa entre los niveles de transcrito de TTP y el tiempo libre de recaída. Esto es interesante, debido a que, aunque no es posible excluir la contribución de la decaída de mRNA dependiente de TTP, estos resultados sugieren que la función nuclear de TTP como correpresor transcripcional juega un rol importante en el desarrollo y progresión de tumores de pacientes de cáncer mamario RE α positivo.


En este trabajo, identificamos un gran número de regiones promotoras cuya accesibilidad disminuye al sobreexpresar a TTP, pero que carecen de la presencia de sitios de unión del RE α . Un ejemplo es CMAS, cuya accesibilidad y niveles de mRNA disminuyen al sobreexpresar a TTP, y TTP se recluta en su región promotora, pero no es regulado por el RE α . Debido a que TTP no interacciona directamente con moléculas de DNA, esto sugiere que TTP está actuando sobre otros factores de transcripción. Estos resultados, son consistentes con estudios previos en donde se ha reportado que TTP ejerce una función correpresora en otros factores de transcripción como NF- κ B, TNF- α , receptor de glucocorticoides (RG), receptor de progesterona (RP) y receptor de andrógenos (RA) (Barrios García et al 2014; Barrios García et al., 2016; Liang et al., 2009; Schichl et al., 2009). Los resultados del análisis de motivos arrojaron el enriquecimiento de secuencias reconocidas por las proteínas STAT2 y PRMD1 en las regiones promotoras que disminuyeron su accesibilidad al sobreexpresar a TTP. El descubrimiento de que la forma nuclear de TTP reprime la actividad transcripcional de otros factores de transcripción sugiere a TTP como parte de un mecanismo regulador de la transcripción en todo el genoma. Adicionalmente, este nuevo rol de



TTP abre la posibilidad de investigar su participación en otras neoplasias dependientes de hormonas como próstata, cáncer colonrectal y pulmón. Son necesarios más estudios para explorar el potencial de TTP nuclear y sus blancos transcripcionales como marcadores tumorales o como herramientas en el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas para el cáncer mamario y otras neoplasias.

Los estudios sobre TTP nuclear han ampliado su espectro de funciones desde su bien caracterizado papel como proteína reguladora de mRNAs conteniendo AREs, hasta su función como correpresor transcripcional. Las diferentes funciones de TTP en el citoplasma y núcleo parecen estar reguladas por su estatus de fosforilación y transporte nucleocitoplasmático en la célula. Esta versatilidad en su función, coloca a TTP en un grupo factores celulares colectivamente referidos como proteínas “moonlighting” que son caracterizadas por exhibir dos o más funciones biológicas en la célula (Jeffery et al., 1999; Jeffery et al., 2014; Copley et al., 2014). Las proteínas moonlighting incluyen enzimas, receptores, canales transmembranales, chaperonas y proteínas ribosomales (Jeffery et al., 2020) y proteínas asociadas al proteosoma (Jeffery et al., 2014). Los mecanismos que les permiten, a las proteínas moonlighting, oscilar entre sus diferentes funciones incluyen relocalización celular, expresión tejido-específica, unión de substratos o ligandos, cambios en su estructura oligomérica y estatus de fosforilación (Jeffery et al., 1999; Jeffery et al., 2004; Sriram et al., 2005). La actividad moonlighting de TTP parece depender en primer lugar de su transporte nucleocitoplasmático y en segundo lugar en su habilidad para actuar como una proteína de andamiaje que interactúa con mRNAs citoplasmáticos conteniendo AREs y enzimas deacetilasas o con factores transcripcionales nucleares y enzimas modificadoras de la cromatina.

Las proteínas que exhiben diferentes funciones biológicas probablemente fueron seleccionadas durante la evolución como un mecanismo para generar complejidad biológica y funcional sin requerir la expansión del genoma (Copley et al., 2014) Inicialmente, las proteínas moonlighting fueron consideradas raras coincidencias en biología, pero ahora su relevancia y amplia participación en numerosos procesos celulares, incluyendo la regulación transcripcional, son bien aceptadas. El impacto de proteínas moonlighting en la biología de células eucariotas es mejor ejemplificado por el descubrimiento de que la mayoría de las enzimas que participan en la



glucólisis y ciclo de Krebs o ácidos tricarboxílicos tienen actividad moonlighting (Siriam et al., 2005).

Los estudios funcionales y moleculares descritos en este trabajo sugieren que TTP posee actividades moonlighting. En el citoplasma TTP forma complejos con diferentes mRNA-desadenilasas para promover la degradación de mRNA. Este mecanismo parece tener como objetivo reducir o restablecer las vías de transducción de señales que participan en procesos celulares como la regulación de la inflamación y la proliferación celular (Ciais et al., 2013; Lai et al., 2003; Tiedje et al., 2016, Saini et al., 2020; Park et al., 2018; Milke et al., 2013). En el núcleo, TTP parece tener una función directa en la regulación transcripcional de la expresión génica a través de participar en diferentes complejos conteniendo HDACs y actuando como un correpresor de diferentes factores transcripcionales como NF- κ B y receptores hormonales nucleares como RE α , RA, RP y RG.



IX. Conclusiones

TTP también conocida como GOS24/ZFP36, es una proteína nucleocitoplasmática que se une, desestabiliza y promueve la degradación de mRNAs conteniendo elementos AREs. La desregulación de la expresión de TTP en cáncer mamario ha sugerido que en células normales TTP funciona como un factor supresor de tumores limitando la vida media y expresión de mRNAs involucrados en la inflamación, tumorigénesis, metástasis y resistencia a la quimioterapia. Sin embargo, en los últimos años se ha acumulado evidencia de que TTP, cuando se localiza en el núcleo, tiene un rol diferente en la regulación de la expresión génica actuando como un correpressor de diferentes factores de transcripción incluyendo el RE α . Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren un mecanismo complementario de TTP, a través de su función en núcleo como corregulador del RE α y otros factores de transcripción, en la regulación de diferentes procesos celulares que participan en la progresión y resistencia a terapia hormonal en cáncer mamario de tipo luminal. Nosotros proponemos que TTP puede ser clasificada como una proteína “moonlighting” que regula la expresión génica a través de dos diferentes mecanismos: por la degradación de mRNAs-ARE y por su función como corregulador transcripcional.



BIBLIOGRAFÍA

- Achour, T. N., Sentis, S., Teyssier, C., Philippat, A., Lucas, A., Corbo, L., Cavailès, V., & Jalaguier, S. (2015). Signaling by SENP2 in Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, 28(February 2014), 183–196. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1376>
- Barrios-García, T., Gómez-Romero, V., Tecalco-Cruz, Á., Viviana, V.-G., & Alfonso, L.-D.-R. (2016). Nuclear tristetraprolin acts as a corepressor of multiple steroid nuclear receptors in breast cancer cells. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 7, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2016.02.004>
- Barrios-garcía, T., Tecalco-cruz, A., Gómez-romero, V., Reyes-carmona, S., Meneses-morales, I., & León-del-río, A. (2014). Tristetraprolin Represses Estrogen Receptor α Transactivation in Breast Cancer Cells *. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22), 15554–15565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548552>
- Blackshear, P. J. (2002). mRNA Degradation : an Important Process in Controlling Gene Expression. *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 945–952.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brennan, S. E., Kuwano, Y., Alkharouf, N., Blackshear, P. J., Gorospe, M., & Wilson, G. M. (2009). The mRNA-Destabilizing Protein Tristetraprolin Is Suppressed in Many Cancers , Altering Tumorigenic Phenotypes and Patient Prognosis. *Cancer Research*, 12, 5168–5177. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4238>
- Brook, M., Tchen, C. R., Santalucia, T., McIlrath, J., Arthur, J. S. C., Saklatvala, J., & Clark, A. R. (2006). Posttranslational Regulation of Tristetraprolin Subcellular Localization and Protein Stability by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 26(6), 2408–2418.



<https://doi.org/10.1128/mcb.26.6.2408-2418.2006>

Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature Methods*, *10*(12), 1213–1218.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2688>

Carman, J. A., & Nadler, S. G. (2004). Direct association of tristetraprolin with the nucleoporin CAN/Nup214. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *315*, 445–449.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.080>

Chen, L. F., & Greene, W. C. (2004). Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(5), 392–401. <https://doi.org/10.1038/nrm1368>

Chrestensen, C. A., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Pelo, J. W., Worthington, M. T., & Sturgill, T. W. (2004). MAPKAP Kinase 2 Phosphorylates Tristetraprolin on in Vivo Sites Including Ser178, a Site Required for 14-3-3 Binding. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(11), 10176–10184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310486200>

Ciais, D., Cherradi, N., & Feige, J. J. (2013). Multiple functions of tristetraprolin/TIS11 RNA-binding proteins in the regulation of mRNA biogenesis and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*(12), 2031–2044. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1150-y>

Copley, S. D. (2014). An evolutionary perspective on protein moonlighting. *Biochemical Society Transactions*, *42*(6), 1684–1691. <https://doi.org/10.1042/BST20140245>

Devita, Hellman & Rosenberg. (2015). *Cancer Principles and Practice of Oncology* (10 ed.). Wolters Kluwer.

Dudziak, K., Mottalebi, N., Senkel, S., Edghill, E. L., Rosengarten, S., Roose, M., Bingham, C., Ellard, S., & Ryffel, G. U. (2008). Transcription factor HNF1 β and novel partners affect nephrogenesis. *Kidney International*, *74*(2), 210–217. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.149>

Fallahi, M., Amelio, A. L., Cleveland, J. L., & Rounbehler, R. J. (2014). CREB Targets Define the Gene Expression Signature of Malignancies Having Reduced Levels of the Tumor



Suppressor Tristetraprolin. *PLOS ONE*, 1–24.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115517>

Forsdyke Donald R. (1985). cDNA cloning of mRNAs which increase rapidly in human lymphocytes cultured with concanavalin-A and cycloheximide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 129(3), 619–625.

Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1st ed., Vol. 116). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>

Garry, D. J., Maeng, G., & Garry, M. G. (2020). Foxk1 regulates cancer progression. *Annals of Translational Medicine*, 8(17), 1041–1041. <https://doi.org/10.21037/atm-2020-94>

Graham, J. R., Hendershott, M. C., Terragni, J., & Cooper, G. M. (2010). mRNA Degradation Plays a Significant Role in the Program of Gene Expression Regulated by Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 30(22), 5295–5305.

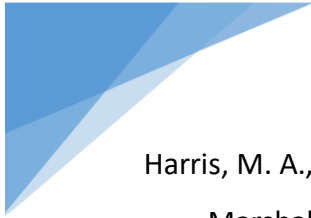
<https://doi.org/10.1128/mcb.00303-10>

Gruber, A. R., Fallmann, J., Kratochvill, F., Kovarik, P., Gruber, A. R., & Hofacker, I. L. (2011). AREsite : a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic Acids Research*, 39(November 2010), 66–69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq990>

Gruber, A. R., Fallmann, J., Kratochvill, F., Kovarik, P., & Hofacker, I. L. (2011). AREsite: A database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 1), 66–69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq990>

Guo, J., Qu, H., Chen, Y., & Xia, J. (2017a). The role of RNA-binding protein tristetraprolin in cancer and immunity. *Medical Oncology*, 34(12). <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1055-6>

Guo, J., Qu, H., Chen, Y., & Xia, J. (2017b). The role of RNA - binding protein tristetraprolin in cancer and immunity. *Medical Oncology*, 34(12), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1055-6>



Harris, M. A., Clark, J., Ireland, A., Lomax, J., Ashburner, M., Foulger, R., Eilbeck, K., Lewis, S., Marshall, B., Mungall, C., Richter, J., Rubin, G. M., Blake, J. A., Bult, C., Dolan, M., Drabkin, H., Eppig, J. T., Hill, D. P., Ni, L., ... White, R. (2004). The Gene Oncology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Research*, 32(DATABASE ISS.), 258–261.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkh036>

Heximer, S. P., & Forsdyke, D. R. (1993). A Human Putative Lymphocyte G0 / Gi Switch Gene Potential Transcription Factor. *DNA and Cell Biology*, 12(1), 73–88.

Hitti, E., Iakovleva, T., Brook, M., Deppenmeier, S., Gruber, A. D., Radzioch, D., Clark, A. R., Blackshear, P. J., Kotlyarov, A., & Gaestel, M. (2006). Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2 Regulates Tumor Necrosis Factor mRNA Stability and Translation Mainly by Altering Tristetraprolin Expression, Stability, and Binding to Adenine/Uridine-Rich Element. *Molecular and Cellular Biology*, 26(6), 2399–2407.

<https://doi.org/10.1128/mcb.26.6.2399-2407.2006>

Jeffery, C.J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), 8–11.

Jeffery, Constance J. (2004). Molecular mechanisms for multitasking: Recent crystal structures of moonlighting proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(6), 663–668.

<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.10.001>


Jeffery, Constance J. (2014). An introduction to protein moonlighting. *Biochemical Society Transactions*, 42(6), 1679–1683. <https://doi.org/10.1042/BST20140226>

Jordan, V. C. (1995). “Studies on the estrogen receptor in breast cancer” - 20 years as a target for the treatment and prevention of cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 36(3), 267–285. <https://doi.org/10.1007/BF00713399>

Lai, W. S., Kennington, E. A., & Blackshear, P. J. (2003). Tristetraprolin and Its Family Members Can Promote the Cell-Free Deadenylation of AU-Rich Element-Containing mRNAs by Poly (A) Ribonuclease. *Molecular and Cellular Biology*, 23(11), 3798–3812.

<https://doi.org/10.1128/MCB.23.11.3798>

Lai, W. S., Wells, M. L., Perera, L., & Blackshear, P. J. (2020). HHS Public Access. *Wiley*



Interdisciplinary Reviews: RNA, 10(4), 1–30. <https://doi.org/10.1002/wrna.1531>.The

Liang, J., Lei, T., Song, Y., Yanes, N., Qi, Y., & Fu, M. (2009). RNA-destabilizing factor tristetraprolin negatively regulates NF- κ B signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), 29383–29390. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024745>

Liu, Haipeng, & Jeffery, C. J. (2020). Cellular Metabolism Chapter. *Molecules*, 25(3440), 1–18.

Liu, Hui, Liu, K., & Dong, Z. (2021). The Role of p21-Activated Kinases in Cancer and Beyond: Where Are We Heading? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.641381>

Liu, Hui, Shin, S. H., Chen, H., Liu, T., Li, Z., Hu, Y., Liu, F., Zhang, C., Kim, D. J., Liu, K., & Dong, Z. (2020). CDK12 and PAK2 as novel therapeutic targets for human gastric cancer. *Theranostics*, 10(14), 6201–6215. <https://doi.org/10.7150/thno.46137>


Lykke-Andersen, J., & Wagner, E. (2005). Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes and Development*, 19(3), 351–361. <https://doi.org/10.1101/gad.1282305>

Métivier, Raphael, Penot, G., Hubner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., & Gannon, F. (2004). Estrogen Receptor Alpha Directs Ordered , Cyclical , and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter. *Cell*, 115, 751–763.

Métivier, Raphaël, Penot, G., Hübner, M. R., Reid, G., Brand, H., Koš, M., & Gannon, F. (2003). Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, 115(6), 751–763. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00934-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00934-6)

Milke, L., Schulz, K., Weigert, A., Sha, W., Schmid, T., & Brüne, B. (2013). Depletion of tristetraprolin in breast cancer cells increases interleukin-16 expression and promotes tumor infiltration with monocytes/macrophages. *Carcinogenesis*, 34(4), 850–857. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs387>

Murata, T., Hikita, K., & Kaneda, N. (2000). Transcriptional activation function of zinc finger



protein TIS11 and its negative regulation by phorbol ester. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274(2), 526–532. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3182>

Murata, Tomiyasu, Yoshino, Y., Morita, N., & Kaneda, N. (2002). Identification of nuclear import and export signals within the structure of the zinc finger protein TIS11. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293, 1242–1247.

Nguyen, K. T., Holloway, M. P., & Altura, R. A. (2012). The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *Molecular Biology International Journal of Biochemistry And*, 3(2), 137–151.

Nousch, M., Techritz, N., Hampel, D., Millonigg, S., & Eckmann, C. R. (2013). The Ccr4 – Not deadenylase complex constitutes the main poly (A) removal activity in *C. elegans*. *Journal of Cell Science*, 126(8), 4274–4285. <https://doi.org/10.1242/jcs.132936>

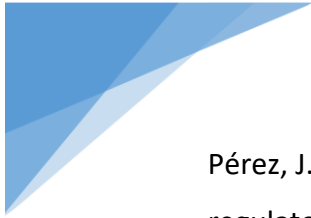
Park, J. M., Lee, T. H., & Kang, T. H. (2018). Roles of tristetraprolin in tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113384>

Pejanovic, N., Hochrainer, K., Liu, T., Aerne, B. L., Soares, M. P., & Anrather, J. (2012). Regulation of nuclear factor κ B (NF- κ B) transcriptional activity via p65 acetylation by the chaperonin containing TCP1 (CCT). *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042020>

Phillips, R. S., Ramos, S. B. V, & Blackshear, P. J. (2002). Members of the Tristetraprolin Family of Tandem CCCH Zinc Finger Proteins Exhibit CRM1-dependent Nucleocytoplasmic Shuttling *. *The Journal Of Biological Chemistry*, 277(13), 11606–11613. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111457200>

Rajbhandari, P., Finn, G., Solodin, N. M., Singarapu, K. K., Sahu, S. C., Markley, J. L., Kadunc, K. J., Ellison-Zelski, S. J., Kariagina, A., Haslam, S. Z., Lu, K. P., & Alarid, E. T. (2012). Regulation of Estrogen Receptor α N-Terminus Conformation and Function by Peptidyl Prolyl Isomerase Pin1. *Molecular and Cellular Biology*, 32(2), 445–457. <https://doi.org/10.1128/mcb.06073-11>

Rodríguez-Gómez, G., Paredes-Villa, A., Cervantes-Badillo, M. G., Gómez-Sonora, J. P., Jorge-



Pérez, J. H., Cervantes-Roldán, R., & León-Del-Río, A. (2021). Tristetraprolin: A cytosolic regulator of mRNA turnover moonlighting as transcriptional corepressor of gene expression. *Molecular Genetics and Metabolism*, *133*(2), 137–147.

<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.03.015>

Ross, C. R., Brennan-Laun, S. E., & Wilson, G. M. (2012). Tristetraprolin: Roles in cancer and senescence. *Ageing Research Reviews*, *11*(4), 473–484.

<https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.005>

Saini, Y., Chen, J., & Patial, S. (2020). The tristetraprolin family of RNA-binding proteins in cancer: Progress and future prospects. *Cancers*, *12*(6), 1–21.

<https://doi.org/10.3390/cancers12061539>

Sandler, H., Kreth, J., Timmers, H. T. M., & Stoecklin, G. (2011). Not1 mediates recruitment of the deadenylase Caf1 to mRNAs targeted for degradation by tristetraprolin. *Nucleic Acids Research*, *39*(10), 4373–4386.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkr011>

Sandler, H., & Stoecklin, G. (2008). Control of mRNA decay by phosphorylation of tristetraprolin. *Biochemical Society Transactions*, *36*, 491–496.

<https://doi.org/10.1042/BST0360491>

Schichl, Y. M., Resch, U., Hofer-Warbinek, R., & de Martin, R. (2009). Tristetraprolin impairs NF- κ B/p65 nuclear translocation. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(43), 29571–29581.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.031237>

Sommer, S., & Fuqua, S. A. W. (2001). Estrogen receptor and breast cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *11*(5), 339–352.


<https://doi.org/10.1006/scbi.2001.0389>

Sriram, G., Martinez, J. A., McCabe, E. R. B., Liao, J. C., & Dipple, K. M. (2005). Single-gene disorders: What role could moonlighting enzymes play? *American Journal of Human Genetics*, *76*(6), 911–924.

<https://doi.org/10.1086/430799>

Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W. F. C., Blackwell, T. K., & Anderson, P. (2004). prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *The EMBO Journal*, *23*(6), 1313–1324.

<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600163>



Sun, L., Stoecklin, G., Van Way, S., Hinkovska-Galcheva, V., Guo, R. F., Anderson, P., & Shanley, T. P. (2007). Tristetraprolin (TTP)-14-3-3 complex formation protects TTP from dephosphorylation by protein phosphatase 2a and stabilizes tumor necrosis factor- α mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(6), 3766–3777.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M607347200>

Taylor, G. A., Lai, W. S., Oakey, R. J., Seldin, M. F., Shows, T. B., Jr, R. L. E., & Blakeshear, P. J. (1991). The human TTP protein : sequence , alignment with related proteins , and chromosomal localization of the mouse and human genes. *Nucleic Acids Research*, *19*(12), 3454.

Tiedje, C., Diaz-Muñoz, M. D., Trulley, P., Ahlfors, H., Laaß, K., Blakeshear, P. J., Turner, M., & Gaestel, M. (2016). The RNA-binding protein TTP is a global post-transcriptional regulator of feedback control in inflammation. *Nucleic Acids Research*, *44*(15), 7418–7440.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkw474>

Travers, A. (1998). Transcription: Activation by cooperating conformations. *Current Biology*, *8*(17). [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)70390-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)70390-2)

Tu, Y., Wu, X., Yu, F., Dang, J., Wang, J., Wei, Y., Cai, Z., Zhou, Z., Liao, W., Li, L., & Zhang, Y. (2019). Tristetraprolin specifically regulates the expression and alternative splicing of immune response genes in HeLa cells. *BMC Immunology*, *20*(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1186/s12865-019-0292-1>

Welboren, W., Driel, M. A. Van, Janssen-megens, E. M., Van, S. J., Sweep, F. C. G. J., Span, P. N., & Stunnenberg, H. G. (2009). ChIP-Seq of ER α and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *The EMBO Journal*, *28*(10), 1418–1428.

<https://doi.org/10.1038/emboj.2009.88>

Xiao, T., Li, W., Wang, X., Xu, H., Yang, J., Wu, Q., Huang, Y., Geradts, J., Jiang, P., Fei, T., Chi, D., Zang, C., Liao, Q., Rennhack, J., Andrechek, E., Li, N., Detre, S., Dowsett, M., Jeselsohn, R. M., ... Brown, M. (2018). Estrogen-regulated feedback loop limits the efficacy of estrogen receptor–targeted breast cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*



of the United States of America, 115(31), 7869–7878.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1722617115>

Yan, F., Powell, D. R., Curtis, D. J., & Wong, N. C. (2020). From reads to insight: A hitchhiker's guide to ATAC-seq data analysis. *Genome Biology*, 21(1), 1–16.


<https://doi.org/10.1186/s13059-020-1929-3>

Yaşar, P., Ayaz, G., Damla, S., Gizem, U., Mesut, G., & Muyan, M. (2017). Molecular mechanism of estrogen – estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, 16, 4–20.

<https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>

Índice de figuras

- Figura 1. Estructura de TTP.** **A)** Secuencia de aminoácidos de TTP. Las secuencias tetra prolina son mostradas en cajas y los dominios de dedos de zinc se muestran subrayados. **B)** Representación esquemática de la estructura de TTP indicando la localización de la secuencia de exporte nuclear (NES), la señal de localización nuclear (NLS), los dominios ricos en prolina (pppp) y los dominios dedos de zinc (Zn). Imagen tomada de Rodríguez-Gómez et al., 2021. 7
- Figura 2. Función citoplasmática y nuclear de TTP.** TTP puede localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma dependiendo de su estatus de fosforilación, y cuyo transporte es mediado por Nup214 y CRM1. En el citoplasma, TTP interacciona con elementos AREs favoreciendo el reclutamiento del complejo deadenilasa Not1/Caf1/Ccr4 y PARN, lo cual promueve la degradación del mRNA. En el núcleo, TTP interacciona con factores de transcripción y facilita el reclutamiento de correpresores que promueven un estado compacto de la cromatina. TTPc: Tristetraprolina citoplasmática; TTPn: Tristetraprolina nuclear; FT factor de transcripción; E/P: enhancer/promotor; ARE: elemento rico en adenina y uracilo en la región 3' no traducible. Imagen tomada de Rodríguez-Gómez et al 2021. 11
- Figura 3. Sobreexpresión de TTP en células T47D.** **A)** Para la sobreexpresión de TTP, el RNAm de TTP (999 pb) fue amplificado mediante RT-qPCR y clonado en el vector pCMV -3Tag-1. La secuencia de la construcción fue verificada mediante **B)** secuenciación de DNA. **C)** Las células T47D con expresión estable del plásmido pCMV-ctl (vector vacío) ó pCMV-TTP fueron seleccionadas mediante la resistencia a geneticina conferida por el plásmido. **D)** Western blot de los niveles de expresión de TTP, FLAG y Tubulina en los pools de células transfectadas con pCMV-ctl y pCMV-TTP. 21
- Figura 4. Aislamiento y propagación de células T47D sobreexpresantes de TTP.** **A)** Western Blot de TTP en las cinco clonas aisladas de células T47D sobreexpresantes de TTP. **B)** Western blot de TTP, RE α , FLAG y Actina de la clona 5 sobreexpresante de TTP (T47DTTP+) y en las clonas aisladas de las líneas. * denota diferencias estadísticamente significativas (t de Student; p<0.05). 22
- Figura 5. La sobreexpresión de TTP disminuye la proliferación y viabilidad celular.** **A)** Ensayo de proliferación celular y **B)** viabilidad celular de las líneas T47D wt, T47D ctl y T47D TTP+ a los 8 días de cultivo. **C)** Micrografías (4x) de las líneas T47D wt, T47D ctl y T47D TTP+. * denota diferencias estadísticamente significativas (t de Student; p<0.05). ns denota diferencias estadísticamente no significativas (t de Student; p<0.05). 23
- Figura 6. Distribución del tamaño del inserto.** Graficas de dispersión del inserto de las **A)** células control y **B)** células sobreexpresantes de TTP. 25
- Figura 7. Enriquecimiento de las lecturas cercas del sitio de inicio de la transcripción (TSS).** **A)** Gráficas y heatmap de la distribución de las lecturas secuenciadas en una ventana de 3kb río arriba y río abajo del TSS de cada gen. **B)** Heatmap de correlación de las lecturas secuenciadas entre las células control y las células sobreexpresantes de TTP. 26
- Figura 8. Grado de confiabilidad del llamado de picos.** **A)** Graficas de fold enrichment y **B)** FDR distribución en células control y células sobreexpresantes de TTP. 28
- Figura 9. Análisis diferencial de picos entre células control y células sobreexpresantes de TTP.** **A)** Estadísticas de las regiones diferencialmente accesibles identificadas (DARs). **B)** Grafica de volcán indicando las DARs (rojo: disminución de accesibilidad; verde: aumento de accesibilidad). **C)** Anotación de



los picos diferenciales de acuerdo con cada elemento funcional del genoma. **D)** Frecuencia de lecturas de los picos diferenciales en una ventana de 3 kb río arriba y río abajo del TSS. 29

Figura 10. Análisis GO de enriquecimiento de genes asociados a picos diferenciales enriquecidos en la región promotora. BP denota proteínas relacionadas a Procesos biológicos, CC a componentes celulares y MF a función molecular. 30

Figura 11. Genes candidatos regulados por el complejo TTP-RE α . **A)** Tracks representativos de los genes PAK2, PIN1 y FOXX1 (se indica los picos de ChIP-Seq de H3K27AC, H3K4me3, H3K27me3 y RE α , así como los picos de ATAC-Seq de células control (CTLE2) y células sobreexpresantes de TTP (TTPE2). **B)** Enriquecimiento de TTP en regiones promotoras en células sobreexpresantes de TTP evaluado mediante ChIP-qPCR. **C)** Niveles de transcrito de los genes PAK2, PIN1 y FOXX1 en células control (CTL) y sobreexpresantes de TTP (TTP+) tratadas con vehículo (V) o con estradiol (E₂)..... 32

Figura 12. Genes candidatos regulados por TTP pero no por el RE α . **A)** Tracks representativos de los genes CMAS, WNT5 y LINC00909 (se indica los picos de ChIP-Seq de H3K27AC, H3K4me3, H3K27me3 y RE α , así como los picos de ATAC-Seq de células control (CTLE2) y células sobreexpresantes de TTP (TTPE2). **B)** Enriquecimiento de TTP en región promotora del gen CMAS en células T47D sobreexpresantes de TTP, evaluado mediante ChIP-qPCR. **C)** Niveles de transcrito del gen CMAS en células T47D control (CTL) y sobreexpresantes de TTP (TTP+) tratadas con vehículo (V) o con estradiol (E₂)..... 34

Figura 13. Expresión de TTP en tumores de cáncer mamario y análisis de Kaplan-Meier de la asociación entre la expresión de TTP y el tiempo libre de recaída (RFS) en pacientes de cáncer mamario. **A)** Grafica de violín del log₂ de los niveles de expresión de TTP usando la base de datos “Breast Cancer Gene-Expression Miner Data Base” (p=0.0001, prueba de Dunnet-Tukey-Kramer). Graficas de tiempo libre de recaída con relación a los niveles de expresión de TTP en **B)** pacientes con cáncer mamario RE α +, **C)** pacientes con cáncer mamario RE α y **D)** pacientes con cáncer mamario RE α + y que fueron tratadas con tamoxifeno (p<0.05). 37



Índice de tablas

Tabla 1. Reactivos utilizados para la síntesis de cDNA	17
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en ensayos de RTqPCR y CHIP qPCR.....	18
Tabla 3. Estadísticas de las lecturas crudas.....	24
Tabla 4. Estadísticas de las lecturas mapeadas.....	24
Tabla 5. Estadísticas de las regiones accesibles	27
Tabla 6. Motivos enriquecidos en los picos diferencialmente expresado entre células control y sobreexpresantes de TTP	35



Review article

Tristetraprolin: A cytosolic regulator of mRNA turnover moonlighting as transcriptional corepressor of gene expression

Gabriel Rodríguez-Gómez, Alejandro Paredes-Villa, Mayte Guadalupe Cervantes-Badillo, Jessica Paola Gómez-Sonora, Jesús H. Jorge-Pérez, Rafael Cervantes-Roldán, Alfonso León-Del-Río *

Programa de Investigación en Cáncer de Mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 December 2020
Received in revised form 23 March 2021
Accepted 24 March 2021
Available online 26 March 2021

Keywords:

Tristetraprolin
mRNA degradation
Transcriptional coregulator
Nucleocytoplasmic protein
Moonlighting protein
Breast cancer

ABSTRACT

Tristetraprolin (TTP) is a nucleocytoplasmic 326 amino acid protein whose sequence is characterized by possessing two CCCH-type zinc finger domains. In the cytoplasm TTP function is to promote the degradation of mRNAs that contain adenylate/uridylate-rich elements (AREs). Mechanistically, TTP promotes the recruitment of poly(A)-specific deadenylases and exoribonucleases. By reducing the half-life of about 10% of all the transcripts in the cell TTP has been shown to participate in multiple cell processes that include regulation of gene expression, cell proliferation, metabolic homeostasis and control of inflammation and immune responses. However, beyond its role in mRNA decay, in the cell nucleus TTP acts as a transcriptional coregulator by interacting with chromatin modifying enzymes. TTP has been shown to repress the transactivation of NF- κ B and estrogen receptor suggesting the possibility that it participates in the transcriptional regulation of hundreds of genes in human cells and its possible involvement in breast cancer progression. In this review, we discuss the cytoplasmic and nuclear functions of TTP and the effect of the dysregulation of its protein levels in the development of human diseases. We suggest that TTP be classified as a moonlighting tumor suppressor protein that regulates gene expression through two different mechanisms; the decay of ARE-mRNAs and a transcriptional coregulatory function.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	137
2. Human TTP sequence and molecular structure	138
3. Cytoplasmic TTP mediates the destabilization and degradation of ARE-containing mRNAs	138
4. TTP phosphorylation regulates its cellular localization and mRNA decay activity	139
5. Nuclear TTP functions as a transcriptional corepressor	140
6. The role of TTP in metabolism and development of human disease	140
6.1. TTP in regulation of metabolism, diabetes and metabolic syndrome	141
6.2. Tristetraprolin and the regulation of immune homeostasis and inflammation	141
6.3. TTP mediated mRNA decay in cancer development and progression	141
6.3.1. TTP expression regulates cell proliferation and apoptosis	142
6.3.2. Downregulation of TTP enhances cell migration and invasion	142
6.3.3. Breast cancer: Revisiting the role of TTP as a tumor suppressor	142
7. TTP is a moonlighting tumor suppressor with different gene expression regulatory activities	143
Funding information	144
Acknowledgments	144
References	144

Abbreviations: TTP, tristetraprolin; ARE, AU-rich element; ER α , estrogen receptor alpha.

* Corresponding author.

E-mail address: leon@biomedicas.unam.mx (A. León-Del-Río).

1. Introduction

TTP, also known as GOS24/ZFP36/TTP (hereafter TTP), is a nucleocytoplasmic protein that binds, destabilizes and promotes the degradation of ARE-containing mRNAs in the cytoplasm. The dysregulation of TTP expression in different types of cancer has suggested that in normal cells TTP functions as a tumor suppressor factor by limiting the lifespan and expression of mRNAs involved in inflammation, tumorigenesis, metastasis and resistance to chemotherapy (1). However, in recent years, evidence has mounted that TTP located in the cell nucleus has a different role in regulation of gene expression acting as a transcriptional corepressor of different transcription factors including *NF- κ B* and steroid nuclear hormone receptors. This review summarizes the cytoplasmic function of TTP on mRNA turnover and its role as a co-repressor in the nuclear regulation of gene expression, which may offer a complementary mechanistic background on the relevance of TTP in cell metabolism, gene expression, inflammation, cancer and other human disorders.

2. Human TTP sequence and molecular structure

In human cells, TTP is a protein of 326 amino acids in length with a predicted molecular weight of 34 kDa which is encoded by the ZFP36 gene located on chromosome 19q13.1 (Fig. 1 A) [2]. TTP was first identified among a group of concanavalin-A-induced genes involved in the entry of cultured G_0 lymphocytes into the G_1 -phase of the cell cycle [3]. The name tristetraprolin derives from the presence of three proline-rich domains (PPPP) located at positions 71, 198 and 219 in the human amino acid protein sequence (Fig. 1 A and B). TTP belongs to a small family of proteins known as the TTP/TIS11 family that in human cells includes two other proteins, ZFP36L1 and ZFP36L2 [4,5]. Although most eukaryotic organisms, except for birds [6], express TTP/TIS11 proteins, its number varies between species. For example, mouse cells express four different members of the TTP/TIS11 protein family [7,8]. Structurally, TTP/TIS11 proteins are characterized by containing two CCCH-type zinc finger domains (CX8 CX5 CX3 H) separated by 18 amino acid residues [9,10]. TTP also exhibits a 14 amino acid motif at its N-terminus that contains a functional nuclear export sequence (NES) and a potential nuclear localization sequence (NLS), that

in rat TTP has been localized within a 66 amino acid region containing the two zinc fingers domains (Fig. 1 B and C) [4,7,11,12]. The NES and NLS sequences are responsible for TTP localization and relocation between the cell nucleus and cytoplasm in response to different growth factor activated signaling transduction pathways.

Early cellular and biochemical analysis suggested that TTP and the other members of the TIS11 protein family regulate cell growth rate because mutations in their genes increased cell division while overexpression of these proteins reduces cellular proliferation [13–18]. However, when researchers developed KO-mice models of TIS11 proteins to investigate their physiological functions, their results suggested that the functions of the TIS11 proteins might not be redundant. For example, TTP-KO mice develop a syndrome that is characterized by growth retardation, cachexia, arthritis and inflammation resulting from the increase in tumor necrosis factor alpha (TNF- α) protein levels [19]. In contrast, ZFP36L-KO mice exhibit angiogenesis defects [20], and disruption of ZFP36L2 expression in mice results in hematopoiesis defects [21]. These results suggest that TTP and the other two members of the TIS11 proteins may have cell and tissue specific functions.

3. Cytoplasmic TTP mediates the destabilization and degradation of ARE-containing mRNAs

The association between TTP and mRNA destabilization in eukaryotic cells was reported for first time by the group of Blackshear and collaborators [19]. While characterizing the inflammatory syndrome developed by a TTP-KO mouse model they found that low TTP animals exhibited augmented levels of TNF- α protein as a result of an increase in the stability of its mRNA. These investigators demonstrated that TTP uses its two tandem CCCH class zinc finger domains to bind to AU-rich elements (AREs) in the TNF- α mRNA promoting its deadenylation and degradation [22].

In eukaryotic cells the mRNAs that are exported from the nucleus to the cytoplasm exhibit on average a 60–80 nucleotide poly-A tail, which increases their stability, prevents their degradation, and enhances their translation into a protein by the ribosomes [23–25]. Under normal circumstances cytoplasmic TTP and the two other members of its family of RNA-binding proteins recognize sequences of 50–150 nucleotides that contain AUUUA rich motifs (AREs) located at the 3'-UTRs of some

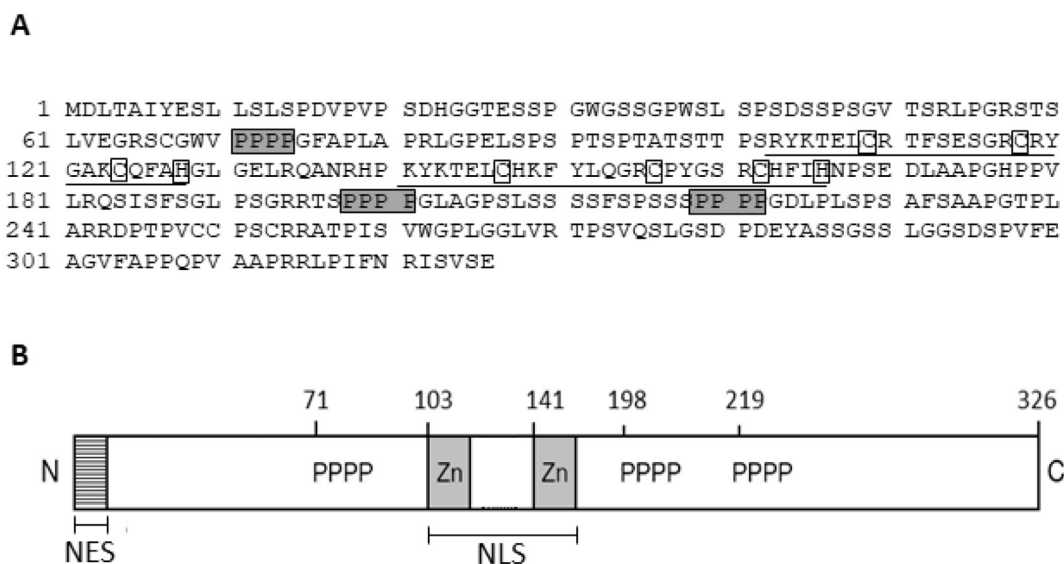


Fig. 1. Sequence and molecular structure of human TTP. (A) Amino acid sequence of human TTP. Proline-rich sequences are shown in gray boxes, the two CCCH type zinc fingers are underlined and their Cys and His amino acids are shown in white boxes. (B) Schematic representation of TTP structure depicting localization of proline-rich domains (PPPP), CCCH-type zinc-fingers (Zn) and nuclear export signal (NES). The nuclear location signal (NLS) in human TTP has not been characterized. However, in rat TTP a potential NLS has been localized within a highly conserved 66 amino acid region containing the two zinc finger domains and it is shown in the corresponding region of human TTP.

mRNAs (Fig. 2) [26–31]. Mechanistically, the binding of TTP to ARE-containing mRNAs promotes the recruitment of the CCR4-NOT complex which is composed of two exonucleases designated CCR4 and CAF1, and the scaffold non-enzymatic proteins NOT1, NOT2, NOT3, and CAF40 (Fig. 2B). While NOT1 is an essential component of the CCR4-NOT-TTP complex, CAF40 and NOT2/3 function as docking platforms for other RNA-binding proteins [32–34]. The CCR4-NOT-TTP complex is responsible for the 3′-5′ deadenylation of the poly(A) tail, which is considered the first step in the ARE-containing mRNA decay [25,35,36] (Fig. 2B). Further, *in vitro* mRNA deadenylation experiments have shown that TTP potentiates the effect of the poly(A) specific ribonuclease (PARN) in the deadenylation of ARE-containing target transcripts [37]. Although TTP does not physically interact with PARN, TTP has been shown to interact with mRNA-decapping enzymes (DCP1 and DCP2). Once the transcript is decapped it is degraded by the 5′-3′ exoribonuclease 1 (Xrn1) which is also recruited by TTP (Fig. 2C) [4,38–41].

In the last 20 years the accumulation of experimental evidence has shown that TTP affects the levels of more than 50 different mRNA's including those that encode c-myc, inducible nitric oxide synthase, plasminogen activator inhibitor type 2, Leukemia inhibitory factor, Polo-like kinase 3, Ubiquitin–protein ligase E3A isoform 1, Toll-like receptor 4, Endothelial cell surface expressed chemotaxis and apoptosis regulator, cyclin-dependent kinase inhibitor 1, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and Tristetraprolin itself [19,34,42–44]. More recently Tiedje and collaborators, while analyzing LPS-stimulated macrophages by individual-nucleotide resolution Cross-Linking and

Immuno-precipitation (iCLIP), identified more than 1100 ARE-containing mRNA targets for TTP [45]. These results in combination with the observation that ARE sequences are present in 7–10% of all transcripts expressed in human cells suggest that TTP plays a global role in the regulation of the human transcriptome [30,31,46].

4. TTP phosphorylation regulates its cellular localization and mRNA decay activity

One of the most interesting characteristics of TTP is its localization in both the cell cytoplasm and nucleus. TTP traffic into and out of the nucleus is regulated by mitogen-stimulated phosphorylation and by its interaction with other proteins. The nuclear translocation of TTP depends on the integrity of the nuclear localization sequence (NLS) and its two zinc-finger domains (Fig. 1) [11,12]. Under normal circumstances TTP exhibits a predominantly nuclear localization, but after the cells are stimulated by serum containing mitogens, such as phorbol myristate acetate, (PMA), TTP is phosphorylated at different serine amino acids and it is rapidly exported to the cytoplasm [47]. Biochemical and molecular analysis have shown that TTP phosphorylation and cell localization can be regulated by the activation of multiple signal transduction pathways that include ERK/MAPK, PKB/AKT, JNK and p38 MAPK [48–53]. The nuclear export of TTP is mediated by the interaction of its amino-terminal nuclear export sequence (NES) with the nuclear exportin protein chromosomal maintenance 1 (CRM1/XPO1) and with the nucleoporin NUP214 (Fig. 2A) [11,12,54].

CYTOPLASM

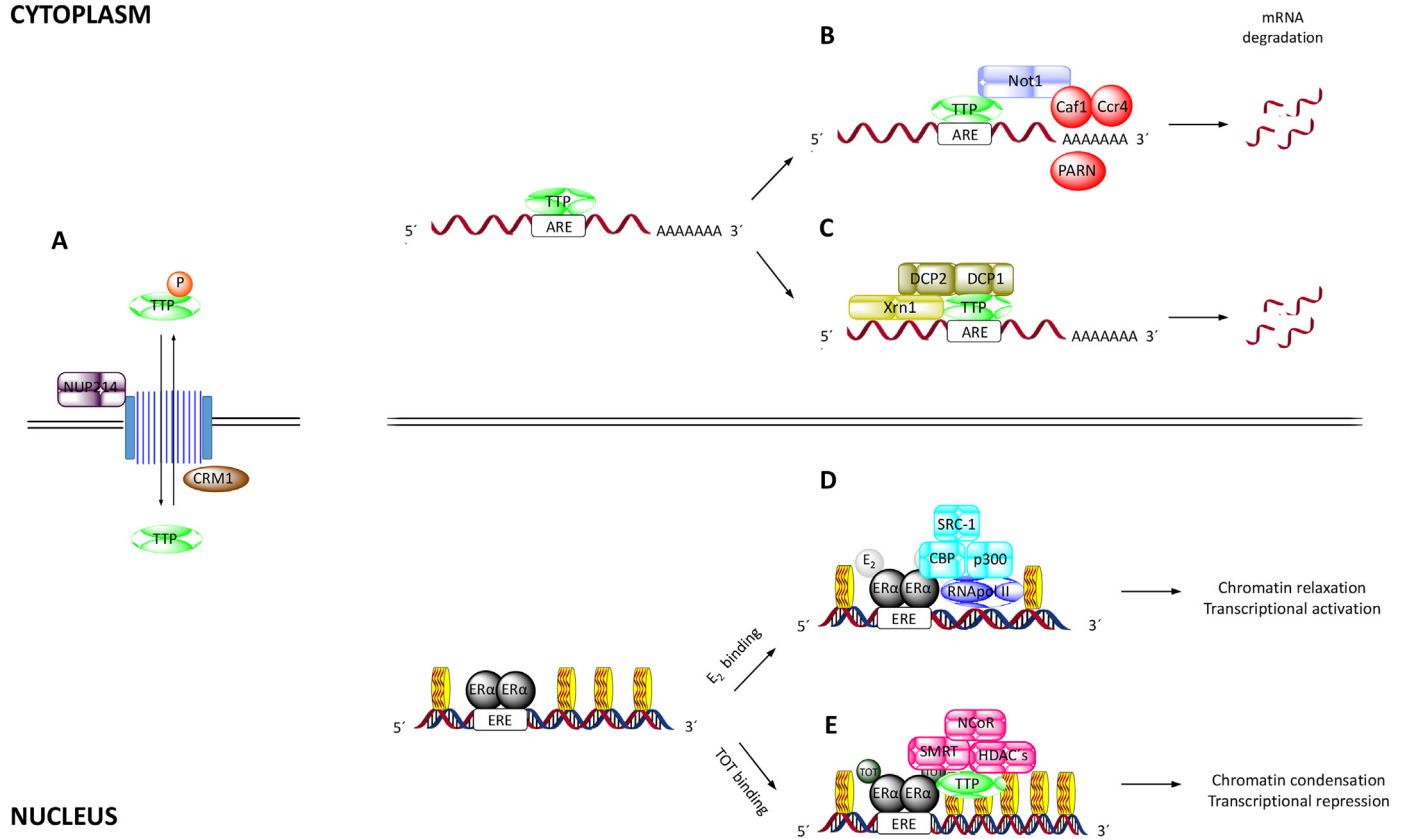


Fig. 2. Cytoplasmic and nuclear functions of TTP. (A) TTP nucleocytoplasmic shuttling. TTP exhibits a predominantly nuclear localization but its phosphorylation by different signal transduction pathways promotes its export to the cytoplasm by the nuclear exportin protein chromosomal maintenance 1 (CRM1/XPO1) and the nucleoporin NUP214 complex. (B) TTP-mediated mRNA deadenylation. The binding of TTP to ARE-containing mRNAs promotes the exonucleolytic degradation of their poly(A) tails by recruiting a deadenylase complex formed by the exonucleases CCR4 and CAF1, the scaffold protein NOT1 and poly(A)-specific 3′ → 5′ ribonuclease (PARN). (C) TTP bound to ARE-containing mRNAs also interacts with the mRNA-decapping complex DCP1/DCP2 and the enzyme 5′-3′ exoribonuclease 1 (Xrn1). (D) The binding of the estrogen receptor to its ligand (17β-estradiol, E2) stimulates its binding to the promoter region of its target genes. ERα-dependent transcriptional activation is mediated by recruitment of a transcription activation complex formed by coactivators possessing histone acetyl transferase activity such as SRC-1 and CBP/p300 that relax the chromatin structure. (E) The binding of TTP to ERα represses its transactivation activity by promoting the recruitment of histone deacetylases (HDACs) whose enzymatic activity increase the condensation status of the chromatin.

In human cells the CRM1/XPO1 protein complex is essential to regulate the nuclear levels of multiple cellular factors including RNA molecules and proteins such as hormone nuclear receptors, transcription factors, oncoproteins and tumor suppressor proteins. The CRM1/XPO1-mediated nuclear export plays a key function in the cell by regulating the nuclear levels of different cellular factors and by preventing the nuclear accumulation of transcriptionally inactive transcription factors that are exported to the cytoplasm to be degraded by the proteasome [55–57].

The phosphorylation of TTP promotes its binding to 14-3-3 proteins which are molecular chaperones that interact with a large number of proteins involved in cell signaling pathways [58]. The binding to 14-3-3 increases TTP stability and promotes its cytoplasmic localization in the cell [59–61]. The interaction between TTP and 14-3-3 proteins has been suggested to regulate the decay of ARE-containing mRNA by preventing the recruitment of the deadenylase Caf1a [62] or reducing its affinity for ARE-mRNAs [62]. However, other studies have shown that TTP phosphorylation by MAPKAP kinase 2 can also block mRNA decay by inhibiting CAF1 deadenylase recruitment independent of 14-3-3 binding to TTP [63,64]. Finally, dephosphorylation of TTP by the protein phosphatase 2A (PP2A) impairs its interaction with 14-3-3 and activates its function in the degradation of ARE-containing mRNAs [65,66]. These results suggest phosphorylation and dephosphorylation of TTP in response to different signal transduction pathways and its interaction with 14-3-3 proteins regulate both TTP cell localization and modulate its function in the turnover of ARE-containing mRNAs [67].

Given that TTP-mediated mRNA degradation occurs in the cytoplasm the contribution of the nucleocytoplasmic shuttling of TTP to this process is not yet completely understood [10]. It has been suggested that in some cases TTP may interact with target mRNAs in the nucleus to deliver them into mRNA processing bodies in the cytoplasm that contain decapping and 5' to 3' degradation enzymes and deadenylases for degradation [68]. However, the number of mRNAs that have been shown to interact with nuclear TTP is low. Alternatively, evidence gathered by different research groups in the last twenty years suggests that in the nucleus TTP participates in transcriptional regulation of gene expression through a mechanism that involves its interaction with chromatin modifying enzymes.

5. Nuclear TTP functions as a transcriptional corepressor

TTP was initially thought to be a transcription factor based on the presence of two zinc-finger domains on its protein sequence, its nuclear localization, and its ability to promote the transcription of a luciferase reporter gene in human cells when fused downstream of the heterologous GAL4 DNA-binding domain [10]. The role of TTP as a nuclear transcriptional regulatory factor seemed to be confirmed by Ryfell and collaborators when they found TTP binds to the hepatocyte nuclear factor (HNF)1b, a tissue specific transcription factor linked to mature onset diabetes (MODY5) and to congenital abnormalities of the kidney and urinary tract. In cells in culture the binding of TTP to HNF1b reduced its transactivation activity, and overexpression of TTP impaired nephrogenesis in *Xenopus* embryos [69]. They concluded that TTP regulates HNF1b transcriptional activity in an mRNA destabilization independent manner. However, the mechanism responsible remained unknown.

In 2009, Liang and coworkers, while reexamining the role of TNF- α in the inflammatory syndrome developed by TTP-KO mice, found that TTP expression inhibits TNF- α promoter activity in a dose dependent manner [70]. While exploring the mechanism responsible they transfected TTP into embryonic human kidney HEK293 cells and found it represses the NF- κ B-dependent TNF α gene activation. Mechanistically, TTP was shown to interact with the p65 subunit of the transcription factor NF- κ B in the promoter region of its target genes. TTP-binding promoted the recruitment of histone deacetylases HDAC1,

HDAC3 and HDAC7 [70–72]. These findings led the investigators to propose that TTP controls the inflammatory response by acting as a transcriptional corepressor of NF- κ B.

More recently Barrios-Garcia and collaborators using a yeast two-hybrid screen, protein co-immunoprecipitation and GST-pulldown assays described that nuclear TTP interacts with the estrogen receptor alpha (ER α) in breast cancer cells [18]. ER α is a ligand-activated transcription factor that in mammary gland mediates the effects of the hormone estrogen (17 β -estradiol; E2) on cell proliferation and differentiation and it is also associated with the development, progression and metastasis of 70–80% of all breast cancer tumors [73]. ER α belongs to the family of transcription factors known as nuclear hormone receptors, and its structure is characterized by possessing functionally independent domains that include a DNA-binding domain, ligand-binding domain and two transactivation domains designated AF1 and AF2 [74,75]. ER α can mediate both the transcriptional activation and repression of its target genes through the binding of its ligand and by the interaction of its two-transactivation domains with numerous structurally diverse coactivators and corepressor proteins. Some nuclear receptor coactivators, including SRC-1, SRC-2/GRIP1/TIF2/NCOA2, SRC3/RAC3/p/CIP/ACTR/AIB1, CREB binding protein (CBP)/p300, and CBP-associated factor (P/CAF) possess acetyl-transferase activity that increases ER α -dependent transcription by relaxing the chromatin structure (Fig. 2 D) [76,77]. In the absence of E2 or in the presence of ER α antagonists, such as tamoxifen (TOT), the AF2 domain recruits corepressor proteins including NCoR, SMRT, and histone deacetylases (HDACs) that increase the condensation status of chromatin (Fig. 2D) [78,79].

Barrios-Garcia and collaborators demonstrated that TTP reduces ER α -transactivation by interacting with its AF1 and DNA-binding domains and promoting the recruitment of histone deacetylases, in particular HDAC1 (Fig. 2D). Functionally, TTP interaction with ER α reduced the proliferation rate of MCF7 cells and their ability to promote tumor formation in nude mice. These results led the authors to propose that the role of TTP as a tumor suppressor in breast cancer cells is mediated by the downregulation of ER α transactivation. Further, they also suggested that dysregulation in TTP nuclear protein levels may contribute to the development of breast cancer tumors [18].

In 2016 Barrios-Garcia and coworkers showed that the activity of TTP as a corepressor goes beyond the regulation of NF- κ B and ER α . These researchers showed that TTP is physically associated with other nuclear receptors, including the progesterone receptor (PR), glucocorticoid receptor (GC) and androgen receptor (AR) in the nucleus of breast cancer MCF-7 cells in vivo [80]. The interaction with TTP attenuated ER α , PR, GR and AR transactivation activity without affecting their protein levels in MCF-7 cells. These results suggest that nuclear TTP forms part of a general transcription repressor mechanism that regulates the activity of different transcription factors and allows multiple steroid nuclear receptors to oscillate between their function as activators and repressors of gene expression [18–80].

6. The role of TTP in metabolism and development of human disease

Since its cloning and characterization TTP has been associated with the degradation of an increasing number of mRNAs, which may be as high as 10% of all transcripts of the cell. This has led to the finding that TTP plays a significant role in the control of different cellular processes such as metabolic homeostasis, immune response and inflammation. Further, the dysregulation of TTP expression in the cell, which affects both its cytoplasmic and nuclear functions, has been recently associated with the development of multiple human disorders. In this section we review some of the cell processes and human disorders linked to TTP expression in the cell. For more detailed reviews on the relation between TTP and human disease see [1,4,81–83].

6.1. TTP in regulation of metabolism, diabetes and metabolic syndrome

The participation of TTP in metabolic processes is supported by several findings. First, TTP is an insulin responsive gene [84–86]. Second, genetic studies have shown a correlation between reduced TTP expression levels with metabolic syndrome and insulin resistance in humans [87]. Further, expression profiling of omental adipose tissue of non-diabetic obese men with and without metabolic syndrome showed a correlation between two TTP polymorphisms with an increase in body mass index, diastolic blood pressure and LDL-cholesterol levels [84]. A clinical study confirmed the link between TTP and insulin resistance by demonstrating that higher TTP mRNA levels in omental adipose tissue were associated with a lower fasting insulin level and lower insulin resistance in women. These results led the authors to propose that TTP expression in omental adipose tissue, but not in abdominal fat, may offer partial protection against the development of insulin resistance and diabetes [85]. The relation between TTP expression levels and diabetes was confirmed using a mouse model for diabetes. This study showed that TTP mRNA levels are reduced in the liver of diabetic mice compared to normal animals. Interestingly, mice in which TTP expression in the liver was eliminated via tissue-specific KO exhibited an improvement in glucose tolerance and peripheral insulin sensitivity compared with littermate control mice when challenged with a high-fat diet [87]. The authors suggested that hepatic TTP regulates systemic insulin sensitivity in diabetes through the degradation of mRNAs encoding cell factors that control hepatic energy metabolism, such as fibroblast growth factor 21 (FGF21) [87]. FGF21 is a hormone that is important to modulate insulin sensitivity in the liver and skeletal muscle [88] and to increase glucose uptake in skeletal muscle, and brown and beige adipose tissue [89,90]. In response to nutrient uptake TTP promotes the CCR4/NOT mediated degradation of AU-rich mRNAs that encode metabolic regulators such as FGF21. Hepatic regulation of FGF21 expression depends on the CCR4–NOT/FGF21 axis which has been proposed to act as a systemic regulator of metabolism that may one day act as a target of new therapeutic strategies to treat metabolic syndrome and its related morbidities [91].

However, the mechanism responsible for the protective effect of TTP against insulin resistance and metabolic syndrome could be much more complex given the large number of cell factors that are regulated by TTP. Other research groups have suggested that TTP expression may counteract the systemic inflammation associated with chronic renal failure, known as diabetic nephropathy, and which is one of the major complications of type 2 diabetes, through the down regulation of TNF α activity and reduction of cytokine production [28,92–94]. Diabetic nephropathy is characterized by the accumulation of inflammatory cells in the kidney, where they secrete pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-18, and TNF- α damaging the kidney architecture [95]. A clinical study performed in diabetic patients found that serum levels of TTP correlate inversely with the levels of IL-6 and IL-18 and that reduced serum and urine TTP might precede the elevation of IL-6 and IL-18, which exacerbate kidney injury. These results suggested TTP might be used as an early molecular marker, and potential therapeutic target, for renal dysfunction in diabetic patients [94].

More recently it has been suggested that TTP may contribute to the regulation of metabolic homeostasis through diverse pathways. For example, Park and collaborators found that TTP is a negative regulator of glycolysis by downregulating the expression of the enzyme *hexokinase 2* (HK2) in cancer cells [96]. In mammalian cells there are four hexokinases that catalyze the first committed step in glycolysis, in which glucose is phosphorylated to glucose-6-phosphate. Besides its role in glycolysis HK2 is of oncological interest because it is upregulated in multiple human cancers where it plays an important role in tumor progression and metastasis [97,98]. All these results indicate that the function of TTP in metabolism is far from being completely understood and suggest it is necessary to identify all the genes that are regulated by TTP

to understand the impact of this mRNA-binding protein in cell physiology.

6.2. Tristetraprolin and the regulation of immune homeostasis and inflammation

TTP has been shown to play an important role in the synthesis of cytokines and the control of the magnitude and duration of the inflammatory and immune responses by promoting the degradation of multiple ARE-containing mRNAs encoding regulatory proteins [82]. The first evidence of the involvement of TTP in the immune response and disease was described by Taylor and colleagues [19]. They showed that a TTP-KO mouse model developed a severe inflammatory syndrome characterized by arthritis, dermatitis, cachexia, autoimmunity and myeloid hyperplasia [17–19]. This syndrome was caused by the stabilization of the TNF- α mRNA and the accumulation of its protein [27,28,99]. TNF- α plays a critical role in the regulation of the synthesis of inflammatory cytokines. In the last 20 years it has been shown that besides TNF- α , TTP regulates the stability of mRNAs encoding cyclooxygenase 2 (COX2) [100] and multiple proinflammatory cytokines including granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [27], cyclooxygenase 2 (COX2) [100], IL-2 [101], chemokine CXCL1 [42], CXCL2 [102], Interleukin-3 (IL-3) [103] and leukemia inhibitor factor (Lif) [42]. More recently it has been shown that TTP is an important participant in the development and function of T-cells and in particular helper T_H17 lymphocytes [104] which have a central role in the development of autoimmune arthritis [105], multiple sclerosis [106], and inflammatory bowel disease (IBD) [107].

Interestingly, TTP not only targets the stability of mRNAs encoding pro-inflammatory cytokines but it also promotes the degradation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 mRNA [108] and IL-22 mRNA [109] which are involved in tissue antimicrobial protection in intestine, lung and liver [110–112].

One of the most important characteristics of TTP expression is its anti-proliferative effect, which is best exemplified in leukemia and lymphoma cells [14,113–115]. Interestingly, TTP overexpression in lymphoma impairs the Myc-induced lymphomagenesis and abolishes the malignant state [44]. In leukemia TTP also acts as a tumor suppressor that targets the expression levels of IL-23, Bcl-2, Bcl-6 and c-Myc mRNAs. The loss of TTP expression in leukemia cells coincides with a significant increase in the expression of all these proteins and has an oncogenic effect [44–116]. These results have led some researchers to suggest that the dysregulation of TTP expression may impair immune system homeostasis and promote the development of leukemia [117].

6.3. TTP mediated mRNA decay in cancer development and progression

In 2003 Moroni and collaborators injected control and TTP-expressing v-H-ras-dependent PB-3c derived mast cells into nude mice to test the effect of TTP on tumor development. Their results showed that TTP expression delayed tumor growth compared to tumors derived from control PB-3c cells. More importantly, they demonstrated that the tumors developed by the animals from the experimental group had lost the expression of TTP. This study showed that the suppression of tumor progression was mediated by the TTP-induced degradation of interleukin-3 mRNA [118]. Since Moroni and coworkers described TTP as a tumor suppressor other researchers have shown that TTP downregulates the expression of numerous genes of clinical and oncological significance. The targets of TTP include oncogenes, cell factors involved in tumor development and progression, cell cycle control, metastasis, chemotherapy response, apoptosis control, angiogenesis and chemotherapy response [34,83,119–121]. The recent findings that show that TTP expression is suppressed or reduced in different types of tumors of breast, prostate, pancreas, liver, cervical and lung epithelium, underscores the importance of TTP in cancer development and

progression [83–122]. In this section we describe some of the mechanisms responsible for the function of TTP as a tumor suppressor and the physiological and cellular consequences of the reduction or loss of expression of TTP. The role of TTP in cancer has been previously reviewed [83,113,122].

6.3.1. TTP expression regulates cell proliferation and apoptosis

Under normal circumstances tissue development, architecture and function are a result of a delicate balance between cell proliferation and apoptosis. In cancer, tumor growth and progression could result from an increase in cell proliferation, an inhibition of apoptosis, or a combination of both. Functional and cellular studies have shown that the loss of TTP expression promotes cell proliferation and invasion in head, neck, breast, pancreas, colon and liver cancer [123–125]. The proliferation effect of TTP depends on its ability to bind to ARE sequences in the mRNA of cell cycle regulators such as c-Myc and cyclin D1 [126]. c-Myc is a transcription factor that regulates around 15% of the human transcriptome [127] including several genes involved in cell proliferation and tumor development [1]. TTP has been shown to regulate the stability of the c-Myc transcript in hepatocellular carcinoma cell lines, malignant gliomas [126], lymphoma [44] and breast cancer cells [113,128].

An alternative mechanism to explain the role of TTP in cancer cell proliferation involves the downregulation of Cyclin D expression. This protein belongs to the highly conserved cyclin family that function as regulators of cyclin-dependent kinases (CDKs). Cyclin D1 is a key regulator of cell cycle G1/S transition, and it is often over-expressed in different types of cancers [129,130]. Under normal circumstances, cyclin D1 expression is induced by Ras and it forms a protein complex with CDK4/CDK6 to phosphorylate the retinoblastoma (Rb) tumor suppressor protein. The resulting release of the E2F1 transcription factor activates the transcription of multiple genes that promote cell entry into S phase [131]. At this point cyclin D1 levels are quickly downregulated until the cell enters the G2 phase. At this stage, the cell produces high levels of cyclin D1 again to promote cell cycle progression. The suppression or reduction in TTP expression is thought to promote the accumulation of cyclin D1, which has been associated with the progression and metastasis of different tumors, including prostate, breast and non-small cell lung cancer [132–134].

TTP has also been shown to affect cell proliferation by regulating the expression of the transcription factor AP-1. AP-1 is formed by the dimerization of its ZIP domain connecting Jun and Fos subunits. The AP-1 factor is involved in the control of cell proliferation, differentiation, and survival, through regulating the expression and function of different cell cycle regulators [135,136]. AP-1 is an important modulator of the cell cycle in several carcinomas, and it has been found to be dysregulated in breast cancer cells, endometrial carcinomas, colorectal cancer, acute myeloid leukemia (AML), Hodgkin's lymphoma, anaplastic large cell lymphoma (ALCL), ovarian and gastric carcinomas and chronic myelogenous leukemia (CML) [136]. Molecular and functional studies have shown that TTP regulates the expression of both c-Fos and c-Jun through different mechanisms in breast cancer cells. While TTP reduces c-Fos expression by destabilizing its mRNA [137], TTP reduces c-Jun transcription by blocking the nuclear translocation of *NF- κ B* p65 [138]. It has been proposed that reduction in TTP expression may result in an increase of AP-1 protein levels leading to the uncontrolled cell proliferation that characterizes cancerous tumors.

In 2000 Johnson and collaborators showed that TTP overexpression increased apoptosis in several cell lines [139]. The mechanism responsible was later shown to depend on the ability of TTP to bind to and degrade mRNAs encoding proteins that inhibit apoptosis such as c-IAP2 and XIAP [140]. cIAP2 and XIAP belong to a family of proteins that in mammals inhibit the activity of caspases, which are the executors of apoptosis [141], and the ubiquitin dependent pathways that modulate innate immune signaling via activation of *NF- κ B* [141].

More recently TTP has been proposed to regulate apoptosis through the assembly of the “ripososome”, a cell death inducing multiprotein platform that contains as core elements RIP1, FADD, and caspase-8 [142]. RIP1 is a kinase that plays a key role in stress-induced signaling pathways [143]. FAS-associated death domain protein (FADD) is a key adaptor protein that transmits apoptotic signals by recruiting apoptotic pro-caspases to form the death-inducing signal complex [144]. The ripososome is assembled in response to genotoxic stress-induced depletion of XIAP, cIAP1 and cIAP2. Therefore TTP-mediated degradation of cIAP2 and XIAP mRNAs results in the stabilization of the ripososome and enables this cell apoptosis pathway [140,145,146].

The combination of all these results suggests that loss of its expression in cancer cells may promote cell proliferation and tumor development by increasing the half-life of mRNAs encoding protein factors involved in cell cycle progression, cell proliferation, and inhibition of apoptosis.

6.3.2. Downregulation of TTP enhances cell migration and invasion

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process by which epithelial cells are transcriptionally reprogrammed and transformed into motile mesenchymal cells. Cells that go through EMT show reduced adhesion and enhanced migration or invasion [147]. EMT is characterized by a reduction in the expression of the epithelial markers E-cadherin and catenin. Transcriptional regulation of E-cadherin is regulated by the transcription factors Snail1, ZEB, Twist1, MACC1 and SOX9, which in turn are regulated by the TTP-mediated mRNA degradation pathway [148,149]. It has been suggested that loss of TTP expression in cancer cells may affect E-cadherin expression and EMT programming. This hypothesis is supported by the finding that overexpression of TTP in different colorectal cancer cell lines impairs EMT [148].

Another key feature of cancer cells is the increased expression of extracellular proteases such as MMP1, MMP2, MMP9 and MMP13 that, by breaking down the extracellular matrix, allow the invasion of tumor cells into the underlying tissue [150]. Different research groups have shown that expression of metalloproteinase and urokinase plasminogen activator (uPA) and its receptor uPAR are negatively regulated by TTP [124,151,152]. Inactivation or loss of expression of TTP promotes an increase in secretion of MMP9 and MMP2 and invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck [124], whereas TTP overexpression reduces MMP1, MMP13, uPA and uPAR expression levels inhibiting the growth and invasion of breast cancer cells [151] and human glioma cells [152].

6.3.3. Breast cancer: Revisiting the role of TTP as a tumor suppressor

TTP is a tumor suppressor whose expression is reduced or lost in breast cancer, the most frequent form of neoplasia and the second cause of cancer-related death in women in the world [153]. Until recently the anti-proliferative effect of TTP in breast cancer cells was thought to be mediated by its ability to promote the destabilization and degradation of mRNAs encoding cell factors involved in cell proliferation, metastasis and invasion [123]. However, the finding that TTP in the cell nucleus acts as a transcriptional coregulator suggests it may affect tumor development through different mechanisms.

TTP expression has been shown to downregulate the transactivation of ER α , which is the principal driver of cell proliferation, tumor progression and metastasis in 70–80% of all breast cancer tumors [153]. The mechanism responsible involves the binding of TTP to the nuclear hormone receptor and its ability to promote the recruitment of HDACs to the promoter region of ER α target genes [18]. At this moment is not possible to assess to what extent the nuclear and cytoplasmic functions of TTP cooperate to promote breast cancer development. However, the analysis of public tumor protein and mRNA databases help researchers to study the impact of TTP expression levels on tumor progression, metastatic disease and response to treatment.

For example, comparison of TTP mRNA levels in tumors, adjacent-tumor tissue and normal tissue of patients can be performed using the Breast Cancer Gene-Expression Miner database [154]. The results

confirm that on average breast cancer tumors exhibit a 6.0-fold reduction in TTP mRNA levels compared to tumor-adjacent tissue or healthy tissue ($p = 0.0001$, Dunnett-Tukey-Kramer's test) (Fig. 3A). To explore the effect of the reduction in TTP expression levels on the prognosis of breast cancer patients we have used the generated Kaplan-Meier plotter to compare relapse-free survival times (RFS) between patients with tumors exhibiting low and high TTP mRNA expression [155]. The results showed that patients with ER α positive and low TTP mRNA expression tumors had significantly shorter RFS times than patients with high TTP expression levels (Fig. 3B). Further, in patients with ER α negative tumors the RFS rate did not show a significant association with TTP expression levels (Fig. 3C).

Interestingly, comparison of RFS data of patients with ER α positive breast cancer patients that received the selective estrogen receptor modulator tamoxifen as part of their treatment reveals that individuals with low TTP mRNA expression levels had a significantly worse RFS times than patients with high TTP expressing tumors (Fig. 3D). These results suggest that the tumor repressor function of TTP on ER α activity and on the RFS of breast cancer patients depends on the expression of ER α . This is interesting because the expression of TTP in breast cancer cells was shown to repress ER α transactivation without affecting its

mRNA or protein expression levels [18]. Although it is not possible to exclude the contribution of TTP-dependent mRNA decay, these results suggest that the nuclear function of TTP as a transcriptional corepressor plays an important role in tumor development and progression in ER α positive breast cancer patients.

The finding that the nuclear form of TTP represses the transactivation activity of other transcription factors including progesterone, androgen and glucocorticoid nuclear hormone receptors suggests TTP is part of a genome-wide transcriptional regulatory mechanism. Further, this new role of TTP opens the possibility to investigate its participation in other hormone-dependent neoplasias such as prostate, lung and colon cancer. More studies will be necessary to explore the potential of nuclear TTP and its transcriptional targets as tumor molecular markers or as tools in the development of new diagnostic and therapeutic strategies for breast cancer and other neoplasias.

7. TTP is a moonlighting tumor suppressor with different gene expression regulatory activities

The studies on nuclear TTP have broadened its function spectrum from its well characterized role as an RNA-binding and deadenylase-

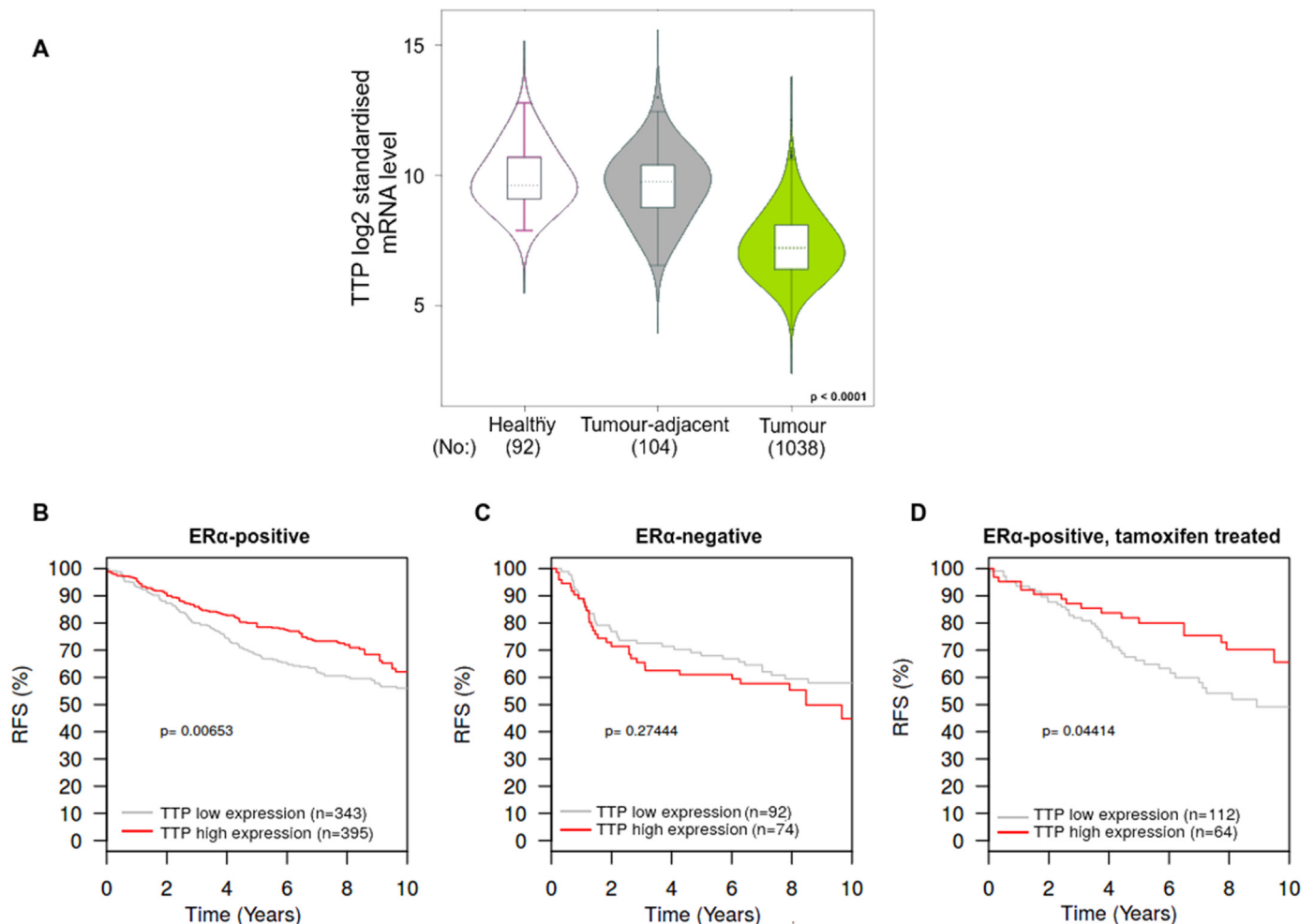


Fig. 3. TTP expression in breast cancer tumors and Kaplan-Meier analysis of the association between TTP expression and relapse-free survival (RFS) in breast cancer patients. (A) TTP mRNA expression levels were determined using the Breast Cancer Gene-Expression Miner database [154]. The results show a significant reduction in TTP mRNA levels in tumors compared to adjacent-tumor tissue and normal tissue in breast cancer patients. Results are shown as a violin plot of the log₂ of TTP mRNA expression ($p = 0.0001$, Dunnett-Tukey-Kramer's test). To explore the relationship between TTP and patient outcome the mRNA levels in tumors from breast cancer patients were ranked from low to high based on TTP mRNA median values. Relapse free survival (RFS) plots were generated using the gene chip database Kaplan-Meier Plotter [155]. The survival analysis was restricted to ER α status and tamoxifen vs. other endocrine treatments. Logrank $P < 0.05$ was considered as statistically significant. (B) Patients with ER α -positive breast cancer tumors and low TTP expression levels had worse RFS times than patients with high TTP expressing tumors. (C) Patients with ER α -negative breast cancer tumors had no significant association between TTP expression and RFS. (D) Patients with ER α -positive breast cancer tumors and low TTP expression levels that received tamoxifen as part of their treatment had worse RFS times than tamoxifen treated patients with high TTP expressing tumors.

recruiting factor in ARE-containing mRNA turnover, to that of a nuclear HDAC-interacting transcriptional corepressor. The different functions of TTP in the cytoplasm and nucleus seem to be regulated by its phosphorylation status and its nucleocytoplasmic shuttling in the cell. The functional versatility of TTP places it in a group of cell factors collectively referred to as moonlighting proteins that are characterized by exhibiting two or more different biological functions in the cell [156–158]. Moonlighting proteins include enzymes, receptors, transmembrane channels, chaperones, ribosomal proteins [159], pre-mRNA-splicing factors and proteasome associated proteins [160]. The mechanisms that allow moonlighting proteins to oscillate between their different functions include subcellular relocalization, tissue-specific expression, substrate or ligand binding, and changes in their oligomeric structure and phosphorylation status [156,160,161]. The moonlighting activity of TTP seems to depend first on its nucleocytoplasmic shuttling and second on its ability to act as a scaffold protein that interacts with cytoplasmic ARE-containing mRNAs and deacetylase enzymes or with nuclear transcription factors and chromatin modifying enzymes.

Proteins exhibiting different biological functions most likely were selected during evolution as a mechanism to generate biological and functional complexity without requiring expansion of the genome [157]. Initially, moonlighting proteins were considered rare occurrences in biology but now their relevance and widespread participation in numerous cellular processes, including transcriptional regulation, are well accepted. The impact of moonlighting proteins in eukaryotic cell biology is best exemplified by the finding that most enzymes participating in glycolysis and in the Krebs cycle of tricarboxylic acids have moonlighting activities [161].

The functional and molecular studies described in this review suggest that TTP possesses moonlighting activities. In the cytoplasm TTP forms complexes with different mRNA-deadenylases to promote ARE-containing mRNAs turnover. This mechanism seems to be aimed at reducing or resetting signal transduction pathways that participate among others in the regulation of inflammation and cell proliferation [4,7,45,83,113,123]. In the nucleus, TTP seems to have a direct role in the transcriptional regulation of gene expression by participating in different HDAC-containing protein complexes and acting as a transcriptional corepressor of transcription factors like NF- κ B and the nuclear hormone receptors ER, AR, PG and GR.

Changes in TTP expression levels in the cell have been associated with different human pathologies and diseases including inflammation, arthritis, and different types of cancer. The identification of the genes whose tissue-specific expression is regulated at the transcriptional or post-transcriptional levels by TTP has been slow and difficult. However, the development of highly efficient CRISPR/Cas9-based genome-wide screens, gene editing in animal models and other genome-wide molecular tools like Cross-Linking and ImmunoPrecipitation (iCLIP) may prove helpful in exploring the different roles of TTP in gene expression in cells and tissues and in understanding its involvement in metabolism, transcriptional regulation, and human disease.

Funding information

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT-Problemas Nacionales 2017-01-4900 and Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México PAPIIT IV200218/PAPIIT IN208018.

Acknowledgments

M-G-C-B is a recipient of a postdoctoral scholarship from DGAPA-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). G-R-G and J-P-G-S are students of Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas-UNAM, A-P-V is a student of Programa de Posgrado en Ciencias

Biológicas-UNAM and J-H-P-J is a student of Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas-UNAM. G-R-G, J-P-G-S, J-H-P-J, A-P-V are recipients of a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

References

- [1] C.R. Ross, S.E. Brennan-Laun, G.M. Wilson, Tristetraprolin: roles in cancer and senescence, *Ageing Res. Rev.* 11 (2012) 473–484, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.005>.
- [2] G.A. Taylor, W.S. Lai, R.J. Oakey, M.F. Seldin, T.B. Shows, R.L. Jr Eddy, P.J. Blakeshear, The human TTP protein: sequence, alignment with related proteins, and chromosomal localization of the mouse and human genes, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 3454, <https://doi.org/10.1093/nar/19.12.3454>.
- [3] D.R. Forsdyke, cDNA cloning of mRNAs which increase rapidly in human lymphocytes cultured with concanavalin-a and cycloheximide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129 (1985) 619–625.
- [4] D. Ciaia, N. Cherradi, J.J. Feige, Multiple functions of tristetraprolin/TIS11 RNA-binding protein in the regulation of mRNA biogenesis and degradation, *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (2013) 2031–2044, <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1150-y>.
- [5] P.J. Blakeshear, Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 945–952, <https://doi.org/10.1042/bst0300945>.
- [6] W.S. Lai, D.J. Stumpo, E.A. Kennington, A.B. Burkholder, J.M. Ward, D.L. Fargo, P.J. Blakeshear, Life without TTP: apparent absence of an important anti-inflammatory protein in birds, *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 305 (2013) R689–R700, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00310.2013>.
- [7] W.S. Lai, M.L. Wells, L. Perera, P.J. Blakeshear, The tandem zinc finger RNA binding domain of members of the tristetraprolin protein family, *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 10 (2019), e1531, <https://doi.org/10.1002/wrna.1531>.
- [8] M.L. Wells, L. Perera, P.J. Blakeshear, An ancient family of RNA-binding proteins: still important! *Trends Biochem. Sci.* 42 (2017) 285–296, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.12.003>.
- [9] D. Wang, Y. Guo, C. Wu, G. Yang, Y. Li, C. Zheng, Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in Arabidopsis and rice, *BMC Genomics* 9 (2008) 44, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-44>.
- [10] T. Murata, K. Hikita, N. Kaneda, Transcriptional activation function of zinc finger protein TIS11 and its negative regulation by phorbol ester, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274 (2000) 526–532, <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3182>.
- [11] T. Murata, Y. Yoshino, N. Morita, N. Kaneda, Identification of nuclear import and export signals within the structure of the zinc finger protein TIS11, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 1242–1247, [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)00363-7](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)00363-7).
- [12] R.S. Phillips, S.B.V. Ramos, P.J. Blakeshear, Members of the tristetraprolin family of tandem CCCH zinc finger proteins exhibit CRM1-dependent nucleocytoplasmic shuttling, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11606–11613, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111457200>.
- [13] R.N. DuBois, M.W. McLane, K. Ryder, L.F. Lau, D. Nathans, A growth factor-inducible nuclear protein with a novel Cys/His repetitive sequence, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 19185–19191 PMID: 1699942.
- [14] E. Warbrick, D. Glover, A *Drosophila melanogaster* homolog of the TISII family of immediate early genes that can rescue a *cdrl cdc25* mutant strain of fission yeast, *Gene* 151 (1994) 243–246, [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90664-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90664-5).
- [15] Q. Ma, H.R. Herschman, The yeast homologue YTIS11, of the mammalian TIS11 gene family is a non-essential, glucose repressible gene, *Oncogene* 10 (1995) 487–4947845673.
- [16] W.S. Lai, M.J. Thompson, G.A. Taylor, Y. Liu, P.J. Blakeshear, Promoter analysis of Zfp-36, the mitogen-inducible gene encoding the zinc finger protein tristetraprolin, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 25266–25272, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.25266>.
- [17] E. Carballo, P.J. Blakeshear, Roles of tumor necrosis factor- α receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome, *Blood* 98 (2001) 2389–2395, <https://doi.org/10.1182/blood.v98.8.2389>.
- [18] T. Barrios García, A. Tecalco Cruz, V. Gómez Romero, S. Reyes Carmona, I. Meneses Morales, A. León Del Río, Tristetraprolin repress estrogen receptor α transactivation in breast cancer cells, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 183–196, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.548552>.
- [19] G.A. Taylor, E. Carballo, D.M. Lee, W.S. Lai, M.J. Thompson, D.D. Patel, D.I. Schenkman, G.S. Gilkeson, H.E. Broxmeyer, B.F. Haynes, P.J. Blakeshear, A pathogenic role for TNF α in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency, *Immunity* 4 (1996) 445–454, [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80411-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80411-2).
- [20] A. Desroches-Castan, N. Cherradi, J.J. Feige, D. Ciaia, A novel function of Tis11b/BRF1 as a regulator of Dll4 mRNA 3'-end processing, *Mol. Biol. Cell* 22 (2011) 3625–3633, <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0149>.
- [21] D.J. Stumpo, H.E. Broxmeyer, T. Ward, S. Cooper, G. Hangoc, Y.J. Chung, W.C. Shelley, E.K. Richfield, M.K. Ray, M.C. Yoder, P.D. Aplan, P.J. Blakeshear, Targeted disruption of Zfp36l2, encoding a CCCH tandem zinc finger RNA-binding protein, results in defective hematopoiesis, *Blood* 114 (2009) 2401–2410, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-214619>.
- [22] W.S. Lai, E. Carballo, J.R. Strum, E.A. Kennington, R.S. Phillips, P.J. Blakeshear, Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor α mRNA, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 4311–4323, <https://doi.org/10.1128/mcb.19.6.4311>.

- [23] E. Wahle, Poly(a) tail length control is caused by termination of processive synthesis, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 2800–2808, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.6.2800>.
- [24] A.O. Subtelny, S.W. Eichhorn, G.R. Chen, H. Sive, D.P. Bartel, Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control, *Nature* 508 (2014) 66–71, <https://doi.org/10.1038/nature13007>.
- [25] T. Raisch, C.T. Chang, Y. Leviansky, S. Muthukumar, S. Raunser, E. Valkov, Reconstitution of recombinant human CCR4-NOT reveals molecular insights into regulated deadenylation, *Nat. Commun.* 10 (2019) 3173, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11094-z>.
- [26] C. Barreau, L. Paillard, H.B. Osborne, AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* 33 (2006) 7138–7150, <https://doi.org/10.1093/nar/gki1012>.
- [27] E. Carballo, W.S. Lai, P.J. Blackshear, Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability, *Blood* 95 (2000) 1891–1899, <https://doi.org/10.1182/blood.V95.6.1891>.
- [28] E. Carballo, W.S. Lai, P.J. Blackshear, Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin, *Science* 281 (1998) 1001–1005, <https://doi.org/10.1126/science.281.5379.1001>.
- [29] D. Beisang, P.R. Bohjanen, Perspectives on the ARE as it turns 25 years old, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3 (2012) 719–731, <https://doi.org/10.1002/wrna.1125>.
- [30] T. Bakheet, B.R. Williams, K.S. Khabar, ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) D111–D114, <https://doi.org/10.1093/nar/gkj052>.
- [31] A.S. Hales, R. El-Badrawi, K.S. Khabar, ARED organism: expansion of ARED reveals AU-rich element cluster variations between human and mouse, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) D137–D140, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm959>.
- [32] D. Bhandari, T. Raisch, O. Weichenrieder, S. Jonas, E. Izaurralde, Structural basis for the Nanos-mediated recruitment of the CCR4-NOT complex and translational repression, *Genes Dev.* 28 (2014) 888–901, <https://doi.org/10.1101/gad.237289.113>.
- [33] J. Van Etten, T.L. Schagat, J. Hrit, C.A. Weidmann, J. Brumbaugh, J.J. Coon, A.C. Goldstrohm, Human Pumilio proteins recruit multiple deadenylases to efficiently repress messenger RNAs, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 36370–36383, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373522>.
- [34] S.A. Brooks, P.J. Blackshear, Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action, *Biochim. Biophys. Acta* 1829 (2013) 666–679, <https://doi.org/10.1016/j.bbaggm.2013.02.003>.
- [35] C. Temme, M. Simonelig, E. Wahle, Deadenylation of mRNA by the CCR4-NOT complex in *Drosophila*: molecular and developmental aspects, *Front. Genet.* 5 (2014) 143, <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00143>.
- [36] M.A. Collart, The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 7 (2016) 438–454, <https://doi.org/10.1002/wrna.1332>.
- [37] W.S. Lai, E.A. Kennington, P.J. Blackshear, Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(a) ribonuclease, *Mol. Cell Biol.* 23 (2003) 3798–3812, <https://doi.org/10.1128/mcb.23.11.3798-3812.2003>.
- [38] M. Gao, D.T. Fritz, L.P. Ford, J. Wilusz, Interaction between a poly(a)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro, *Mol. Cell* 5 (2000) 479–488, [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80442-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80442-6).
- [39] M. Fenger-Gron, C. Fillman, B. Norrild, J. Lykke-Andersen, Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping, *Mol. Cell* 20 (2005) 905–915, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.031>.
- [40] J. Lykke-Andersen, E. Wagner, Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1, *Genes Dev.* 19 (2005) 351–361, <https://doi.org/10.1101/gad.1282305>.
- [41] G. Stoecklin, T. Mayo, P. Anderson, ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway, *EMBO Rep.* 7 (2006) 72–77, <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400572>.
- [42] L.Q. Qiu, W.S. Lai, A. Bradbury, D.C. Zeldin, P.J. Blackshear, Tristetraprolin (TTP) coordinately regulates primary and secondary cellular responses to proinflammatory stimuli, *J. Leukoc. Biol.* 97 (2015) 723–736, <https://doi.org/10.1189/jlb.3A0214-106R>.
- [43] T.J. Horner, W.S. Lai, D.J. Stumpo, P.J. Blackshear, Stimulation of polo-like kinase 3 mRNA decay by tristetraprolin, *Mol. Cell Biol.* 29 (2009) 1999–2010, <https://doi.org/10.1128/MCB.00982-08>.
- [44] R.J. Rounbehler, M. Fallahi, C. Yang, M.A. Steeves, W. Li, J.R. Doherty, F.X. Schaub, S. Sanduja, D.A. Dixon, P.J. Blackshear, J.L. Cleveland, Tristetraprolin impairs myc-induced lymphoma and abolishes the malignant state, *Cell* 150 (2013) 563–574, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.033>.
- [45] C. Tiedje, M.D. Diaz-Muñoz, P. Trulley, H. Ahlfors, K. Laas, P.J. Blackshear, M. Turner, M. Gaestel, The RNA-binding protein TTP is a global post-transcriptional regulator of feedback control in inflammation, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 7418–7440, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw474>.
- [46] A.R. Gruber, J. Fallmann, F. Kratochvill, P. Kovarik, I.L. Hofacker, AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) D66–D69, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq990>.
- [47] G.A. Taylor, M.J. Thompson, W.S. Lai, P.J. Blackshear, Mitogens stimulate the rapid nuclear to cytosolic translocation of tristetraprolin, a potential zinc-finger transcription factor, *Mol. Endocrinol.* 10 (1996) 140–146, <https://doi.org/10.1210/mend.10.2.8825554>.
- [48] K.R. Mahtani, M. Brook, J.L. Dean, G. Sully, J. Saklatvala, A.R. Clark, Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability, *Mol. Cell Biol.* 21 (2001) 6461–6469, <https://doi.org/10.1128/mcb.21.9.6461-6469.2001>.
- [49] J.R. Graham, M.C. Hendershott, J. Terragni, G.M. Cooper, mRNA degradation plays a significant role in the program of gene expression regulated by phosphatidylinositol 3-kinase signaling, *Mol. Cell Biol.* 30 (2010) 5295–5305, <https://doi.org/10.1128/MCB.00303-10>.
- [50] E. Hitti, T. Iakovleva, M. Brook, S. Deppenmeier, A.D. Gruber, D. Radzich, A.R. Clark, P.J. Blackshear, A. Kotlyarov, M. Gaestel, Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element, *Mol. Cell Biol.* 26 (2006) 2399–2407, <https://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2399-2407.2006>.
- [51] H. Cao, F. Dzineku, P.J. Blackshear, Expression and purification of recombinant tristetraprolin that can bind to tumor necrosis factor-alpha mRNA and serve as a substrate for mitogen-activated protein kinases, *Arch. Biochem. Biophys.* 412 (2003) 106–120, [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00012-2).
- [52] E. Carballo, H. Cao, W.S. Lai, E.A. Kennington, D. Campbell, P.J. Blackshear, Decreased sensitivity of Tristetraprolin-deficient cells to p38 inhibitors suggests the involvement of Tristetraprolin in the p38 signaling pathway, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42580–42587, <https://doi.org/10.1074/jbc.M104953200>.
- [53] C. Bourcier, P. Griseri, R. Grépin, C. Bertolotto, N. Mazure, G. Pagès, Constitutive ERK activity induces downregulation of tristetraprolin, a major protein controlling interleukin8/CXCL8 mRNA stability in melanoma cells, *Am. J. Phys. Cell Phys.* 301 (2011) C609–C618, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00506.2010>.
- [54] J.A. Carman, S.G. Nadler, Direct association of tristetraprolin with the nucleoporin CAN/Nup214, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 445–449, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.080>.
- [55] L.F. Pemberton, B.M. Paschal, Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export, *Traffic* 6 (2005) 187–198, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00270.x>.
- [56] D. Nonclercq, F. Journé, I. Laios, C. Chaboteaux, R.A. Toillon, G. Leclercq, G. Laurent, Effect of nuclear export inhibition on estrogen receptor regulation in breast cancer cells, *J. Mol. Endocrinol.* 39 (2007) 105–118, <https://doi.org/10.1677/JME-07-0040>.
- [57] M. Lombardi, G. Castoria, A. Migliaccio, M.V. Barone, R. Di Stasio, A. Ciociola, D. Bottero, H. Yamaguchi, E. Appella, F. Auricchio, Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells, *J. Cell Biol.* 182 (2008) 327–340, <https://doi.org/10.1083/jcb.200712125>.
- [58] Z. Xu, K. Graham, M. Foote, F. Liang, R. Rizkallah, M. Hurt, Y. Wang, Y. Wu, Y. Zhou, 14-3-3 protein targets misfolded chaperone-associated proteins to aggregates, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 4173–4186, <https://doi.org/10.1242/jcs.126102>.
- [59] M. Baou, A. Jewell, J.J. Murphy, TIS11 family proteins and their roles in posttranscriptional gene regulation, *J. Biomed. Biotechnol.* 2009 (2009) 634520, <https://doi.org/10.1155/2009/634520>.
- [60] D. Benjamin, M. Schmidlin, L. Min, B. Gross, C. Moroni, BRF1 protein turnover and mRNA decay activity are regulated by protein kinase B at the same phosphorylation sites, *Mol. Cell Biol.* 26 (2006) 9497–9507, <https://doi.org/10.1128/MCB.01099-06>.
- [61] L. Sun, G. Stoecklin, S. Van Way, V. Hinkovska-Galcheva, R.F. Guo, P. Anderson, T.P. Shanley, Tristetraprolin (TTP)-14-3-3 complex formation protects TTP from dephosphorylation by protein phosphatase 2a and stabilizes tumor necrosis factor-alpha mRNA, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 3766–3777, <https://doi.org/10.1074/jbc.M607347200>.
- [62] K.T. Wang, H.H. Wang, Y.Y. Wu, Y.L. Su, P.Y. Chiang, N.Y. Lin, S.C. Wang, G.D. Chang, C.J. Chang, Functional regulation of Zfp3611 and Zfp3612 in response to lipopolysaccharide in mouse RAW264.7 macrophages, *J. Inflamm (Lond)* 12 (2015) 42, <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0088-x>.
- [63] F.P. Marchese, A. Aubareda, C. Tudor, J. Saklatvala, A.R. Clark, J.L.E. Dean, MAPKAP kinase 2 blocks tristetraprolin-directed mRNA decay by inhibiting CAF1 deadenylation recruitment, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 27590–27600, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.136473>.
- [64] B.A. Johnson, J.R. Stehn, M.B. Yaffe, T.K. Blackwell, Cytoplasmic localization of tristetraprolin involves 14-3-3-dependent and -independent mechanisms, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18029–18036, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.10465200>.
- [65] L. Sun, G. Stoecklin, S. Van Way, V. Hinkovska-Galcheva, R.F. Guo, P. Anderson, T.P. Shanley, Tristetraprolin (TTP)-14-3-3 complex formation protects TTP from dephosphorylation by protein phosphatase 2a and stabilizes tumor necrosis factor-alpha mRNA, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 3766–3777, <https://doi.org/10.1074/jbc.M607347200>.
- [66] H. Sandler, G. Stoecklin, Control of mRNA decay by phosphorylation of tristetraprolin, *Biochem. Soc. Trans.* 36 (2008) 491–496, <https://doi.org/10.1042/BST0360491>.
- [67] S. Sanduja, F.F. Blanco, L.E. Young, V. Kaza, D.A. Dixon, The role of tristetraprolin in cancer and inflammation, *Front Biosci (Landmark Ed)* 17 (2012) 174–188, <https://doi.org/10.2741/3920>.
- [68] S.V. Vergara, S. Puig, D.J. Thiele, Early recruitment of AU-rich element-containing mRNAs determines their cytosolic fate during iron deficiency, *Mol. Cell Biol.* 31 (2011) 417–429, <https://doi.org/10.1128/MCB.00754-10>.
- [69] K. Dudziak, N. Mottalebi, S. Senkel, E.L. Edghill, S. Rosengarten, M. Roose, C. Bingham, S. Ellard, G.U. Ryffel, Transcription factor HNF1beta and novel partners affect nephrogenesis, *Kidney Int.* 74 (2008) 210–217, <https://doi.org/10.1038/ki.2008.149>.
- [70] J. Liang, T. Lei, Y. Song, N. Yanes, Y. Qi, M. Fu, RNA-destabilizing factor tristetraprolin negatively regulates NF-kappaB signaling, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 29383–29390, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024745>.
- [71] L.F. Chen, W.C. Greene, Shaping the nuclear action of NF-kappaB, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 392–401, <https://doi.org/10.1038/nrm1368>.
- [72] N. Pejanovic, K. Hochrainer, T. Liu, B.L. Arner, M.P. Soares, J. Anrather, Regulation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) transcriptional activity by p65 acetylation by the

- chaperonin containing TCP1 (CCT), *PLoS One* 7 (2012), e42020, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042020>.
- [73] V.C. Jordan, Third annual William L. McGuire Memorial Lecture. "Studies on the estrogen receptor in breast cancer" – 20 years as a target for the treatment and prevention of cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* 36 (1995) 267–285, <https://doi.org/10.1007/BF00713399>.
- [74] L. Tora, J. White, C. Brou, D. Tasset, N. Webster, E. Scheer, P. Chambon, The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions, *Cell* 59 (1989) 477–487, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90031-7).
- [75] M.T. Zzukerman, A. Esty, D. Santiso-Mere, P. Danielian, M.G. Parker, R.B. Stein, J.W. Pike, D.P. McDonnell, Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions, *Mol. Endocrinol.* 8 (1994) 21–30, <https://doi.org/10.1210/mend.8.1.8152428>.
- [76] R. Métivier, G. Penot, M.R. Hübner, G. Reid, H. Brand, M. Kos, F. Gannon, Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter, *Cell* 115 (2003) 751–763, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00934-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00934-6).
- [77] C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors, *Genes Dev.* 14 (2000) 121–141, <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.121>.
- [78] J.D. Chen, R.M. Evans, A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors, *Nature* 377 (1995) 454–457, <https://doi.org/10.1038/377454a0>.
- [79] R.M. Lavinsky, K. Jepsen, T. Heinzel, J. Torchia, T.M. Mullen, R. Schiff, A. Leon-Del-Rio, M. Ricote, S. Ngo, J. Gemsch, S.G. Hilsenbeck, C.K. Osborne, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, D.W. Rose, Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 2920–2925, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2920>.
- [80] T. Barrios-García, V. Gómez-Romero, A. Tecalco-Cruz, V. Valadéz-Graham, A. León-Del-Río, Nuclear tristetraprolin acts as corepressor of multipled steroid nuclear receptors in breast cancer cells, *Mol Genet Metab Rep.* 7 (2016) 20–26, <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2016.02.004>.
- [81] S. Patial, P.J. Blakeshear, Tristetraprolin as a therapeutic target in inflammatory disease, *Trends Pharmacol. Sci.* 37 (2016) 811–821, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.07.002>.
- [82] M. Fu, P.J. Blakeshear, RNA-binding proteins in immune regulation: a focus on C/EBP zinc finger proteins, *Nat. Rev. Immunol.* 17 (2017) 130–143, <https://doi.org/10.1038/nri.2016.129>.
- [83] Y. Saini, J. Chen, S. Patial, The Tristetraprolin family of RNA-binding proteins in cancer: Progress and future prospects, *Cancers (Basel)* 12 (2020) 1539, <https://doi.org/10.3390/cancers12061539>.
- [84] L. Bouchard, A. Tchernof, Y. Deshaies, S. Marceau, O. Lescelleur, S. Biron, M.C. Vohl, ZFP36: a promising candidate gene for obesity-related metabolic complications identified by converging genomics, *Obes. Surg.* 17 (2007) 372–382, <https://doi.org/10.1007/s11695-007-9067-5>.
- [85] L. Bouchard, M.C. Vohl, Y. Deshaies, C. Rhéaume, M. Daris, A. Tchernof, Visceral adipose tissue zinc finger protein 36 mRNA levels are correlated with insulin, insulin resistance index, and adiponectinemia in women, *Eur. J. Endocrinol.* 157 (2007) 451–457, <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0073>.
- [86] H. Cao, J.F. Jr Urban, R.A. Anderson, Insulin increases tristetraprolin and decreases VEGF gene expression in mouse 3T3-L1 adipocytes, *Obesity (Silver Spring)* 16 (2008) 1208–1218, <https://doi.org/10.1038/oby.2008.65>.
- [87] K.T. Sawicki, H.C. Chang, J.S. Shapiro, M. Bayeva, A. De Jesus, B.N. Finck, J.A. Wertheim, P.J. Blakeshear, H. Ardehali, Hepatic tristetraprolin promotes insulin resistance through RNA destabilization of FGF21, *JCI Insight* 3 (2018), e95948, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95948>.
- [88] H. Li, G. Wu, Q. Fang, M. Zhang, X. Hui, B. Sheng, L. Wu, Y. Bao, P. Li, A. Xu, W. Jia, Fibroblast growth factor 21 increases insulin sensitivity through specific expansion of subcutaneous fat, *Nat. Commun.* 9 (2018) 272, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02677-9>.
- [89] F.L. Mashili, R.L. Austin, A.S. Deshmukh, T. Fritz, K. Caidahl, K. Bergdahl, J.R. Zierath, A.V. Chibalin, D.E. Moller, A. Kharitonenkova, A. Krook, Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 27 (2011) 286–297, <https://doi.org/10.1002/dmrr.1177>.
- [90] F.M. Fisher, S. Kleiner, N. Douris, E.C. Fox, R.J. Mepani, F. Verdeguer, J. Wu, A. Kharitonenkov, J.S. Flier, E. Maratos-Flier, B.M. Spiegelman, FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis, *Genes Dev.* 26 (2012) 271–281, <https://doi.org/10.1101/gad.177857.111>.
- [91] M. Morita, N. Siddiqui, S. Katsumura, C. Rouya, O. Larsson, T. Nagashima, B. Hekmatnejad, A. Takahashi, H. Kiyonari, M. Zang, R. St-Arnaud, Y. Oike, Y. Giguère, I. Topisirovic, M. Okada-Hatakeyama, T. Yamamoto, N. Sonenberg, Hepatic posttranscriptional network comprised of CCR4-NOT deadenylase and FGF21 maintains systemic metabolic homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (2019) 7973–7981, <https://doi.org/10.1073/pnas.1816023116>.
- [92] A. Neisinger, D. Kontoyiannis, A. Kotlyarova, R. Winzen, R. Eckert, H.D. Volk, H. Holtmann, G. Kollias, M. Gaestel, MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 3065–3068, <https://doi.org/10.1074/jbc.C100685200>.
- [93] M.B. Duran-Salgado, A.F. Rubio-Guerra, Diabetic nephropathy and inflammation, *World J. Diabetes* 5 (2014) 393–398, <https://doi.org/10.4239/wjcd.v5.i3.393>.
- [94] F. Liu, J. Guo, Q. Zhang, D. Liu, L. Wen, Y. Yang, L. Yang, Z. Liu, The expression of Tristetraprolin and its relationship with urinary proteins in patients with diabetic nephropathy, *PLoS One* 10 (2015), e0141471, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141471>.
- [95] Y. Liu, Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis, *Nat. Rev. Nephrol.* 7 (2011) 684–696, <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.149>.
- [96] D.J. Kim, M.T. Vo, S.H. Choi, J.H. Lee, S.Y. Jeong, C.H. Hong, J.S. Kim, U.H. Lee, H.M. Chung, B.J. Lee, W.J. Cho, J.W. Park, Tristetraprolin-mediated hexokinase 2 expression regulation contributes to glycolysis in cancer cells, *Mol. Biol. Cell* 30 (2019) 542–553, <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-09-0606>.
- [97] P.L. Pedersen, The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: an overview, *J. Bioenerg. Biomembr.* 39 (2007) 1–12, <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9070-5>.
- [98] R. Fang, T. Xiao, Z. Fang, Y. Sun, F. Li, Y. Gao, Y. Feng, L. Li, Y. Wang, X. Liu, H. Chen, X.Y. Liu, H. Ji, microRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 23227–23235, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373084>.
- [99] E. Carballo, G.S. Gilkeson, P.J. Blakeshear, Bone marrow transplantation reproduces the tristetraprolin-deficiency syndrome in recombination activating gene-2 (–/–) mice, Evidence that monocyte/macrophage progenitors may be responsible for TNF α overproduction, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 986–995, <https://doi.org/10.1172/JCI119649>.
- [100] L.E. Young, S. Sanduja, K. Bemis-Standoli, E.A. Pena, R.L. Price, D.A. Dixon, The mRNA binding proteins HuR and tristetraprolin regulate cyclooxygenase 2 expression during colon carcinogenesis, *Gastroenterology* 136 (2009) 1669–1679, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.010>.
- [101] R.L. Ogilvie, J.R. Sternjohn, B. Rattenbacher, I.A. Vlasova, D.A. Williams, H.H. Hau, P.J. Blakeshear, P.R. Bohjanen, Tristetraprolin mediates interferon- γ mRNA decay, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 11216–11223, <https://doi.org/10.1074/jbc.M901229200>.
- [102] L. Mahmoud, W. Moghrabi, K.S.A. Khabar, E.G. Hitti, Bi-phased regulation of the post-transcriptional inflammatory response by Tristetraprolin levels, *RNA Biol.* 16 (2019) 309–319, <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1572437>.
- [103] G. Stoecklin, X.F. Ming, R. Looser, C. Moroni, Somatic mRNA turnover mutants implicate tristetraprolin in the interleukin-3 mRNA degradation pathway, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) 3753–3763, <https://doi.org/10.1128/mcb.20.11.3753-3763.2000>.
- [104] H. Peng, H. Ning, Q. Wang, J. Lai, L. Wei, D.J. Stumpo, P.J. Blakeshear, M. Fu, R. Hou, D.F. Hofst, J. Liu, Tristetraprolin regulates T H 17 cell function and ameliorates DSS-induced colitis in mice, *Front. Immunol.* 11 (2020) 1952, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01952>.
- [105] J. Leipe, M. Grunke, C. Dechant, C. Reindl, U. Kerzendorf, H. Schulze-Koops, A. Skapenko, Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis, *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 2876–2885, <https://doi.org/10.1002/art.27622>.
- [106] J. van Langelaar, R.M. van der Vuurst de Vries, M. Janssen, A.F. Wierenga-Wolf, I.M. Spilt, T.A. Siepmann, W. Dankers, G.M.G.M. Verjans, H.E. de Vries, E. Lubberts, R.Q. Hintzen, M.M. Van Luijn, T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention, *Brain* 141 (2018) 1334–1349, <https://doi.org/10.1093/brain/awy069>.
- [107] A. Ueno, L. Jeffery, T. Kobayashi, T. Hibi, S. Ghosh, H. Jijon, Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease, *J. Autoimmun.* 87 (2018) 38–49, <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.004>.
- [108] G. Stoecklin, S.A. Tenenbaum, T. Mayo, S.V. Chittur, A.D. George, T.E. Baroni, P.J. Blakeshear, P. Anderson, Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 11689–11699, <https://doi.org/10.1074/jbc.M709657200>.
- [109] L. Härdle, M. Bachmann, F. Bollmann, A. Pautz, T. Schmid, W. Eberhardt, H. Kleinert, J. Pfeilschifter, H. Mühl, Tristetraprolin regulation of interleukin-22 production, *Sci. Rep.* 5 (2015) 15112, <https://doi.org/10.1038/srep15112>.
- [110] H.M. McGee, B.A. Schmidt, C.J. Booth, G.D. Yancopoulos, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, S. Stevens, R.A. Flavell, V. Horsley, IL-22 promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin, *J Invest Dermatol.* 133 (2013) 1321–1329, <https://doi.org/10.1038/jid.2012.463>.
- [111] L.J. Li, C. Gong, M.H. Zhao, B.S. Feng, Role of interleukin-22 in inflammatory bowel disease, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 18177–18188, <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18177>.
- [112] J.A. Dudakov, A.M. Hanash, M.R.M. van den Brink, Interleukin-22: immunobiology and pathology, *Annu. Rev. Immunol.* 33 (2015) 747–785, <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112123>.
- [113] J.M. Park, T.H. Lee, T.H. Kang, Roles of Tristetraprolin in tumorigenesis, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 3384, <https://doi.org/10.3390/ijms19113384>.
- [114] M. Baou, A. Jewell, A. Muthurania, R.G. Wickremasinghe, K.L. Yong, R. Carr, P. Marsh, J.J. Murphy, Involvement of Tis11b, an AU-rich binding protein, in induction of apoptosis by rituximab in B cell chronic lymphocytic leukemia cells, *Leukemia* 23 (2009) 986–989, <https://doi.org/10.1038/leu.2008.340>.
- [115] M. Baou, J.D. Norton, J.J. Murphy, AU-rich RNA binding proteins in hematopoiesis and leukemogenesis, *Blood* 118 (2011) 5732–5740, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-347237>.
- [116] C. Molle, T. Zhang, L.Y. de Lendonck, C. Gueydan, M. Andrianne, F. Sherer, G. Van Simaey, P.J. Blakeshear, O. Leo, S. Goriely, Tristetraprolin regulation of interleukin 23 mRNA stability prevents a spontaneous inflammatory disease, *J. Exp. Med.* 210 (2013) 1675–1684, <https://doi.org/10.1084/jem.20120707>.
- [117] J. Guo, H. Qu, Y. Chen, J. Xia, The role of RNA-binding protein TIP in cancer and immunity, *Med. Oncol.* 34 (2017) 196, <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1055-6>.
- [118] G. Stoecklin, B. Gross, X.F. Ming, C. Moroni, A novel mechanism of tumor suppression by destabilizing AU-rich growth factor mRNA, *Oncogene* 22 (2003) 3554–3561, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206418>.

- [119] D.M. Carrick, P.J. Blackshear, Comparative expression of tristetraprolin (TTP) family member transcripts in normal human tissues and cancer cell lines, *Arch. Biochem. Biophys.* 462 (2007) 278–285, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.04.011>.
- [120] H.H. Lee, Y.J. Son, W.H. Lee, Y.W. Park, S.W. Chae, W.J. Cho, Y.M. Kim, H.J. Choi, D.H. Choi, S.W. Jung, Y.J. Min, S.E. Park, B.J. Lee, H.J. Cha, J.W. Park, Tristetraprolin regulates expression of VEGF and tumorigenesis in human colon cancer, *Int. J. Cancer* 126 (2010) 1817–1827, <https://doi.org/10.1002/ijc.24847>.
- [121] W.H. Lee, M.W. Han, S.H. Kim, D. Seong, J.H. An, H.W. Chang, S.Y. Kim, S.W. Kim, J.C. Lee, Tristetraprolin Posttranscriptionally downregulates TRAIL death receptors, *Cells* 9 (2020) 1851, <https://doi.org/10.3390/cells9081851>.
- [122] S.E. Brennan, Y. Kuwano, N. Alkharouf, P.J. Blackshear, M. Gorospe, G.M. Wilson, The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis, *Cancer Res.* 69 (2009) 5168–5176, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4238>.
- [123] L. Milke, K. Schulz, A. Weigert, W. Sha, T. Schmid, B. Brüne, Depletion of tristetraprolin in breast cancer cells increases interleukin-16 expression and promotes tumor infiltration with monocytes/macrophages, *Carcinogenesis* 34 (2013) 850–857, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs387>.
- [124] E.A. van Tubergen, R. Banerjee, M. Liu, R.V. Broek, E. Light, S. Kuo, S.E. Feinberg, A.L. Willis, G. Wolf, T. Carey, C. Bradford, M. Prince, F.P. Worden, K.L. Kirkwood, N.J. D'Silva, Inactivation or loss of TTP promotes invasion in head and neck cancer via transcript stabilization and secretion of MMP9, MMP2, and IL-6, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 1169–1179, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2927>.
- [125] Z.R. Wei, C. Liang, D. Feng, Y.J. Cheng, W.M. Wang, D.J. Yang, Y.X. Wang, Q.P. Cai, Low tristetraprolin expression promotes cell proliferation and predicts poor patients outcome in pancreatic cancer, *Oncotarget* 7 (2016) 17737–17750, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7397>.
- [126] M. Marderosian, A. Sharma, A.P. Funk, R. Vartanian, J. Masri, O.D. Jo, J.F. Gera, Tristetraprolin regulates cyclin D1 and c-Myc mRNA stability in response to rapamycin in an Akt-dependent manner via p38 MAPK signaling, *Oncogene* 25 (2006) 6277–6290, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209645>.
- [127] J. Gearhart, E.E. Pashos, M.K. Prasad, Pluripotency redux—advances in stem-cell research, *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 1469–1472, <https://doi.org/10.1056/NEJMp078126>.
- [128] I. Pandiri, Y. Chen, Y. Joe, H.J. Kim, J. Park, H.T. Chung, J.W. Park, Tristetraprolin mediates the anti-proliferative effects of metformin in breast cancer cells, *Breast Cancer Res. Treat.* 156 (2016) 57–64, <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3742-y>.
- [129] D.W. Stacey, Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 158–163, [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00008-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00008-5).
- [130] J.P. Alao, The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention, *Mol. Cancer* 6 (2007) 24, <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-24>.
- [131] K. Yang, M. Hitomi, D.W. Stacey, Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell, *Cell Div* 1 (2006) 32, <https://doi.org/10.1186/1747-1028-1-32>.
- [132] D.C. Betticher, J. Heighway, P.S. Hasleton, H.J. Altermatt, W.D. Ryder, T. Cerny, N. Thatcher, Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer, *Br. J. Cancer* 73 (1996) 294–300, <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.52>.
- [133] M. Drobnjak, I. Osman, H.I. Scher, M. Fazzari, C. Cordon-Cardo, Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1891–1895, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-99-0192>.
- [134] J.K. Kim, J.A. Diehl, Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer, *J. Cell. Physiol.* 220 (2009) 292–296, <https://doi.org/10.1002/jcp.21791>.
- [135] E. Shaulian, M. Karin, AP-1 in cell proliferation and survival, *Oncogene* 20 (2001) 2390–2400, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204383>.
- [136] S. Trop-Steinberg, A. Azar, AP-1 expression and its clinical relevance in immune disorders and Cancer, *Am J Med Sci* 353 (2017) 474–483, <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.01.019>.
- [137] W.D. Patino, J.G. Kang, S. Matoba, O.Y. Mian, B.R. Gochoico, P.M. Hwang, Atherosclerotic plaque macrophage transcriptional regulators are expressed in blood and modulated by Tristetraprolin, *Circ. Res.* 98 (2006) 1282–1289, <https://doi.org/10.1161/01.RES.000022284.48288.28>.
- [138] L. Xu, H. Ning, L. Gu, Q. Wang, W. Lu, H. Peng, W. Cui, B. Ying, C.R. Ross, G.M. Wilson, L. Wei, W.S.M. Wold, J. Liu, Tristetraprolin induces cell cycle arrest in breast tumor cells through targeting AP-1/c-Jun and NF- κ B pathway, *Oncotarget* 6 (2015) 41679–41691, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6149>.
- [139] B.A. Johnson, M. Gega, T.K. Blackwell, Similar but distinct effects of the tristetraprolin/TIS11 immediate-early proteins on cell survival, *Oncogene* 19 (2000) 1657–1664, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203474>.
- [140] C.W. Kim, H.K. Kim, M.T. Vo, H.H. Lee, H.J. Kim, Y.J. Min, W.J. Cho, J.W. Park, Tristetraprolin controls the stability of cIAP2 mRNA through binding to the 3'UTR of cIAP2 mRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400 (2010) 46–52, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.136>.
- [141] R.S.Y. Wong, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30 (2011) 1–14, <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>.
- [142] T. Tenev, K. Bianchi, M. Darding, M. Broemer, C. Langlais, F. Wallberg, A. Zachariou, J. Lopez, M. MacFarlane, K. Cain, P. Meier, The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs, *Mol. Cell* 43 (2011) 432–448, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.006>.
- [143] N. Festjens, T. Vanden Berghe, S. Cornelis, P. Vandenebeele, RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 400–410, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402085>.
- [144] L. Tourmeur, G. Chiochia, FADD: a regulator of life and death, *Trends Immunol.* 31 (2010) 260–269, <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.05.005>.
- [145] T. Selmi, A. Martello, T. Vignudelli, E. Ferrari, A. Grande, C. Gemelli, P. Salomoni, S. Ferrari, T. Zanocco-Marani, ZFP36 expression impairs glioblastoma cell lines viability and invasiveness by targeting multiple signal transduction pathways, *Cell Cycle* 11 (2012) 1977–1987, <https://doi.org/10.4161/cc.20309>.
- [146] T. Selmi, C. Alecci, M. Dell'Aquila, L. Montorsi, A. Martello, F. Guizzetti, N. Volpi, S. Parenti, S. Ferrari, P. Salomoni, A. Grande, T. Zanocco-Marani, ZFP36 stabilizes RIP1 via degradation of XIAP and cIAP2 thereby promoting ripoptosome assembly, *BMC Cancer* 15 (2015) 357, <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1388-5>.
- [147] A. Gheldof, G. Berx, Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 116 (2013) 317–336, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00014-5>.
- [148] L. Montorsi, F. Guizzetti, C. Alecci, A. Caporali, A. Martello, C.G. Atene, S. Parenti, S. Pizzini, P. Zanovello, S. Bortoluzzi, S. Ferrari, A. Grande, T. Zanocco-Marani, Loss of ZFP36 expression in colorectal cancer correlates to wnt/ β -catenin activity and enhances epithelial-to-mesenchymal transition through upregulation of ZEB1, SOX9 and MACC1, *Oncotarget* 7 (2016) 59144–59157, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10828>.
- [149] N.A. Yoon, H.G. Jo, U.H. Lee, J.H. Park, J.E. Yoon, J. Ryu, S.S. Kang, Y.J. Min, S.A. Ju, E.H. Seo, I.Y. Huh, B.J. Lee, J.W. Park, W.J. Cho, Tristetraprolin suppresses the EMT through the down-regulation of Twist1 and Snail1 in cancer cells, *Oncotarget* 7 (2016) 8931–8943, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7094>.
- [150] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [151] W. Al-Ahmadi, M. Al-Ghamdi, N. Al-Souhibani, K.S. Khabar, miR-29a inhibition normalizes HuR over-expression and aberrant AU-rich mRNA stability in invasive cancer, *J. Pathol.* 230 (2013) 28–38, <https://doi.org/10.1002/path.4178>.
- [152] J. Ryu, N.A. Yoon, Y.K. Lee, J.Y. Jeong, S. Kang, H. Seong, J. Choi, N. Park, N. Kim, W.J. Cho, S.H. Paek, G.J. Cho, W.S. Choi, J.Y. Park, J.W. Park, S.S. Kang, Tristetraprolin inhibits the growth of human glioma cells through downregulation of urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor mRNAs, *Mol. Cell* 32 (2015) 156–162, <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.2259>.
- [153] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424, <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [154] P. Jézéquel, M. Campone, W. Gouraud, C. Charbonnel, C. Leux, G. Ricolleau, L. Campion, Bc-GenExMiner: an easy-to-use online platform for gene prognostic analyses in breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* 131 (2012) 765–775, <http://bcgenex.centregauducheu.fr/BC-GEM/GEM-Accueil.php?js=1> (Accessed 15 October 2020).
- [155] M. Ringnér, E. Fredlund, J. Häkkinen, Å. Borg, J. Staaf, GOBO: gene expression-based outcome for breast cancer online, *PLoS One* 6 (2011), e17911, <http://co.bmc.lu.se/gobo/> (Accessed 16 October 2020).
- [156] C.J. Jeffery, Moonlighting proteins, *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999) 8–11, [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01335-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01335-8).
- [157] S.D. Copley, An evolutionary perspective on protein moonlighting, *Biochem. Soc. Trans.* 42 (2014) 1684–1691, <https://doi.org/10.1042/BST20140245>.
- [158] C.J. Jeffery, An introduction to protein moonlighting, *Biochem. Soc. Trans.* 42 (2014) 1679–1683, <https://doi.org/10.1042/BST20140226>.
- [159] H. Liu, C.J. Jeffery, Moonlighting proteins in the fuzzy logic of cellular metabolism, *Molecules* 25 (2020) 3440, <https://doi.org/10.3390/molecules25153440>.
- [160] C.J. Jeffery, Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14 (2004) 663–668, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.10.001>.
- [161] G. Sriram, J.A. Martinez, E.R.B. McCabe, J.C. Liao, K.M. Dipple, Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? *Am. J. Hum. Genet.* 76 (2005) 911–924, <https://doi.org/10.1086/430799>.