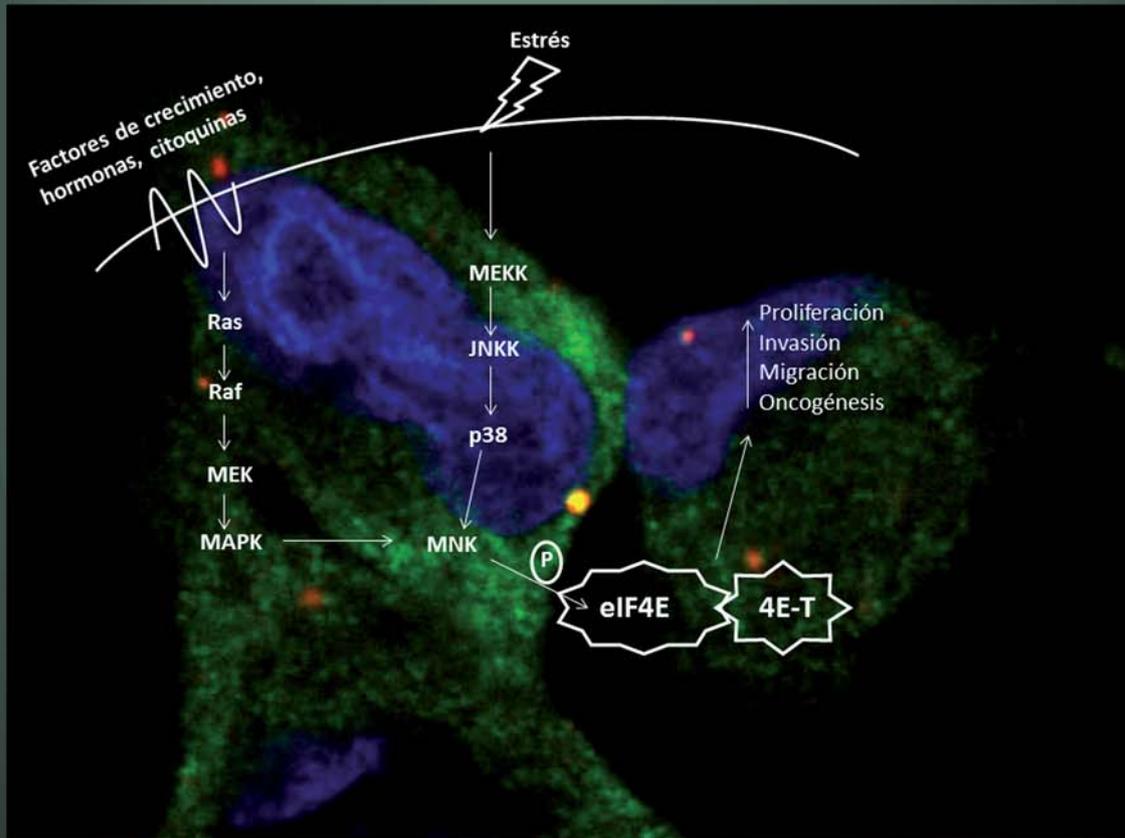


# Estudio de la fosforilación de eIF4E y del factor 4E-T en situaciones de estrés celular en cáncer de mama



**Tesis doctoral**  
**Alba Martínez Díaz**

Julio 2014







**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departamento de Biología y Bioquímica Molecular**  
Unidad de Bioquímica, Facultad de Medicina

## **Estudio de la fosforilación de eIF4E y del factor 4E-T en situaciones de estrés celular en cáncer de mama**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Alba Martínez Díaz para optar al grado de Doctora en la Universidad Autónoma de Barcelona.

Trabajo realizado en el Departamento de Patología Molecular del Hospital Universitario Vall d'Hebron, bajo la dirección del Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras y del Dr. Trond Aasen.

Barcelona, 2014

Doctoranda

Director

Codirector

Tutor

Alba  
Martínez

Santiago  
Ramón y Cajal

Trond  
Aasen

Anna  
Meseguer



*A mis padres y abuelas,  
a ti Agus,  
y en especial a mis yayos, Avelino y Félix*



“La ciencia se compone de errores,  
que a su vez,  
son los pasos hacia la verdad”

-Julio Verne



---

# ÍNDICE

---



Índice de figuras.....	XVII
Índice de tablas .....	XXI
Abreviaturas.....	XXV
Resumen .....	XXXI
1. INTRODUCCIÓN.....	- 3 -
1. 1 Traducción (Síntesis de proteínas).....	- 3 -
1.1.1 Regulación de la traducción cap dependiente.....	- 5 -
1.1.2 Inicio de la traducción cap-dependiente .....	- 6 -
1.1.2.1 Factores implicados en la formación del complejo eIF4F.....	- 7 -
eIF4E.....	- 7 -
eIF4A .....	- 7 -
eIF4G .....	- 9 -
1.2. eIF4E.....	- 10 -
1.2.1 Función de eIF4E.....	- 12 -
1.2.1.1 eIF4E como factor de inicio de la traducción cap-dependiente .....	- 12 -
1.2.1.2 eIF4E como transportador de mRNAs de núcleo a citoplasma .....	- 12 -
1.2.1.3 Otras funciones de eIF4E .....	- 13 -
1.2.2 Regulación de eIF4E.....	- 13 -
1.2.2.1 4E-BPs .....	- 14 -
1.2.2.2 Regulación eIF4E vía Mnk1/2.....	- 15 -
1.2.2.2.1 Mnks .....	- 16 -
1.2.2.2.2 Efectos de la fosforilación de eIF4E .....	- 18 -
1.2.2.3 Otras modificaciones y regulación de eIF4E .....	- 19 -
1.3 Traducción y cáncer .....	- 20 -
1.3.1 eIF4E y cáncer .....	- 22 -
1.3.1.1 Papel de la fosforilación de eIF4E en cáncer .....	- 24 -
1.3.1.2 eIF4E en cáncer de mama .....	- 25 -
1.4 Transición epitelio mesénquima (EMT) .....	- 26 -
1.4.1 Cadherinas .....	- 27 -
1.4.2 Papel de eIF4E en la invasión y migración celular .....	- 30 -
1.5 4E-T .....	- 31 -
1.5.1 Regulación 4E-T.....	- 31 -
1.5.2 Función 4E-T .....	- 31 -
1.6 Estrés celular.....	- 33 -

1.6.1 Gránulos de estrés (GS) .....	- 34 -
1.6.2 <i>Processing bodies</i> (PBs).....	- 36 -
1.6.2.1 HUR (ELAV like RNA binding protein 1) .....	- 37 -
1.6.2.2 Ago2 .....	- 37 -
1.6.3 eIF4E en estrés.....	- 38 -
1.6.3.1 eIF4E y 4E-T en estrés .....	- 40 -
2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO .....	- 43 -
3. OBJETIVOS.....	- 47 -
4. MATERIALES Y METODOS .....	- 51 -
4.1. Cultivos celulares .....	- 51 -
4.2. Recuento de células .....	- 52 -
4.3. Construcción de los plásmidos .....	- 53 -
4.4. Transformación.....	- 56 -
4.5. Aislamiento del DNA .....	- 57 -
4.6 Generación de retrovirus e infección .....	- 58 -
4.7 Generación de lentivirus e infección .....	- 59 -
4.8 Transfección con siRNAs.....	- 60 -
4.9 Estrés celular.....	- 60 -
4.10 Ensayo clonogénico .....	- 61 -
4.11 Ensayo de migración celular .....	- 61 -
4.12 Ensayo de invasión celular.....	- 61 -
4.13 Ensayo MTT.....	- 62 -
4.14 Detección de apoptosis.....	- 63 -
4.15 Extracción de proteínas .....	- 63 -
4.16 Cuantificación de proteínas .....	- 63 -
4.17 Western blot .....	- 64 -
4.18 Inmunoprecipitación.....	- 65 -
4.19 Ensayo 7-Methyl-GTP-Sepharosa pull-down .....	- 66 -
4.20 Inmuncitofluorescencia .....	- 67 -
4.21 Perfil polisómico .....	- 67 -
4.22 Extracción RNA polisomas .....	- 68 -
4.23 Síntesis de cDNA .....	- 68 -
4.24 PCR con retrotranscriptasa (RT-PCR) a tiempo real.....	- 69 -
4.25 Obtención de muestras de tumores .....	- 69 -

4.26 Inmunohistoquímica de las muestras tumorales .....	- 70 -
4.27 Evaluación inmunohistoquímica de tumores .....	- 70 -
4.28 Análisis estadístico de las muestras tumorales .....	- 71 -
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>- 75 -</b>
5.1 Estudio in vitro de la función de la fosforilación de eIF4E.....	- 75 -
5.1.1 Fosforilación de eIF4E y resistencia a estrés celular.....	- 76 -
5.1.1.1 La fosforilación de eIF4E aumenta la capacidad de formación de colonias .....	- 76 -
5.1.1.2 La fosforilación de eIF4E incrementa la resistencia a diferentes situaciones de estrés .....	- 78 -
5.1.1.3 La fosforilación de eIF4E previene la activación de la apoptosis.....	- 78 -
5.1.1.4 La inhibición de la fosforilación endógena de eIF4E incrementa la sensibilidad a estrés .....	- 80 -
5.1.1.5 El mutante eIF4E-S209D forma unos cuerpos citoplasmáticos con elevada afinidad hacia 4E-T.....	- 83 -
5.1.1.6 El complejo peIF4E/4E-T interacciona con las proteínas HuR y Ago2 .....	- 85 -
5.1.1.7 El complejo peF4E/4E-T juega un papel importante bajo situaciones de estrés- 87 -	-
5.1.1.8 Ago2 y HuR juegan un papel importante junto al complejo peIF4E/4E-T en la recuperación celular .....	- 89 -
5.1.1.9 El mutante S209D de eIF4E media la síntesis proteica de ciertas proteínas tras el estrés. ....	- 90 -
5.2 Estudio in vitro de la función de eIF4E-Transporter (4E-T).....	- 93 -
5.2.1 La sobreexpresión de 4E-T incrementa la migración y la invasión celular .....	- 96 -
5.2.2 Se requiere la unión 4E-T /eIF4E para que se produzca un incremento en invasión y migración .....	- 99 -
5.2.3 eIF4E tiene que estar fosforilado en el complejo eIF4E/4E-T para que se produzca un aumento en la capacidad migratoria e invasiva de la célula. ....	- 100 -
5.3 peIF4E en cáncer de mama.....	- 101 -
5.4 4E-T en cáncer de mama.....	- 106 -
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>- 111 -</b>
6.1 Estudio de la fosforilación de eIF4E en situaciones de estrés .....	- 111 -
6.1.2 La fosforilación de eIF4E incrementa la resistencia a ciertas situaciones de estrés- 111 -	-
6.1.3 La fosforilación de eIF4E previene la activación de la apoptosis.....	- 113 -
6.1.4 El mutante fosfomimético forma unos cuerpos citoplasmáticos con elevada afinidad hacia 4E-T.....	- 113 -

6.1.5 El mutante fosfomimético de eIF4E media la síntesis proteica de ciertas proteínas tras el estrés.....	- 116 -
6.2 Estudio in vitro de la función de 4E-T .....	- 118 -
6.2.1 Se requiere la unión 4E-T /pelf4E para que se produzca un incremento en invasión y migración .....	- 120 -
6.3 pelf4E en cáncer de mama.....	- 122 -
6.4 4E-T en cáncer de mama.....	- 123 -
7. CONCLUSIONES.....	- 127 -
8. BIBLIOGRAFÍA.....	- 133 -
ANEXO.....	- 147 -
AGRADECIMIENTOS .....	- 179 -

---

# **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

---



# Índice de figuras

## Introducción

<b>Figura 1:</b> Fases de la traducción.....	-4-
<b>Figura 2:</b> Organización de tripletes de la secuencia del mRNA.....	-5-
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de inicio de la traducción.....	-8-
<b>Figura 4:</b> Modelo de las dos funciones conocidas de eIF4E: exportación de mRNAs y traducción cap-dependiente.....	-14-
<b>Figura 5:</b> Esquema de las vías de regulación de eIF4E.....	-15-
<b>Figura 6:</b> Señales de identidad del cáncer.....	-21-
<b>Figura 7:</b> Niveles elevados de eIF4E incrementan la tumorigénesis.....	-23-
<b>Figura 8:</b> Vía de activación de la invasión celular mediante el complejo N-cadherina y FGFR-1.....	-28-
<b>Figura 9:</b> Representación esquemática de los seis lugares de fosforilación de 4E-T por JNK.....	-31-
<b>Figura 10:</b> 4E-T media la importación de eIF4E a núcleo.....	-33-
<b>Figura 11:</b> Modelo hipotético entre la relación de GS y PBs.....	-35-
<b>Figura 12:</b> Componentes de los PBs y GS.....	-36-
<b>Figura 13:</b> Esquema representativo del role de la fosforilación de 4E-T en PBs.....	-38-

## Materiales y métodos

<b>Figura 14:</b> Cámara de Neubauer.....	-53-
<b>Figura 15:</b> Mapa de restricción vector pCS3MT y pLPCX.....	-55-
<b>Figura 16:</b> Mapa de restricción del vector pBABE.....	-56-
<b>Figura 17:</b> Mapa de restricción del vector sh4E-T-pLKO.1-puro.....	-57-

## Resultados

<b>Figura 18:</b> Niveles de la expresión de eIF4E y Myc-tag.....	-75-
<b>Figura 19:</b> Ensayo de proliferación celular mediante MTT.....	-76-

<b>Figura 20:</b> Tinción con cristal violeta del ensayo de formación de colonias realizado en las líneas celulares MDA-MB-231 y HaCaT.....	-77-
<b>Figura 21:</b> Efecto en la proliferación y resistencia celular de diferentes tipos de estrés.....	-79-
<b>Figure 22:</b> Actividad apoptótica medida con el ensayo de luminiscencia caspasa-3/7.....	-80-
<b>Figura 23:</b> Western blot de los niveles de eIF4E fosforilado (peIF4E) y eIF4E.....	-80-
<b>Figura 24:</b> La inhibición de la fosforilación de IF4E disminuye la resistencia a estrés.....	-81-
<b>Figura 25:</b> Niveles de peIF4E en MEF WT y MEF KO.....	-82-
<b>Figura 26:</b> La inhibición de la fosforilación de eIF4E inhibe la recuperación tras el tratamiento con arsénico y cisplatino.....	-82-
<b>Figura 27:</b> Colocalización del mutante S209D en las líneas celulares MDA-MB-231 y HaCaT con 4E-T.....	-84-
<b>Figura 28:</b> Inmunoprecipitación de eIF4E y 4E-T.....	-85-
<b>Figura 29:</b> Inmunofluorescencia en la línea celular MDA-MB-231 con la sobreexpresión de eIF4E-S209A y eIF4E-S209D, de 4E-T con los marcadores de GS (TIA-1) y PBs (DCP1A).....	-86-
<b>Figura 30:</b> Inmunoprecipitación de 4E-T, Ago2 y HuR.....	-87-
<b>Figura 31:</b> La inhibición de 4E-T endógeno disminuye la capacidad de S209D de recuperarse tras un estrés celular.....	-88-
<b>Figura 32:</b> Es necesaria la unión de eIF4E a 4E-T y que eIF4E esté fosforilado para que se dé la recuperación tras el estrés celular.....	-89-
<b>Figura 33:</b> 4E-T por sí solo no permite la recuperación celular tras el tratamiento con arsénico.....	-89-
<b>Figura 34:</b> La inhibición de Ago2 y HuR evita la recuperación celular del mutante S209D tras el tratamiento con arsénico.....	-90-
<b>Figura 35:</b> eIFE-S209D inhibe rápidamente la síntesis proteica tras el tratamiento con arsénico.....	-91-
<b>Figura 36:</b> Se observa un incremento de la síntesis proteica en células que sobreexpresan el mutante S209D.....	-92-
<b>Figura 37:</b> Q-PCR del mRNA de Ciclina D1 y Mcl-1 de la fracción polisomal.....	-93-
<b>Figura 38:</b> Niveles basales de 4E-T en las diferentes líneas celulares.....	-93-
<b>Figura 39:</b> La sobreexpresión de 4E-T incrementa los niveles de N-cadherina.....	-94-
<b>Figura 40:</b> Los marcadores de EMT Slug, Twist y Snail no se ven aumentados por la sobreexpresión de 4E-T.....	-95-

<b>Figura 41:</b> La sobreexpresión de 4E-T incrementa los niveles de MMP9 y MMP3.....	-96-
<b>Figura 42:</b> Ensayo de proliferación celular mediante MTT del mutante de 4E-T Y30A, 4E-T WT y sh 4E-T.....	-97-
<b>Figura 43:</b> La sobreexpresión de 4E-T confiere más capacidad migratoria.....	-98-
<b>Figura 44:</b> MTT a las 24 horas con mitomicina C.....	-98-
<b>Figura 45:</b> La sobreexpresión de 4E-T confiere más capacidad invasiva.....	-99-
<b>Figura 46:</b> La inhibición del 4E-T endógeno disminuye la capacidad migratoria e invasiva de las células.....	-99-
<b>Figura 47:</b> La unión de 4E-T y eIF4E es necesaria para el incremento en migración e invasión debido a 4E-T.....	-100-
<b>Figura 48:</b> La fosforilación de eIF4E es necesaria para que la unión 4E-T/eIF4E incremente la migración y la invasión celular.....	-101-
<b>Figura 49:</b> Inmunohistoquímica de 4E-T, pEIF4E nuclear y HuR.....	-105-
<b>Figura 50:</b> Análisis por western blot del grado de expresión de pEIF4E y eIF4E en diferentes tumores de la serie clínica de estudio.....	-106-
<b>Figura 51:</b> Inmunohistoquímica de la expresión de 4E-T, YB-1, pYB-1, Ago2 y N-caderina en dos tumores de la serie clínica de estudio.....	-107-
 <b>Discusión</b>	
<b>Figura 52:</b> Posible relación entre GS y PBs.....	-116-
<b>Figura 53:</b> Modelo de la posible vía de activación de la invasión y migración celular.....	-121-



# Índice de tablas

## Introducción

**Tabla 1:** Descripción de los diferentes factores de iniciación y proteínas implicadas en el inicio de la traducción.....-9-

**Tabla 2:** Ejemplos de proteínas de unión a eIF4E.....-11-

## Materiales y métodos

**Tabla 3:** Dosis del antibiótico puromicina utilizadas para la selección de las líneas celulares infectadas.....-59-

**Tabla 4:** Solución para preparar el gel concentrador.....-65-

**Tabla 5:** Solución para preparar el gel separador.....-65-

**Tabla 6:** Anticuerpos utilizados para western blot.....-66-

**Tabla 7:** Anticuerpos primarios utilizados en las inmunohistoquímicas.....-71-

## Resultados

**Tabla 8:** Características de la serie de tumores de mama analizados.....-102-

**Tabla 9:** Test de coeficiente de correlación de Spearman de eIF4E total y fosforilado (nuclear y citoplasmático) con diferentes características clínico-patológicas.....-103-

**Tabla 10:** Niveles de expresión de marcadores analizados en la serie clínica de 77 tumores de mama.....-104-

**Tabla 11:** Test de coeficiente de correlación de Spearman de eIF4E total y fosforilado (nuclear y citoplasmático) con 4E-T, Ago2 y HuR.....-104-

**Tabla 12:** Significancia y coeficiente de correlación de 4E-T con YB-1, pYB-1, Ago2, N-caderona y peIF4E nuclear.....-106-



---

# **ABREVIATURAS**

---



# Abreviaturas

**4E-T:** Transportador de eIF4E (*eIF4E transporter*)

**A:** Adenina

**Ago2:** *Argonaute 2*

**AMD:** Degradación de elementos ARE (*ARE-mediated decay*)

**ARE:** mRNAs que contienen elementos ARE (ricos en AU) (*AU-Rich Elements*)

**ATM:** *Protein kinase ataxia-telangiectasia mutated*

**ATP:** Adenosín trifosfato

**Bcl-X:** *B-cell lymphoma-extra large*

**BIRC2:** *Baculoviral IAP repeat containing 2*

**BRSK2:** *BR serine/threonine kinase 2*

**BSA:** Albúmina sérica bovina

**BTF3:** *Basic transcription factor 3*

**C:** Citosina

**Cap:** Guanosina trifosfato metilada

**CDDP:** Cisplatino

**CDK1:** Quinasa dependiente de Ciclina 1

**CGP:** *N3-(4-Fluorophenyl)-1H-pyrazolo-[3,4-d]pyrimidine-3,4-diamine*

**CK1:** *Casein kinase 1*

**COX-2:** Ciclooxygenasa 2

**CPE:** *Cytoplasmic polyadenylation element*

**CPEB:** Proteína citoplasmática de unión a elementos poliadenilados (*Cytoplasmic polyadenylation element binding protein*)

**CRM-1:** *Chromosomal region maintenance 1*

**CYFIP1:** *Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1*

**Dcp:** *Decapping mRNA*

**DMSO:** Dimetilsulfòxid

**DNA:** Ácido desoxiribonucleico

**dNTPs:** Desoxinucleótidos trifosfato

**DTT:** Ditiotreitòl

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)

**eIF:** Factor de inicio de la traducción eucariota (*Eukaryotic Initiation Factor*)

**EMT:** Transición epitelio mesénquima

**EMX2:** *Empty spiracles homeobox 2*

**ERK:** Quinasa reguladora de señales extracelulares (*Extracellular signal-regulated kinases*)

**FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factors*)

**FGFR:** Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor Receptors*)

**FXR1:** *Fragile X Mental Retardation, Autosomal Homolog 1*

**G3BP:** *Ras-GAP SH3 domain binding protein*

**GDP:** Guanosín difosfato

**GFP:** Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

**GS:** Gránulos de estrés

**GTP:** Guanosín trifosfato

**HCL:** Ácido clorhídrico

**HEPES:** Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico

**hnRNP:** *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*

**HuR:** *ELAV like RNA binding protein 1*

**IF:** Inmunofluorescencia

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**IP:** Inmunoprecipitación

**Jnk:** Quinasas c-Jun N-terminal (*Jun N-terminal kinase*)

**KCL:** Cloruro de potasio

**kDa:** Kilodalton

**KI:** *Knock-in*

**KO:** *Knock out*

**LB:** Caldo de Lisogenia (*Lysogeny broth*)

**LRRC:** *leucine-rich repeat protein*

**LSm1:** *U6 small nuclear RNA associated*

**MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

**MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón (*Mouse Embryonic Fibroblast*)

**MEK:** Proteína quinasa activada por mitógenos (*MAP kinase kinase*)

**Met:** Metionina

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio

**MKK1:** Proteína quinasa activada pro mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase kinase*)

**MMPs:** Metaloproteinasas de la matriz (*Matrix metalloproteinases*)

**Mnk:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos que interactúan con quinasas [(*Mitogen-Activated Protein Kinase*)-*Interacting Kinase*]

**mRNA:** RNA mensajero

**MTA1:** *Metástasis associated 1*

**mTOR:** *Mammalian target of rapamycin*

**MTT:** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

**Myc:** Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis aviar V-myc

**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>:** Ortovanadato de sodio

**NaAsO<sub>2</sub>:** Arsenito de sodio

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NaF:** Fluoruro de sodio

**NaOAc:** Acetato de sodio

**NaPPi:** Pirofosfato tetrasódico

**NES:** Señal de exportación nuclear (*Nuclear Export Signal*)

**ng:** Nanogramos

**NLS:** Señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*)

**NMD:** *Nonsense-mediated mRNA decay*

**NPC:** Complejo de poro nuclear (*nuclear pore complex*)

**NTP:** Nucleótido trifosfato

**OCT:** Medio de congelación (*Optimal Cutting Temperatur*)

**ODC:** Ornitina descarboxilasa

**PABP:** Proteína de unión a Poly-A (*Poly(A)-binding protein*)

**PBs:** *Processing bodies*

**PBS:** Tampon de fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PERK:** *Protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase*

**PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa (*phosphatidylinositol 3-kinase*)

**Pkc:** Proteína quinasa C

**PKR:** *Double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR*

**PML:** *Progressive multifocal leukoencephalopathy*

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**PP2A:** *Protein phosphatase 2A*

**PSF:** *Protein-associated splicing factor*

**PVDF:** *Polyvinylidene Fluoride*

**Q-PCR:** PCR cuantitativa

**r.p.m.:** Revoluciones por minuto

**Raf:** Proteína quinasa serina-treonina

**RISC:** Complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-induced silencing complex*)

**RNA:** Ácido ribonucleico

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

**RQ:** Método comparativo, estudio de la expresión de los genes (o PCR)

**RT-PCR:** PCR con retrotranscriptasa inversa

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**shRNA:** *Short hairpin* RNA. ARN de interferencia pequeño con conformación de horquilla, codificado en un vector de expresión

**siRNA:** *Small interference* RNA. ARN de interferencia pequeño con conformación lineal

**SMN:** *Survival of motor neuron 1*

**SUMO:** *Small ubiquitin-like modifier*

**T:** Timina

**TBS:** *Tris Buffer Saline*

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

**TIA1:** *TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein*

**TNF- $\alpha$ :** *Tumor necrosis factor  $\alpha$*

**Tris (Trizma):** tris(hidroximetil)aminometano

**Triton:** *octyl phenol ethoxylate*

**tRNA:** RNA de transferencia

**T-TBS:** *Tween 20* en TBS

**TTP:** Tristetraprolin

**U:** Uracilo

**UTR:** Región no traducida (*Untranslated región*)

**UV:** Ultravioleta

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

**VPg:** *viral protein genome-linked*

**WB:** *western blot*

**WT:** *Wild type*

**Xrn1:** *5'-3' exoribonuclease 1*

**YB-1:** *Y-box binding protein 1*

**ZEB:** *Zinc finger E-box-binding homeobox*

**$\mu$ g:** Microgramos

**$\mu$ l:** Microlitro

---

# **RESUMEN**

---



# Resumen

En los últimos años se ha descrito la desregulación de la síntesis proteica en muchas enfermedades, esto ha incrementado la investigación de nuevos mecanismos que controlan la expresión génica, en particular a nivel del inicio de la traducción. La mayor enfermedad con alteraciones en la traducción de mRNAs es el cáncer, donde se han encontrado desregulados varios factores implicados en el inicio de la traducción, incluyendo el eIF4E, eIF4G y 4E-BPs.

Hipotetizamos que la regulación del inicio de la traducción es importante para la respuesta y la resistencia al estrés celular que ocurre durante el desarrollo del tumor. Nuestro estudio se centra en el factor de inicio de la traducción eIF4E (y su proteína de unión 4E-T) en cáncer de mama, donde se ha observado que elevados niveles de eIF4E se encuentran asociados con la malignidad y un peor pronóstico. La fosforilación de la serina 209 de eIF4E parece ser esencial para las propiedades tumorigénicas de eIF4E. Hemos analizado el rol de la fosforilación de eIF4E en diferentes líneas celulares tumorales bajo diferentes situaciones de estrés como el tratamiento con arsénico (estrés oxidativo), la privación de nutrientes y el tratamiento con drogas quimioterapéuticas (cisplatino). Mediante la utilización de un mutante hipofosforilado y un mutante fosfomimético de eIF4E, observamos que la fosforilación de eIF4E aumentaba la resistencia celular tras una situación de estrés, así como inhibía la apoptosis, correlacionándose con un aumento de ciertas proteínas relacionadas con la proliferación, como es el caso de Ciclina D1, y un incremento de proteínas antiapoptóticas, como es el caso de Mcl-1. El tratamiento con arsénico conduce a un bloqueo mayor de la traducción de proteínas en células que expresan el mutante fosfomimético, una vez regresado a las condiciones normales la sobreexpresión de este mutante permite una recuperación más rápida de la síntesis de proteínas normal.

La sobreexpresión del mutante fosfomimético conduce a la formación de unos cuerpos citoplasmáticos que colocalizan con la proteína 4E-T. Este complejo pEIF4E/4E-T también interacciona con las proteínas Ago2 y HuR. La inhibición de la expresión de 4E-T, HuR y/o Ago2, inhibe la recuperación celular, tras determinadas situaciones de estrés, mediada por pEIF4E.

Debido que la interacción de eIF4E con 4E-T parece ser esencial para la función de la fosforilación de eIF4E en respuesta a estrés, especulamos que este factor también juega un papel importante en el proceso tumorigénico. En efecto, la sobreexpresión de 4E-T incrementa los niveles de N-cadherina y de las metaloproteinasas -3 y -9. A parte se observa un incremento de la migración e invasión al sobreexpresar 4E-T; por el contrario, observamos una disminución de la invasión y migración al inhibir la expresión de 4E-T o al utilizar el mutante de 4E-T incapaz de unirse a eIF4E o, cuando inhibimos la fosforilación de eIF4E. Estos resultados nos indican que la interacción pEIF4E/4E-T regula la invasión y la migración celular.

Finalmente, realizamos unas inmunohistoquímicas de 77 tumores de mama. Se encontraron altos niveles de eIF4E y pEIF4E, los cuales se correlacionaban con el tamaño del tumor. En el caso de 4E-T, este correlacionaba con altos niveles de N-cadherina, tal y como observamos *in vitro* al sobreexpresar 4E-T.

En conclusión, hemos identificado el complejo pEIF4E/4E-T como un complejo regulador de la resistencia a estrés y de la invasión y migración celular. El estudio de este complejo ofrece nuevas oportunidades terapéuticas contra el cáncer.



---

# INTRODUCCIÓN

---



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1. 1 Traducción (Síntesis de proteínas)

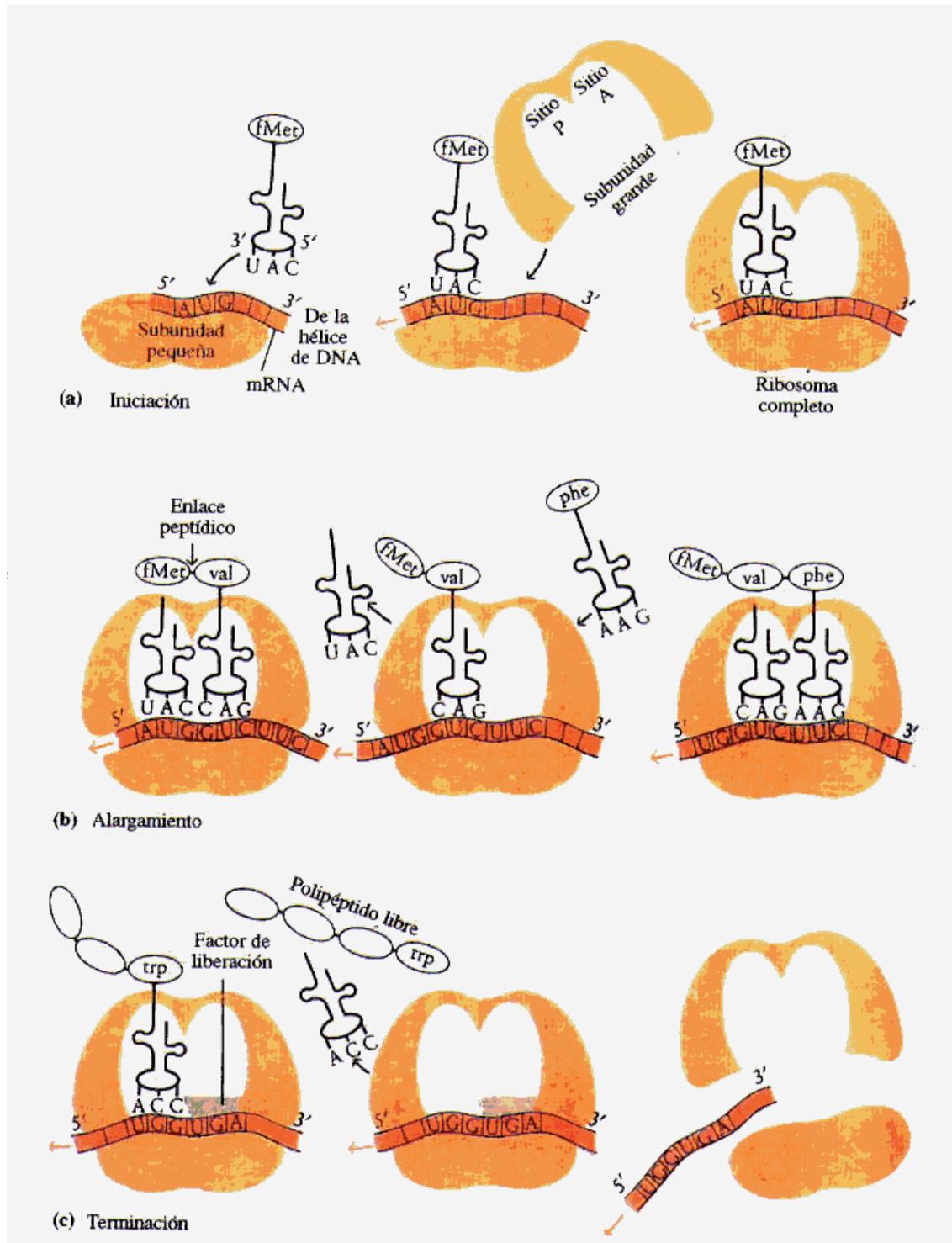
La síntesis proteica o traducción permite en último término que la información genética almacenada en las moléculas de los ácidos nucleicos se plasme en forma de proteínas, que son los componentes estructurales y funcionales básicos para la organización y el funcionamiento de la célula (Gray and Wickens 1998). Es decir, es el proceso por el cual la información contenida en el RNA (ácido ribonucleico) mensajero (mRNA) es traducida a proteínas. Este proceso tiene lugar en los ribosomas del citoplasma celular. Está dividido en tres fases: la iniciación, la elongación y la terminación (Figura 1). El inicio de la traducción requiere diferentes factores denominados eIFs (factores de inicio de la traducción en eucariotas) (Kozak 1999); estos factores actúan en conjunto para unir el ribosoma a un mRNA y permiten que este sea escaneado hasta llegar al codón de inicio de la traducción (en un 95% de los casos AUG) (Kozak 1984). Los ribosomas son complejos macromoleculares formados por proteínas y RNAs ribosomales (rRNAs), los cuales están divididos en dos subunidades diferentes, la subunidad pequeña, con un coeficiente de sedimentación de 40 S (formada por una sola molécula de rRNA y 33 proteínas diferentes) y la subunidad grande con un coeficiente de sedimentación de 60 S (formada por tres tipos de rRNAs: 5 S, 28 S y 5,8 S y 49 proteínas diferentes); su función es facilitar la síntesis del péptido utilizando la secuencia de aminoácidos definida por el mRNA (Doudna and Rath 2002).

El mRNA es el ácido ribonucleico que contiene la información genética procedente del DNA, es el resultado de la transcripción de un gen codificador de una cadena polipeptídica determinada, se trata de un ácido nucleico monocatenario. Determina el orden en que se unirán los aminoácidos de una proteína y actúa como plantilla para la síntesis de dicha proteína; también marca cuando empieza y acaba el proceso de traducción mediante codones de inicio y finalización de la traducción. La secuencia del mRNA está descrita por 4 bases nucleotídicas A (adenina), U (Uracil), C (Citosina) y G (guanina) y es leída por el ribosoma de forma unidireccional en tripletes en sentido 5'-3'. El codón de inicio de la traducción generalmente es AUG y como codón de finalización de la traducción encontramos tres diferentes: UAG, UAA o UGA (Brenner, Stretton et al. 1965; Hinnebusch 2011). Las secuencias distales se denominan región 5' no traducidas (5'UTR) o región 3' no traducida (3'UTR) (Gingras, Raught et al. 1999)(Figura 2).

En su extremo 5' terminal podemos encontrar una guanina metilada o estructura Cap, m<sup>7</sup>GpppX (donde X es cualquier nucleótido) (Banerjee 1980); el grupo fosfato que se encuentra en el extremo terminal 5' es eliminado mediante la acción de una fosfatasa creándose un extremo 5' difosfato, este extremo se une con GTP (guanosina trifosfato) para formar un enlace 5'-5' trifosfato; seguidamente la guanina es metilada por una metiltransferasa formándose la estructura cap (Kapp and Lorsch 2004). La estructura cap proporciona un lugar de unión de los factores de inicio de la traducción para que se pueda producir la traducción cap-dependiente, a parte, protege el mRNA de la degradación por exonucleasas.

En el extremo 3' terminal encontramos la cola poly(A), compuesta por un promedio de 250 residuos de adenina (Wickens 1990) confiere estabilidad al mRNA (Walther, Wittop Koning et al. 1998) y facilita la unión de los factores de inicio de la traducción al forzar que el mRNA tenga

una conformación de bucle cerrado (Munroe and Jacobson 1990; Tarun and Sachs 1995), esto se logra gracias a la proteína de unión a poly(A) (PABPs), la cual se asocia con la cola poly(A) y con el complejo eIF4G-eIF4E, el cual se localiza en el extremo 5' del mRNA.



**Figura 1: Fases de la traducción.** A) proceso de inicio de la traducción donde intervienen las dos subunidades ribosomales, mRNA y el tRNA. B) Elongación de la traducción, incorporación de aminoácidos a través de los dos lugares de unión, A y P. C) Finalización de la traducción (Murray, D. et al. 1997).

La regulación del inicio de la traducción en eucariotas es debida a los factores de iniciación eucarióticos, conocidos como eIFs (eukaryotic initiation factor). Estos pueden ser un factor limitante en el inicio de la traducción. En ambientes donde estos factores se encuentran en concentraciones limitadas algunos mRNAs celulares y virales se pueden traducir mediante otro tipo de traducción no dependiente de cap, denominada traducción cap-independiente. La unión del ribosoma depende de una región específica del mRNA dentro del 5' UTR, denominada IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) (Pelletier and Sonenberg 1988)

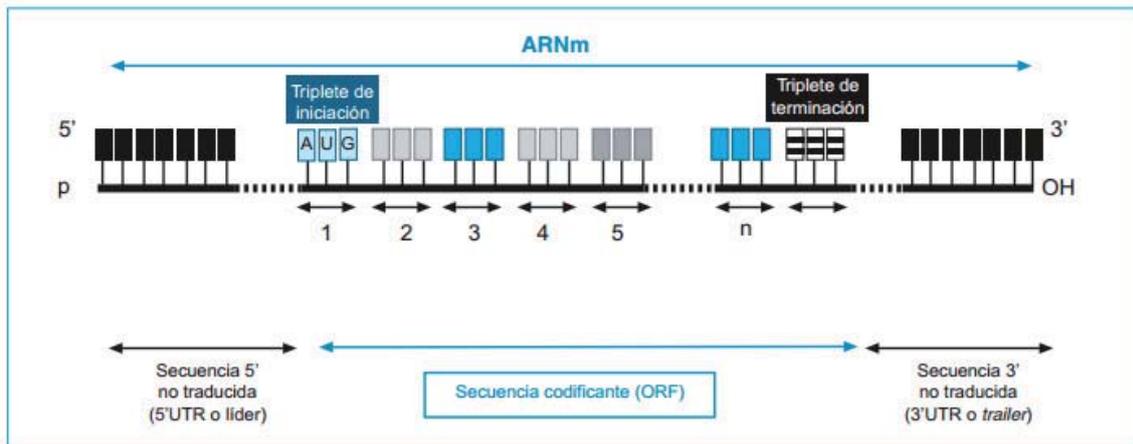


Figura 2: Organización de tripletes de la secuencia del mRNA (McGraw-Hill 2012).

### 1.1.1 Regulación de la traducción cap dependiente

El inicio de la traducción es un punto importante en la regulación de la expresión de muchos genes. Su regulación es un punto importante de estudio, ya que se ha visto correlación de alteraciones en la síntesis de proteínas con un gran número de enfermedades (Sonenberg and Hinnebusch 2009). La síntesis proteica es un proceso que consume elevados niveles de energía, por lo tanto, necesita estar regulado.

La traducción envuelve tres etapas diferentes la iniciación, la elongación y la terminación. Aunque la traducción es regulada en cada una de las etapas, el paso limitante es la iniciación, que se centra en el reclutamiento de las subunidades ribosomales al mRNA. El inicio de la traducción envuelve la interacción entre RNA-proteínas y proteína-proteína donde están implicados muchos factores. Los niveles celulares de los diferentes factores de inicio de la traducción difieren en los diferentes tipos de células y tejidos; modulando la actividad de estos factores se regulan los ratios globales de la síntesis proteica.

Los cambios que regulan el inicio de la traducción son mediados por cambios en el estado de la fosforilación de los factores de la traducción y de proteínas específicas de unión al RNA. Las vías que controlan la capacidad traduccional se coordinan con las que controlan la actividad de factores de traducción y de esta manera se garantiza un control coordinado de la síntesis proteica. El ratio de síntesis para una proteína es proporcional de la concentración y la eficiencia de la traducción del mRNA. (Hershey, Sonenberg et al. 2012)

El control de la síntesis proteica es una función homeostática fundamental de las células que están estrechamente asociadas a los estímulos extracelulares que impulsan el crecimiento celular y la proliferación, por lo tanto, las vías mitogénicas de transducción de señales convergen

con los factores de inicio de la traducción (Dobrikov, Dobrikova et al. 2011). Entre los mecanismos de control de la traducción cap-dependiente, destaca la regulación sobre los niveles de eIF4E (Ver capítulo 1.2.2 *Regulación de eIF4E*). En el inicio de la traducción eIF4E se une a eIF4G, el dominio de unión es compartido por las proteínas de unión a eIF4E (4E-BPs). Cuando estas proteínas están hipofosforiladas, se unen a eIF4E secuestrándolo de eIF4G e inhibiendo el inicio de la traducción. Mediante la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, en respuesta a factores de crecimiento y determinados estados de estrés celular, se produce la fosforilación de 4E-BP, el cual libera eIF4E y se puede dar el inicio de la traducción (Harris, Chi et al. 2006; Sonenberg 2008). Por otro lado los niveles de proteína de eIF4E son bajos en la célula, comparado con otros factores de inicio de la traducción. Debido a sus bajos niveles de expresión y ser el único de los factores de inicio de la traducción que se unen directamente con la estructura cap del mRNA, es uno de los factores limitantes para la unión del complejo eIF4F a Cap; por lo tanto un punto regulador importante del inicio de la traducción.

A parte de la regulación por fosforilación, modificaciones postranscripcionales como la metilación, glicosilación o sumoylación pueden afectar al ratio de síntesis proteica, pero el efecto de estas modificaciones no ha sido estudiado de forma extensa.

Una nueva área de estudio es la regulación de la traducción por microRNAs, estos pueden estimular la degradación de ciertos mRNAs o afectar a la síntesis proteica directamente (Braun, Huntzinger et al. 2012)

### 1.1.2 Inicio de la traducción cap-dependiente

El inicio de la traducción en eucariotas es un proceso en el cual se requiere el reclutamiento de la subunidad 80 S del ribosoma al mRNA, la identificación del codón de inicio y el reclutamiento del tRNA iniciador a la subunidad pequeña del ribosoma 40 S. Es un proceso muy complejo que requiere varios factores, incluyendo el tRNA de transferencia que contiene una metionina ( $\text{met-tRNA}_i^{\text{met}}$ ), las subunidades ribosomales 40 S y 60 S, 12 factores de inicio de la traducción y energía en forma de ATP y GTP.

Un punto importante en el proceso de inicio de la traducción es la formación del complejo de preiniciación 43 S; requiere el reclutamiento del tRNA iniciador ( $\text{met-tRNA}_i^{\text{met}}$ ) a la subunidad 40 S del ribosoma. Para ello se requiere la unión del eIF2 a GTP para formar un complejo binario. Este complejo se une al  $\text{met-tRNA}_i^{\text{met}}$  formando el complejo ternario eIF2/GTP/Met-tRNA. eIF2 está compuesta por tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La fosforilación de eIF2 $\alpha$  en la serina 51 estabiliza la unión a GDP impidiendo que eIF2 pueda reciclarse, por lo tanto se inhibe el inicio de la traducción (Kapp and Lorsch 2004). Una vez formado el complejo ternario junto a otros factores de iniciación (eIF1, eIF5 y eIF3) se unen a la subunidad 40 S para formar el complejo de preiniciación 43 S (Chaudhuri, Chowdhury et al. 1999; Majumdar, Bandyopadhyay et al. 2003; Bilanges and Stokoe 2007) (Figura 3 punto 1 y 2). El complejo 43 S recluta el extremo 5' del mRNA. Esto es facilitado por el complejo eIF4F, el cual está formado por tres factores de inicio de la traducción: eIF4E, eIF4A y eIF4G.

La estructura cap del mRNAs se une con factores de iniciación específicos antes de asociarse con el complejo de preiniciación. En el proceso de reclutamiento del ribosoma al mRNA juegan un papel muy importante varias proteínas: PABP [*poly(A) binding protein*], eIF3 y la formación del complejo eIF4F; eIF4F regula la unión del mRNA a la subunidad 43 S y es el paso limitante del inicio de la traducción, requiere la interacción de eIF4E con el cap del mRNA. (Gingras, Raught et

al. 1999). eIF3 juega un papel muy importante en el mantenimiento de la unión de la subunidad grande del ribosoma y también se une al complejo eIF4F. (Figura 3 punto 3).

Una vez el complejo eIF4F y el complejo 43 S se han unido al mRNA, éste es escaneado en dirección 5' – 3'. Posteriormente un cambio de conformación del complejo 43 S activa la hidrólisis del GTP, permitiéndose el reconocimiento del codón de iniciación y desencadenándose la liberación de eIF1 y eIF2-GDP, lo cual permite el reclutamiento de la subunidad ribosomal 60 S y que se inicie la síntesis proteica (Kozak 1989; Jaramillo, Dever et al. 1991) (Figura 3 punto 4 y 5).

A partir de este punto el met-tRNA<sub>i</sub><sup>met</sup> está unido al mRNA dentro de un lugar específico del ribosoma llamado P (lugar del péptido), el otro lugar, A (aminoácido), será por donde entrarán los siguientes tRNAs cargados con el aminoácido concreto entrando en la fase de elongación de la traducción.

En la tabla 1 se muestran las diferentes funciones de los factores de inicio de la traducción así como de proteínas implicadas en la regulación de estos factores.

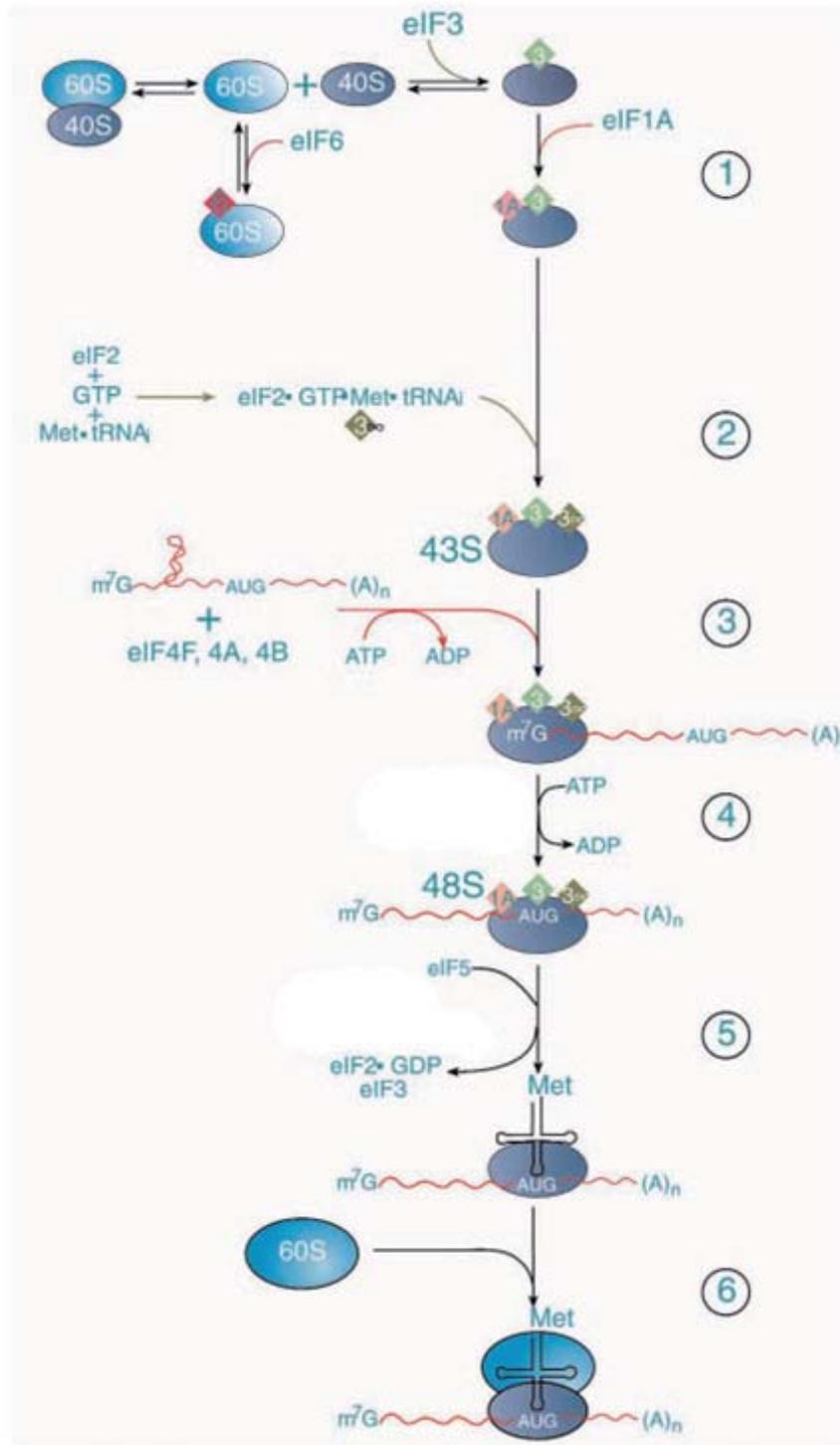
### **1.1.2.1 Factores implicados en la formación del complejo eIF4F**

#### eIF4E

eIF4E (ver capítulo 1.2 *eIF4E*) es la proteína que físicamente reconoce y se une a la estructura cap del mRNA y es un factor indispensable y limitante para que se pueda producir el inicio de la traducción cap-dependiente, es el factor menos abundante de todos los eIFs (Mochizuki, Oguro et al. 2005). Su actividad puede ser regulada por una serie de proteínas de unión, las 4E-BPs (*eIF4E-binding proteins*), en mamíferos encontramos 3 diferentes (4E-BP1, 4E-BP2 y 4E-BP3), 4E-BP1 es la mayoritaria en mamíferos; 4E-BP interacciona con eIF4E en el mismo dominio de unión que eIF4G ΨXXXXLϕ, donde ϕ es un residuo hidrofóbico y X cualquier aminoácido. Mediante esta unión 4E-BP bloquea la unión de eIF4E a eIF4G, impidiendo así la traducción cap-dependiente (Mader, Lee et al. 1995); otra proteína de unión poco conocida es 4E-T (ver capítulo 1.5 *4E-T*), la cual se encarga del transporte de eIF4E de citoplasma a núcleo mediante su unión en el mismo dominio de unión que eIF4G (Dostie, Ferraiuolo et al. 2000).

#### eIF4A

eIF4A forma parte de una gran familia de proteínas (más de 28 miembros) denominada DEAD-box. Estas proteínas participan en varios procesos a parte de la traducción, incluyendo el *splicing* de pre-mRNAs, biogénesis de ribosomas, el desarrollo, espermatogénesis y ovogénesis. eIF4A es una proteína de 46 kDa que hidroliza el ATP y tiene actividad helicasa, desenrolla la estructura secundaria del mRNA para permitir el acceso de las subunidades ribosomales y que estas puedan escanear el mRNA hasta llegar al codón de iniciación; su actividad es estimulada por eIF4G y eIF4B (Rozen, Edery et al. 1990; Rogers, Komar et al. 2002). Existen tres isoformas en mamíferos: eIF4AI, eIF4AII y eIF4AIII (Gingras, Raught et al. 1999). Las isoformas humanas eIF4AI y eIF4AII son altamente homólogas y son funcionalmente equivalentes, pero se expresan de forma diferente según el tejido celular y juegan diferentes roles durante el desarrollo (Nielsen and Trachsel 1988).



**Figura 3: Mecanismo de inicio de la traducción.** 1) Disociación del complejo ribosomal 80 S preexistente promovida por eIF6, el cual se une a la subunidad 60 S, eIF3 y eIF1A se unen a la subunidad 40 S. 2) Unión del complejo ternario eIF3-GTP-Met-tRNA a la subunidad 40 S formando el complejo de preiniciación 43S. 3) unión del complejo 43S al mRNA, necesario que el complejo eIF4F reconozca el mRNA y se dé hidrólisis de ATP. 4) Colocación del codón de inicio de la traducción en dirección 5' - 3'. 5) liberación de los factores de iniciación de la traducción. 6) Unión a la subunidad ribosomal 60S. (Gingras, Raught et al. 1999)

Factor de Iniciación y proteínas implicadas en su regulación	Actividad
eIF-1	Reposición de met-tRNA para facilitar la unión del mRNA
eIF-2	Formación de un complejo ternario eIF2-GTP-Met-tRNA
eIF-2A	AUG-dependiente de met-tRNA uniendo al ribosoma 40S
eIF-2B (también llamado GEF) factor de intercambio del nucleótido guanina	Intercambio de GTP/GDP durante el reciclaje de eIF-2
eIF-3, compuesto de 13 subunidades	Unión subunidad grande del ribosoma
eIF-4F compuesto por 3 subunidades: eIF-4E, eIF-4A, eIF-4G y por lo menos 2 factores adicionales: PABP, Mnk1 (o Mnk2)	Unión del mRNA a la subunidad 40S, actividad helicasa del RNA dependiente de ATPasa, la interacción entre la cola poliA y la estructura cubierta (cap)
PABP: proteína de unión poliA	Une la cola poliA de los mRNAs, permite la unión al eIF-4G
eIF-4A	Helicasa de RNA dependiente de ATPasa
eIF-4E	Reconocimiento de cubierta 5'; frecuentemente encontrada sobre expresada en cánceres humanos, la inhibición de eIF4E es actualmente un blanco para terapias cancerígenas
4E-BP (3 formas conocidas)	Cuando 4E-BP esta defosforilado se une eIF-4E y reprime su actividad, la fosforilación de 4E-BP ocurre en respuesta a muchos estímulos de crecimiento conduciendo a la liberación de eIF-4E e incrementando la iniciación de la traducción
eIF-4G	Actúa como una base para el ensamblaje de eIF-4E y -4A en el complejo eIF-4F
eIF-4B	Estimula la helicasa, se une simultáneamente con el eIF-4F
eIF-5	Liberación de eIF-2 y de eIF-3, GTPasa dependiente del ribosoma

**Tabla 1: Descripción de los diferentes factores de iniciación y proteínas implicadas en el inicio de la traducción.**

### eIF4G

eIF4G es una proteína de unión que juega un papel importante en el reclutamiento del ribosoma al mRNA. Hay dos isoformas en mamíferos, eIF4GI y eIF4GII, que son en un 46 % idénticas y funcionalmente homólogas, de 171 kDa y 176 kDa respectivamente. eIF4GI es constitutivamente expresada a una concentración más elevada que eIF4GII (Coldwell, Sack et al. 2012). Las dos son capaces de iniciar la traducción cap-dependiente. eIF4GI es importante en la proliferación, la actividad mitocondrial y es importante para la traducción de mRNAs relacionados con este proceso (Caron, Charon et al. 2004; Ramirez-Valle, Braunstein et al. 2008).

Tienen tres dominios estructurales funcionales, que se encuentran conectados entre sí; los tres dominios interactúan con diferentes factores de inicio de la traducción. Contiene lugares de unión para eIF4E y PABP en el dominio N-terminal; eIF4A y eIF3 en el dominio central de la proteína; y realiza una función de puente entre el ribosoma y el mRNA, encontrándose el lugar de unión al RNA en el centro de la proteína, a mas, eIF4G establece contacto con la cola 3' poliA vía PABP (proteína de unión a la cola poli-A). La asociación de PABP con eIF4G induce la recircularización del mRNA, esto aumenta la iniciación y la estabilidad del mRNA (Lamphear, Kirchweger et al. 1995; Imataka, Gradi et al. 1998). Por otro lado también encontramos un lugar de interacción a Mnk (Fukunaga and Hunter 1997) (ver capítulo 1.2.2.2.1 *Mnks*). El dominio de unión a eIF4E es el más estudiado, contiene la secuencia YXXXXL $\phi$ , donde  $\phi$  es cualquier aminoácido hidrofóbico. Por otro lado eIF4G recluta la mRNA helicasa eIF4A.

## 1.2. eIF4E

eIF4E fue identificado por su habilidad de unirse a cap y promover el inicio de la traducción. (Sonenberg, Morgan et al. 1978). Es una proteína de 24 kDa, es esencial en el reconocimiento de la estructura cap 5' presente en la mayoría de mRNA y en el reclutamiento del ribosoma al mRNA en el inicio de la traducción cap-dependiente (Lazaris-Karatzas, Montine et al. 1990). Apoyando estas evidencias vieron que la eliminación de eIF4E de extractos celulares dramáticamente reducía la traducción cap dependiente. Estos experimentos apoyaron fuertemente la evidencia de que eIF4E recluta el complejo eIF4F a la estructura cap. En consecuencia, el análisis mediante cristalografía de rayos X de eIF4E, reveló una estructura perfectamente apropiada para realizar esta función (Marcotrigiano, Gingras et al. 1997). Se dice que eIF4E es un potenciador traduccional, aunque en la última década se ha descubierto que también puede actuar como represor traduccional (Rhoads 2009).

Debido a las funciones que desempeña en la célula, no es sorprendente que la secuencia primaria de aminoácidos de eIF4E sea altamente conservada en todos los organismos. Mediante rayos X y resonancia magnética nuclear (NMR) han demostrado que eIF4E tiene una estructura flexible en el lugar de unión a cap, el núcleo de la estructura se asemeja a un guante de beisbol y el reconocimiento de CAP ocurre en la parte cóncava mediante la interacción de dos triptófanos altamente conservados; por otro lado la mayoría de proteínas que interaccionan con eIF4E se unen por la cara convexa de la estructura (Rhoads 2009).

Ha sido estudiada en diferentes organismos, encontrándose una región evolutivamente conservada en la proteína, que consiste entre 160 y 170 aminoácidos ubicados entre la His-37 y la His-200, los extremos N y C-terminal son más variables. Se han encontrado 411 miembros de la familia eIF4E en 230 especies, todos ellos tienen un contenido elevado en Trp. Se conocen diferentes isoformas, *Arabidopsis thaliana* no solo expresa eIF4E, también eIF(iso)4E y nCBP (Ruud, Kuhlow et al. 1998); *Homo sapiens* expresa un segundo miembro de la familia, 4EHP (Rom, Kim et al. 1998); y *C. elegans* expresa tres miembros de la familia de eIF4E, IFE-1, -2 y -3 (Jankowska-Anyszka, Lamphear et al. 1998). En el 2005 Joshi et al agruparon a los miembros de la familia de eIF4E en tres clases diferentes según la presencia de residuos correspondientes a Trp-43 y Trp-56:

Clase 1: Trp en los dos aminoácidos. En mamíferos se une a cap, eIF4G y 4E-BPs.

Clase 2: En la posición 43 podemos encontrar Tyr, Phe o Leu y en la posición 56 Tyr o Phe. En mamíferos solo unió a cap y 4E-BPs.

Clase 3: En la posición 43 encontramos un Trp y en la 56 Cys. En mamíferos solo unió a cap y eIF4G.

Cada uno de los tipos tiene diferentes grados de afinidad de unión a cap, eIF4G o 4E-BPs según la especie. En organismos que presentan varios miembros de la familia de eIF4E, se ha encontrado que sólo uno de ellos es ubicuo y se encuentra expresado constitutivamente, siendo éste responsable de la traducción cap dependiente; en mamíferos correspondería al eIF4E-1. El resto de eIF4Es son activos en diferentes tejidos, en diferentes etapas del desarrollo o se unen a ciertos mRNAs. (Joshi, Cameron et al. 2004; Joshi, Lee et al. 2005; Rhoads 2009)

eIF4E fue inicialmente descubierto como un solo polipéptido, pero cuando fue encontrado en complejo con eIF4G fue redefinido como una subunidad de un nuevo factor de inicio de la traducción en mamíferos denominado eIF4F. Sonenberg y Lawrence vieron que eIF4E podía tener otras proteínas de unión a parte de eIF4G, las denominadas 4E-BPs (Pause, Belsham et al. 1994). El número de proteínas de unión de eIF4E conocidas ha incrementado en la última década; muchas de las nuevas funciones de eIF4E están mediadas por la interacción con algunas de sus proteínas de unión (Tabla 2).

La localización de eIF4E puede ser tanto nuclear como citoplasmática. En el citoplasma puede estar formando parte del complejo de inicio de la traducción así como formando parte de los denominados processing bodies (PBs) o gránulos de estrés (GS) (Ferraiuolo, Basak et al. 2005; Parker and Sheth 2007). Según Topisirovic et al. el 68 % del eIF4E reside en el núcleo participando en el secuestro de ciertos mRNAs y su exportación (Culjkovic, Topisirovic et al. 2007). En el núcleo se ha encontrado tanto de forma difusa por el nucleoplasma como en cuerpos nucleares, pero no se encuentra en el nucléolo (Lejbkovicz, Goyer et al. 1992).

Proteínas	Consecuencias de unión
eIF4G	Recluta eIF4A y el ribosoma al mRNA
4E-BP1,-2,-3	Reprime la traducción cap-dependiente
Maskin	Reprime la traducción de mRNAs que contienen CPE
4E-T	Transporta eIF4E al núcleo
Lipoxigenasa 2	Compite con eIF4G para unirse a eIF4E
BTF3	Compite por la unión eIF4E a eIF(iso)4E
Gemin5	Inhibe la traducción. Colocalización en PBs
Neuroregulina	Reprime la traducción de mRNAs que contienen CPE
CYFIP	Se une a eIF4E en extractos cerebrales. Presente en sinapsis
LRRC	Modula positivamente la exportación de mRNAs con la secuencia 4E-SE de forma dependiente de eIF4E
EMX2	Modula las funciones de eIF4E en el desarrollo del sistema nervioso
PML	Disminuye el transporte de mRNAs de núcleo a citoplasma

**Tabla 2: Ejemplos de proteínas de unión a eIF4E**

eIF4E se considera una proteína de supervivencia envuelta en la progresión del ciclo celular, la transformación celular y la resistencia a la apoptosis. Tiene un papel crítico en la traducción de mRNAs reguladores del ciclo celular y de proteínas oncogénicas. (Wang, Yue et al. 2007). Modula la expresión de genes, mediante el incremento de su traducción o por el transporte de estos del mRNA de núcleo a citoplasma, envueltos en la proliferación y la supervivencia celular. La sobreexpresión de eIF4E produce una desregulación del crecimiento celular y una transformación maligna (Beghi, Azzoni et al. 1990; Lazaris-Karatzas, Montine et al. 1990; Avdulov, Li et al. 2004) (Ver capítulo 1.3.1 *eIF4E* y *cáncer*)

### **1.2.1 Función de eIF4E**

#### **1.2.1.1 *eIF4E* como factor de inicio de la traducción cap-dependiente**

Es un factor clave en el inicio de la traducción al interactuar con la estructura 5'Cap del mRNA durante su reclutamiento al ribosoma (Filipowicz, Furuichi et al. 1976). Como hemos comentado anteriormente, forma un complejo con eIF4G y eIF4A, denominado eIF4F, que facilita la unión del complejo ribonucleoproteico de pre-iniciación 43 S al mRNA, imprescindible para el inicio de la traducción. Para llevar a cabo esta función, eIF4E se une al extremo 5' metil-7guanosina (m<sup>7</sup>G cap) que se encuentra en los transcritos (Figura 4). Su unión con eIF4G favorece la estabilidad de la unión a cap y permite el reclutamiento del resto de factores del complejo (Duncan, Milburn et al. 1987; Sonenberg and Gingras 1998).

Recientemente Feoktistova et al. han visto que la unión de eIF4E a eIF4G incrementa la capacidad de eIF4G para estimular la actividad helicasa de eIF4A, eIF4E permite que eIF4G tome la conformación necesaria para estimular eIF4A, manteniendo la unión eIF4E/eIF4G a lo largo del escaneo del mRNA puede explicar un posible mecanismo de cómo la abundancia de eIF4E promueve la traducción de mRNAs altamente estructurados (Feoktistova, Tuvshintogs et al. 2013)

La sobreexpresión de eIF4E no conduce a un incremento global de la traducción de mRNAs, pero sí que se ven aumentados ciertos mRNAs específicos como ODC, c-myc o Ciclina D1 (Clemens 2004; Mamane, Petroulakis et al. 2004). Así como la *downregulation* de eIF4E no afecta los niveles globales de síntesis proteica (Graff, Konicek et al. 2007). Se ha visto que transcritos con regiones 5'UTRs altamente estructuradas son más sensibles a ser traducidos por eIF4E (Sonenberg and Gingras 1998).

#### **1.2.1.2 *eIF4E* como transportador de mRNAs de núcleo a citoplasma**

Como hemos comentado anteriormente, eIF4E también se encuentra en cuerpos nucleares a lo largo del nucleoplasma (Lejbkovicz, Goyer et al. 1992). En el núcleo eIF4E contribuye en la exportación núcleo-citoplasmático de ciertos mRNAs mediante la unión en un elemento estructural localizado en el extremo 3' UTR conocido como *eIF4E-sensitivity elements* (4E-SE), tiene función carrier de ciertos mRNAs de núcleo a citoplasma. Los elementos 4E-SE están formados por unos 50 nucleótidos, estos confieren sensibilidad del mRNA hacia eIF4E permitiendo la exportación su exportación. (Rousseau, Kaspar et al. 1996; Proud 2002; Culjkovic, Topisirovic et al. 2006; Topisirovic, Siddiqui et al. 2009; Topisirovic, Siddiqui et al. 2009). Este

proceso es dependiente de la vía de exportación CRM1-Ran, en el núcleo eIF4E se asocia a CRM-1 para permitir la exportación del mRNA al cual se encuentra unido (Culjkovic, Topisirovic et al. 2006) (Figura 4).

Igual que en el citoplasma, eIF4E afecta tan solo a un número específico de mRNAs, mayormente genes involucrados en la proliferación y la supervivencia.

En resumen eIF4E promueve la expresión de un grupo determinado de transcritos mediante el incremento de la exportación nuclear vía 4E-SE y/o mediante el incremento de la traducción en citoplasma de transcritos con unas estructuras complejas en el extremo 5' UTR.

### **1.2.1.3 Otras funciones de eIF4E**

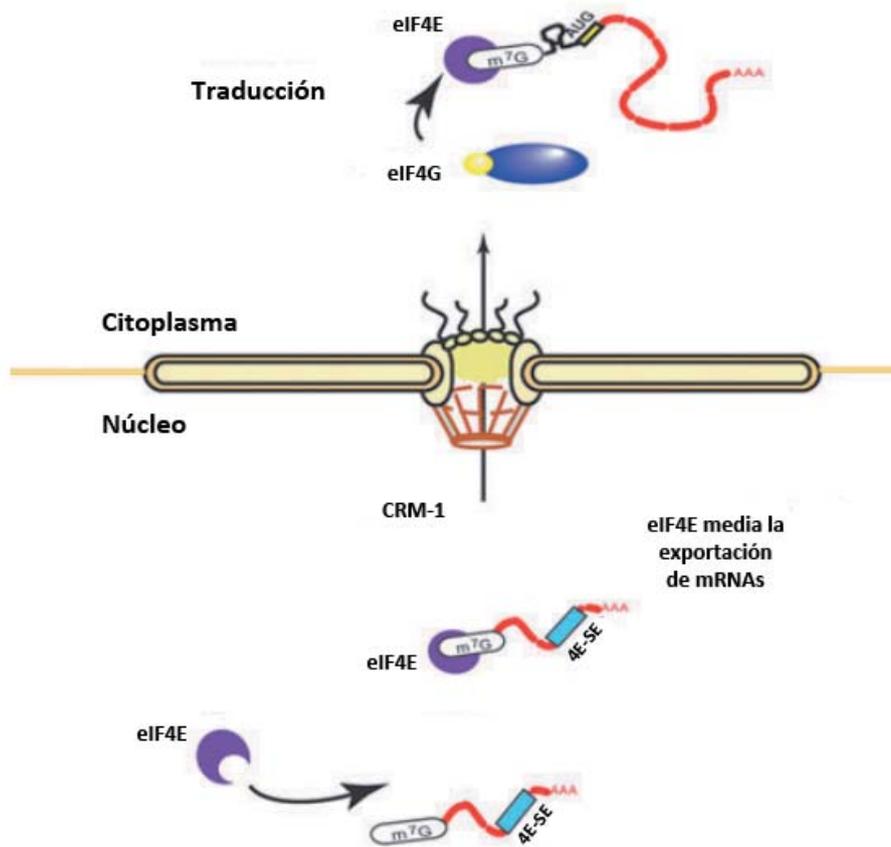
Se han descrito otras funciones de eIF4E en los últimos años, por ejemplo su importancia en la formación de la memoria, se cree que está relacionado en cambios en la unión entre conexiones sinápticas de neuronas (Klann and Sweatt 2008). También se ha visto implicado en la traducción de mRNAs de virus, como sería el caso de la familia caliciviridae, lo cuales contienen en su mRNA una proteína viral (VPg) la cual actúa como un sustituto de cap y recluta eIF4E para la traducción del mRNA (Chaudhry, Nayak et al. 2006).

Por otro lado se ha visto que eIF4E puede formar parte tanto de los gránulos de estrés (GS) como de los *processing bodies (PBs)*, esto significa que juega un papel en el almacenamiento o turnover de ciertos mRNAs (Ferraiuolo, Basak et al. 2005; Parker and Sheth 2007). Puede incrementar la traducción de ciertos transcritos particularmente durante periodos de estrés celular y proliferación (Ver capítulo 1.6 *estrés celular*).

### **1.2.2 Regulación de eIF4E**

Dado la relevancia de eIF4E en la expresión génica es un blanco de múltiples mecanismos de regulación que pueden afectar su función; mediante la regulación de eIF4E se mantienen los niveles óptimos de crecimiento y división celular, respondiendo a estímulos externos. Una serie de condiciones debe cumplirse para que eIF4E pueda participar en la iniciación de traducción (Gingras, Raught et al. 1999). El hecho de que eIF4E es generalmente el factor de iniciación menos común en cuanto al número de moléculas por célula lo convierte en un punto clave para la regulación.

eIF4E actúa como punto convergente de dos vías de señalización, la vía PI3K y la vía de las MAPK. Encontramos dos vías principales de regulación de eIF4E, por un lado mediante sus proteínas de unión 4E-BPs activadas vía PI3K (Pause, Belsham et al. 1994) y por otro lado la regulación de su fosforilación vía las quinasas Mnk1/2 en la serina 209 activadas vía ERK o p38/MAPK (Waskiewicz, Flynn et al. 1997; Waskiewicz, Johnson et al. 1999) (Figura 5).



**Figura 4: Modelo de las dos funciones conocidas de eIF4E: exportación de mRNAs y traducción cap-dependiente.** eIF4E permite la traducción de mRNAs con la estructura cap en el extremo 5'; por otra parte media la exportación de mRNAs de núcleo a citoplasma mediante la su unión al extremo 3' UTR del mRNA, en unas secuencias denominadas *eIF4E-sensitivity elements* (4E-SE) (adaptado de Carroll and Borden 2013).

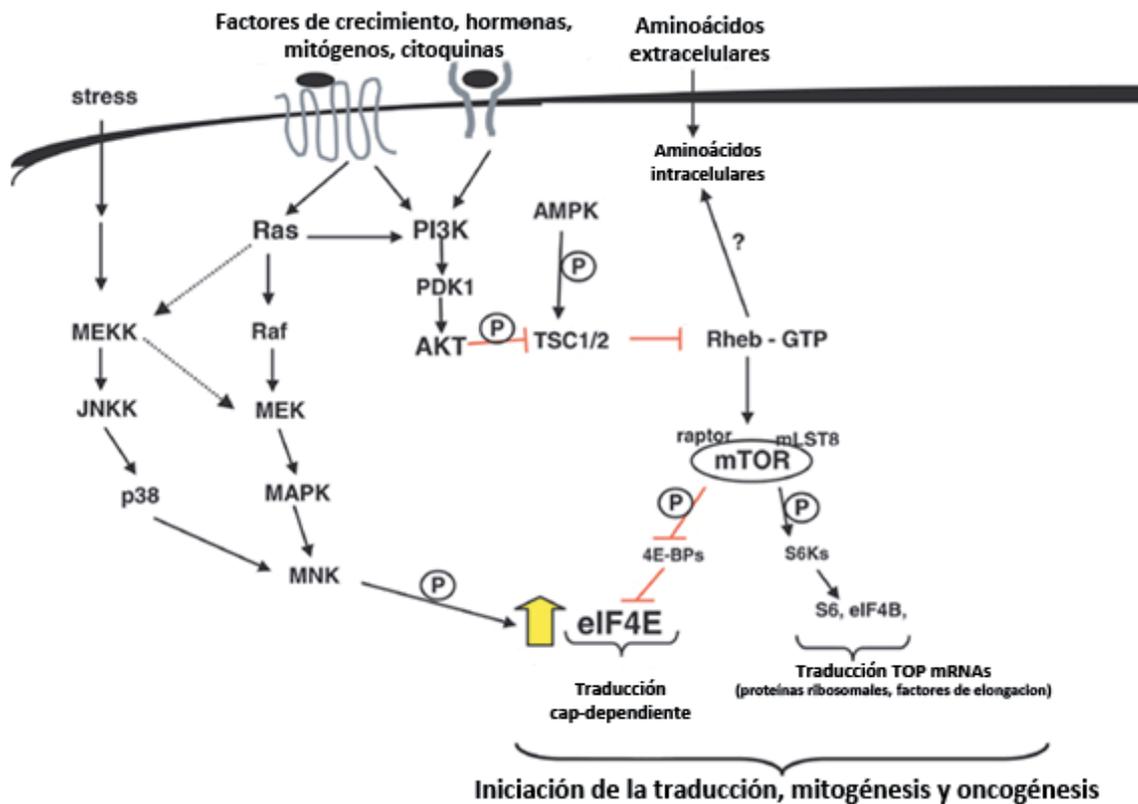
### 1.2.2.1 4E-BPs

Son proteínas pequeñas de 10 a 15 kDa. Se han descrito tres isoformas de 4E-BPs -1, -2 y -3. 4E-BP1 y 4E-BP2 comparten un 65 % de identidad y 4E-BP3 comparte un 57 % y un 59 % de identidad con 4E-BP1 y 4E-BP2 respectivamente; las tres inhiben la traducción cap-dependiente. 4E-BP1 es la mayormente expresada, pero predominantemente se detecta en el tejido adiposo (Tsukiyama-Kohara, Poulin et al. 2001), 4E-BP2 es ante todo expresada en el cerebro (Banko, Hou et al. 2004) y la tercera isoforma, 4E-BP3, se expresa mayormente en el colon, hígado y riñón (Poulin, Gingras et al. 1998).

La unión de las 4E-BPs a eIF4E se controla a través de su fosforilación (Pause, Belsham et al. 1994; Poulin, Gingras et al. 1998). Las formas hipofosforiladas de 4E-BPs se unen a eIF4E impidiendo la formación del complejo de inicio de la traducción (Haghighat, Mader et al. 1995), por el contrario, en respuesta a nutrientes o células estimuladas con suero las 4E-BPs se hiperfosforilan y se reduce su afinidad hacia eIF4E, de forma que éste queda liberado y puede formar el complejo eIF4F para dar así el inicio de la traducción cap-dependiente.

4E-BP1 ha sido la más caracterizada de las tres. Presenta seis lugares de fosforilación, entre ellos se destacan cuatro: treonina 37, treonina 46, treonina 70 (esta fosforilación permite la

liberación de eIF4E) y la serina 65 (su fosforilación impide la reasociación de 4E-BP1 con eIF4E). Las diferentes fosforilaciones presentan un seguimiento jerárquico. La vía PI3K/AKT/mTOR se ha descrito como la vía principal de fosforilación de 4E-BP1 (Wang, Beugnet et al. 2005), a pesar de ello otras quinasas pueden estar también implicadas en la fosforilación de 4E-BP1, como por ejemplo CDK1 (Heesom, Gampel et al. 2001), ATM (Yang and Kastan 2000), ERK (Herbert, Tee et al. 2002).



**Figura 5: Esquema de las vías de regulación de eIF4E.** La vía Ras/Raf/MAPK, activada por factores de crecimiento y estrés activa las Mnks, las cuales fosforilan eIF4E. eIF4E participa en el inicio de la traducción y su fosforilación incrementa la mitogénesis y la oncogénesis. Por otro lado la vía PI3K/Akt/mTOR es activada por factores de crecimiento, mitógenos y hormonas. mTOR fosforila 4E-BP inhibiendo su función represora hacia eIF4E (adaptado de Mamane, Petroulakis et al. 2004).

### 1.2.2.2 Regulación eIF4E vía Mnk1/2

eIF4E es fosforilado en respuesta a ciertos estímulos. Unas de las principales quinasas responsables de la fosforilación de eIF4E son las Mnks (*MAP kinase-activated protein kinase*) las cuales acceden a eIF4E mediante su unión a eIF4G (Pyronnet, Imataka et al. 1999). eIF4E es fosforilado en un solo lugar *in vivo*, en la Ser209 en mamíferos, que se encuentra en el extremo C-terminal (Joshi, Cai et al. 1995; Fukunaga and Hunter 1997; Waskiewicz, Flynn et al. 1997). eIF4E rápidamente es fosforilado en respuesta a una gran variedad de estímulos extracelulares como mitógenos, hormonas polipeptídicas, promotores tumorales y factores de crecimiento (Proud 1992; Flynn and Proud 1996). Las proteínas quinasas Mnk1 y Mnk2 son activadas vía MEK/ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*), se ha observado que hay una inhibición de la

fosforilación de eIF4E al utilizar inhibidores de dicha vía (Waskiewicz, Johnson et al. 1999; Tschopp, Knauf et al. 2000). Otra vía que activa Mnk1 y Mnk2 es la vía p38MAPK, la cual es activada en respuesta a mitógenos, citoquinas o estrés celular (Morley and McKendrick 1997), el uso de inhibidores específicos de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de p38 demostraron que estas dos isoformas son las responsables del incremento en la fosforilación de eIF4E en respuesta a estrés mediante la activación de las Mnks (Cuenda, Rouse et al. 1995). Mnk1 y Mnk2 son las quinasas fisiológicas de eIF4E, mediante la utilización del doble KO de Mnks en fibroblastos embrionarios no se observó un incremento en la fosforilación de eIF4E, indicando que son las quinasas responsables de dicha fosforilación (Ueda, Watanabe-Fukunaga et al. 2004).

El estado de fosforilación de eIF4E también es controlado por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Bu and Hagedorn 1992).

Se han dado algunas confusiones con respecto a la existencia de otros lugares de fosforilación, como por ejemplo, en la serina 53; se generó un mutante de eIF4E donde la serina 53 fue mutada a alanina, impidiendo la fosforilación de dicho residuo. Este mutante no provocaba la transformación celular que se observaba al sobreexpresar la forma *wild type* de eIF4E, esto hizo pensar que dicha fosforilación era necesaria para la transformación celular (De Benedetti and Rhoads 1990). Estudios realizados posteriormente vieron que la serina 53 no era el verdadero lugar de fosforilación de eIF4E, mediante análisis de fosfoaminoácidos vieron que solo había un lugar de fosforilación en eIF4E, y observaron que este estaba posicionado cerca del extremo N-terminal. En la secuencia de eIF4E hay tres serinas que pueden ser fosforiladas, mediante un mapeo bidireccional del péptido se eliminaron dos de las serinas, tan solo quedando la serina 209, confirmando que este era el mayor punto de fosforilación de eIF4E (Flynn and Proud 1995). *In vitro* también se ha observado la fosforilación de la Thr210 cuando la Ser209 es mutada a alanina o en ciertas circunstancias como el tratamiento celular con ácido okadaico, no se observó una transformación celular al producirse la fosforilación de la Thr210. (Makkinje, Xiong et al. 1995; Scheper and Proud 2002; Topisirovic, Ruiz-Gutierrez et al. 2004)

#### 1.2.2.2.1 Mnks

Mnk1 y Mnk2 son proteínas quinasas treonina/serina y fueron originalmente descubiertas como resultado de un screening de los sustratos o proteínas de unión de Erk (Fukunaga and Hunter 1997; Waskiewicz, Flynn et al. 1997). En humanos se han encontrado dos genes que codifican para dos isoformas cada uno (Mnk1a, 2a, 1b y 2b), las isoformas b son las formas cortas y no contienen el motivo de unión a MAPK. El análisis de su secuencia revela que las cuatro isoformas tienen una señal de localización nuclear (NLS), un lugar de unión a eIF4G en el extremo N-terminal y el dominio quinasa; tan solo Mnk1 contiene una señal de exportación nuclear y las isoformas Mnk1a y Mnk2a un lugar de unión a MAPK, el cual puede ser fosforilado y activado por la vía Erk y p38 MAPK. Las isoformas Mnk1b y Mnk2b no contienen este dominio, por lo tanto no son sustrato de Erk y p38; por otro lado al no tener el fragmento C-terminal de exportación nuclear tienen una distribución tanto nuclear como citoplasmática, mientras que las isoformas Mnk1a y Mnk2a predominan en el citoplasma (Shenberger, Zhang et al. 2007; Hou, Lam et al. 2012).

Mnk1 y Mnk2 tienen una similitud del 88 % en el dominio catalítico y del 77 % y 65 % en el dominio N- y C-terminal respectivamente. La actividad y regulación de las Mnks por MAPKs depende de cada una de las isoformas. En el caso de la Mnk1a, que tiene una actividad basal

baja, contiene un dominio de unión a MAPK con los residuos Leu-Ala-Arg-Arg-Arg y media la interacción de Mnk1 con Erk1/2 y p38. En el caso de Mnk1b, con actividad basal elevada, su actividad no se ve afectada por Erk1/2 o p38 ya que no tiene un dominio de unión a MAPK (Knauf, Tschopp et al. 2001; Scheper and Proud 2002; Parra, Buxade et al. 2005; O'Loughlen, Gonzalez et al. 2007). Con respecto a las Mnk2, la isoforma Mnk2a contiene un dominio de unión a MAPK el cual contiene solo dos residuos básicos continuos, Leu-Ala-Gln-Arg-Arg, preferentemente interacciona con Erk1/2 (Waskiewicz, Flynn et al. 1997). Mnk2b, con una actividad basal muy baja, no es conocido quien promueve su actividad (Scheper, Parra et al. 2003).

El análisis de Mnk1 y Mnk2 revela la presencia de muchos puntos de fosforilación por MAPKs, por ejemplo la fosforilación de la Thr209 y Thr214 de Mnk1a se ha visto que es esencial para su activación. Otro ejemplo es el residuo Thr344, el cual afecta la actividad de la Mnk1a pero no el de la Mnk2a (Scheper, Morrice et al. 2001). Esto sugiere que la fosforilación de las Mnks en varios residuos es necesaria para la activación eficiente de las Mnks.

La interacción de eIF4G con las Mnks es regulada por la fosforilación de las Mnks, los puntos de fosforilación se encuentran cerca del lugar de interacción con eIF4G. Mnk1 se une mejor a eIF4G que Mnk2 (Parra, Buxade et al. 2005).

Se ha descrito que las Mnks tienen un gran número de sustratos que pueden fosforilar, incluyendo componentes de la maquinaria traduccional, algunos factores de unión a mRNA y factores de splicing. No se ha encontrado una secuencia consenso de fosforilación en los diferentes sustratos.

eIF4E es el sustrato fisiológico mejor caracterizado de las Mnks, la expresión de Mnks en células incrementa el nivel y la fosforilación de eIF4E en respuesta a estrés y por la estimulación de mitógenos (Pyronnet, Imataka et al. 1999). Las dos, Mnk1 y Mnk2, específicamente fosforilan eIF4E en la serina 209. Mnk y eIF4E interaccionan con eIF4G, el cual permite la aproximación de estas dos proteínas y facilita la fosforilación de eIF4E (Flynn and Proud 1995; Ueda, Watanabe-Fukunaga et al. 2004). Mnk1 es la responsable de inducir la fosforilación de eIF4E en respuesta a MAPK, mientras que Mnk2 contribuye a mantener la fosforilación de eIF4E (Ueda, Watanabe-Fukunaga et al. 2004).

Dos proteínas de unión a RNA que se ha visto que son reguladas vía Mnks son hnRNP A1 y PSF (Splicing factor asociado a PTB). hnRNP A1 es una proteína muy abundante en el núcleo y juega un papel importante en el metabolismo del mRNA. Se ha visto que las Mnks fosforilan hnRNP A1 en dos lugares, Ser192 y Ser310, en respuesta a la activación de células T (Buxade, Parra et al. 2005). La fosforilación de hnRNP A1 se ha visto que disminuye su interacción con el mRNA de TNF- $\alpha$ , sugiriendo que las Mnks juegan un papel en la regulación de mRNAs específicos.

PSF es una proteína nuclear envuelta en la transcripción de RNAs de procesamiento, es un factor de splicing. Las Mnks lo fosforilan en los residuos Ser8 y Ser283, incrementando su afinidad hacia el mRNA de TNF- $\alpha$  (Buxade, Morrice et al. 2008).

Otro sustrato es cPLA<sub>2</sub>, el cual juega un papel importante en la producción de mRNAs con funciones importantes en el sistema inmune e inflamatorio, este es fosforilado por las Mnks en el residuo Ser272.

También se ha visto que Mnk1 regula la fosforilación de Sprouty2, una proteína que suprime la activación de ERK (Bundschu, Walter et al. 2006).

#### 1.2.2.2 Efectos de la fosforilación de eIF4E

El significado biológico de la fosforilación de eIF4E no se ha determinado y su rol en el inicio de la traducción es controvertido (Scheper and Proud 2002). Se ha descrito su importancia en tumorigénesis, un incremento de eIF4E y su fosforilación se ha correlacionado con la progresión tumoral (Byrnes, White et al. 2006; Wendel, Silva et al. 2007; Furic, Rong et al. 2010) (Ver capítulo 1.3.1.1 *Papel de la fosforilación de eIF4E en cáncer*).

Debido a que los estímulos que incrementan la traducción de proteínas generalmente incrementan el estado de fosforilación de eIF4E, se pensó que la fosforilación podría aumentar la actividad de eIF4E incrementando su afinidad hacia la estructura cap del mRNA. Minich et al. mediante un ensayo de cromatografía sobre sefarsa del RNA separaron la forma fosforilada de la no fosforilada de eIF4E, mediante métodos de fluorescencia vieron que la fracción que contenía la forma fosforilada de eIF4E mostraba de 3 a 4 veces más afinidad por la estructura cap del mRNA que la forma no fosforilada (Minich, Balasta et al. 1994); también, mediante análisis de los datos estructurales de eIF4E inicialmente se pensó que la forma fosforilada de eIF4E tenía mayor afinidad hacia la estructura cap que la forma no fosforilada (Joshi, Cai et al. 1995); recientes estudios basados en una nueva estructura indican lo contrario (Scheper and Proud 2002; Zuberek, Jemielity et al. 2004). Por lo tanto el rol y la función de la fosforilación de eIF4E no están del todo claro.

Con el descubrimiento de las Mnk se pudo fosforilar eIF4E *in vitro*, gracias a esto y utilizando un análogo del cap mRNA se vio, contrariamente a lo descubierto por Minich et al., que la forma fosforilada de eIF4E tenía menor afinidad por la estructura cap que la forma no fosforilada (Scheper and Proud 2002); por otro lado vieron que esta fosforilación no afectaba a la unión a 4E-BPs y, debido a que se unen al mismo lugar que eIF4G, tampoco se veía afectada la unión con eIF4G (Ptushkina, von der Haar et al. 1999).

Otros estudios que concuerdan con la observación que la fosforilación de eIF4E disminuye la afinidad hacia la estructura cap fueron los realizados al sobreexpresar mutantes de Mnk1 y Mnk2, los cuales al incrementar la fosforilación de eIF4E impedían la traducción cap dependiente (Knauf, Tschopp et al. 2001).

Por el contrario Yikun Li et al. recientemente han visto que tratando líneas celulares de cáncer de pulmón con el inhibidor PP2A (*protein phosphatase 2A*), el cual controla la actividad de la mayoría de proteínas quinasas envueltas en las vías PI3K/Akt, Rad/MAPK/ERK y mTOR/p70S6K (Westermarck and Hahn 2008), e inhibe la fosforilación de Mnk y por lo tanto de eIF4E, regula negativamente la formación del complejo eIF4F al inhibir la fosforilación de eIF4E, indicando que la fosforilación de eIF4E sería necesaria para el inicio de la traducción cap-dependiente (Li, Yue et al. 2010).

Se demostró que la sobreexpresión del mutante de eIF4E S209A era igual de eficiente que la forma WT de la proteína al promover la síntesis proteica (McKendrick, Morley et al. 2001). Por el contrario en algunos casos, la fosforilación de eIF4E y el incremento de la traducción están asociados; por ejemplo, se ha visto que la estimulación celular con factores de crecimiento y mitógenos incrementa los ratios de traducción y los niveles de fosforilación de eIF4E (Morley and McKendrick 1997; Wang, Flynn et al. 1998); por ello, fue asumido que la fosforilación de eIF4E estimulaba la traducción cap-dependiente. Sin embargo, los efectos de la fosforilación de eIF4E en la traducción cap-dependiente *in vitro* no son significativos, el tratamiento con agentes inductores de estrés, como la anisomicina o el arsénico, fosforilan eIF4E y se observa una

traducción global disminuida (Wang, Flynn et al. 1998). Se ha visto que hay un incremento selectivo de ciertas proteínas, en tumores de próstata, debido al incremento de la fosforilación de eIF4E, como sería el caso de VEGF, MMP3 y BIRC2 (Furic, Rong et al. 2010).

*In vitro* se ha visto que la activación de la traducción de ciertos mRNAs en respuesta a señales estimuladoras de crecimiento, se correlaciona con un aumento de la fosforilación de eIF4E, mientras que la inhibición de la síntesis proteica debido a choque térmico, a estrés osmótico o infecciones virales, se correlaciona con la desfosforilación de eIF4E. A pesar de ello, la fosforilación de eIF4E no es suficiente para que se dé un aumento en la síntesis proteica global (Ueda, Watanabe-Fukunaga et al. 2004). Se ha observado que dicha fosforilación es requerida para la inhibición de la apoptosis y para promover la tumorigénesis *in vivo*. (Silva and Wendel 2008).

Scheper and Proud propusieron dos modelos para el papel fisiológico de la fosforilación de eIF4E, por un lado la fosforilación de eIF4E por las Mnk's podría estimular una carga rápida y secuencial de múltiples complejos de iniciación y ribosomas en un mismo mRNA o, por otro lado, podría estimular un rápido reciclaje de los factores de inicio de la traducción de un mRNA a otro mRNA, dependiendo de en qué punto del inicio de la traducción se fosforile eIF4E.

Teniendo en cuenta estos resultados, parece ser que la fosforilación de eIF4E no es crítica bajo situaciones normales, es decir, cuando las 4E-BPs están fosforiladas por mTOR y el complejo eIF4F puede formarse con normalidad. La actividad de las Mnk's y el estado de fosforilación de eIF4E es importante sólo cuando el suministro de nutrientes es bajo o se produce un estrés ambiental, lo que produce un incremento de la desfosforilación de 4E-BPs y por consiguiente una formación limitada del complejo eIF4F.

También se demostró que la hiperfosforilación de eIF4E por la sobreexpresión de las quinasas Mnk's en *Drosophila* conduce a la reducción de la traducción y/o los ratios de crecimiento, es importante para que se produzca un desarrollo normal (Knauf, Tschopp et al. 2001); por el contrario, ratones deficientes en las quinasas Mnk1 y Mnk2 no muestran ningún cambio en los ratios globales de traducción y en el desarrollo normal (Ueda, Watanabe-Fukunaga et al. 2004; Wendel, Silva et al. 2007).

Por otro lado se ha visto que la fosforilación de eIF4E puede estar implicada en el transporte de ciertos mRNAs de núcleo a citoplasma, una posibilidad es que la fosforilación de eIF4E modula la asociación con proteínas de unión a elementos 4E-SE y esta interacción module la capacidad de eIF4E de promover el transporte de ciertos mRNAs (Topisirovic, Ruiz-Gutierrez et al. 2004).

En resumen, el efecto de la fosforilación de eIF4E es altamente controvertido y son necesarios más estudios para ver la implicación de dicha fosforilación. Lo que sí es comúnmente aceptado es que la activación o fosforilación de eIF4E está asociada con la proliferación celular, la transformación, la progresión tumoral y la resistencia a la apoptosis (Wang, Yue et al. 2007).

### **1.2.2.3 Otras modificaciones y regulación de eIF4E**

Varias proteínas se han visto implicadas en la regulación de eIF4E tanto a nivel proteico como de su mRNA. En humanos otras dos proteínas, a parte de las descritas, se han identificado como proteínas de unión a eIF4E: PML (*Promyelocytic leukemia protein*) y PRH (*proline-rich homeodomain protein*).

PML se encuentra en cuerpos nucleares y media la supresión de la transformación oncogénica y del crecimiento celular; inhibe la función de exportación de mRNA de núcleo a citoplasma de

eIF4E así como su afinidad hacia cap (Cohen, Sharma et al. 2001; Culjkovic, Topisirovic et al. 2007). PRH es un regulador negativo de eIF4E, es una proteína nuclear que impide la función de exportación de eIF4E (Topisirovic, Culjkovic et al. 2003).

Por otro lado también es regulado vía sumoylación, modificación postraduccional envuelta en varios procesos celulares como el transporte núcleo-citoplasma, apoptosis, estabilidad proteica, respuesta a estrés y progresión del ciclo celular. eIF4E es modificado por SUMO1 y es la fosforilación de la serina 209 la que promueve dicha fosforilación. Mientras que la sumoylación de eIF4E no afecta la unión a cap, sí que promueve la disociación de eIF4E con 4E-BP, incrementando así la formación del complejo eIF4F y por lo tanto la traducción cap dependiente de proteínas que son esenciales para la proliferación celular y la prevención de la apoptosis; La desumoylación inhibe las propiedades antiapoptóticas de eIF4E (Xu, Vatsyayan et al. 2010).

A nivel de mRNA, se ha visto que hay un incremento de la transcripción de eIF4E en líneas celulares con elevados niveles estables de c-myc (Rosenwald, Rhoads et al. 1993); la familia de factores de transcripción myc, es responsable del control de genes que están directamente envueltos en el crecimiento celular y la proliferación, eIF4E es uno de los genes regulados por myc; la región promotora de eIF4E contiene dos lugares de unión a myc (Jones, Branda et al. 1996) y como consecuencia la expresión de eIF4E es aumentada al sobreexpresarse myc (Rosenwald, Rhoads et al. 1993).

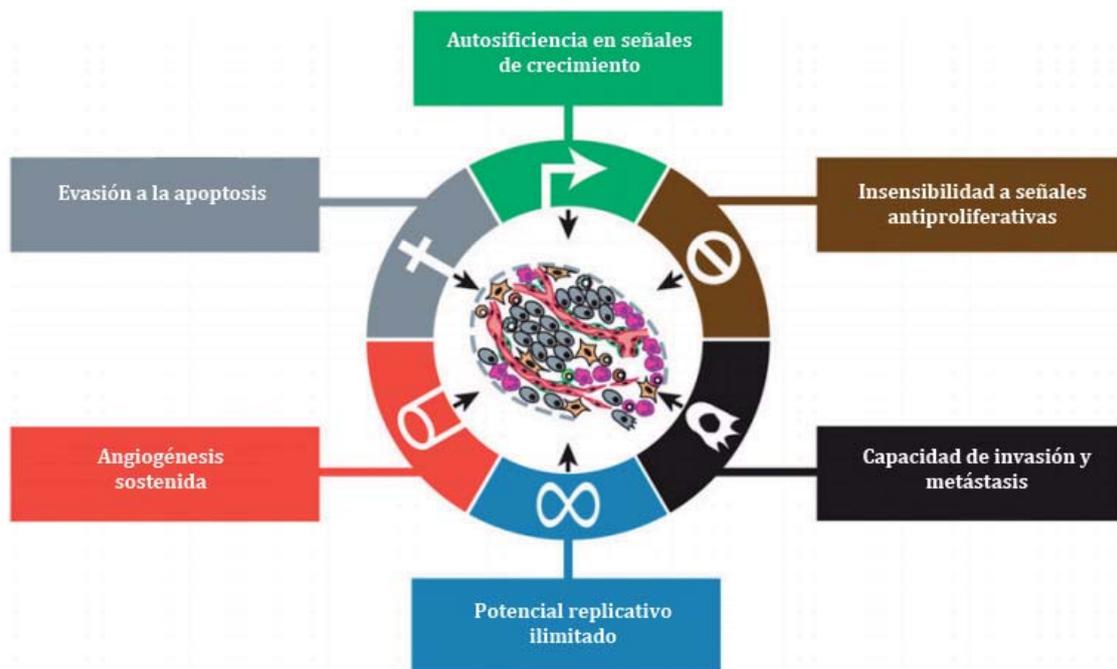
Se han encontrado tres elementos ticos en AU (AREs) en el transcrito de eIF4E. La proteína HuR frecuentemente regula la estabilidad de transcritos que contienen elementos ARE. HuR se asocia con los transcritos de eIF4E estabilizándolos y aumentando su tiempo de vida media; por el contrario AUF1 interacciona con el 3'UTR de eIF4E y disminuye la estabilidad del mRNA. eIF4E y HuR colaboran en la regulación de la expresión génica, teniendo como targets transcritos comunes. Por ejemplo, se ha visto que HuR induce el aumento de Ciclina D1, VEGF y c-myc, en parte, dependiendo de los niveles de eIF4E. (Topisirovic, Siddiqui et al. 2009).

### **1.3 Traducción y cáncer**

El cáncer es una de las enfermedades de mayor predominio en el mundo debido a su incidencia, prevalencia y mortalidad. Es una de las principales causas de muerte a escala mundial. En España es la primera causa de muerte entre los hombres y la segunda entre las mujeres. Aproximadamente una de cada tres personas están diagnosticadas de cáncer a lo largo de su vida. Los más frecuentemente diagnosticados son el cáncer de mama, próstata, colorrectal y pulmón. Hasta el momento se conocen más de 250 tipos de tumores que muestran a su vez diferentes subtipos morfológicos e histológicos con comportamientos desiguales, y cientos/miles de alteraciones oncogénicas que pueden estar implicadas, lo que demuestra la gran heterogeneidad de esta enfermedad, pudiendo tener diferentes características entre ellos lo que hace que se pueda clasificar como enfermedades independientes con causa, evolución y tratamiento específicos para cada caso (Stratton, Campbell et al. 2009).

Se propusieron seis capacidades compartidas en la mayoría de cánceres: autosuficiencia en señales de crecimiento, evasión de la apoptosis, insensibilidad a señales antiproliferativas, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida y capacidad de invasión y metástasis

(Hanahan and Weinberg 2000) (Figura 6). En cada una de estas vías, hay muchos factores que pueden estar implicados y lo importante es la alteración funcional de la vía. La característica más fundamental de las células cancerígenas envuelve su capacidad para mantener una proliferación crónica; el tejido normal controla la producción de señales promotoras de proliferación asegurándose la homeostasis de la célula y el mantenimiento de la arquitectura y función del tejido normal, por el contrario en las células tumorales esta producción se encuentra desregulada, ya sea produciendo sus propios factores de crecimiento, sobreexpresando sus receptores o influenciando las células adyacentes para que produzcan señales de crecimiento; a de más, las células tumorales tienen la capacidad de eludir señales que negativamente regularían la proliferación celular y señales de muerte celular, lo que conlleva a un crecimiento del tumor. El crecimiento del tumor conlleva a un requerimiento de suministro de nutrientes y oxígeno mayor, los bajos niveles de oxígeno provocan un incremento de la formación de capilares sanguíneos dentro del tumor, angiogénesis, estos capilares suministran el oxígeno y los nutrientes que requiere el tumor para continuar creciendo. La invasión y metástasis permite la propagación del cáncer de su localización original a otras partes del cuerpo.



**Figura 6: Señales de identidad del cáncer.** La ilustración muestra las seis capacidades compartidas en la mayoría de los cánceres (adaptado de Hanahan and Weinberg 2011).

El proceso de carcinogénesis se desencadena por la aparición de una mutación inicial que no ha sido reparada, seguido de la acumulación de sucesivas mutaciones que se van incorporando al genoma. Estas mutaciones pueden ser producidas por diferentes agentes cancerígenos y/o por errores espontáneos producidos o inducidos por la replicación o reparación del DNA. Existen dos tipos de genes que juegan un papel importante en el inicio y progresión del tumor cuando están mutados o alterados genéticamente: los protooncogenes, codifican proteínas que de algún modo pueden influenciar el ciclo celular, ya sea favoreciendo su progresión o procesos proliferativos o bien inhibiendo los procesos normales de senescencia y apoptosis; y los genes supresores de tumores, definidos como genes que codifican proteínas que inhiben la

proliferación celular y/o pueden inducir la apoptosis. En condiciones normales estos genes participan en la regulación del ciclo celular activando e inhibiendo los procesos dirigidos hacia la proliferación celular. Tanto la activación de los oncogenes como la inactivación de los genes supresores de tumores, da lugar a una desregulación del ciclo celular y a una proliferación incontrolada, provocando la aparición del tumor.

Como hemos comentado anteriormente el inicio de la traducción es un proceso altamente regulado, dónde múltiples vías de señalización convergen controlando la actividad de los diferentes factores de inicio de la traducción y proteínas implicadas en la regulación de estos. Una desregulación del inicio de la traducción puede producir diversas alteraciones, entre ellas la aparición del cáncer, debido a aberraciones en la síntesis de ciertas proteínas implicadas en la proliferación celular, la apoptosis, angiogénesis, supervivencia y transformación celular.

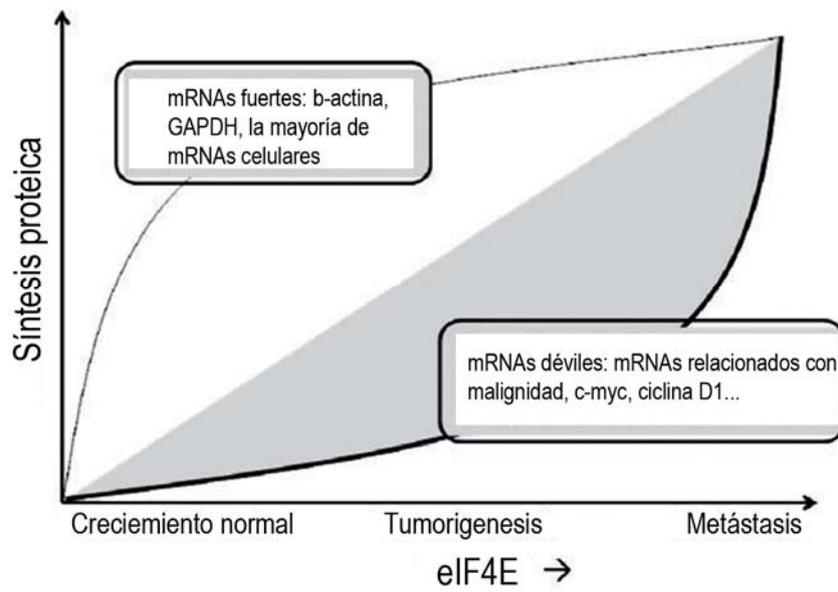
Varios factores implicados en el inicio de la traducción se han visto desregulados en cáncer. Entre otros factores, por ejemplo se han encontrado altos niveles de eIF4G en un gran número de cánceres humanos, principalmente en carcinomas escamosos de pulmón (Bauer, Diesinger et al. 2001); la fosforilación de 4E-BP1 se ha visto asociada con prognosis de cáncer de mama, de ovario y de próstata (Armengol, Rojo et al. 2007); eIF2 $\alpha$  se ha visto incrementado en tumores gastrointestinales (Lobo, Martin et al. 2000); subunidades de eIF3 se han visto incrementado en cáncer de pulmón, mama y de esófago (Lin, Holbro et al. 2001; Pincheira, Chen et al. 2001) Nosotros nos centramos en el estudio de eIF4E, el cual se encuentra *upregulado* en varios tipos de tumores humanos.

### 1.3.1 eIF4E y cáncer

De todos los factores de iniciación de la traducción, eIF4E es el más directamente implicado en la malignidad del cáncer. Se han encontrado elevados niveles de eIF4E en muchos tipos de tumores y líneas celulares de cáncer, incluyendo cáncer de colon, mama, vejiga, pulmón, próstata, del tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, linfomas de Hodgkin's y neuroblastomas, pero no es típico de lesiones benignas. Ya se sugirió eIF4E como un marcador pronóstico para diversos tipos de canceres y su papel en metástasis (De Benedetti and Harris 1999; Nathan, Franklin et al. 1999; Rosenwald, Chen et al. 1999; Wang, Rosenwald et al. 1999). Este hecho refleja su papel primario en el proceso de tumorigénesis, ya que su sobreexpresión *in vitro* causa transformación maligna y crecimiento celular desregulado, mientras que la disminución de sus niveles de expresión comporta una inhibición del crecimiento tumoral (Oridate, Kim et al. 2005).

Los mRNAs celulares pueden ser divididos en dos grupos: mRNAs fuertes, los cuales contienen una estructura 5' UTR relativamente corta; y los mRNAs débiles, los cuales contienen una estructura 5' UTR larga y altamente estructurada (Koromilas, Lazaris-Karatzas et al. 1992; De Benedetti and Harris 1999). La diferencia entre los dos grupos de mRNAs es que los mRNAs débiles son más sensibles a la unión con eIF4E; normalmente codifican para factores de crecimiento y supervivencia (Graff, Konicek et al. 2008); A pesar que eIF4E no regula la traducción global, contribuye a la malignidad permitiendo selectivamente la traducción de un grupo limitado de mRNAs (mRNAs débiles) que codifican para proteínas claves envueltas en la proliferación celular, la angiogénesis y la supervivencia, así como proteínas implicadas en la transformación y metástasis, como por ejemplo: Ciclina D1, VEGF, c-myc, ODC y MMP9 (De

Benedetti and Graff 2004; Larsson, Li et al. 2007), provocando así la tumorigénesis. Debido a que muchos de estos mRNAs codifican para oncoproteínas reguladoras del ciclo celular, factores de crecimiento y sus receptores, los niveles elevados de eIF4E hacen que el crecimiento celular sea más rápido y que las células puedan convertirse en neoplásticas (De Benedetti and Harris 1999). (Figura 7).



**Figura 7: Niveles elevados de eIF4E incrementan la tumorigénesis.** Niveles elevados de eIF4E incrementan la traducción de los niveles de los mRNA débiles, los cuales codifican proteínas relacionadas con la malignidad, esto incrementa la tumorigénesis y la metástasis (adaptado de Graff, Konicek et al. 2008).

Por otro lado reduce la sensibilidad celular a la apoptosis; media el rescate apoptótico por la activación de la traducción de bcl-x y otros factores intermedios (Li, Takasu et al. 2003).

Las dos funciones de eIF4E principales, exportación de mRNAs de núcleo a citoplasma y su papel en el inicio de la traducción cap-dependiente, contribuyen al efecto oncogénico y al rescate apoptótico, debido a que el incremento de proteínas implicadas en este efecto puede ser debido tanto a un incremento del transporte de los mRNA como a un aumento de su traducción (Culjkovic, Topisirovic et al. 2006; Culjkovic, Topisirovic et al. 2007; Culjkovic, Tan et al. 2008).

Hay varias evidencias que apoyan el rol de eIF4E en malignidad, se ha visto que la inhibición mediante siRNA de eIF4E en la línea celular HeLa, suprime la proliferación y la morfología celular alterada (De Benedetti, Joshi-Barve et al. 1991), así como la inhibición de eIF4E en tumores de mama, cabeza y cuello suprime la formación del tumor, el crecimiento y la metástasis (Graff, Boghaert et al. 1995; Nathan, Liu et al. 1997; DeFatta, Nathan et al. 2000). Así como la inhibición de eIF4E tanto en modelos tumorales epiteliales y fibroblastos suprime el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis, así como la reducción de la traducción de una serie de proteínas relacionadas con malignidad, como sería el caso de ODC, VEGF y FGF-2 (De Benedetti and Graff 2004).

Ruggero et al. demostraron que la sobreexpresión de eIF4E provoca la formación de tumores. Parece ser que la sobreexpresión de eIF4E no solo incrementa la expresión de c-myc, si no que eIF4E coopera con él en el proceso de la transformación celular (Ruggero, Montanaro et al. 2004).

En cánceres humanos, los niveles de eIF4E son comúnmente elevados como consecuencia de un incremento en la expresión de eIF4E o por la liberación de eIF4E de 4E-BP, un resultado de la activación de las vías Akt/mTOR y ras, las cuales se han visto activadas en varios tipos de tumores (De Benedetti and Graff 2004). Por otra parte, también se ha visto que la fosforilación de 4E-BP también se ve incrementada y se asocia a la progresión maligna de tumores de mama, ovario, próstata y colon (Armengol, Rojo et al. 2007).

La activación de eIF4E puede representar un punto de convergencia para las vías claves que conducen a la malignidad y la progresión tumoral; por otra parte, la función de eIF4E es crítica para la expresión de una gran variedad de proteínas que contribuyen en diferentes aspectos de la malignidad. Como consecuencia, la inhibición de la función de eIF4E puede ser una potente estrategia viable para el tratamiento de muchos tipos de tumores diferentes y, se esperaría, que su inhibición disminuyera simultáneamente la expresión de múltiples proteínas implicadas en la progresión tumoral.

### **1.3.1.1 Papel de la fosforilación de eIF4E en cáncer**

En las células sanas la fosforilación en la serina 209 no es esencial para el correcto funcionamiento de eIF4E y el proceso de la traducción; sin embargo, se ha visto que en las células tumorales es crucial ya que favorece la progresión tumoral y contribuye a la invasión hacia otros tejidos. Causa desregulación del crecimiento celular y transformación. Actúa como un oncogén, un aumento de su expresión produce un desarrollo del tumor. (Bilanges and Stokoe 2007). Se ha visto que la sobreexpresión de eIF4E causa el desarrollo de tumores malignos cuando eIF4E contiene la serina 209 funcional permitiendo la fosforilación (Lazaris-Karatzas, Montine et al. 1990; Ruggero, Montanaro et al. 2004).

Mediante la inyección de células con el mutante de eIF4E S209A, incapaz de fosforilarse, en ratones se observó que en estos no se promovía la tumorigénesis en comparación con ratones inyectados con células control, por el contrario, ratones reconstituidos con eIF4E S209D, mutante fosfomimético, se veía un incremento de la formación del tumor, comparado con la sobreexpresión de la forma *wild type* de eIF4E, concluyendo que la forma fosforilada de eIF4E en la serina 209 es importante para la tumorigénesis. El hecho que la fosforilación en la serina 209 de eIF4E sea importante en la tumorigénesis indicaría que las Mnks juegan un papel importante; mediante la utilización de un mutante activo de la Mnk1 y la inactivación de esta vieron que tan solo el mutante activo era capaz de acelerar la formación de linfomas, indicando que la fosforilación de eIF4E parecía ser importante para la progresión tumoral (Wendel, Silva et al. 2007).

*In vitro* se ha visto que la fosforilación de eIF4E incrementa el transporte núcleo-citoplasmático de el mRNA de Ciclina D1, la cual promueve la transformación (Topisirovic, Ruiz-Gutierrez et al. 2004). Estos datos dan soporte al hecho que el incremento de la fosforilación de eIF4E puede ser

una de las vías del cáncer, la progresión tumoral se correlaciona con los niveles de fosforilación de eIF4E.

El rol de la fosforilación de eIF4E en cáncer requiere una mayor investigación.

### **1.3.1.2 eIF4E en cáncer de mama**

El cáncer de mama representa uno de los mayores problemas de salud con más de 500000 muertes anuales en todo el mundo; es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer, estando su incidencia en aumento sobre todo en países desarrollados. Se han hecho muchos avances en el estudio de esta enfermedad, aunque la incidencia sigue en aumento, la mortalidad está disminuyendo en el mundo occidental; aunque las tasas de curación han mejorado en estados tempranos del desarrollo de la enfermedad, los pacientes siguen teniendo recaídas a pesar de las terapias actuales (Wheater, Johnson et al. 2010).

Representa un grupo de tumores con un comportamiento biológico muy diverso y una gran variabilidad clínica. La diversidad clínica y pronóstica del carcinoma de mama se establece a nivel molecular, al expresar distintos genes que les confiere variabilidad biológica y pronóstica (Perou, Sorlie et al. 2000). El estudio de estos genes, en los últimos años, ha hecho posible comprender el comportamiento biológico, el pronóstico y el tratamiento de algunos cánceres de mama.

Los perfiles de expresión genética del carcinoma de mama se identifican en 5 subtipos moleculares: *normal-like*, HER2 positivo, luminal (A y B), basal A y basal B (Hu, Fan et al. 2006). Estos diferentes subtipos reflejan el tipo de célula del cual se originan. Los carcinomas de mama de tipo luminal son los subtipos con mejor pronóstico y se caracterizan por expresar los receptores de estrógeno (RE). El carcinoma de mama HER2 positivo muestra una expresión aumentada de genes asociados a c-erB-2 y suele asociarse a otros marcadores de mal pronóstico. El subtipo basal se caracteriza por la sobreexpresión de citoqueratinas características de la capa basal y la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, suelen tener mutado el oncogén p53, sobreexpresan EGFR (el factor de crecimiento epidérmico) y se caracterizan por la ausencia de la expresión de RE y HER2, se asocia a la mutación BRCA1 y presenta un comportamiento más agresivo (Irigoyen, Garcia et al. 2011).

Muchos estudios se han realizado para el estudio de la relación de eIF4E en cáncer de mama, Kerekatte et al. fueron los primeros en demostrar que la proteína eIF4E se encontraba sobreexpresada en cáncer de mama (Kerekatte, Smiley et al. 1995). Posteriormente se demostró que el grado de la sobreexpresión de eIF4E predice la recurrencia en pacientes (Li, Liu et al. 1997). Pacientes que expresan elevados niveles de expresión de eIF4E tienen un incremento mayor en la recurrencia del cáncer de mama, en comparación con pacientes con bajos niveles de expresión de eIF4E (McClusky, Chu et al. 2005; Byrnes, White et al. 2006; Zhou, Wang et al. 2006; Flowers, Chu et al. 2009). La sobreexpresión de eIF4E en cáncer de mama parece estar relacionada con la angiogénesis, la recidiva tumoral y la supervivencia de los pacientes. eIF4E está asociado con una progresión maligna en el carcinoma ductal infiltrante de mama (IDCA) (Sorrells, Meschonat et al. 1999); se ha visto correlación de la sobreexpresión de eIF4E, en pacientes con cáncer de mama, con elevados niveles de VEGF y con un incremento en la número de la densidad de los microvasos del tumor (MVD), por lo tanto, la sobreexpresión de eIF4E en

cáncer de mama parece predecir el incremento en la vascularidad del tumor y, por lo tanto, la capacidad de diseminación del tumor (Byrnes, White et al. 2006).

Se ha visto que su sobreexpresión se correlaciona con elevados niveles de Ciclina D1, c-myc y VEGF y esto está asociado con un peor pronóstico en tumores de mamá y una mayor recaída (Kleiner, Krishnan et al. 2009). Bajos niveles de eIF4E se han correlacionado con mejor pronóstico tras el tratamiento con terapia adyuvante (Hiller, Chu et al. 2009).

## 1.4 Transición epitelio mesénquima (EMT)

La transición epitelio mesénquima (EMT) describe una serie de cascadas que conducen a un cambio en el fenotipo celular, desde un estado estacionario, fenotipo diferenciado característico del tejido epitelial normal, a un estado migratorio, fenotipo des-diferenciado característico de fibroblastos o células tumorales metastásicas (Savagner 2010). Es la conversión de células sedentarias a células migratorias.

Las células que sufren EMT pierden el contacto entre ellas, cambian su modo de asociación con la matriz extracelular y se vuelven móviles. Estas células pueden remodelar su matriz extracelular y secretar proteasas para ayudar en el proceso. (Leopold, Vincent et al. 2012). Por definición este proceso confiere movilidad celular permitiendo la evolución, fusión o generación del epitelio secundario, esencial para la morfogénesis y la organogénesis. (Peinado, Olmeda et al. 2007; Thiery, Acloque et al. 2009).

Tres tipos de EMT han sido propuestos (Kalluri and Weinberg 2009; Zeisberg and Neilson 2009) basados en estados del desarrollo y asociados a diferentes biomarcadores: EMT envuelto en embriogénesis (Tipo I), regeneración/fibrosis en tejido maduro (Tipo II) y EMT comúnmente asociada con metástasis (Tipo III). El uso de estas tres categorías últimamente falla debido a la complejidad de la plasticidad de las células en respuesta a los cambios del entorno, por ejemplo, Acloque et al. diferencian tres grados en EMT tipo I durante la embriogénesis. (Leopold, Vincent et al. 2012).

EMT se conduce mediante diferentes factores de traducción que regulan la expresión de numerosas proteínas implicadas en la polaridad celular, en el contacto célula-célula, en la estructura del citoesqueleto y en la degradación de la matriz extracelular. Estos factores de transcripción incluyen miembros de la familia ZEB, SNAIL y TWIST. Estas proteínas embriológicas están ausentes en diferentes células adultas, pero frecuentemente se ven reactivadas en cáncer, promoviendo mediante EMT la diseminación de células cancerígenas.

Muchas vías de señalización celular se han encontrado implicadas en EMT, donde se incluyen las vías tirosina quinasa, la vía Ras, vía ILK (*integrin-linked kinase*), la vía integrina, vía Wnt/-catenina, la vía Notch y la vía PI3K/Akt (Larue and Bellacosa 2005). La activación de la vía PI3K/Akt es una característica central de la activación de EMT. Akt se encuentra frecuentemente aumentada y activada en tumores de ovario, mama y páncreas; está envuelta en muchos procesos celulares como la progresión del ciclo celular, la proliferación, la supervivencia, el metabolismo celular y EMT (Grille, Bellacosa et al. 2003).

Muchos inductores de EMT proporcionan a las células ventajas en situaciones de estrés, como por ejemplo activando vías anti-apoptóticas (Ansieau 2013). El cambio en la movilidad celular

envuelve un cambio en las interacciones entre las células, algunas interacciones célula-célula no pueden verse mantenidas durante la movilidad, por ello en EMT algunas proteínas implicadas en la interacción celular se ven disminuidas, es el caso de ciertas conexinas, como Cx26 y Cx43, la integrina  $\alpha6\beta4$  y la E-cadherina. Cuando la expresión de E-cadherina es reducida, una cadherina no epitelial, la N-cadherina, a veces, muestra elevados niveles de expresión, siendo otro marcador de EMT. La remodelación de la matriz extracelular después de la migración requiere ciertas metaloproteinasas (MMP) las cuales se ven aumentadas, como es el caso de MMP-2, MMP-9, MMP-13 y MMP14; MMP-1 y MMP-3 no están tan envueltas en EMT (Leopold, Vincent et al. 2012).

### 1.4.1 Cadherinas

Los tejidos epiteliales y endoteliales están compuestos por capas continuas de células que están interconectadas por uniones célula-célula, en particular uniones adherentes y uniones estrechas (*tight junctions*). Las principales moléculas implicadas en las uniones adherentes son las cadherinas. Las interacciones entre las diferentes cadherinas son importantes y requeridas para la formación de los tejidos durante el desarrollo y para el mantenimiento de la función de barrera del epitelio o del endotelio (Takeichi 2011). Se ha visto que alteraciones en la función de las cadherinas es un paso crítico para el desarrollo de tumores (Nieman, Prudoff et al. 1999).

Las cadherinas constituyen una familia de glicoproteínas transmembrana que median la adhesión celular dependiente de calcio; juegan un papel importante en el mantenimiento de la arquitectura del tejido normal y en el reconocimiento entre células. Se han caracterizado dos tipos diferentes de cadherinas, el tipo I, donde encontramos las P-, N- y E-cadherinas, y el tipo II, cadherinas 5-12, del cual se conoce poco su función y su patrón de expresión.

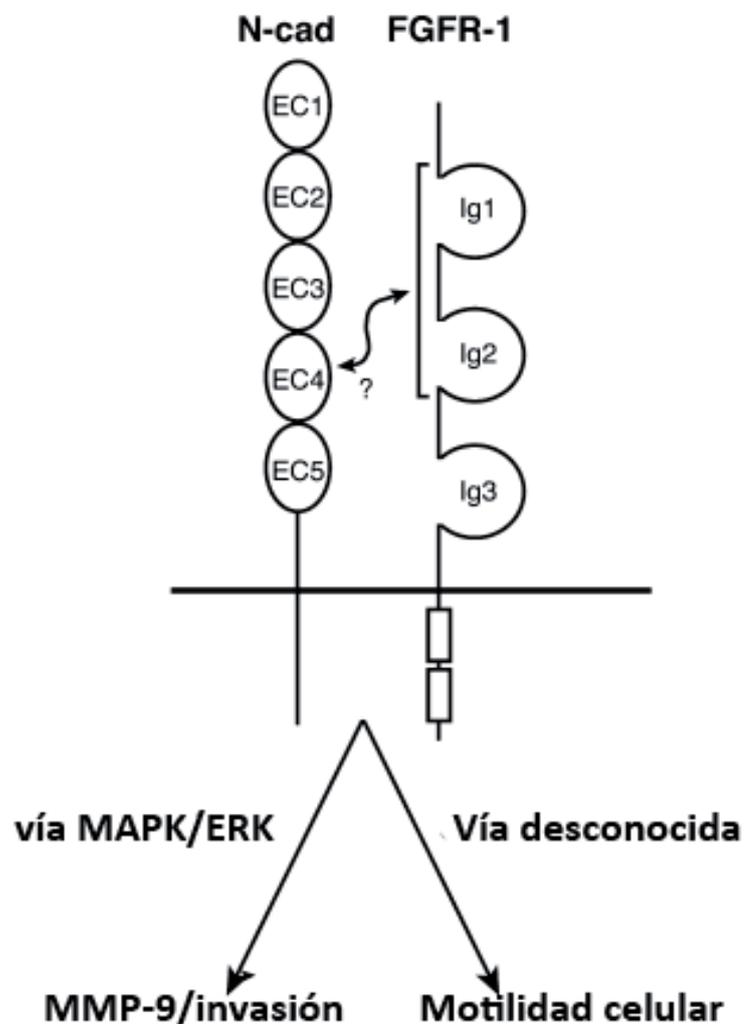
Las diferentes cadherinas tienen diferentes tipos de expresión durante el desarrollo embrionario normal, sugiriendo que tienen diferentes funciones. E- y P-cadherinas se encuentran en el epitelio donde promueven la asociación célula-célula conocida como uniones adherentes. En cambio, la N-cadherina se encuentra mayormente en el tejido primario neural y en fibroblastos, donde media una unión menos estable y más dinámica entre las células (Hazan, Qiao et al. 2004).

Las cadherinas contienen un largo dominio extracelular, el cual se une con la misma molécula de una célula adyacente. También contienen un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, el cual es altamente conservado. La parte intracelular de las cadherinas interacciona con diferentes proteínas denominadas cateninas, las cuales unen las cadherinas con el citoesqueleto. Esta unión es requerida para la función adherente de las cadherinas (Hazan, Qiao et al. 2004).

Ha sido descrito que E-cadherina promueve tan solo la adhesión célula-célula, mientras que la N-cadherina promueve tanto la estabilidad como la inestabilidad entre las interacciones entre células, facilitando la migración celular. Este aumento en la invasión y la migración celular no siempre se ve correlacionado con la transición epitelio mesénquima, ya que no se ven afectados otros factores implicados en EMT.

En tejidos, cambios en la adhesión celular no son suficientes para activar la penetración en la matriz extracelular. Las células tumorales, para romper las barreras biológicas y poder invadir y

producir metástasis necesitan producir enzimas proteolíticas, las más conocidas son las metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Mignatti and Rifkin 1993). Las MMPs son una familia de enzimas de degradación de la matriz extracelular, muchas están asociadas con la invasión y la metástasis (Coussens and Werb 1996). La presencia de N-cadherina resulta en un incremento de la adhesión de las células tumorales a las células endoteliales, incrementando la migración y la invasión de estas. La movilidad y la invasión se ve aumentada por FGF y acompañada por un aumento en de la actividad de la MMP9 (Hazan, Phillips et al. 2000). La actividad proinvasiva de la N-cadherina resulta, parcialmente, por la interacción sinérgica con el receptor de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFR) vía su dominio extracelular, el cual estabiliza FGFR-1 y sostiene la señal extracelular que regula la activación de la vía MAPK-ERK, lo que resulta con un incremento de la producción de metaloproteinasa 9 (MMP9), se cree que pueden haber implicadas otras vías que incrementan la movilidad celular vía N-cadherina/FGFR-1, pero hasta el momento no son conocidas (Figura 8) (Gradl, Kuhl et al. 1999; Hult, Suyama et al. 2007).



**Figura 8: Vía de activación de la invasión celular mediante el complejo N-cadherina y FGFR-1.** La interacción sinérgica de la N-cadherina con el receptor de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFR) incrementa la invasión celular mediante la secreción de MMP9 al activarse la vía MAPK/ERK, y la motilidad celular mediante una vía desconocida (adaptado de Hazan, Qiao et al. 2004).

Para infiltrar otros tejidos las células cancerígenas con origen epitelial se tienen que separar de la masa del tumor mediante la rotura de los contactos entre células, conocidos como uniones adherentes (Frixen, Behrens et al. 1991; Vleminckx, Vakaet et al. 1991). Las células cancerígenas adquieren la capacidad de mantener una continua proliferación, evadir la inhibición del crecimiento, invadir tejidos y formar metástasis (Hanahan and Weinberg 2011). Una característica de la progresión del tumor es la pérdida del fenotipo epitelial y un incremento en el fenotipo mesenquimal (Yilmaz and Christofori 2009; Micalizzi, Farabaugh et al. 2010). Según esta hipótesis, la molécula de adhesión celular E-cadherina, la cual es el componente adhesivo de las uniones adherentes, es ausente en la mayoría de tumores. La pérdida de E-cadherina se considera un factor importante en la invasión del tumor, se pierden las uniones célula-célula y se produce la progresión del tumor a un estado invasivo/migratorio (Frixen, Behrens et al. 1991; Takeichi 1993; Hazan, Qiao et al. 2004). La pérdida de función de la E-cadherina en muchos tumores epiteliales es debida a mecanismos que incluyen mutaciones que la inactivan o proteólisis del dominio extracelular. A más, se cree que la pérdida de E-cadherina, aparte de reducir la interacción entre las células, proporciona un estímulo oncogénico al liberar la  $\beta$ -catenina de la membrana, la cual puede ir hacia el núcleo y activar la regulación de genes como c-myc, Ciclina d1 o fibronectina, los cuales son importantes para la proliferación celular y la invasión (Gradl, Kuhl et al. 1999; Peifer and Polakis 2000).

Más recientemente se ha visto un aumento en la expresión de N-cadherina en células tumorales, relacionado con un aumento en el potencial invasivo de éstas. Se ha visto que N-cadherina se encuentra aumentada en tumores de mama mas invasivos y menos diferenciados, mientras que hay una pérdida de la expresión de E-cadherina (Hazan, Kang et al. 1997). N-cadherina puede promover la invasión y la motilidad de las células cancerígenas, se cree que la N-cadherina media la interacción entre las células cancerígenas y las células del estroma (Hazan, Kang et al. 1997). N-cadherina contribuye a la metástasis vía su función adherente, particularmente mediante la adhesión de células tumorales a células huésped, que expresan N-cadherina, del estroma o del endotelio vascular (Hult, Suyama et al. 2007).

Los miembros de la superfamilia de cadherinas se encuentran expresados en la glándula mamaria normal: la E-cadherina se expresa exclusivamente en el epitelio mamario, mientras que la N-cadherina se encuentra en las células mesenquimales del estroma (Andrews, Kim et al. 2012). E-cadherina y N-cadherina pueden encontrarse co-expresadas en células epiteliales malignas de cáncer de mama de ratón sin llegar a producirse invasión celular (Labelle, Schnittler et al. 2008). Se ha visto en un gran número de carcinomas de mama la coexpresión de N-cadherina y E-cadherina, así como en líneas celulares y, no siempre al incrementar los niveles de N-cadherina se ve una reducción de E-cadherina o al revés, como en el caso de la línea celular MDA-MB-435, donde al incrementar los niveles de E-cadherina de forma exógena no se ve una reducción de los niveles de N-cadherina ni una disminución en el potencial de invasión de esta línea celular (Nieman, Prudoff et al. 1999). Esos resultados demuestran que N-cadherina puede promover su efecto metastático en presencia de E-cadherina, es capaz de promover motilidad independientemente de la expresión de E-cadherina (Nieman, Prudoff et al. 1999).

### 1.4.2 Papel de eIF4E en la invasión y migración celular

Una característica de las células malignas es la capacidad invasora y migratoria que permite que se produzca el proceso de metástasis. Para formar metástasis, las células tumorales individuales deben romper con la masa del tumor primario, degradar la matriz extracelular, invadir el tejido normal circundante, entrar en la sangre o la circulación linfática y establecer nuevas colonias dentro de un nuevo tejido. Este comportamiento aberrante de las células cancerígenas requiere la función cooperativa de numerosas proteínas, proteínas que facilitan la angiogénesis (por ejemplo VEGF), proteínas de supervivencia celular (como Bcl2), invasión (MMPs) y el crecimiento por estimulación autocrina (como por ejemplo c-myc y Ciclina D1). Aunque la expresión de estas proteínas está regulada a muchos niveles, la traducción de estas proteínas relacionadas con la malignidad, están reguladas principalmente por la actividad de eIF4E (Rosenwald, Kaspar et al. 1995; Graff and Zimmer 2003; De Benedetti and Graff 2004; Graff, Konicek et al. 2008). Recientes estudios han demostrado el rol de eIF4E en la traducción de mRNAs asociados en la transición epitelio mesénquima, como por ejemplo YB-1 (*Y-box protein 1*), vimentina, MTA1 (*metástasis associated 1*) y CD44 (Hsieh, Liu et al. 2012). Por otro lado se ha visto que al inhibir eIF4E en la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231, se inhibe el crecimiento y la migración celular (Zhou, Yan et al. 2010). Por lo tanto, la función de eIF4E contribuye a la progresión de la metástasis por el aumento de la traducción de ciertas proteínas implicadas en el proceso de malignidad.

Por otro lado, se ha visto que la fosforilación de eIF4E está implicada en este proceso de invasión y migración celular; estudios realizados al bloquear la función de las Mnks, y por lo tanto la fosforilación de eIF4E, en líneas celulares de cáncer de mama, han demostrado que se reduce la migración e invasión celular (Ramalingam, Gediya et al. 2014). Recientemente, mediante la utilización de ratones eIF4E-KI S209A, se observó que la invasión del tumor mamario desarrollado era menor; se observó un incremento temprano de la fosforilación de eIF4E en la progresión de la metástasis en ratones WT, indicando la importancia de la fosforilación de eIF4E en el proceso de invasión (Robichaud, Del Rincon et al. 2014). *In vitro* Robichaud et al. observaron al utilizar las MEF KI S209A disminuían la capacidad invasiva y migratoria de las células en comparación con las MEF WT; observaron que eIF4E era fosforilado durante la transición epitelio mesénquima inducida por TGF- $\beta$ , a la vez que se producía un aumento de marcadores mesenquimales como la N-cadherina y la fibronectina y, una disminución de marcadores epiteliales como la E-cadherina. Observaron que TGF- $\beta$  inducía la fosforilación de eIF4E al activar las dos vías implicadas en la activación de las Mnks, p38 y ERK1/2, en células mesenquiales hipertróficas. Por otro lado observaron que la fosforilación de eIF4E es requerida para que se dé el proceso de EMT, mediante la utilización del inhibidor de las Mnks CGP 57380, el cual inhibe la fosforilación de eIF4E, observaron que se inhibía el incremento del marcador mesenquimal vimentina, y se observó un incremento de mRNAs que promueven EMT, como MMP3.

## 1.5 4E-T

4E-T, *eIF4E-transporter*, es una proteína de unión a eIF4E y se encarga de su transporte de citoplasma a núcleo. Fue caracterizada primeramente como una proteína núcleo-citoplasmática con una secuencia YX<sub>4</sub>Lφ que media la unión a eIF4E y su importación a núcleo vía Crm1 (miembro de la superfamilia de importinas de receptores de transporte nuclear). 4E-T es la proteína de unión a eIF4E menos expresada.

La secuencia de 4E-T está altamente conservada en vertebrados. Es una fosfoproteína. Su localización puede ser tanto nuclear como citoplasmática, formando parte de los PBs, unos cuerpos citoplasmáticos encargados del almacenamiento y degradación de ciertos mRNAs. Contiene un lugar de unión a eIF4E entre los residuos 30-36, así como una señal de localización nuclear, NLS, (residuos 195-211) y dos señales de exportación nuclear, NES, (residuos 438-447 y 613-638) (Figura 9). Actualmente su función no está muy clara (Kamenska, Lu et al. 2014). Se ha visto que inhibe la traducción cap-dependiente y regula la estabilidad de mRNA con elementos ARE (Dostie, Ferraiuolo et al. 2000).

### 1.5.1 Regulación 4E-T

Poco es conocido de la regulación de 4E-T. Se ha visto que 4E-T puede ser fosforilado en varios residuos pero el significado biológico de esta fosforilación no es conocido hasta el momento. Jnk interacciona con 4E-T y lo fosforila en respuesta a estrés oxidativo. Esta fosforilación permite la formación y localización de 4E-T en PBs.

Mediante espectrometría de masas realizaron un estudio de los puntos de fosforilación de 4E-T, encontraron 34 puntos de fosforilación, observaron que comparando la activación e inactivación de JNK, tan solo 6 puntos de fosforilación mostraban diferencias entre las dos condiciones, indicando que estos eran regulados vía JNK. Estos residuos son los siguientes: Ser301, Ser374, Ser513, Ser587, Ser693 y Ser752, localizados en la parte central de la proteína (Figura 9)(Cargnello, Tcherkezian et al. 2012).

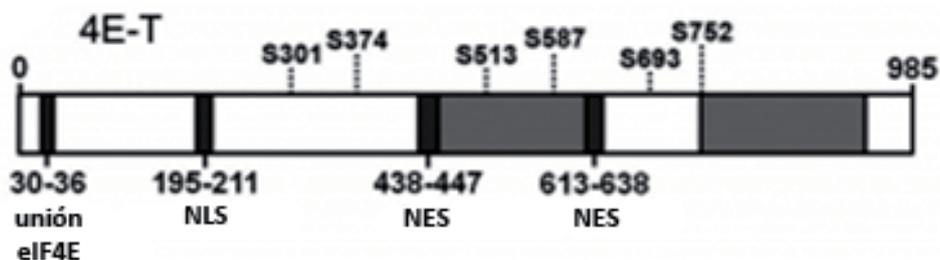


Figura 9: Representación esquemática de los seis lugares de fosforilación de 4E-T por JNK. NES: señal de exportación nuclear; NLS: señal de localización nuclear (Cargnello, Tcherkezian et al. 2012).

### 1.5.2 Función 4E-T

Una de sus principales funciones es la importación de eIF4E al núcleo.

El transporte núcleo-citoplasmático de macromoléculas ocurre mediante “*nuclear pore complex*” (NPC) y es usualmente dependiente de energía. Se han descrito varios tipos de señales de localización nuclear (NLSs) y de exportación nuclear (NESs). Las señales básicas de importación son reconocidas por la importina  $\alpha$ , una proteína adaptadora que está asociada con la proteína receptora, la importina  $\beta$ . El complejo importina  $\alpha\beta$  permite la entrada a núcleo.

La importación de eIF4E a núcleo ocurre mediante esta vía de la importina  $\alpha\beta$  requiriendo la proteína núcleo citoplasmática eIF4E-Transporter (4E-T). 4E-T interacciona el dominio conservado de eIF4E Tyr-X-X-X-X-Leu, esta unión permite la importación de eIF4E al núcleo mediante la vía importina  $\alpha\beta$ ; una vez en el núcleo, eIF4E y 4E-T se disocian de la importina  $\alpha$  debido a la interacción de Ran-GTP con importina $\beta$ . Este proceso probablemente ocurre rápidamente tras la entrada a núcleo, ya que 4E-T reside la mayor parte del tiempo en el citoplasma. La disociación de 4E-T y eIF4E no es conocida, la afinidad entre dichas proteínas puede disminuir al no estar unidas al complejo de importación y/o debido a una disminución de afinidad por interacción con proteínas nucleares. Una vez disociada dicha unión, 4E-T vuelve a citoplasma mediante la vía CRM1/exportin 1 (Figura 10) (Dostie, Ferraiuolo et al. 2000; Ferraiuolo, Basak et al. 2005).

Su función nuclear no está muy clara, recientes estudios se han centrado en su función citoplasmática con el descubrimiento de 4E-T en los *Processing bodies (PBs)*. 4E-T mayoritariamente se localiza en el citoplasma y se concentra en los descritos PBs, unos cuerpos citoplasmáticos que contienen mRNAs, micro RNAs, proteínas de unión a RNAs, represores de la traducción y enzimas de degradación de RNAs. Los PBs están envueltos es la represión de la traducción, la cual puede se reversible, y están encargados de la degradación de ciertos mRNAs. eIF4E es el único factor de inicio de la traducción que se ha visto en PBs, y 4E-T la única proteína de unión de eIF4E. 4E-T es requerido para la formación de los PBs y para la localización de eIF4E en PBs (Kamenska, Lu et al. 2014).

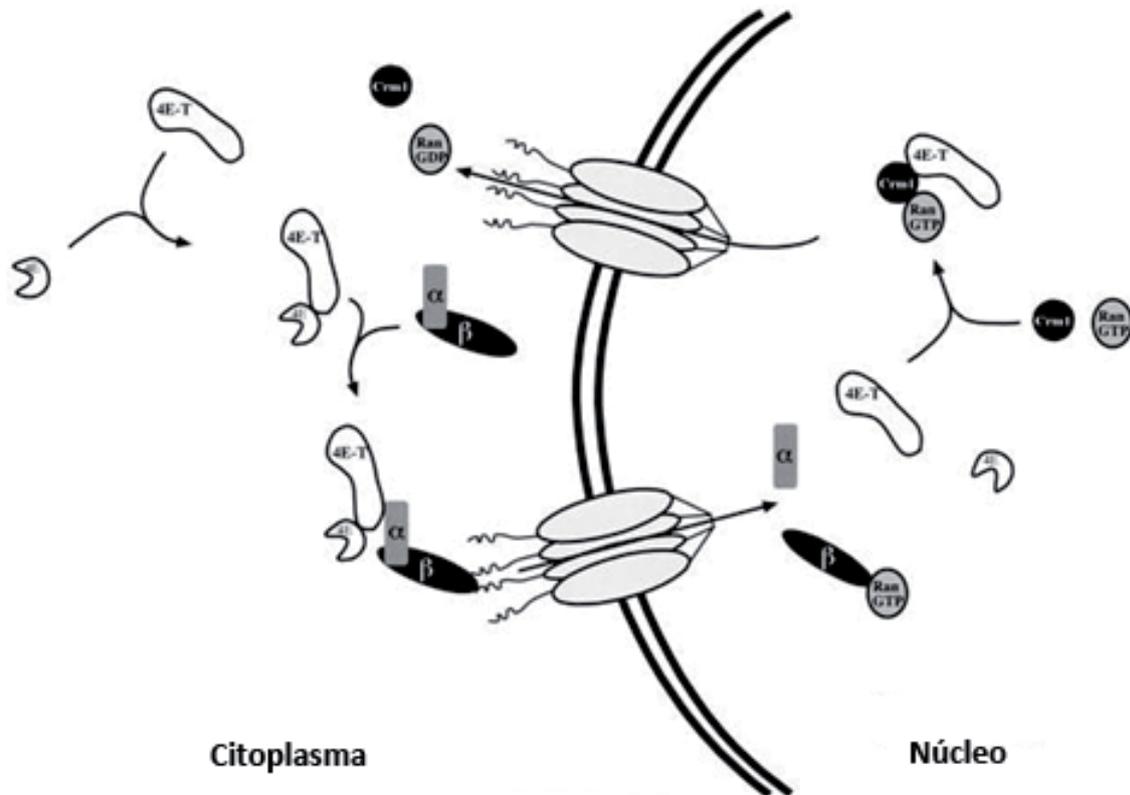
Se cree que inhibe la traducción y disminuye la estabilidad de ciertos mRNA al colocalizar con *decapping factors* en estos cuerpos citoplasmáticos (Dostie, Ferraiuolo et al. 2000). Parecido a otros inhibidores de la traducción cap dependiente, 4E-T inhibe la traducción al competir con eIF4G para la unión con eIF4E, evitando así la formación del complejo eIF4F. Al interaccionar 4E-T con eIF4E en el mismo dominio que eIF4G, este compite y lleva el eIF4E unido al mRNA hacia PBs, inhibiéndose la traducción.

La localización de eIF4E en PBs requiere la unión con 4E-T, en cambio 4E-T puede encontrarse en PBs sin necesidad de estar unido a eIF4E. Al inhibir la expresión de 4E-T se observa una reducción de la actividad *decapping* en PBs, resultado de una disminución de Dcp1a y p54 en los PBs. Teniendo en cuenta estos datos, la interacción de 4E-T con eIF4E actúa como un primer evento que conduce al remodelamiento de mRNPs y a la degradación de ciertos mRNAs.

En conclusión, la interacción de 4E-T con eIF4E tiene dos consecuencias: la importación de eIF4E al núcleo y la focalización de eIF4E a cuerpos citoplasmáticos donde se produce, supuestamente, degradación de mRNAs (Ferraiuolo, Basak et al. 2005).

También se ha estudiado su papel en oocitos de *Xenopus*, donde es un componentes de CPEB RNP (complejo ribonucleoproteico represor), junto con CPEB regula la traducción de mRNAs maternos con el 3' UTR poliadenilados; CPEB tiene dos funciones en *Xenopus*, por un lado reprime la traducción cap-dependiente en el oocito y activa la traducción de mRNAs

poliadenilados en huevos en fase de maduración meiótica y en embriones tempranos (Minshall, Reiter et al. 2007).



**Figura 10: 4E-T media la importación de eIF4E a núcleo.** 4E-T media la importación a núcleo de eIF4E mediante su unión a la importina  $\alpha\beta$ , una vez en núcleo 4E-T y p-eIF4E se disocian del complejo importina  $\alpha\beta$  por la acción de Ran-GTP. Una vez en núcleo 4E-T es exportado a citoplasma mediante la vía CRM1/exportin 1 (Dostie, Ferraiuolo et al. 2000).

## 1.6 Estrés celular

Los organismos a todo nivel tienen un innato sentido de supervivencia cuando se enfrentan a situaciones peligrosas. A nivel celular la habilidad de responder a un estímulo de estrés es crucial. Para sobrevivir las células realizan las modificaciones necesarias para poderse adaptar a la nueva situación y evitar la muerte celular. Un estímulo se considera estresante para una célula cuando se desafía su medio de vida y se ve amenazada su supervivencia. Hay dos tipos diferentes de estrés: un estímulo externo, como pueden ser drogas o influencias ambientales, o estímulos internos, como errores en el funcionamiento celular.

Hay cuatro respuestas celulares que se pueden dar de forma secuencial o simultáneamente en respuesta a un estrés:

- Se detienen diferentes actividades celulares como la transcripción o la traducción, así como el tráfico intracelular.
- Almacenamiento de mRNAs o proteínas que puedan ser necesarias tras pasar el estrés, esto requiere la formación de nuevas estructuras como por ejemplo los gránulos de estrés (GS) o los *processing bodies* (PBs).

- Degradación de componentes que pueden no ser necesarios para sobrevivir tras el estrés o se pueden sintetizar rápidamente.
- Producción de proteínas que sean necesarias para la respuesta al estrés (von Roretz, Di Marco et al. 2011).

La regulación postranscripcional de la expresión de diferentes genes es una de los mayores mecanismos que puede ayudar a las células a hacer frente a varios tipos de estrés. Recientes estudios han demostrado la importancia de la regulación de los niveles de ciertos mRNAs durante la respuesta a estrés. Se ha visto que los mRNAs localizados en el núcleo al producirse una situación de estrés, se retienen dentro de este; en cambio mRNAs citoplasmáticos con la cola poly(A) van directamente a los GS (gránulos de estrés). Se ha visto que mRNAs inactivos que se liberan de los polisomas, pueden ser guardados en estructuras dinámicas y transitorias, gránulos de estrés (GS) o *processing bodies* (PBs). Tanto los GS como los PBs se han encontrado en células en condiciones normales, pero su formación puede ser modulada por diferentes tipos de estrés, como por ejemplo por infecciones virales, irradiación ultravioleta, hipoxia, choque térmico, especies reactivas de oxígeno (ROS). El estrés oxidativo, por ejemplo, producido por el tratamiento con arsénico, incrementa el número y tamaño de los PBs en las células (Parker and Sheth 2007).

Los PBs, por lo general se consideran gránulos de degradación de mRNAs en situaciones normales, pero se ha visto que bajo situaciones de estrés crecen en tamaño y número, y se ha visto que se pueden asociar junto con los GS en respuesta a ciertos estímulos, no quedando muy clara si su actividad en situaciones de estrés es la de degradar ciertos mRNAs o almacenarlos para una posterior traducción (Anderson and Kedersha 2008). Esta relación entre GS y PBs es debida a ciertas proteínas que comparten en común, como por ejemplo eIF4E entre otras. La interacción y la probabilidad de cambio del mRNA entre los PBs y GS sugiere diferentes estados de mRNP entre polisomas, PBs y GS, reflejando el hecho que la composición de proteínas vaya variando de un estado a otro (Figura 11) (Buchan and Parker 2009).

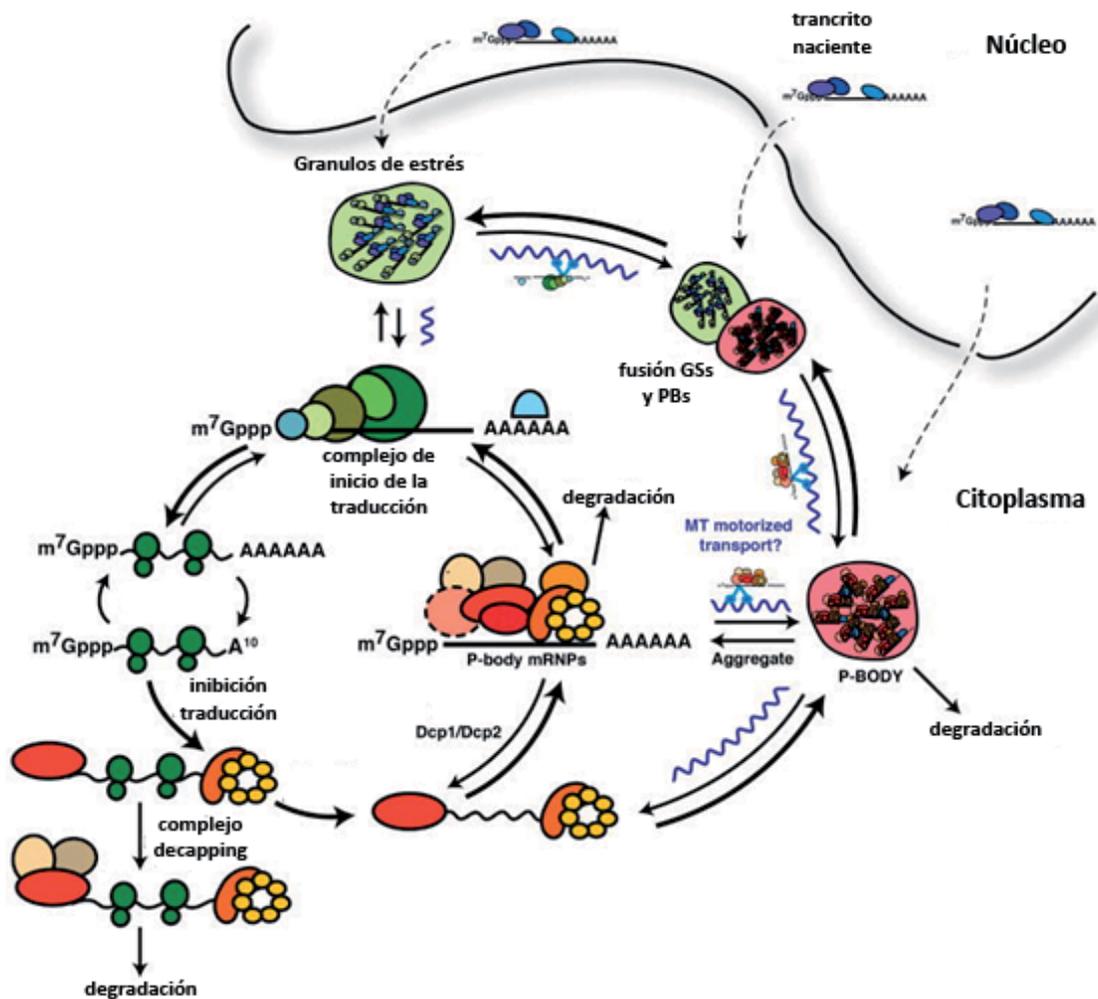
Durante décadas se han centrado en el estudio del rol de los mRNAs que contienen elementos ARE (ricos en AU). Los mRNAs que contienen estos elementos, en su región 3'UTR, es conocido que son particularmente frágiles en condiciones normales, y suelen ser degradados (*ARE-mediated decay*, AMD). En respuesta a señales de estrés, algunos mRNAs con secuencias ARE son estabilizados y posteriormente traducidos; por lo tanto los mRNAs con elementos ARE juegan un papel importante durante la respuesta a estrés celular (von Roretz, Di Marco et al. 2011).

### **1.6.1 Gránulos de estrés (GS)**

Los gránulos de estrés son estructuras de fase densa que se forman en las células eucariotas cuando se produce una disminución de los ratios de traducción durante una respuesta a estrés. Un gran número de proteínas y mRNAs forman parte de los GS. El núcleo de los GS está compuesto por el complejo de preiniciación 48 S silenciado, el cual incluye la subunidad pequeña ribosomal y los factores de inicio de la traducción eIF4E, eIF2, eIF4A, eIF4G, PABP, eIF3 y eIF2 (Kedersha and Anderson 2002). También incluyen proteínas de unión a RNA que regulan la traducción (TIA, TTP, PABP, HuR, FXR1, CPEB) y degradación de

ciertos mRNA, así como proteínas envueltas en ciertos aspectos del metabolismo de mRNAs (G3BP, p54/rck, SMN) (Figura 12). La sobreexpresión de alguna de estas proteínas, como por ejemplo G3BP, TIA-1 o TTP es suficiente para la formación de los GS en ausencia de estrés (Kedersha, Gupta et al. 1999; Buchan and Parker 2009).

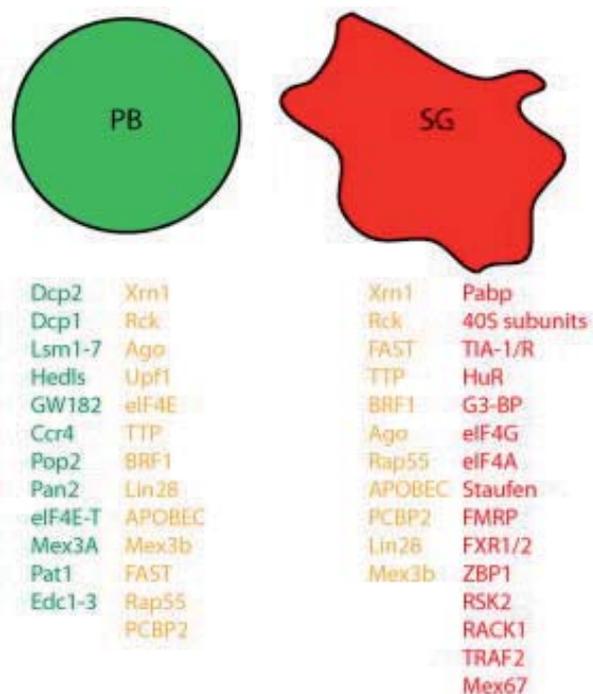
La formación de los GS es normalmente iniciada por la fosforilación del factor de iniciación eIF2 $\alpha$ , un componente del complejo ternario eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup> (Kedersha, Gupta et al. 1999). Diferentes tipos de estrés activan diferentes quinasas de eIF2 $\alpha$  (PKR, PERK, HRI y CGN2) que inician la formación de los GS. La fosforilación de eIF2 $\alpha$  reduce la disponibilidad del complejo ternario eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup> previniendo la formación del complejo de preiniciación 48 S, esto provoca que no se pueda dar el inicio de la traducción y se permita la formación de los GS (Kedersha and Anderson 2002). Cuando el estrés desaparece los GS se desmontan.



**Figura 11: Modelo hipotético entre la relación de GS y PBs.** Las flechas discontinuas indican un posible destino de los transcritos nacientes exportados desde el núcleo al citoplasma en una situación de estrés. Las líneas onduladas representan los microtúbulos y su posible contribución en el movimiento de los gránulos permitiendo que puedan agregarse y/o el movimiento de las mRNPs que forman parte de estos y pueden encontrarse en diferentes estados (Buchan and Parker 2009).

## 1.6.2 Processing bodies (PBs)

Los PBs son cuerpos dinámicos envueltos en diferentes vías de degradación de mRNAs. Contienen diferentes componentes de la maquinaria de degradación de 5' a 3' (Xrn1, DCP1/DCP2, Hedls/Ge-1, LSM1; proteínas de la vía de degradación NMD (*nonsense-mediated decay*), degradación de mRNAs que contienen codones prematuros de terminación (GW182, microRNAs, Ago2; y activadores de las vías de degradación (4E-T, p54/RCK, CBEP) entre otras. 4E-T es exclusiva de PBs (Figura 12) (Buchan and Parker 2009).



**Figura 12: Componentes de los PBs y GS.** En amarillo están señalados los componentes que comparten ambos tipos de gránulos (adaptado de Buchan and Parker 2009).

En condiciones normales los mRNAs pueden ser reclutados en los PBs donde serán destinados a degradación o a un silenciamiento de su traducción. Poco se conoce de los estímulos necesarios y del mecanismo que afectan a la formación de los PBs. Se conoce que el tratamiento con arsénico incrementa la formación de PBs, pero otros tipos de estrés que incrementan la formación de GS, como choque térmico, la falta de nutrientes como glucosa no inducen la formación de PBs. Se sugiere que la quinasa Jnk puede participar en la formación de los PBs, se ha visto que fosforila Dcp1, un componente de PBs, así como 4E-T. El estrés oxidativo activa Jnk la cual media la fosforilación de 4E-T; al ser fosforilado 4E-T incrementa su acumulación en los PBs permitiendo el crecimiento en tamaño de estos (Figura 13). Se cree que los PBs se forman por la agregación de las diferentes ribonucleoproteínas que forman parte del complejo, siendo esta agregación de forma móvil y por etapas, dando diferentes estadios de maduración a los PBs (Kulkarni, Ozgur et al. 2010).

A parte del rol de los PBs en la degradación de mRNAs, también se ha sugerido una función de almacenamiento de mRNAs, recientes estudios indican que puede haber una correlación entre los PBs (degradación mRNAs) y los gránulos de estrés (almacenan mRNAs para su posterior

traducción) (Sheth and Parker 2003; Collier and Parker 2004). Es posible que bajo ciertas condiciones, la presencia de eIF4E en los PBs pueda permitir la transición de un estado de represión/almacenamiento de mRNAs a un estado de traducción (von Roretz, Di Marco et al. 2011).

#### **1.6.2.1 HUR (ELAV like RNA binding protein 1)**

HuR forma parte de la familia de proteínas ELAV/Hu que poseen un motivo de reconocimiento de RNA, mediante el que se unen con elevada afinidad y especificidad a mRNAs con secuencias ricas en AU o U, modificando su expresión al alterar su estabilidad, traducción o ambas; la estabilización de mRNAs por HuR puede estar unida a un incremento de los niveles citoplasmáticos de proteína. HuR se expresa de forma más predominante en el núcleo (>90 %), pero puede translocarse al citoplasma (Lopez de Silanes, Zhan et al. 2004).

Los mRNAs con secuencias ricas en AU (elementos ARE) en su región 3' UTR, pueden ser divididos en tres categorías diferentes. La clase I y la clase II contienen copias del motivo pentamérico AUUUA; la clase I contiene de una a tres copias, como por ejemplo c-fos; la clase II puede contener múltiples pentámeros, como por ejemplo TNF- $\alpha$  y COX-2; por último, la clase III, como por ejemplo c-Jun, no contiene el pentámero AUUUA pero contiene regiones ricas en U (Shaw and Kamen 1986).

Se ha visto que incrementa la división celular al aumentar la estabilidad de mRNAs implicados en el control del ciclo celular y asociados a la proliferación, como por ejemplo la Ciclina A, Ciclina B1 y c-fos (Wang, Caldwell et al. 2000) y se ha visto también relacionada con la carcinogénesis, debido a su capacidad de regular la expresión de proteínas como VEGF, TNF $\alpha$ ,  $\beta$ -catenina, c-myc y ciclooxigenasa-1 (Nabors, Gillespie et al. 2001; Nabors, Suswam et al. 2003). También está implicada en la regulación de la diferenciación de las células musculares, en la senescencia replicativa y en la activación de las células inmunitarias. A parte de estas funciones se ha visto su habilidad para aumentar la estabilidad de ciertos mRNAs y su traducción en respuesta a varios tipos de estrés, como por ejemplo choque térmico, hipoxia, estrés oxidativo y UV (Gallouzi, Brennan et al. 2000; Mazan-Mamczarz, Galban et al. 2003).

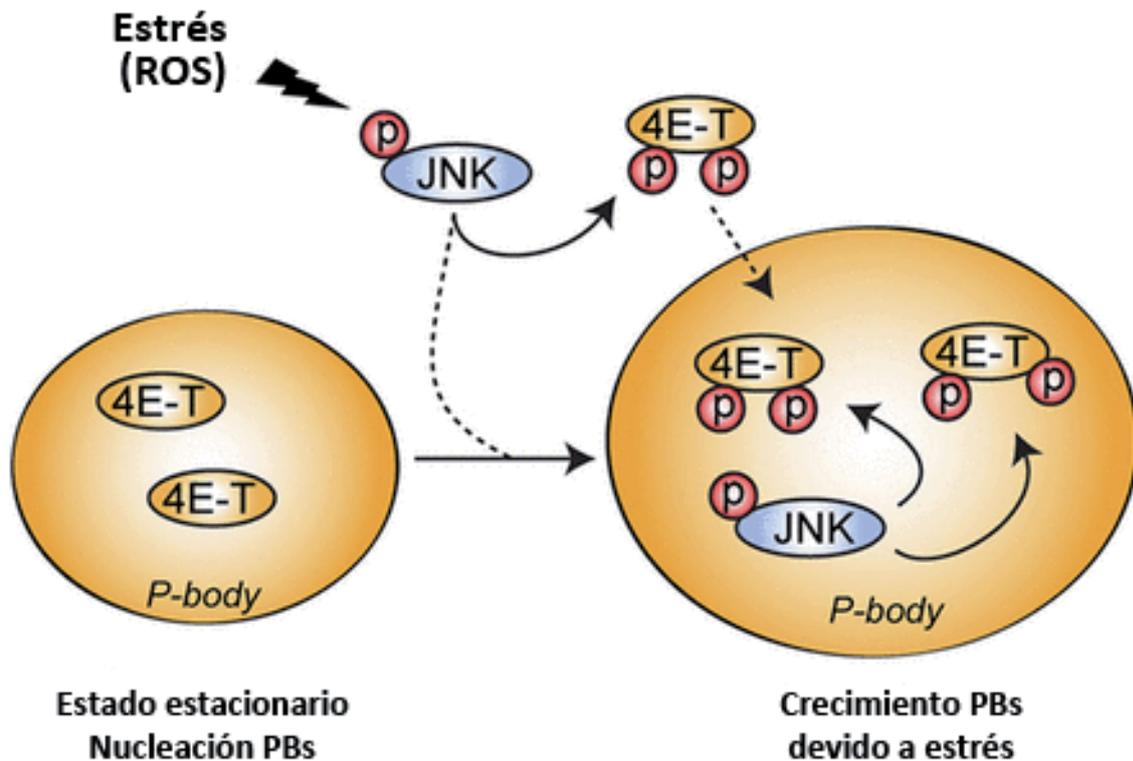
HuR ha sido principalmente descrita como componente de los GS, pero se ha visto que también puede formar parte de los PBs.

#### **1.6.2.2 Ago2**

Ago2 forma parte de la familia de proteínas *Argonaute*, las cuales están relacionadas con el silenciamiento de ciertos RNAs. En humanos la familia Argonaute puede ser dividida en dos categorías, la subfamilia Ago y la Piwi. La subfamilia Ago está formada por 4 proteínas diferentes, denominadas de 1 a 4. Ago2 es uno de los componentes principales del complejo silenciador inducido por el RNA (RISC, *RNA-induced silencing complex*). También parece estar envuelta en distintas etapas de la maduración de RNAs pequeños. Necesita interactuar con diversas proteínas y complejos para realizar su función. Recientes estudios han visto que muchas de estas proteínas están envueltas en diferentes etapas del procesamiento de RNAs,

maduración, transporte y regulación de la estabilidad y traducción de ciertos mRNAs (Hock, Weinmann et al. 2007).

Su localización puede ser tanto citoplasmática como nuclear. Se conoce que se asocia tanto con los GS como los PBs. No se conoce muy bien qué papel juega en estos gránulos, su relocalización en PBs parece que está altamente regulada por diferentes vías de señalización y parece ser que juega un papel de mediar la regulación de ciertos RNAs; por otro lado su papel en GS está menos entendido, se ha visto que su acumulación en estos gránulos puede ser debida a estrés oxidativo o traduccional (Detzer, Engel et al. 2011).



**Figura 13: Esquema representativo del role de la fosforilación de 4E-T en PBs.** Tras el estrés oxidativo se activa JNK, la cual media la fosforilación de 4E-T y incrementa su acumulación en PBs y el crecimiento de estos. JNK puede regular la formación de PBs mediante la fosforilación de 4E-T (Cargnello, Tcherkezian et al. 2012).

### 1.6.3 eIF4E en estrés

Como hemos comentado anteriormente eIF4E forma parte tanto de los GS como de los PBs. El papel de eIF4E en estos cuerpos es poco conocido. En GS, donde se almacenan mRNAs para una posterior traducción, eIF4E se encuentra unido a ciertos mRNAs junto a otros factores de inicio de la traducción, pudiéndose activar el inicio de la traducción una vez pasado el estrés. eIF4E juega un papel importante en la formación de los GS. La formación de los GS ocurre bajo condiciones donde la traducción cap-dependiente se encuentra inhibida, esto sugiere que la inhibición de esta es suficiente para promover la formación de los GS, pero algunos estudios han demostrado que solo la inhibición o inactivación de proteínas de unión a eIF4E, que por lo tanto inhiben la traducción cap-dependiente, no es suficiente para inducir la formación de GS (Mokas,

Mills et al. 2009); se ha visto que eIF4E es necesario para la formación de GS, así como su unión a eIF4G; estudios realizados por Marie-Josée Fournier et al. han demostrado que la inhibición mediante siRNA de eIF4E en la línea celular HeLa inhibe la formación de GS tras el tratamiento con arsénico; mTOR especialmente promueve la formación de GS por la interacción de eIF4E con eIF4G al fosforilar 4E-BP; la sobreexpresión de 4E-BP1 hipofosforilado suprime la formación de los GS (Mokas, Mills et al. 2009; Fournier, Coudert et al. 2013); en un estudio reciente se ha demostrado que el tratamiento de las células con selenito induce el secuestro de eIF4E por 4E-BP1 y promueve la formación de un tipo de GS diferentes a los comúnmente conocidos, los cuales los denominan como tipo 2 de GS, estos tienen un tamaño menor y no contienen eIF4E ni otros factores de inicio de la traducción (Fujimura, Sasaki et al. 2012). Esto nos indica que el papel de eIF4E en situaciones de estrés depende según el tipo de estrés promovido.

Los PBs son estructuras dinámicas que interactúan con GS en situaciones de estrés, pudiendo permitir que ciertos factores, como eIF4E se encuentren en los dos tipos de gránulos citoplasmáticos. Se conoce que 4E-T y otras proteínas que forman parte de los PBs, como la Dcp1a, reclutan eIF4E hacia estos cuerpos (Lee, Cho et al. 2008). El papel de eIF4E en PBs no es conocido, pero su presencia es un indicador que, además de participar en el inicio de la traducción, también juega un papel importante en la remodelación de mRNPs que dirigen a ciertos mRNAs a su degradación o almacenamiento en PBs, al estar eIF4E unido a la estructura 5' del mRNA evita su degradación 5'-3', por lo tanto los mRNAs en PBs serán almacenados en forma de mRNPs hasta una posterior remodelación. La presencia de mRNA poliadenilados en PBs y la falta de PABP también sugiere que ciertos mRNAs podrían ser almacenados de forma reversible (Andrei, Ingelfinger et al. 2005); a pesar de todo es necesario la realización de más estudios para conocer el papel exacto de eIF4E en los PBs.

En resumen eIF4E bajo ciertas situaciones de estrés es desplazado tanto a PBs como a GS pudiendo participar en el almacenamiento de ciertos mRNAs para su posterior traducción tras pasar la situación de estrés.

Por otro lado también juega un papel importante la fosforilación de eIF4E bajo situaciones de estrés. Como se ha comentado anteriormente Mnk es activada vía p38, la cual se activa en ciertas situaciones de estrés. El papel de la fosforilación en situaciones de estrés no está claro. Por un lado se ha visto que la fosforilación de eIF4E también se ve afectada en respuesta a ciertos estímulos de estrés; se ha visto un incremento en la fosforilación de eIF4E en respuesta a diferentes tipos de estrés, incluyendo la exposición a anisomicina, arsénico, TNF e interleukina, observándose una reducción del ratio de traducción proteica en estas situaciones (Morley and McKendrick 1997). Por el contrario, otros tipos de estrés como el choque térmico, sorbitol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o la infección con ciertos tipos de virus disminuyen la fosforilación de eIF4E (Raught and Gingras 1999). Los diferentes tipos de estrés activan la vía p38 y por lo tanto la activación de las Mnks, las cuales fosforilan eIF4E, se cree que el hecho que algunos tipos de estrés no incrementen la fosforilación de eIF4E es debido a que incrementan la unión de eIF4E con 4E-BP1 impidiendo, por lo tanto, que las Mnks puedan fosforilar eIF4E (Wang, Flynn et al. 1998). El papel del incremento o disminución de la fosforilación en respuesta a los diferentes estímulos de estrés no es conocido. Se ha visto que el incremento de la fosforilación de eIF4E producido por un estrés oxidativo no produce un incremento global de la síntesis proteica, si no un incremento selectivo de ciertos mRNAs implicados en la supervivencia celular (Rao 2000). Por otro lado mediante el tratamiento de estrés hipertónico de células de riñón, se observó una

rápida inhibición de la síntesis proteica y la disgregación de los polisomas, esto se correlaciona con una desfosforilación de eIF4E y 4E-BPs (Morley and Naegele 2002).

Es necesario un mayor estudio del papel de eIF4E y su fosforilación en diferentes situaciones de estrés, así como su función al formar parte de los gránulos citoplasmáticos GS y PBs.

### ***1.6.3.1 eIF4E y 4E-T en estrés***

Como hemos comentado anteriormente 4E-T forma parte de los PBs pero no se ha descrito en los GS. Poco es conocido del papel de 4E-T en situaciones de estrés, se ha visto que tras el tratamiento con arsénico incrementa su fosforilación vía la activación de la quinasa c-jun, esto implica una mayor formación y tamaño de PBs (Cargnello, Tcherkezian et al. 2012). 4E-T juega un papel importante en el proceso de formación de PBs, la inhibición de 4E-T inhibe la acumulación de proteínas que forman parte de estos cuerpos, como es el caso de eIF4E, LSM1, rck/p54 y Ccr4, esto sugiere que 4E-T es importante para la acumulación de mRNAs y factores de degradación en PBs (Andrei, Ingelfinger et al. 2005).

Se cree que bajo situaciones de estrés 4E-T secuestra eIF4E en los PBs inhibiendo así la traducción cap-dependiente, impide la interacción de eIF4E con eIF4G interrumpiendo la comunicación entre el extremo 5' del RNA y la cola polyA, de ese modo facilita la inactivación del complejo de la traducción (Cargnello, Tcherkezian et al. 2012).

Teniendo en cuenta que los PBs contienen proteínas de degradación de mRNAs y 4E-T es necesario para su formación, se podría pensar que 4E-T está implicado en la degradación de ciertos mRNAs, tal y como afirman ciertos autores (Ferraiuolo, Basak et al. 2005), por otro lado 4E-T es necesario para la acumulación de eIF4E en PBs, y eIF4E evita la degradación de mRNAs de 5' a 3' al proteger el extremo 5' del mRNA al unirse a él. El papel que juega la unión de estas dos proteínas bajo situaciones de estrés y su acumulación en PBs es controvertido y es necesario un mayor estudio.

---

# **HIPÓTESIS DEL TRABAJO**

---



## 2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

El control del proceso de la síntesis de proteínas es un proceso bioquímico complejo, que todavía no está definido en su totalidad. Se conocen unos factores que constituyen la denominada traducción canónica (*cap-dependent*) y también otras vías alternativas de la síntesis proteica, poco definidas, y agrupadas como *cap-independent* o no-canónicas.

El estudio y el conocimiento de los mecanismos y vías que regulan la síntesis de proteínas en situaciones es de gran interés en el cáncer. En muchos tumores se han encontrado elevados niveles de diversos factores implicados en el inicio o regulación de la síntesis proteica, tales como eIF4E, eIF4G, 4E-BP1, entre otros (Clemens 2004; Mamane, Petroulakis et al. 2004). En nuestro laboratorio se han estudiado durante los últimos 10 años la expresión de muchos de dichos factores asociados con la síntesis proteica y las vías que con más frecuencia están implicadas en la transmisión de señales celulares. En los trabajos previos se constató que altos niveles de 4E-BP1 fosforilados se asociaban a peor pronóstico clínico; dicho factor, cuando está fosforilado, no se une a eIF4E y, por tanto, favorece la traducción canónica de proteínas; se observó que la sobreexpresión de un mutante de 4E-BP1 que está permanentemente unido a eIF4E, y bloquea la traducción *cap-dependiente*, no produce la muerte celular ni una disminución en la proliferación de un elevado número de líneas celulares, las cuales sobreexpresaban altos niveles de eIF4E fosforilado (Castellvi, Garcia et al. 2006; Armengol, Rojo et al. 2007; Castellvi, Garcia et al. 2009; Pons, Peg et al. 2011).

Basado en los resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo, donde se correlacionó la expresión de algunos de dichos factores con pronóstico y supervivencia, y con objeto de profundizar en los mecanismos bioquímicos y moleculares que puedan estar asociados a pronóstico y respuesta al tratamiento, nos planteamos estudiar con más detalle la regulación bioquímica de eIF4E y su fosforilación; así como su relación en situaciones de estrés celular como falta de nutrientes, estrés oxidativo y resistencia a agentes que dañan el DNA. También realizamos el estudio de su proteína de unión 4E-T.

Postulamos que eIF4E fosforilado puede ser importante para que las células puedan sobrevivir en situaciones de alto stress celular y su interacción con 4E-T puede ser importante; por otro lado 4E-T por si solo o en combinación con eIF4E puede jugar un papel importante en la carcinogénesis; por lo tanto, eIF4E y 4E-T pueden ser una diana terapéutica.



---

# **OBJETIVOS**

---



# 3. OBJETIVOS

El objetivo central del trabajo es estudiar la relevancia de los niveles totales del factor de inicio de la traducción eIF4E y de su forma fosforilada en situaciones de estrés celular, así como el estudio de su proteína transportador 4E-T en líneas de cáncer de mama y en una serie clínica de tumores de mama.

## 1. Estudio del papel de la fosforilación del eIF4E *in vitro* en diferentes líneas celulares y tras diversas situaciones de estrés celular, mediante la sobreexpresión de diferentes mutantes del eIF4E (no fosforilado y fosfomimético), valorando:

- a. Estudio del papel de la sobreexpresión de los diferentes mutantes de eIF4E *in vitro*:
  - i. Efecto en la proliferación, viabilidad celular y sobre la capacidad formadora de colonias.
  - ii. Efecto en la resistencia a diferentes tipos de estrés celular, falta de nutrientes, estrés oxidativo y daño genómico tras la adición del agente quimioterápico cisplatino. Así como su efecto en la activación de la apoptosis
- b. Estudio del efecto de la inhibición de la fosforilación de eIF4E en situaciones de estrés celular:
  - i. Tras la adición del inhibidor de las quinasas Mnks CGP 57380.
  - ii. Tras el estudio de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) con ausencia de las quinasas Mnk1/2.
- c. Estudio de la interacción de diferentes proteínas de unión a eIF4E y su asociación diferencial a otras proteínas/complejos ribonucleoproteicos en función de la fosforilación.
- d. Estudio del efecto de la inhibición de la expresión de 4E-T y la resistencia al estrés celular inducida por peIF4E.

## 2. Estudio de la función del factor transportador 4E-T *in vitro* tras su sobreexpresión y/o downregulación en líneas celulares de mama:

- a. Estudio del efecto de la sobreexpresión de 4E-T, del mutante 4E-T Y30A (el cual no puede unirse a eIF4E) y de la inhibición de la expresión de 4E-T en la proliferación y viabilidad celular.
- b. Efecto de 4E-T y su asociación con factores relacionados con la transición epitelio-mesénquima y en la invasión y migración celular.

- c. Efecto de 4E-T en la invasión y migración celular tras inhibir la unión a eIF4E y la fosforilación de eIF4E.

**3. Estudio *in vivo* de la función de pelf4E en diferentes tumores de mama.**

- a. Estudio de la correlación de los niveles de pelf4E con las características histológicas de los tumores, tales como grado histológico, tipo histológico y con las características clínicas.
- b. Estudio de la correlación de pelf4E nuclear y citoplasmático con diferentes proteínas de señalización celular.

**4. Estudio *in vivo* de la función de 4E-T en diferentes tumores de mama.**

- a. Estudio de la correlación de 4E-T con características histológicas del tumor.
- b. Estudio de la correlación de 4E-T con su proteína de unión eIF4E y pelf4E.
- c. Estudio de la correlación de 4E-T con marcadores de transición epitelio-mesénquima.

---

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



# 4. MATERIALES Y METODOS

## 4.1. Cultivos celulares

Para la realización del estudio se escogieron líneas celulares con características fenotípicas diferentes, las líneas celulares utilizadas fueron:

- **MDA-MB-468:** Línea celular de carcinoma de mama (American Type Culture Collection ATCC, Manassas, VA; número HTB-132). Responden a quimioterapia, moderadamente invasora, tumorigénica.
- **MDA-MB-231:** Línea celular de carcinoma de mama (ATCC, número CRM-HTB-26). Respuesta a quimioterápicos intermedia, altamente invasora, tumorigénica.
- **HeLa:** Línea celular de carcinoma de cérvix uterino (ATCC, número CCL-2), tumorigénica.
- **HaCaT:** Línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados no tumorigénicos.
- **MEF:** Células primarias de fibroblastos murinos embrionarios. Cedida por el Dr. N. Sonenberg (McGill University, Montreal, Canadá).
- **MCF10A:** Línea celular epitelial de mama humana. Células no tumorigénicas (ATCC, número CRL-10317).
- **HEK 293T:** Línea celular de riñón embrionario con expresión del antígeno T del adenovirus SV40 (ATCC, número CRL-11238). Productora de lentivirus.
- **GP2:** Derivadas de la línea celular HEK 293T. Línea celular de riñón embrionario con expresión estable de los genes GAG y pol del virus de la leucémica murina Moloney (Clontech, Heidelberg, Alemania). Productora de retrovirus.
- **PHOENIX:** Línea celular derivada de las HEK 293T con expresión estable de los genes GAG y Pol y Env del virus de la leucemia murina de Moloney. Productora de retrovirus (ATCC, número CRL-3215).

Todas las líneas fueron cultivadas con medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium 4,5 g/l de glucosa; 30 mg/l L-Glutamina, Gibco, Barcelona, España) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (Labclinics, Barcelona, España), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin (Cambrex, Verviers, Bélgica); con excepción de la línea celular MCF10A, las cuales fueron cultivadas con medio DMEMF/12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 10 % L-Glutamina (Cambrex), 10 ng/ml de toxina colérica (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), 0.005 mg/ml de insulina (Sigma), 100 ng/ml hidrocortisona (Sigma) y 20 ng/ml de EGF (Sigma). El cultivo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar vertical (Bio II, Telstar, Life Science solutions), las células fueron crecidas en un incubador de aire al 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C (AutoFlow UN-5510 incubator, Nuair).

El mantenimiento de cada una de las líneas se realizó tres días a la semana, las células fueron tripsinizadas (Tripsina 0,25 % en PBS sin Calcio, magnesio y phenol red, Labclinics) y plantadas en una nueva placa de cultivo. Para la tripsinización de las células se aspiró el medio de la placa y se

realizó un lavado con PBS estéril para quitar los restos de suero (inhiben la tripsina); posteriormente se añadió 1 ml de tripsina en cada placa de cultivos de 10 cm de diámetro y se dejó durante tres minutos en el incubador a 37 °C para que la tripsina hiciese efecto y las células perdiesen su adherencia, para así poder pasarlas a una nueva placa de cultivo. Según la línea celular la dilución de siembra variaba.

Se realizaron stocks de las diferentes líneas celulares y fueron congelados en nitrógeno líquido. Para la realización del stock las células fueron tripsinizadas y diluidas con 9 ml del medio correspondiente en falcons de 15 ml. Posteriormente fueron centrifugadas durante 5 minutos a 500 g. Se aspiró el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 ml de suero con DMSO al 10 %. Los viales fueron congelados en un contenedor con 2-propanol a -80 °C durante tres días, posteriormente se pasaron al nitrógeno líquido.

Para descongelar las células, los viales fueron descongelados a 37 °C en el baño de cultivos. Los viales se pasaron a falcons de 15 ml con 9 ml de medio de cultivo, se centrifugaron durante 5 minutos a 500 g. El pellet se resuspendió con 10 ml de medio y se pasó a una placa de 100 cm. Se dejaron en el incubador para que las células se pegasen a la placa, y al cabo de un día se cambió el medio de cultivo.

Periódicamente se obtuvieron sobrenadantes de cultivos celulares para detectar la presencia de micoplasma utilizando el test EZ-PCR Mycoplasma Test Kit, (Biological Industries, Haemek, Israel). Se obtuvo de cada muestra a analizar un mililitro del sobrenadante, el medio ha de estar de dos a tres días en la placa. Este fue centrifugado durante un minuto a 250 g para descartar los restos celulares. El sobrenadante recuperado fue centrifugado durante 10 minutos a velocidad máxima. Se recupero el pellet, el cual fue resuspendido con 10 µl del buffer proporcionado por el kit. Se realizó un choque térmico de 95 °C durante 3 minutos.

Para cada muestra se realizó una mix con 7 µl de agua destilada y 2 µl de la mix de reacción proporcionada por el kit, en la mix se añadió 1 µl de la muestra a analizar; se añadió un control positivo proporcionado por el kit y como control negativo agua.

Con el termociclador se realizó la siguiente PCR:

94° - 30''	desnaturalización inicial
94° - 30''	} 35 ciclos
60° - 120''	
72° - 60''	
94° - 30''	
60° - 120''	
72° - 5'	} Ciclo final
4°	

El resultado de la PCR fue analizado mediante un gel de agarosa al 2 %.

## 4.2. Recuento de células

Para realizar el recuento de las diferentes líneas celulares para poder plantar el mismo número de células en cada uno de los experimentos, utilizamos el método de la cámara de

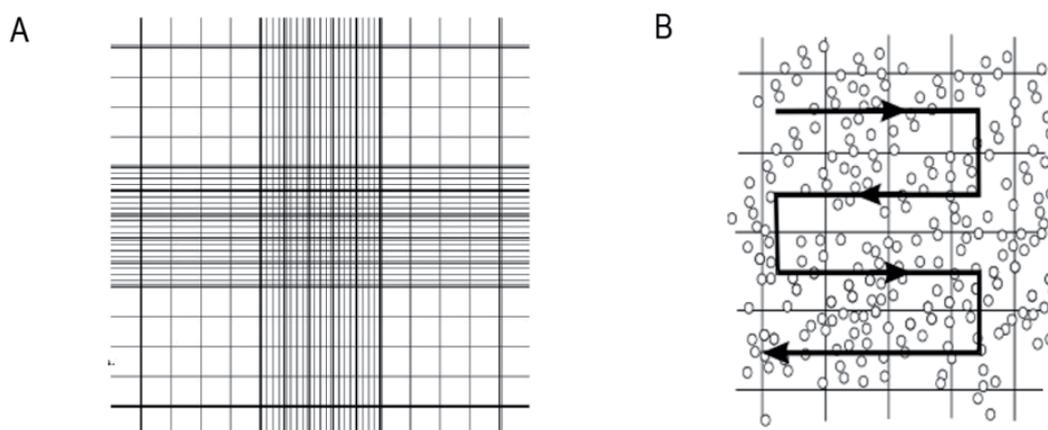
Neubauer, es un método utilizado para realizar el recuento en un medio líquido. Para ello se tripsinizaron las células y se diluyeron en 10 ml de medio; posteriormente fueron centrifugadas 5 minutos a 1200 rpf y el pellet fue resuspendido en 10 ml de medio. 10  $\mu$ l de la resuspensión fueron introducidos en la cámara de Neubauer (Figura 14A) cubierta con un cubreobjetos que se adhiere por tensión superficial. Por capilaridad el líquido entra entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos. El recuento se realizó mediante un microscopio de campo claro, para ello se contaron los 4 cuadrantes grandes de la cámara de Neubauer siguiendo el orden indicado en la figura 14B.

Contados los 4 cuadrantes se realizó el siguiente cálculo a partir del número de células obtenidas:

Concentración de células por mililitro = (Total células contadas \* 10000) / número de cuadrados

Dónde 10000 corresponde a la superficie recontada (1 mm \* 1 mm) \* la profundidad de la cámara de Neubauer (0.1 mm).

Una vez obtenido el número de células se realizó la dilución necesaria para plantar el número determinado de células de interés.



**Figura 14: Cámara de Neubauer.** A) Imagen de los cuadrantes de la cámara de Neubauer. B) Dirección de conteo de las células dentro de un cuadrante de la cámara de Neubauer (*Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting, Celeromics*).

### 4.3. Construcción de los plásmidos

Para inducir la sobreexpresión de los mutantes de eIF4E pLPCX-S209A, pLPCX-S209D, pLPCX-W73A, pLPCX-W73AS209D y del mutante de 4E-T pBABE-Y30A y su sobreexpresión WT, se utilizaron dos vectores retrovirales: pLPCX y pBABE.

Los mutantes de eIF4E fueron cedidos por el Dr. Nahum Sonenberg (McGill University, Montreal, Canadá) en el vector pCS3MT. Se introdujeron dentro del vector pLPCX (Figura 15). Para realizar este clonaje se realizó una digestión del vector pCS3MT-eIF4E mediante los enzimas HindII y EcoRI. Se añadieron 2  $\mu$ g de DNA del vector, 0,5  $\mu$ l de cada uno de los encimas, 2  $\mu$ l del buffer

correspondiente según la tabla proporcionada por promega (*Restriction Enzyme Activity in Promega 10X Buffers, Reaction Temperature and Heat Inactivation*), en nuestro caso el buffer E, con una actividad de digestión del 100 % para los dos enzimas, y por último 16 µl de H<sub>2</sub>O, para obtener un volumen final de 20 µl. La digestión se realizó durante 1 hora a 37 °C.

El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa, la banda de interés se cortó y fue purificado el DNA mediante el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* de promega siguiendo el siguiente protocolo:

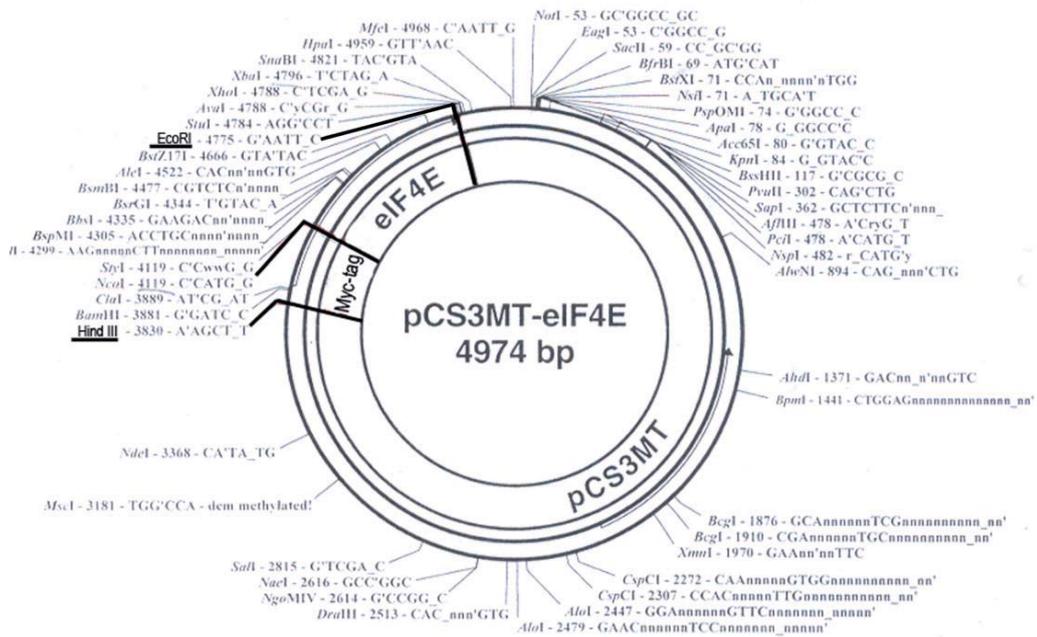
El fragmento de gel con el DNA de interés se introdujo en un eppendorf y se añadieron 10 µl de la solución de lavado de membrada proporcionada por el kit. Se vorteoó y se incubó a 50-65 °C hasta que el gel quedó completamente disuelto. Se transfirió la muestra a una mini columna proporcionada por el kit y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada 1 minuto a 16000 g, se descartó el fluido y se reinsertó la mini columna en un tubo colector nuevo. Se añadieron 700 µl de la solución de limpieza de membrana con etanol añadido. Se centrifugó 1 minuto a 16000 g, se descarto el fluido. Se repitió el mismo paso añadiendo 500 µl de la solución de limpieza. Para acabar de limpiar la columna y descartar cualquier resto de etanol, se volvió a centrifugar durante 1 minuto. Posteriormente se pasó a la recuperación del DNA pegado en la columna; esta se transfirió a un eppendorf de 1,5 y se añadieron 30 µl de agua libre de nucleasas. Se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 16000 g durante un minuto. Se descartó la mini columna y el DNA obtenido se cuantificó mediante el nanodrop (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, Thermo Scientific).

Con el DNA extraído se pasó a la realización de la ligación dentro del vector pLPCX, el cual previamente había sido digerido con HindII y EcoRI. Para introducir el DNA de interés en este vector, se realizó la siguiente mix: 20-100 ng del vector lineal de DNA, un ratio 1:1 a 5:1 del inserto de DNA respecto al vector, 2 µl del buffer 10X de la ligasa de DNA T4 (fermentas), 1 µl de la ligasa de DNA T4 (fermentas), y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 20 µl. La mix se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se comprobó que el producto de la digestión fuese correcto mediante un gel de agarosa.

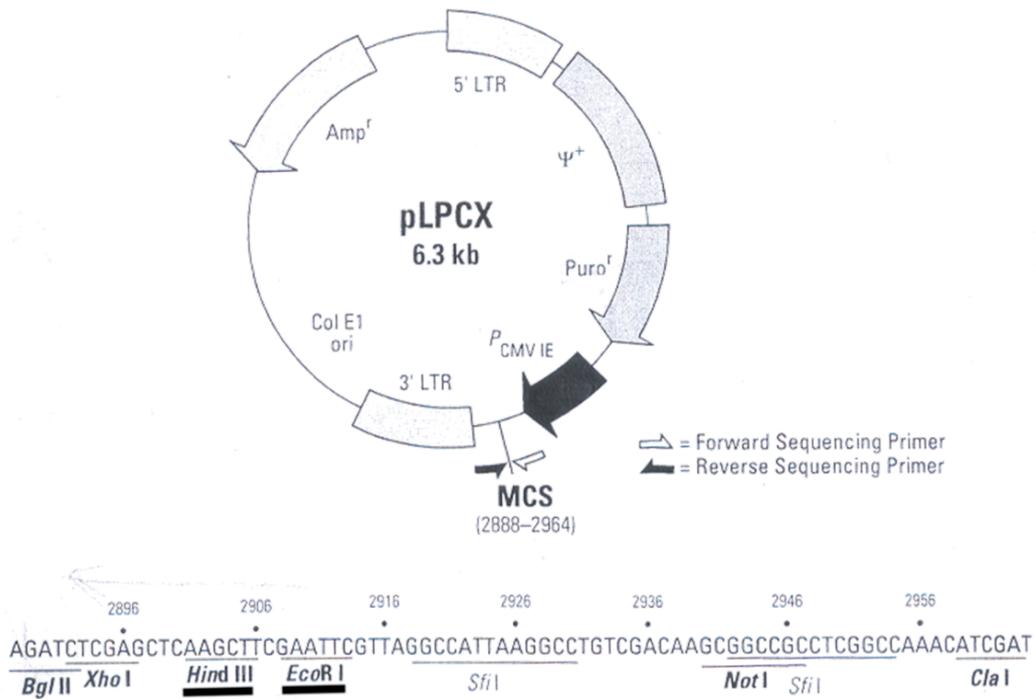
Los vectores con los diferentes mutantes de eIF4E están marcados con el epítipo Myc (EQKLISEEDL) en el extremo N-terminal; como control se utilizo la sobreexpresión de estos vectores marcados con GFP.

En el caso del mutante de 4E-T y su sobreexpresión, se introdujeron dentro del pBABE entre BamHI y EcoRI (Figura 16), estos vectores fueron cedidos por la Dr. Maritza Jaramillo del laboratorio del Dr. Nahum Sonenberg (McGill University, Montreal, Canadá). La construcción de los plásmidos se realizo según como describen Dostie et al. (Dostie, Ferraiuolo et al. 2000). Los dos plásmidos tenían selección con puromicina. Los vectores que contienen 4E-T están marcados con el péptido Flag (DYKDDDDK) en el extremo N-terminal.

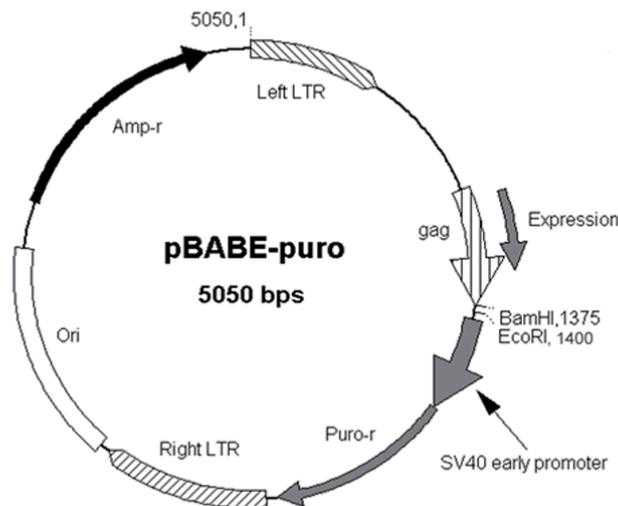
A



B



**Figura 15: Mapa de restricción vector pCS3MT y pLPCX.** A) Se extrajo eIF4E con el Myc-tag mediante la digestión HindIII y EcoRI. B) eIF4E-Myc-tag se clono dentro del vector retroviral pLPCX mediante la digestión HindIII y EcoRI.



**Figura 16: Mapa de restricción del vector pBABE para realizar la downregulación de 4E-T.** Se utilizaron dos short hairpin RNA contra 4E-T. Un short hairpin RNA (shRNA) es un plásmido que contiene una horquilla que expresa el siRNA (RNA interferente con una longitud de 20 a 25 nucleótidos altamente específico para la secuencia de nucleótidos diana), los shRNA son procesados por el encima Dicer para generar siRNAs funcionales contra el gen de interés. Los siRNAs, conocido también como RNA de silenciamiento, es un tipo de RNA interferente con una longitud de unos 20-25 nucleótidos, altamente específicos para una secuencia de RNA mensajero diana interfiriendo con ello la expresión del gen respectivo.

Para la introducción del shRNA utilizamos un plásmido lentiviral: pLKO.1 (Figura 17). La clonación de este vector fue realizado por la Dra. Maritza Jaramillo en el laboratorio del Dr. Nahum Sosenberg (McGill University, Montreal, Canadá).

#### 4.4. Transformación

Para la obtención de una concentración suficiente de los plásmidos para poder posteriormente transfectar o infectar las diferentes líneas celulares, se realizó una amplificación en el número de copias del plásmido utilizando las bacterias DH5 $\alpha$ , cepa de *E. coli* que se utiliza con mayor frecuencia para las aplicaciones de clonación de rutina. 1  $\mu$ l del plásmido de interés se mezclaron con 50  $\mu$ l de las bacterias. Se incubó durante 30 minutos en hielo, posteriormente se realizó un choque a 42  $^{\circ}$ C durante 1:15 minutos y posteriormente 5 minutos en hielo. Se le añadió 250  $\mu$ l de medio LB (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) y se dejó una hora a 37  $^{\circ}$ C en agitación.

Del cultivo obtenido se plantaron 20  $\mu$ l en placas de LB Agar con ampicilina (Applichem GmbH). Las placas se dejaron crecer toda la noche a 37  $^{\circ}$ C. Las colonias obtenidas al día siguiente contienen el vector de interés. El siguiente paso es la obtención del vector, separar el DNA plasmídico del DNA bacteriano y restos celulares, para ello realizamos el aislamiento del DNA.

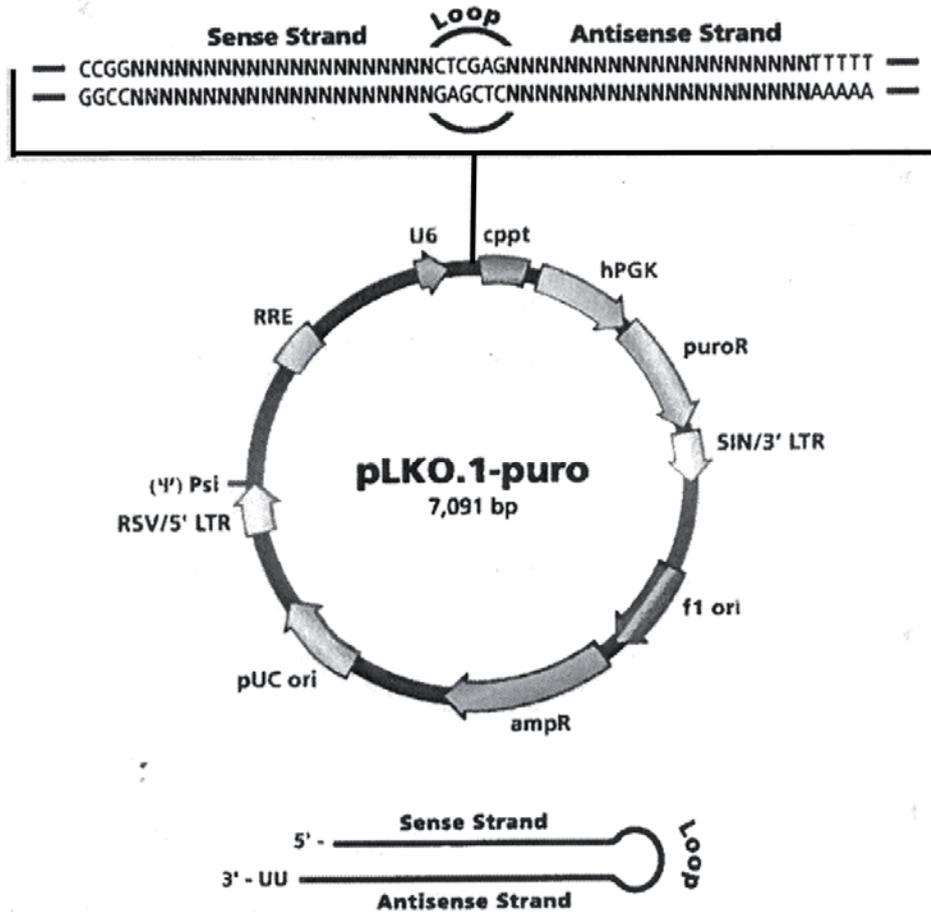


Figura 17: Mapa de restricción del vector sh4E-T-pLKO.1-puro.

#### 4.5. Aislamiento del DNA

Para extraer el DNA plasmídico se picó una de las colonias obtenidas de la transformación celular y se dejó crecer toda la noche en 3 ml de LB con ampicilina. Una vez realizado el cultivo se pasó a la purificación del DNA plasmídico mediante el kit de *minipreps Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo el protocolo siguiente:

A partir de 1 ml del cultivo crecido se realizó un centrifugado durante 5 minutos a 10000 g. Se resuspendió el pellet con 250 µl de la solución de resuspensión proporcionada por el kit. Se añadieron 250 µl de la solución de lisado celular y se invirtió 4 veces para mezclarlo bien, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 350 µl de la solución neutralizante, se invirtió 4 veces, se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se introdujo en una mini columna proporcionada por el kit y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para lavar la columna se añadieron 750 µl de solución de limpiado (con etanol añadido) y se centrifugó 1 minuto a máxima temperatura; se repitió el mismo paso pero añadiendo 250 µl de la solución de limpiado. Para acabar de descartar cualquier resto que no fuese DNA plasmídico se centrifugó 2 minutos a máxima velocidad. Para eludir el DNA se transfirió la columna a un eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 100 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y se centrifugó 1 minuto a

temperatura ambiente a máxima velocidad. Se descartó la columna y el DNA obtenido fue cuantificado mediante el nanodrop.

Para confirmar que el DNA obtenido fuese el de interés se realizó una digestión para linealizar el plásmido; mediante un gel de agarosa se comprobó que el plásmido linealizado tuviese las pares de bases correctas.

Tras comprobar que el DNA plasmídico obtenido de la miniprep era el de interés, se creció parte de la alícuota de la miniprep en 250 ml de medio LB con ampicilina, para así obtener más concentración de DNA, para extraerlo utilizamos el kit de maxipreps (Cultek) siguiendo el siguiente protocolo:

El cultivo fue centrifugado a 6000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con el buffer de lisado proporcionado por el kit. Posteriormente se separó el DNA bacteriano del DNA del vector mediante un segundo buffer realizando el mezclado por inversión y manteniendo de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Para acabar de separar los restos celulares y el DNA bacteriano se centrifugó durante 15 minutos a 4 °C a 12000 g. Para obtener el DNA del vector se pasó el lisado por una columna previamente activada, el DNA de interés se queda retenido en la membrana de la columna. Para eludir y obtener el DNA se añadió el buffer de elución proporcionado por el kit, obteniendo así el DNA plasmídico. Se precipitó el DNA añadiendo isopropanol y centrifugando a 15000 g durante 30 minutos a 4 °C, tras descartar el sobrenadante al pellet se le añadió etanol al 70 % para acabar de limpiar el DNA, se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Una vez secado el pellet se diluyó con agua y se pasó a la cuantificación de este.

## 4.6 Generación de retrovirus e infección

Para la generación de virus es necesario que las células productoras contengan el genoma vírico. Las líneas celulares productoras han de contener, o en su caso se ha de introducir los siguientes vectores: Gag, necesario para el procesamiento de proteínas de matriz y del núcleo del retrovirus; Pol, gen que incluye la transcriptasa reversa, Rnasa H y la integrasa; y Env, responsable de las glicoproteínas de la superficie viral y de proteínas transmembrana que median la unión de receptores celulares y la fusión de membranas.

Para la producción de retrovirus se utilizaron dos líneas celulares empaquetadoras indistintamente, GP2 y Phoenix. Son derivadas de la línea celular HEK-293T. La línea celular GP2 fue cotransfectada con el vector de expresión viral pVSV-G (Clontech), el cual contiene el gen que codifica para la proteína viral Env, y el vector de interés. En el caso de las Phoenix tan solo es necesario transfectarlas con el vector de interés. Tanto con las GP2 como con las Phoenix se plantaron  $1 \times 10^6$  células por placa de 60 mm, a las 24 horas utilizando el agente de transfección JetPei (Genycell Biotech, Granada, España) fueron transfectadas; siguiendo las instrucciones del fabricante se utilizaron 2,5 µg de cada vector en el caso de las GP2 y 5 µg del vector de interés en el caso de las Phoenix. Para la realización de la transfección se siguió el siguiente protocolo:

Mix 1: 5 µg de DNA + 250 µl NaCl 150mM

Mix 2: 250 µl NaCl 150mM + 10 µl Jet Pei

Tras vortear cada una de las mix se añadió la mix 2 sobre la mix 1, se vorteo y se dejo 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurridos los 15 minutos se cambio el medio de las células productoras y se añadió 5ml por p60 de medio nuevo, gota a gota se añadió la mix final.

A las 24 y 48 horas se recogió el sobrenadante que contenía los retrovirus y se filtró con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sarstedt, Numbrecht, Alemania), el cual permite que tan solo los virus contenidos en el medio puedan atravesar la membrana, quedando los restos celulares o células enteras adheridas al filtro. El sobrenadante se suplementó con 4  $\mu\text{g/ml}$  de polibreno (Sigma-Aldrich). Para realizar la infección se remplazó el medio de cultivo de las células diana por el sobrenadante + polibreno + retrovirus. Las células diana se plantaron el día anterior, según la línea celular el número de células a plantar es diferente:  $5.5 \times 10^5$  MDA-MB-468, HaCaT y MCF10A,  $4 \times 10^5$  MDA-MB-231 y HeLa. Tras 24 horas de infección el medio fue remplazado por medio normal y las células infectadas fueron seleccionadas durante 3 días con la dosis apropiada del antibiótico puromicina (Sigma- Aldrich) (Tabla 3). La dosis de selección de los diferentes modelos celulares se escogió tras la realización de curvas de resistencia a puromicina. Por western blot se comprobó la sobreexpresión de la proteína de interés o del mutante de estudio.

Línea celular	Puromicina ( $\mu\text{g/ml}$ )
MDA-MB-231	0,7
MDA-MB-468	0,7
HeLa	1
HaCaT	1,25
MCF10A	1,25

**Tabla 3. Dosis del antibiótico puromicina utilizadas para la selección de las líneas celulares infectadas.**

#### 4.7 Generación de lentivirus e infección

Para realizar la inhibición de 4E-T en las diferentes líneas celulares se utilizó la tecnología de short hairpin RNAs (shRNAs), introducción en las células de un plásmido que contiene una horquilla que exprese el shRNA de interés procesado por la enzima Dicer para generar siRNAs funcionales.

La generación de lentivirus se realizó a partir de la línea celular HEK 293T, línea celular específica derivada de células embrionarias de riñón humano inmortalizadas con el antígeno T del virus SV40. Son fáciles de transfectar y se utilizan como células productoras de lentivirus, no contienen ni el Gag, ni el Pol, ni el Env, por ello es necesario introducirlo junto al DNA de interés. Utilizando el mismo protocolo de transfección para retrovirus con JetPei, se transfectaron 2  $\mu\text{g}$  del vector de interés, 2  $\mu\text{g}$  del vector de expresión Gag-pol y 2  $\mu\text{g}$  del vector Env. Al día siguiente se realizó una dilución 1:4 del sobrenadante conteniente de los lentivirus con medio normal y se realizó la infección de las células diana siguiendo el mismo protocolo que para la infección retroviral. Las células fueron seleccionadas con la dosis correspondiente de puromicina. Por western blot se comprobó la inhibición de la proteína de interés.

## 4.8 Transfección con siRNAs

Se realizó la transfección con siRNAs para inhibir la expresión temporal de determinados genes.

Se realizó la transfección de la línea celular de interés con los siRNAs de HuR, Ago2 y 4E-T:

- Hs\_ELAVL1\_1 (HuR): AAGTAGCAGGACACAGCTTGG
- Hs\_ELAVL1\_11 (HuR): ACCAGTTTCAATGGTCATAAA
- Hs EIF2C2\_1 (Ago2): ATACGGGTCTGTGGTGATAAA
- Hs EIF4ENIF1\_5 (4E-T): GACCTTGAGTGCCGTAACCAA
- Hs EIF4ENIF1\_2 (4E-T): CCCGCCAAAGTTATCAGTGTA

Obtenidos de la casa comercial Quiagen®.

El siRNA utilizado como control fue *Negative Control siRNA* (1022076, Qiagen, Valencia, CA, USA). Se plantaron  $18 \times 10^4$  células diana (MDA-MB-231) en placas de 6 pocillos. A las 24 horas se transfectaron con 30 nM de cada siRNA con lipofectaina 2000 (Invitrogen). Para ello se realizó una mix: 500  $\mu$ l de optimem (Gibco, life technologies) + 2  $\mu$ l lipofectamina (Invitrogen). La mix fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadió 30 nM del siRNA de interés, se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Las células a transfectar fueron lavadas con optimem para quitar todos los restos de suero restantes del medio anterior. Para proceder a la transfección se añadió 500  $\mu$ l de la mezcla conteniente del siRNA a cada uno de los pocillos. Durante toda la noche se dejó a 37 °C, al día siguiente se cambio el medio a DMEM. El pico de transfección lo encontramos entre las 48 y 72 horas. Por western blot se analizó la inhibición de la proteína de interés.

## 4.9 Estrés celular

Para observar el efecto de la inhibición de la fosforilación de eIF4E se trataron las diferentes líneas celulares con el inhibidor de las Mnks, CGP 57380, (Tocris Bioscience, Ellisville, Mo), a una concentración de 40  $\mu$ M durante 18 horas. El efecto de la inhibición de la fosforilación de eIF4E fue comprobado por western blot.

Se realizaron diferentes tipos de estrés celular a las diferentes líneas estudiadas. Estrés oxidativo mediante arsénico a 250  $\mu$ M durante 90 minutos (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany); estrés citotóxico mediante cisplatino a 33  $\mu$ M en la líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468, HaCaT y HeLa y 10  $\mu$ M en la línea celular MEF durante 3 horas; y estrés debido a la falta de nutrientes, sin glucosa ni glutamina, durante 3 horas. Tras el tratamiento de estrés los medios fueron cambiados a medio normal para poder estudiar tanto la recuperación celular, mediante el ensayo de MTT, la expresión de diferentes proteínas mediante western blot o el efecto en la formación de colonias mediante el ensayo clonogénico.

#### 4.10 Ensayo clonogénico

Este ensayo se realizó para evaluar la capacidad de una célula para dividirse y formar una colonia tanto en condiciones normales como en situaciones de estrés.

Para realizar el ensayo clonogénico se plantaron diez mil células en placas de 100 mm y fueron cultivadas durante 12 días, cada tres días se realizaba un cambio de medio. Posteriormente fueron fijadas con 4 % de paraformaldeído (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Después de la fijación las células fueron lavadas con PBS y teñidas con 0,1 % de cristal violeta (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) durante 30 minutos, una vez teñidas fueron lavadas con agua y dejadas secar. Posteriormente se cuantificó la formación de colonias mediante la disolución del cristal violeta con 5 ml ácido acético al 5 %, 200  $\mu$ l de la disolución fueron tomados para medir la absorbancia a 590 nm usando el espectrofotómetro Synergy (Biotek).

#### 4.11 Ensayo de migración celular

Este ensayo se realizó para ver la capacidad migratoria de cada una de las líneas celulares.

Para el estudio de la migración se realizó el ensayo de la “herida” sobre una monocapa celular confluyente. En placas de 24 pocillos, por triplicado, se plantó un 100 % de confluencia; a las 24 horas se realizó una línea (herida) en cada pocillo con una punta de 0,5-10  $\mu$ l; se realizaron dos lavados con PBS para descartar los restos celulares generados; se reemplazó el medio con medio con mitomicina C (Santa cruz biotechnologies) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml durante 3 horas para inhibir la división celular. La mitomicina C es un *crosslinker* de DNA utilizado como quimioterapéutico, a dosis bajas en cultivos celulares se utiliza para inhibir la proliferación celular.

A las 0 y 24 horas se capturaron dos imágenes en cada una de las líneas; las imágenes en cada tiempo fueron capturadas en la misma zona, para ello se marco con bolígrafo una línea horizontal a la “herida” y se capturó la imagen siempre encima de la línea marcada. Se calculó el área de la herida mediante el programa ImageJ en cada uno de los tiempos y se realizó una media de las dos áreas calculadas. Para determinar el tanto por ciento de migración se consideró el área de cierre de la herida a las 24 horas con respecto al tiempo 0; el tiempo 0 corresponde a un 0 % de migración, el avance de las células en la herida (disminución del área) corresponderá al tanto por ciento de migración.

#### 4.12 Ensayo de invasión celular

Para el estudio de la invasión celular se realizó un ensayo con la cámara de Boyden recubierta con matrigel (Geltex, Invitrogen, USA) en una dilución 1:6 en medio sin suero. Las placas con el matrigel se dejaron toda la noche a 37 °C para permitir la solidificación de este. Se plantaron 50000 células en la parte superior la cámara de Boyden en medio sin suero, en un volumen final de 200  $\mu$ l. En la parte inferior se añadió 700  $\mu$ l se medio con suero. A las 24 horas

las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % durante 30 minutos tras un lavado con PBS. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS.

Para el conteo de las células se utilizó el siguiente método:

- Tinción Hoescht: Se añadió Hoescht diluido 1:200 en PBS, 600 µl en la parte inferior de la cámara de Boyden y 100 µl en la parte superior, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado con PBS. Se realizaron fotos en cuatro campos diferentes en el microscopio de fluorescencia, posteriormente se pasó al conteo del número de células mediante el programa ImageJ. Para evaluar el tanto por ciento de invasión se consideró la línea parental infectada con GFP como 100 % de invasión, a partir de aquí se evaluó el incremento o disminución de la invasión de cada uno de los mutantes o shRNA comparado con el control. Ejemplo:

Si con el mutante A contamos un total de X células en los 4 campos, el % de invasión corresponde a= n° células contadas \*100/ n° células contadas en la muestra control:

$$\% = \frac{(X * 100)}{C}$$

### 4.13 Ensayo MTT

Se utilizó el ensayo de MTT para determinar el efecto de las diferentes situaciones de estrés en los diferentes mutantes de estudio, así como para determinar la proliferación de cada uno de ellos en situaciones normales.

El ensayo MTT es un método colorimétrico que mide la actividad de los encimas que reducen el MTT (Sigma-aldrich, Taufkirchen, Germany), es decir, se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-25-ilo)-2,5-difeniltetrazol) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán, producto producido al reducirse las sales de tetrazolium), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para este ensayo se plantaron 5000 células de cada línea celular en placas de 96 pocillos. Tras los diferentes tratamientos se añadió MTT en cada pocillo a una concentración final de 0,5 mg/ml y fue incubado durante 4 horas a 37 °C. El medio fue extraído de cada pocillo y se añadió 200 µl de DMSO (Sigma-aldrich, Taufkirchen, Germany). Se midió la absorbancia a 590 nm usando el espectrofotómetro Synergy (Biotek). Las diferentes medidas fueron realizadas a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas después del tratamiento celular. Los resultados se representaron mediante gráficas indicando el tanto por ciento de proliferación celular, para ello el punto cero se consideró como 100 %, a partir de aquí cada una de las absorbancias se transformó a tanto por ciento con respecto a su control, observando una disminución de la proliferación o muerte celular en el caso de tratamientos de estrés y un incremento en los casos que las células no se veían afectadas por el estrés o crecían en condiciones normales.

#### 4.14 Detección de apoptosis

Para medir la apoptosis se utilizó el kit Caspasa-Glo<sup>®</sup> Assay (Promega Biotech Ibérica). Es un ensayo luminiscente que mide la actividad de las caspasas -3 y -7. Estas proteínas son miembros de la familia cisteín-aspartato-proteasas, caracterizada por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas, en el caso de las caspasas el corte se produce a nivel de un residuo aspartato. Las caspasas son mediadores esenciales de los procesos de apoptosis, muerte celular programada. Este ensayo proporciona un substrato luminógeno (contiene luciferasa) de las caspasas -3 y -7, el cual contiene la secuencia de tetrapeptidos Asp-Glu-Val-Asp. Añadiendo el reactivo proporcionado por el kit se produce un lisado de las células seguido del corte producido por las caspasas en el substrato del kit, esto produce una señal luminiscente. La luminiscencia es proporcional a la cantidad de actividad caspasa presente. Para realizar el ensayo se plantaron cinco mil células en 200 µl de medio en placas de 96 pocillos. Tras el tratamiento de estrés correspondiente 100 µl del reactivo Caspase-Glo<sup>®</sup> se añadió en cada pocillo; las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente la luminiscencia fue medida con el lector Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate.

#### 4.15 Extracción de proteínas

Las células plantadas en placas de cultivos fueron lavadas con PBS. Una vez lavadas fueron lisadas con el tampón de lisis: HEPES 50 M pH 7,5; NaCl 50 mM; 1% Triton X-100; EDTA 1 mM; Glicerol 10 %, en presencia de inhibidores de proteasas (aprotinina 1 µg/ml; leupeptina 1 µg/ml; DTT 1 mM) y inhibidores de fosfatasa (NaF 20 mM; NaPPi 0,1 M; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM; PMSF en etanol 1 mM; β-Glicerofosfato 20 mM). En hielo se añadieron 100 µl del buffer de lisis en placas de 100 mm y 50 µl en placas de 60 mm. El lisado celular fue recogido en un eppendorf, se dejaron 30 minutos en hielo y fueron vorteadas cada 10 minutos. Para separar los restos celulares de las proteínas se centrifugó el lisado a 15000 g durante 20 minutos a 4 °C. Se descartó el pellet y el sobrenadante fue recogido en un eppendorf nuevo. A partir de aquí se pasó a determinar la concentración de proteínas obtenida.

#### 4.16 Cuantificación de proteínas

Para cuantificar la concentración de proteínas obtenida se utilizó el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (BioRad, Munich, Alemaña). Este ensayo está basado en el método Bradford, método para determinar la concentración de proteínas solubilizadas; implica la adición de un colorante ácido a la solución de proteínas y la posterior medida a una longitud de onda de 595 nm con un espectrofotómetro. El resultado se compara con una curva estándar que permite determinar la concentración relativa de proteínas. El principio del reactivo es la unión del colorante ácido (comassie) a aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina, sufriendo un cambio de absorvancia.

Para determinar la concentración de proteínas a partir de 1 ml del buffer a 1 X se añade 1 µl del lisado para cada una de las muestras, tras vortear 200 µl de la disolución se añadieron a una placa de 96 pocillos que posteriormente fue leída en el espectrofotómetro. Para determinar la concentración realizamos la siguiente curva con BSA (Sigma-aldrich, Taufkirchen, Germany) diluido en el mismo buffer de lisis: 0 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml y 4 µg/ml. A partir de la recta obtenida extrapolamos la concentración de cada una de las muestras.

Para realizar el análisis por western blot se igualaron las muestras a una misma concentración, diluyéndolas con el buffer de lisis correspondiente y añadiendo el tampón de carga a 1 X (tampón Laemli 1 X: 0,0626 M Tris HCl pH 6,8; 2 % SDS; 0,01 % azul de bromofenol; 10 % glicerol), posteriormente fueron desnaturalizadas durante 5 minutos a 95 °C.

#### 4.17 Western blot

Para la detección de los niveles de proteína se utilizó la técnica de western blot. Las proteínas fueron cargadas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato (SDS-PAGE), el SDS reviste las proteínas con carga negativa para así poder separarlas según su peso molecular mediante electroforesis.

Los geles de poliacrilamida están formados por dos partes, el gel concentrador, el cual permite que las proteínas de diferente peso molecular queden retenidas a un mismo nivel para que puedan ser separadas correctamente por el denominado gel separador, donde las proteínas se separan según su peso molecular. El gel concentrador está compuesto por: agua, 30 % de acrilamida, 1,5 M de Tris (pH 6.8), 10 % SDS, 10 % persulfato de amonio y TEMED (Tabla 4). Y el gel separador está compuesto por: agua, 30 % de acrilamida, 1.5 M Tris (pH 8.8), 10 % SDS, 10 % persulfato de amonio y temed (Tabla 5). Para proteínas de bajo peso molecular realizamos geles entre un 12 y un 15 % y para alto peso molecular entre 6 y 10 %. La electroforesis se corre en cubetas con un tampón que contiene un 0,1 % de SDS, 25 mM Tris y 190 mM glicina a un voltaje de 120. Como marcador de peso molecular utilizamos el marcador *Precision Plus Protein Standards dual color de Biorad*.

Una vez realizada la electroforesis y separadas las proteínas por peso molecular se transfirieron a una membrana de PDVF, aplicando un amperaje constante de 400 mA durante 1 hora y 15 minutos para proteínas de bajo peso molecular y de 350 mA durante 2 horas para proteínas de alto peso molecular, como tampón se utilizó 25 mM trizma, 190 mM glicina y metanol a una concentración final del 20 %. Las membranas de PVDF fueron activadas previamente durante 1 minuto con metanol.

Una vez finalizada la transferencia las membranas fueron bloqueadas con un 5 % de leche desnatada en T-BST (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM y 0,1 % de Tween-20) durante 1 hora. Tras el bloqueo se incubó cada membrana con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 6) en 5 % de leche desnatada en T-BST (o 5 % de BSA en T-BST en el caso de fosfoanticuerpos) durante toda la noche a 4 °C o 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con T-TBS y se añadió el anticuerpo secundario (Tabla 6) diluido con 5 % de leche desnatada en T-TBS. Para extraer el exceso de anticuerpo secundario se realizaron tres lavados de 10 minutos con T-TBS y se pasó a revelar la señal utilizando el sistema de

emisión de quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharma-Biotech, Dreieich, Almenaya). Como control de carga se utilizó la expresión de la proteína  $\beta$ -actina o GAPDH.

Volúmenes para 1 gel (5ml)	
H <sub>2</sub> O	3,4
30 % Acrilamida/bis acrilamida (Mix ratio 29:1)	0,83
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,63
10 % SDS	0,05
10 % PSA	0,05
TEMED	0,005

**Tabla 4: Solución para preparar el gel concentrador.**

Volúmenes para 1 gel (10ml)		
	8 %	12 %
H <sub>2</sub> O	4,6	3,3
30 % Acrilamida/bis acrilamida (Mix ratio 29:1)	2,7	4
1,5 Tris ( pH 8,8)	2,5	2,5
10 SDS	0,1	0,1
10 PSA	0,1	0,1
TEMED	0,006	0,004

**Tabla 5: Solución para preparar el gel separador.**

## 4.18 Inmunoprecipitación

Mediante la inmunoprecipitación es precipitado un antígeno proteico específico de una solución usando un anticuerpo que se une específicamente a esa proteína, este anticuerpo requiere que esté acoplado a un substrato sólido. Para ello se utilizó la proteína G sefarosa (G sepharose 4 Fast Flow, Amersham Pharma-Biotech), la cual se unirá al anticuerpo de interés que añadimos a nuestro lisado extraído mediante la utilización del siguiente buffer de lisis: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100 y 5 mM EDTA. Los anticuerpos utilizados en cada uno de los experimentos fueron: Myc-tag (1:2000), Ago 2 (1:100) y 4E-T (1:100).

Para realizar el ensayo se extrajo una concentración de 100  $\mu$ g de proteínas de placas de cultivos de 10 mm. Se añadió el anticuerpo de interés, según la dilución, durante toda la noche a 4 °C en rotación. Antes de añadir el substrato sólido, en nuestro caso la proteína G sefarosa, el medio que la contiene fue lavado tres veces con buffer de lisis centrifugando a 12000 g durante 20 segundos, para quitar el 20 % de etanol utilizado para resuspender la proteína G. Una vez lavadas se realizó una dilución 1:1 con buffer de lisis con un volumen final de 50  $\mu$ l para cada muestra. Se añadió este volumen a la muestra con el anticuerpo y se dejó 1 hora en rotación a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12000 g durante 30 segundos. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado 3 veces con 1 ml de tampón de lisis a 12000 g durante 3

minutos. Posteriormente fue resuspendido en 50 µl de tampón Laemli 1X + 100 mM DTT, se procedió a dar un choque térmico durante 5 minutos a 95°C, con una posterior centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos para recoger el sobrenadante y pasar a su posterior análisis por western blot.

Anticuerpos	Referencia y casa comercial	Dilución
<b>Primarios</b>		
anti-Myc-tag	#2276 Cell Signaling	1:1000
anti-pelF4E Ser-209	#9741 Cell Signaling	1:1000
anti-Mnk1 C4C1	#2195 Cell Signaling	1:1000
anti-eIF4G	#2498 Cell Signaling	1:1000
anti-YB1	#4202 Cell Signaling	1:1000
anti-mTOR 7C10	#2983 Cell Signaling	1:1000
anti- $\beta$ -catenin	#9562 Cell Signaling	1:1000
anti-EIF4ENIF1	Sigma	1:500
anti-cyclin D1 M-20	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
anti-MCL1 Y37	Abcam	1:500
anti-Ago2	Abcam	1:500
anti-GAPDH 6C5	Abcam	1:2000
Anti-N-cadherina	Abcam	1:1000
and anti-HuR	Millipore	1:500
Anti-actin CP01	Calbiochem	1:500
<b>Secundarios</b>		
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	NA9340 Amersham Pharma-Biotech	1:5000
Donkey anti-mouse IgG-HRP	NA9340 Amersham Pharma-Biotech	1:5000

**Tabla 6. Anticuerpos utilizados para western blot.**

#### 4.19 Ensayo 7-Methyl-GTP-Sepharosa pull-down

Para realizar el ensayo se utilizaron las bolas *7-methyl-GTP-Sepharose* (GE Healthcare), las cuales son una resina de p-aminofenil éster con afinidad a la región de unión a cap del mRNA. El protocolo es parecido a la inmunoprecipitación, con la diferencia que se inmunoprecipitarán las proteínas unidas a cap.

El lisado celular fue incubado durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-Myc (1:2000) a 4 °C. Al día siguiente las bolas *7-methyl-GTP-Sepharose* fueron lavadas 3 veces y equilibradas con buffer de lisis; una vez lavadas se añadió 50 µl de las bolas al lisado celular con el anticuerpo, durante 1 hora a 4 °C. Una vez finalizada la incubación el extracto fue centrifugado a 12000 g durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado 3 veces con 1 ml de buffer de lisis. Finalmente el pellet fue resuspendido en 50 µl de tampón

Laemli 1X + 100 mM DTT y se procedió a dar un choque térmico durante 5 minutos a 95 °C para el posterior análisis por western blot.

## 4.20 Inmunocitofluorescencia

Para analizar la localización de diferentes proteínas dentro de la célula se realizaron inmunocitofluorescencias, técnica de inmunomarcación donde se utilizan anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente detectables por microscopio de fluorescencia.

Las líneas celulares de interés fueron plantadas en placas de 24 pocillos sobre unos cubreobjetos redondos de 12 mm (Afora, Barcelona, España) previamente esterilizados; según la línea celular el número de célula plantadas fue el siguiente: 20000 células para MDA-MB-468 y HaCaT, 150000 células para MDA-MB-231 y HeLa.

Una vez plantadas las células el medio fue aspirado al día siguiente y se lavaron las células dos veces con PBS. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % en PBS (Panreac Applichem) durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron dos lavados con PBS. Para bloquear, evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos, y permeabilizar las células, se dejó 1 hora con BSA al 5 %, Triton 0,5 % en PBS 1 X. Tras el bloqueo se pasó a la incubación de los anticuerpos primarios correspondientes durante 2 horas a temperatura ambiente diluidos en la misma solución de bloqueo; se lavó el exceso de primario con tres lavados de PBS y se incubó con el anticuerpo secundario conjugados con Alexa Fluor 488 o 594 (1:200; Molecular Probes) durante 1 hora a temperatura ambiente. El Alexa Fluor 488 contiene una longitud máxima de absorción de 495 nm y una longitud máxima de emisión de 519 nm dando una emisión del color verde; el Alexa 594 tiene una longitud máxima de absorción de 590 nm y una longitud máxima de emisión de 617 nm dando una emisión de color rojo. Finalmente las células fueron montadas sobre un porta objetos añadiendo 7 µl de la solución de montaje, 50 % glicerol en PBS, los cristales fueron sellados con esmalte de uñas. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal, Espectral FV1000 Olympus, configurado para la adquisición de imágenes de fluorescencia de múltiples canales digitales utilizando una excitación láser y un sistema de detección espectral.

## 4.21 Perfil polisómico

El análisis del perfil polisómico se realizó para el estudio de la eficiencia de la traducción. Para el análisis polisómico a partir de placas de 150 mm se obtuvieron 400 µg de lisado celular los cuales fueron congelados en nitrógeno líquido y resuspendidos en 1 ml del siguiente buffer de extracción: 1,5 mM KCl, 2,5 mM Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 5 mM Tris, pH 7,4; 1,0 % Triton X-100; 1,0 % Na-deoxycolato; inhibidores de proteasas; 100 U/ml RNase Out; y 100 µg/ml ciclohexamida.

Los extractos celulares fueron analizados con gradientes de sucrosa 10-50 %:

- Solución sucrosa 10 %: 10 % de sucrosa  
15 mM Tris pH 7,4  
15 mM Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

0.15 M NaCl  
1 mg/ml heparina  
Cyclohexamida a una concentración final 100µg/ml

- Solución sucrosa 50 %: 50 % sucrosa  
15 mM Tris pH 7,4  
15 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.15 M NaCl  
1 mg/ml heparina  
Cyclohexamida a una concentración final 100 µg/ml

Los gradientes se hicieron mediante la utilización de la máquina *Gradient Master* de Biocomp y se dejaron media hora a 4 °C para que se estabilizase el gradiente.

Posteriormente se añadieron 300 µl del extracto al gradiente de sucrosa 10-50 % y fueron centrifugados durante 2 horas y 30 minutos a 37000 rpm a 4 °C en un rotor SW40 Ti en ultracentrífuga. Las diferentes fracciones polisómicas fueron extraídas utilizando un detector ISCP UV de Biocomp, el cual recogió 12 fracciones, separando de la 1 a la 4 el RNA libre y de la 5 a la 12 el RNA polisómico. De cada fracción se obtuvieron 900 µl, las fracciones fueron congeladas a -80 °C.

#### 4.22 Extracción RNA polisomas

Para extraer el RNA a cada una de las fracciones se añadió EDTA a una concentración final de 20 mM y SDS a 0,5 % de concentración final. Posteriormente se añadió un volumen de 900 µl de ácido phenol:cloroformo 1:1, tras vortear se centrifugó cada fracción a 14000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Se obtuvieron dos fases, la fase acuosa se pasó a un eppendorf nuevo donde se añadió igual volumen de cloroformo, tras vortear se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm y se recuperó la fase acuosa. En este punto se juntaron las fracciones separando el RNA libre, fracciones de la 1 a la 4, del RNA polisómico, fracciones de la 5 a la 12. Se añadió 0.1 volumen de NaOAc pH 5,2 y un volumen de isopropanol. Se dejó toda la noche a -20 °C para precipitar el RNA. Al día siguiente se centrifugó durante 1 hora a 14000 rpm a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Los pellets fueron lavados dos veces con etanol al 70 % y centrifugados durante 15 minutos, descartando el sobrenadante cada vez. Finalmente el pellet fue resuspendido con agua libre de RNasa y cuantificado mediante el NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer de Thermo Scientific.

#### 4.23 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA a partir del RNA obtenido se siguió el siguiente protocolo: se añadió 1,5 µg del RNA, 200 ng de *Random Primers*, 0,5 mM de dNTPs y H<sub>2</sub>O destilada hasta 12 µl. Esta reacción se calentó durante 5 minutos a 65 °C, después fue añadido el Tampón de Reacción a 1X, 20 U de *Thermo scientific rioblock RNase inhibitor*, el cual inhibe la actividad de las RNases A, B y C protegiendo el RNA, y la máxima reverse transcriptasa (Thermo Scientific). La

mix fue incubada durante 10 minutos a 25 °C seguido de 30 minutos a 50 °C, terminando la reacción con un choque de 5 minutos a 85 °C. El cDNA se guardó a -20 °C para su posterior utilización.

#### 4.24 PCR con retrotranscriptasa (RT-PCR) a tiempo real

A partir del RNA extraído de las fracciones polisómicas se realizó una RT-PCR a tiempo real con el equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) de Ciclina D1 y Mcl1:

- Ciclina D1-For:5'AGT GGA AAC CAT CCG CCG-3'
- Ciclina D1-Rev: 5'-TCT GTT CCT CGC AGA CCT CCA-3'
- Mcl1-For:5'-AAG CCA ATG GGC AGG TCT-3'
- Mcl1-Rev:5'TGT CCA GTT TCC GAA GCAT-3'

Se realizó la cuantificación relativa de las fracciones polisómicas respecto al RNA total; se normalizó respecto a un gen de referencia (genes que no ven su expresión alterada ni por el tipo de muestra ni por el tipo de tratamiento), en nuestro caso actina.

La RT-PCR a tiempo real se realizó en dos pasos, primeramente se realizó la síntesis de cDNA de las fracciones de RNA libre, las polisómicas y los respectivos inputs. La síntesis de cDNA de cadena sencilla se realizó con *SuperScriptii reverse transcriptase Kit* (invitrogen, Carisbad, CA) a partir de 1,5 µg de RNA total.

En un segundo paso se realizó la RT-PCR a tiempo real. Cada muestra se analizó por triplicado. A partir de 15 ng de cDNA se añadió 11 µl de cada una de las sondas Taqman de interés, 10 µl de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (20xTaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). La reacción de PCR fue de 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

Para evaluar la expresión relativa de los diferentes genes y del gen de referencia se utilizó el método comparativo *RQ Study*. Este método requiere que tanto los genes diana como el gen de referencia tengan la misma eficiencia de amplificación. Se utilizan fórmulas aritméticas para calcular el valor de expresión relativa del gen diana (RQ) a la muestra problema, normalizado con el gen de referencia y relativo a un calibrador (en nuestro caso la muestra control sin tratamiento ni sobreexpresión de ningún mutante). El valor RQ se calcula según la fórmula:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$  y  $\Delta\Delta C_T = [C_T(\text{condición normal, gen diana}) - C_T(\text{condición x, gen diana})]$ , donde  $C_T$  es el ciclo de PCR donde la amplificación del gen (diana o de referencia) asume un umbral fijo.

#### 4.25 Obtención de muestras de tumores

Se seleccionaron al azar muestras de tejido tumoral de mama de 77 pacientes, procedentes del banco de tumores del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona. Las muestras fueron recogidas y seccionadas en tres partes, dos partes fueron congeladas en nitrógeno líquido y la tercera se congeló en un criomolde con OCT. A partir de este criomolde se realizó un corte con un criostato, el cual fue valorado por un

patólogo para confirmar el diagnóstico del material congelado. En el caso de haber tejido sano adyacente, se realiza el mismo procedimiento.

## **4.26 Inmunohistoquímica de las muestras tumorales**

Se realizó una tinción inmunohistoquímica en las muestras tumorales extraídas para poder valorar la expresión de los diferentes factores de señalización estudiados. Se cortaron láminas de 2-3  $\mu\text{m}$  de cada muestra y se colocaron sobre portaobjetos cubiertos con poli-lisina. Después de cortar los tejidos las preparaciones se hornearon durante al menos 2 horas a 60  $^{\circ}\text{C}$  para mejorar la adhesión del tejido al portaobjetos y se colocaron en el módulo de tinción para proceder al protocolo automatizado diseñado para la IHQ.

Los anticuerpos utilizados fueron puestos a punto mediante el módulo de tinción Benchmark XT, utilizando el *ultraView* Universal DAB Detection kit de Ventana Medical Systems, el cual se basa en un sistema directo desprovisto de biotina, para detectar IgG de ratón, IgM de ratón y anticuerpos de conejo.

El módulo de tinción Benchmark XT utiliza un sistema automatizado propio. Cada paso se incuba durante un tiempo y temperatura determinada. El desparafinado de las muestras se realiza mediante la solución EZ prep<sup>TM</sup>(10 X) y el desenmascaramiento con la solución Cell conditioning 1, Pre-diluido pH 8; una vez realizado el desenmascaramiento a pH 8, las muestras se bloquean con solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (Dako).

Los anticuerpos primarios y las diluciones utilizadas fueron los mostrados en la tabla 7. El tiempo de incubación de todos los anticuerpos fue de 60 minutos. Todos los anticuerpos primarios fueron probados previamente por western blot para evaluar su especificidad.

La detección del anticuerpo primario se realiza mediante la adición de un anticuerpo secundario, el complejo resultante de la unión del anticuerpo primario y secundario se visualiza utilizando un producto enzimático que precipita (sustrato de peróxido de hidrógeno y cromógeno de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina DAB), finalmente se realiza una contratinción con hematoxilina.

Una vez finalizado el proceso de automatizado, las preparaciones se lavan, se deshidratan y se procede a su montaje.

## **4.27 Evaluación inmunohistoquímica de tumores**

Todos los casos seleccionados fueron evaluados por dos patólogos para determinar el porcentaje de células positivas y la intensidad de tinción. El Hscore de las diferentes proteínas fue calculado de la siguiente forma:  $(1 \times \% \text{ células con tinción débil}) + (2 \times \% \text{ células con tinción moderada}) + (3 \times \% \text{ células con tinción fuerte})$ , con un resultado que va en el intervalo de 0 a 300. El tejido de mama adyacente también fue analizado para poder definir el umbral del Hscore para los casos positivos.

Anticuerpos	Referencia y casa comercial	Dilución
Anti-p-4E-BP1 (Thr70)	#9455 Cell Signaling	1:50
Anti-pelf4E Ser-209	Ab76256 Abcam	1:100
Anti-4E-BP1	#9452 Cell Signaling	1:25
Anti-Ki-67	DAKO	Pre diluido
Anti-receptor de estrógeno (ER)	Novocastra	1:50
Anti-receptor de progesterona (PR)	Novocastra	Pre diluido
Anti-HER2	DAKO	Pre diluido
Anti-YB1	#4202 Cell Signaling	1:40
Anti-p-YB1	#2900 Cell Signaling	1:100
Anti-4E-T	#HPA001619 SIGMA	1:100
Anti-Ago2	Ab32381 Abcam	1:5000
Anti-HuR	#07-468 upstate chemicon	1:1000
Anti- N-Cadherina	Ab18203 Abcam	1:100
Anti-MMP3	Ab53015 Abcam	1:500

**Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados en las inmunohistoquímicas.**

#### 4.28 Análisis estadístico de las muestras tumorales

El análisis estadístico se realizó con el software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, versión 13.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Mediante el Test de Spearman se realizó la correlación entre los diferentes genes de estudio, esta medida de correlación nos mide la asociación entre dos variables aleatorias continuas, oscila entre -1 y +1, indicándonos correlaciones negativas o positivas.

Se utilizó el test de Anova para buscar la asociación de los diferentes genes de estudio (variable dependiente) con las diferentes variables clínicas y patológicas de los tumores: grado histológico, media del tumor, edad y metástasis (variables categóricas).

En los dos casos la significancia estadística se fijó en  $<0,05$ , en las figuras los valores de significación estadística se señalan según el siguiente código: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; y \*\*\* $p<0,005$ .



---

# **RESULTADOS**

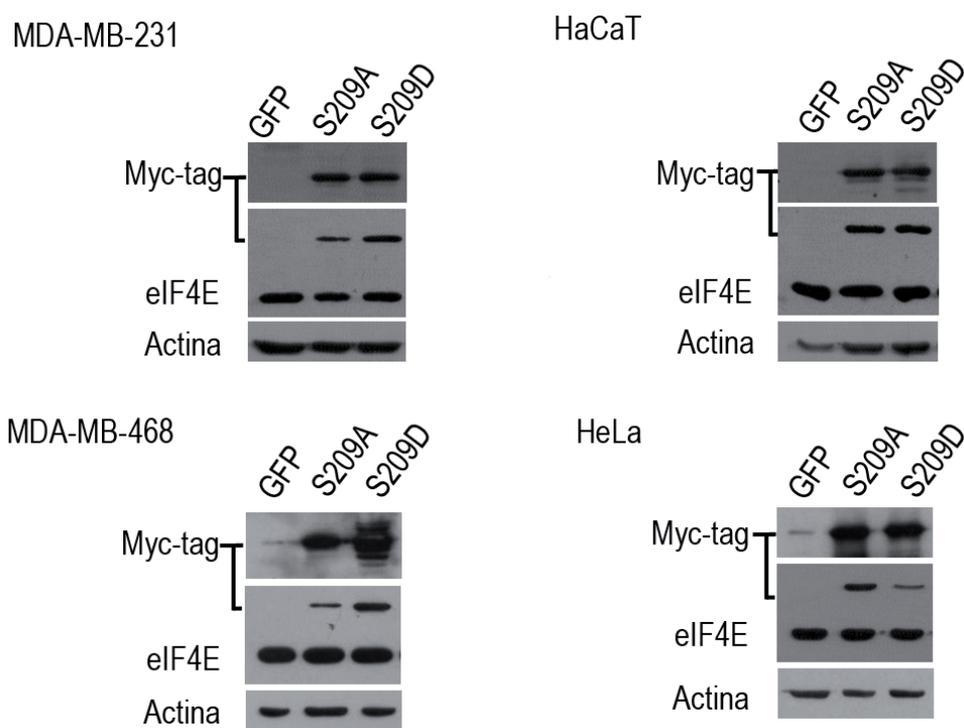
---



# 5. RESULTADOS

## 5.1 Estudio in vitro de la función de la fosforilación de eIF4E

Es conocido que la fosforilación de eIF4E en la Ser209 por Mnk1/2 afecta la proliferación celular y la malignidad tumoral (Wang, Yue et al. 2007). Para entender el papel de la fosforilación de eIF4E en este proceso se infectaron diferentes tipos celulares con un vector retroviral que sobreexpresaba la forma de eIF4E incapaz de fosforilarse (eIF4E S209A) y la forma fosfomimética (eIF4E S209D), los dos marcados con Myc-tag para poder determinar la correcta expresión de la forma exógena; como control se utilizó el mismo vector retroviral con la expresión de GFP. Se infectaron las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468, HaCaT y HeLa. Los niveles de expresión de cada uno de los mutantes y del eIF4E fue comprobada en cada una de las líneas mediante western blot (Figura 18)

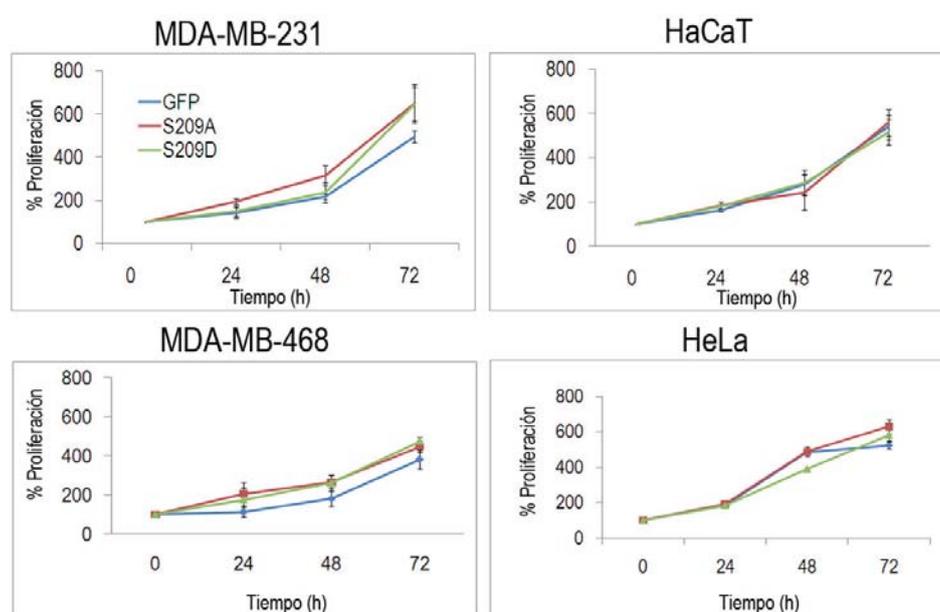


**Figura 18: Niveles de la expresión de eIF4E y Myc-tag.** Por western blot vemos niveles similares de la expresión de los dos mutantes de eIF4E y del eIF4E endógeno (25KDa) en la línea celular HaCaT y MDA-MB-231; en la línea celular MDA-MB-468 vemos una expresión de los mutantes de eIF4E inferior al eIF4E endógeno, viéndose una menor expresión del mutante S209A; en la línea celular HeLa se observa una menor expresión de los mutantes de eIF4E, siendo esta menor en el caso del mutante S209D.

Realizando el western blot contra eIF4E observamos una banda sobre unos 35 kDa correspondiente a la expresión exógena, unos 10 kDa superior al eIF4E endógeno debido a la expresión en el vector de 9 epítopos myc-tag. En las líneas celulares que expresaban los

mutantes de eIF4E observamos la expresión del Myc-tag con niveles similares a la expresión del eIF4E endógeno en el caso de las líneas celulares MDA-MB-231 y HaCaT; en el caso de la línea celular MDA-MB-468 la expresión de los mutantes de eIF4E es inferior al eIF4E endógeno, habiendo más expresión del mutante S209D que del S209A; en el caso de la línea celular HeLa la sobreexpresión del mutante S209D es menor que el S209A y está poco sobreexpresado en comparación con el eIF4E endógeno.

Posteriormente se realizaron análisis de proliferación celular hasta las 72 horas, mediante el ensayo de MTT en condiciones normales, respecto a los dos mutantes de eIF4E y el control (GFP) (Figura 19). No se observó ninguna diferencia significativa al sobreexpresar los mutantes de eIF4E con respecto al control en ninguna de las cuatro líneas celulares de estudio.



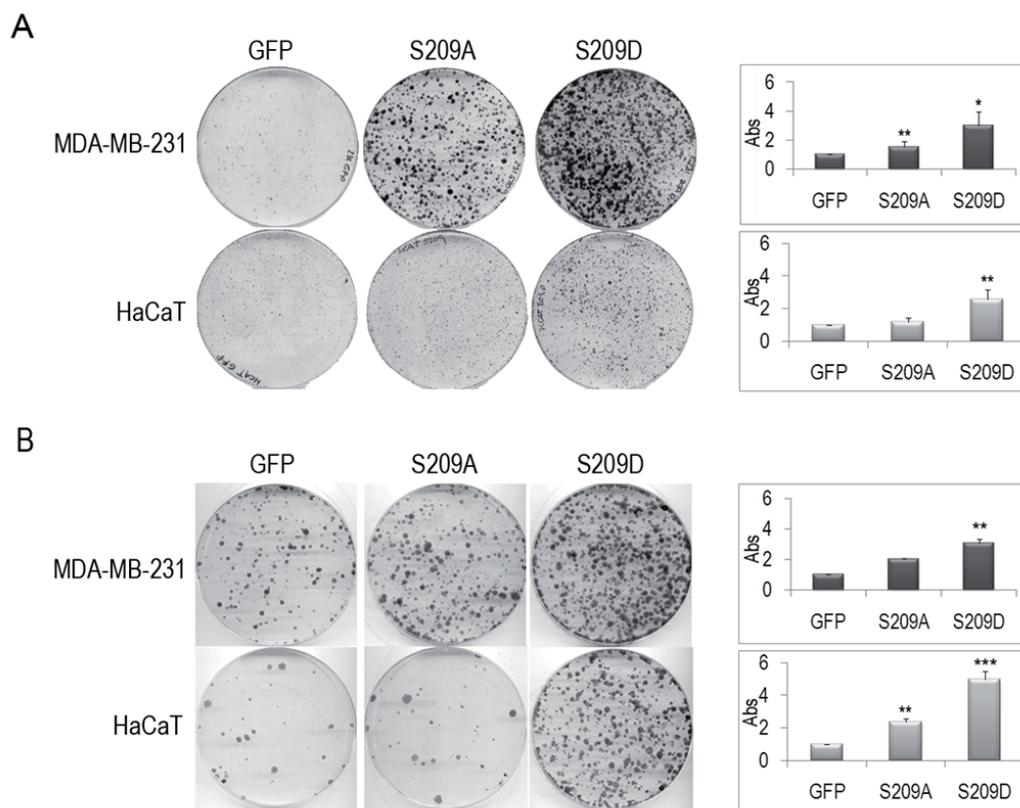
**Figura 19: Ensayo de proliferación celular mediante MTT.** No se observa una diferencia significativa en la proliferación entre los dos mutantes de eIF4E y GFP en ninguna de las cuatro líneas de estudio. Media del resultado de tres experimentos.

### 5.1.1 Fosforilación de eIF4E y resistencia a estrés celular

#### 5.1.1.1 La fosforilación de eIF4E aumenta la capacidad de formación de colonias

Como hemos comentado anteriormente la fosforilación de eIF4E por las quinasas Mnk1/2 en respuesta a mitógenos, promotores tumorales y factores de crecimiento, es crítica para la actividad oncogénica (Flynn and Proud 1995; Joshi, Cai et al. 1995; Fukunaga and Hunter 1997; Waskiewicz, Flynn et al. 1997). Para realizar un estudio del efecto de la fosforilación de eIF4E en diferentes situaciones de estrés, primeramente realizamos un ensayo de formación de colonias para evaluar si las células con la sobreexpresión de los diferentes mutantes eran capaces de dividirse y formar una colonia tanto en situaciones normales como en situaciones de estrés. Para ello tratamos las células con arsénico (estrés oxidativo) y evaluamos el efecto de la sobreexpresión de los dos mutantes. En las diferentes líneas celulares de estudio, MDA-MB-231

y HaCaT, se observó que la sobreexpresión del mutante S209D incrementaba el número y tamaño de las colonias con respecto al GFP, tan solo en el caso de la línea celular MDA-MB-231 vemos un aumento significativo de la formación de colonias con el mutante S209A en condiciones normales (Figura 20A). Tras el tratamiento de las células con arsénico durante 90 minutos y realizar el ensayo de formación de colonias, observamos que el número de células se ve reducido pero el tamaño de estas aumenta tanto en el control como en la sobreexpresión de los mutantes (Figura 20B); este aumento en el tamaño en las colonias puede ser debido a diferentes motivos: un incremento de la fosforilación endógena de eIF4E; competencia de nutrientes, la cual se ve reducida tras el tratamiento de estrés debido a la disminución en el número celular; o por migración celular y agrupamiento en clústeres de las células que sobreviven. De nuevo se observa un aumento en el tamaño y número de colonias en el mutante S209D con respecto al GFP y el mutante S209A.



**Figura 20: Tinción con cristal violeta del ensayo de formación de colonias realizado en las líneas celulares MDA-MB-231 y HaCaT.** Ensayo de formación de colonias en placas de 10 cm. Colonias teñidas con cristal violeta y analizada la absorbancia al diluir el cristal violeta con ácido acético. A) En condiciones normales se observa un incremento significativamente estadístico en el número y tamaño de colonias al sobreexpresar el mutante S209D en las dos líneas celulares. En la línea celular MDA-MB-231 se observa un incremento significativo de la formación de colonias al sobreexpresar el mutante S209A, siendo este incremento menor que en el caso del mutante S209D. B) La supervivencia y la ventaja sobre el crecimiento al expresar el mutante S209D se ve más evidente al tratar las células con arsénico durante 90 minutos antes de empezar en ensayo de formación de colonias. Incremento en el tamaño de las colonias en el control GFP tras el tratamiento con arsénico en las dos líneas celulares de estudio. Se observa un incremento significativo tanto en número como en el tamaño de las colonias al sobreexpresar el mutante S209D. Significativo si \* <0,05, \*\* < 0,01 y \*\*\* <0,001.

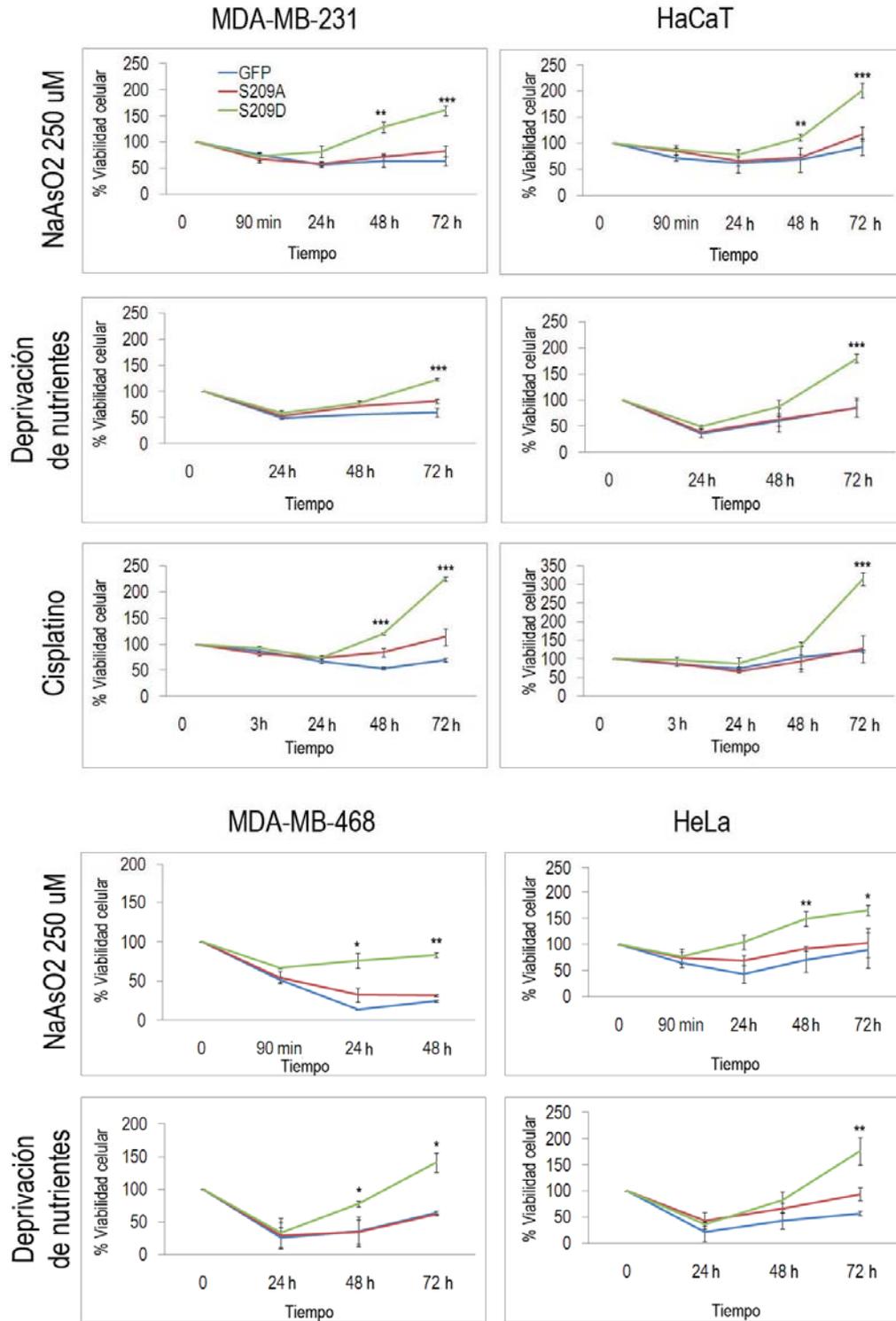
### **5.1.1.2 La fosforilación de eIF4E incrementa la resistencia a diferentes situaciones de estrés**

Para un análisis más detallado del efecto de la fosforilación de eIF4E en situaciones de estrés evaluamos la proliferación y la viabilidad celular tras exponer a las células a diferentes tipos de estrés. Para ello realizamos un ensayo de MTT en el cual, en cada caso, tratamos las células con arsénico durante 90 minutos a 250  $\mu$ M, cisplatino durante 3 horas a 10  $\mu$ M y con falta de nutrientes (glucosa y glutamina) durante 24 horas. Tras el tratamiento con cada uno de los diferentes estreses se realizó un cambio de medio para poder observar la viabilidad de cada una de las líneas celulares así como su capacidad de recuperarse tras el estrés celular; el ensayo se realizó con los diferentes mutantes de eIF4E y su respectivo control, a las 24, 48 y 72 horas (Figura 21).

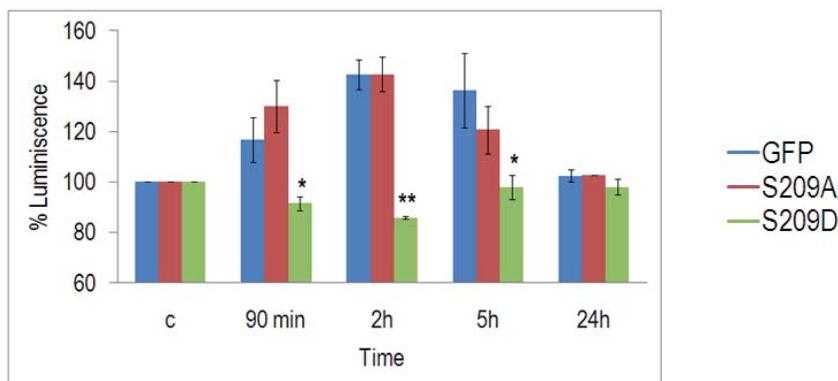
En las cuatro líneas celulares hay un incremento en la recuperación al sobreexpresar el mutante eIF4E S209D, no observable con el mutante S209A y el control GFP, al producirle a las células un estrés oxidativo, de falta de nutrientes (MDA-MB-468, HeLa, MDA-MB-231 y HaCaT) y con cisplatino, (MDA-MB-231 y HaCaT; no analizado en MDA-MB-468 y HeLa). La recuperación celular, que se observa al infectar las células con el mutante S209D, varía según la línea celular y el tratamiento de estrés inducido. En la línea celular MDA-MB-231 al realizar el tratamiento con arsénico y cisplatino observamos una recuperación significativa del mutante S209D a las 48 horas, al deprivar las células de nutrientes esta recuperación se observa a partir de las 72 horas. En el caso de la línea celular HaCaT el mutante S209D permite una recuperación significativa del tratamiento con cisplatino o al deprivar las células de nutrientes a las 72 horas tras el tratamiento; al tratar las células con arsénico esta recuperación se observa a las 48 horas. La línea celular MA-MB-468 se recupera significativamente a las 24 horas tras el tratamiento con arsénico y a las 48 horas tras la deprivación de nutrientes. Por último en la línea celular HeLa el mutante S209D se recupera significativamente a las 48 horas tras el tratamiento de arsénico y a las 72 horas tras la deprivación de nutrientes. En las cuatro líneas celulares de estudio el mutante S209A no muestra diferencias significativas respecto al control GFP en ninguno de los cuatro tratamientos de estrés realizados.

### **5.1.1.3 La fosforilación de eIF4E previene la activación de la apoptosis**

Se conoce que el estrés celular, como por ejemplo el estrés oxidativo producido por el arsénico, induce apoptosis (Chen, Lin-Shiau et al. 1998). Se ha demostrado, en modelos de ratón, que la fosforilación de eIF4E promueve la tumorigénesis mediante la supresión de la apoptosis (Ruggero, Montanaro et al. 2004). Para ver el efecto de la fosforilación de eIF4E en la activación/inhibición de la apoptosis en situaciones de estrés, tratamos la línea celular MDA-MB-231 con arsénico durante 90 minutos, mediante el kit Caspase-Glo® 3/7 se midió la activación de las caspasas 3 y 7. En el control GFP y en el mutante S209A hubo una activación de las caspasas 3 y 7 al tratar durante 90 minutos con arsénico, esta activación se incrementó a las 2 horas tras el tratamiento y disminuyó a los niveles basales a las 24 horas de haber inducido el estrés. Por el contrario, en el mutante S209D no se observó un incremento en la actividad de estas caspasas; tanto GFP como S209D tienen un incremento significativo de la activación de las caspasas 3 y 7 con respecto al mutante S209D (Figura 22).



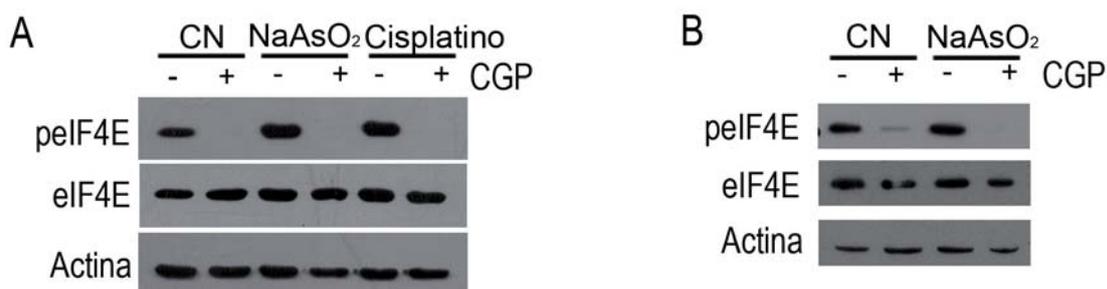
**Figura 21: Efecto en la proliferación y resistencia celular de diferentes tipos de estrés.** En MDA-MB-231 y HaCaT se observa un incremento de la resistencia con el mutante S209D tras el tratamiento con arsénico (significativo a las 48 horas en las dos líneas celulares), la falta de nutrientes (significativo a las 72 horas en las dos líneas celulares) y cisplatino (significativo a las 48 y 72 horas en MDA-MB-231 y a las 72 horas en HaCaT). En el caso de las MDA-MB-468 y HeLa el mutante S209D confiere más resistencia al tratar las células con arsénico (significativo a las 24 y 48 horas en las dos líneas celulares) y con falta de nutrientes (significativo a las 48 y 72 horas en MDA-MB-468 y a las 72 horas en HeLa). Significativo si \* <0,05, \*\* < 0,01 y \*\*\* <0,001.



**Figure 22: Actividad apoptótica medida con el ensayo de luminiscencia caspasa-3/7.** Se observa una disminución significativa en la activación de la apoptosis al sobreexpresar el mutante S209D con respecto al mutante S209A y el control GFP, el cual no muestra una activación de la apoptosis al tratar con arsénico. El incremento se da a los 90 minutos tras el tratamiento con arsénico y se ve incrementado a las 2 horas; a las 24 horas tras el tratamiento se restablecen los niveles normales de activación de las caspasas 3 y 7. Significativo si \* <0,05, \*\*< 0,01.

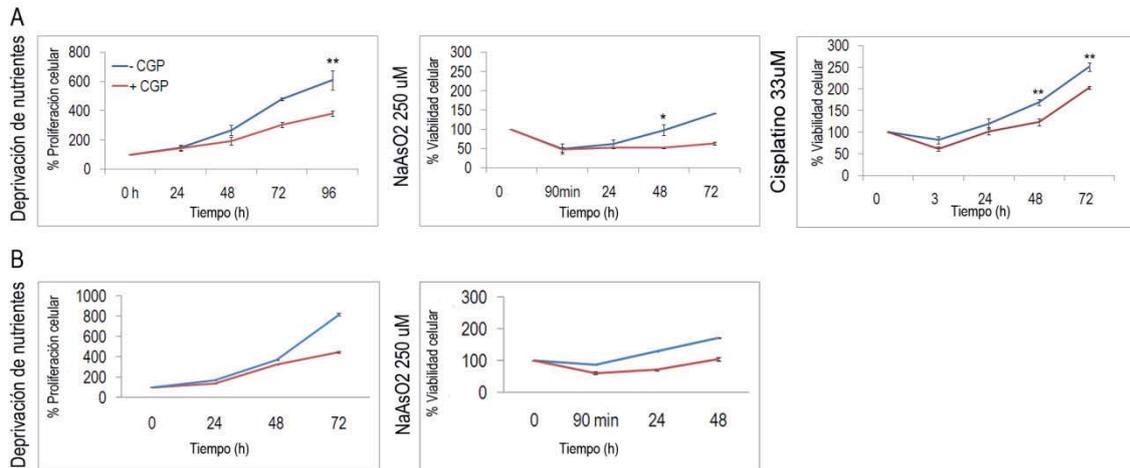
#### 5.1.1.4 La inhibición de la fosforilación endógena de eIF4E incrementa la sensibilidad a estrés

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los diferentes mutantes de eIF4E, quisimos corroborar que la fosforilación de eIF4E incrementaba la resistencia a estrés. Para ello tratamos las células MDA-MB-231 y HaCaT con el inhibidor de Mnks 1/2 CGP 57380, el cual inhibe la fosforilación de eIF4E de forma eficiente. El tratamiento con arsénico en las dos líneas celulares y con cisplatino en el caso de las MDA-MB-231 incrementa la fosforilación de eIF4E, la cual se ve disminuida al tratar con el inhibidor de las Mnk1/2 (Figura 23).



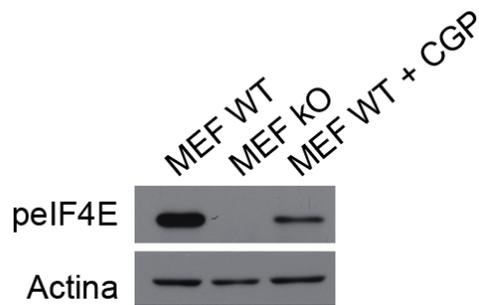
**Figura 23: Western blot de los niveles de eIF4E fosforilado (pEIF4E) y eIF4E.** A) MDA-MB-231 en condiciones normales (CN), con tratamiento de arsénico (NaAsO<sub>2</sub>) y con tratamiento de cisplatino. Incremento de la fosforilación de eIF4E con los dos tipos de estrés, disminución de la fosforilación al tratar con el inhibidor de las Mnk1/2. B) HaCaT en condiciones normales y arsénico. Incremento de pEIF4E al tratar con arsénico. Disminución de la fosforilación al tratar con el inhibidor de las Mnk1/2.

Para ver si la inhibición de la fosforilación del eIF4E endógeno inhibía la capacidad de recuperación de las células tras un estrés celular realizamos un ensayo de MTT para medir la viabilidad celular en respuesta a arsénico y cisplatino al ser tratadas las células con CGP 57380. Las líneas estudiadas fueron MDA-MB-231 y HaCaT (Figura 24).



**Figura 24: La inhibición de la fosforilación de eIF4E disminuye la resistencia a estrés.** A) MDA-MB-231 en condiciones normales, arsénico y cisplatino menos/más CGP 57380. El tratamiento con CGP 57380 disminuye la proliferación celular de forma significativa a las 96 horas. A partir de las 48 horas las células no tratadas con el inhibidor de las Mnks 1/2 son más resistentes al tratamiento con arsénico y cisplatino. B) HaCaT en condiciones normales y arsénico menos/más CGP 57380. La proliferación celular tras el tratamiento con CGP 57380 disminuye a las 72 horas. Tras el tratamiento con arsénico la línea parental no tratada con el inhibidor de las Mnks es más resistente al estrés. Significativo si \* <0,05 y \*\*< 0,01.

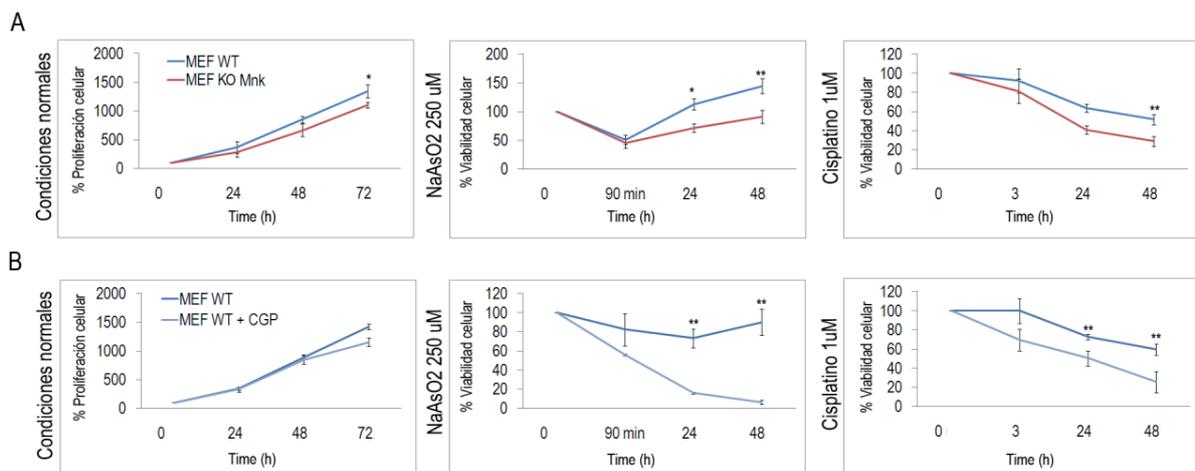
El tratamiento con CGP 57380 reduce la viabilidad celular en las dos líneas de estudio a partir de las 72 horas, siendo significativa en el caso de la línea celular MDA-MB-231 a las 96 horas. Al tratar las células con arsénico y cisplatino más CGP 57380 observamos que la inhibición de la fosforilación de eIF4E disminuye la resistencia a estrés, siendo significativa a partir de las 48 horas en el caso de la línea celular MDA-MB-231. En el caso de la línea celular HaCaT observamos que la proliferación celular disminuye a las 72 horas al tratar las células con CGP 57380; al tratar las células con arsénico la línea parental es más resistente y se recupera de forma más rápida que si inhibimos la fosforilación de eIF4E mediante CGP 57380. El hecho de que el tratamiento con CGP 57380 disminuya la proliferación celular a partir de las 72 horas, hace pensar que no es un inhibidor específico de las Mnk1/2 y a parte de inhibir la fosforilación de eIF4E pueden verse afectada otras vías que afectarían a una disminución de la proliferación al tratar las células varios días con CGP 57380. Varios autores han descrito que dicho inhibidor también afecta a otras proteínas, como por ejemplo la proteína CKI, envuelta en el tráfico de membranas, el procesamiento de RNAs y la progresión del ciclo celular; SGK1, importante en la activación de ciertos canales de sodio, potasio y cloro, juega un papel importante en la respuesta al estrés celular entre otras (Bain, Plater et al. 2007). Por ello decidimos realizar el mismo experimento en la línea celular MEF, fibroblastos embrionarios primarios de ratón, ya sea en su forma salvaje (MEF WT) como la forma Mnk1/2 knock out (MEF KO), incapaz de fosforilarse el eIF4E (Ueda, Watanabe-Fukunaga et al. 2004). Mediante western blot analizamos los niveles de p-eIF4E, siendo detectables en el caso de las MEF WT e indetectables en el caso de las MEF Mnk1/2 KO (Ueda, Watanabe-Fukunaga et al. 2004). El tratamiento de las MEF WT con CGP 57380 disminuye la fosforilación de eIF4E significativamente, pero no en de forma total (Figura 25).



**Figura 25: Niveles de pEIF4E en MEF WT y MEF KO.** El tratamiento con CGP 57380 reduce los niveles de pEIF4E en las MEF WT pero no de forma tan drástica como en el caso de las MEF KO, las cuales no presentan niveles de pEIF4E endógeno.

Mediante el ensayo de MTT observamos una disminución en la proliferación de las MEF KO a las 72 horas y una disminución en la resistencia celular al estrés con respecto a las MEF WT, siendo significativa a las 24 horas en el tratamiento con arsénico y a las 48 horas con el tratamiento de cisplatino (Figura 26A), indicando que la inhibición de las Mnks es importante para la resistencia a ciertos tipos de estrés, posiblemente vía la inhibición de la fosforilación de eIF4E.

Para acabar de corroborar dichos resultados se trató la línea celular MEF WT menos/más CGP (Figura 26B). En condiciones normales se observó una disminución en la proliferación celular a las 72 horas, siendo esta no significativa. Al provocar estrés oxidativo (arsénico) y daño en el DNA (cisplatino) se observa una disminución considerable de la resistencia al estrés en el caso de la línea celular tratada con CGP 57380, siendo significativa a las 24 y 48 horas.



**Figura 26: La inhibición de la fosforilación de eIF4E inhibe la recuperación tras el tratamiento con arsénico y cisplatino.** A) En condiciones normales a las 72 horas vemos una disminución significativa de la proliferación en las MEF KO con respecto las MEF WT. Tras tratar con arsénico observamos un incremento significativo en la viabilidad celular en las MEF WT a partir de las 24 horas, en el caso del tratamiento con cisplatino las células MEF WT son más resistentes, siendo significativo a partir de las 48 horas. B) El tratamiento con CGP 57380 de las MEF WT parece no afectar a la proliferación celular, viéndose una disminución, no significativa, a las 72 horas; CGP 57380 las hace más sensibles al tratamiento con arsénico y cisplatino, en ambos casos significativo a partir de las 24 horas. Significativo si \* <0,05, \*\*< 0,01.

### **5.1.1.5 El mutante eIF4E-S209D forma unos cuerpos citoplasmáticos con elevada afinidad hacia 4E-T**

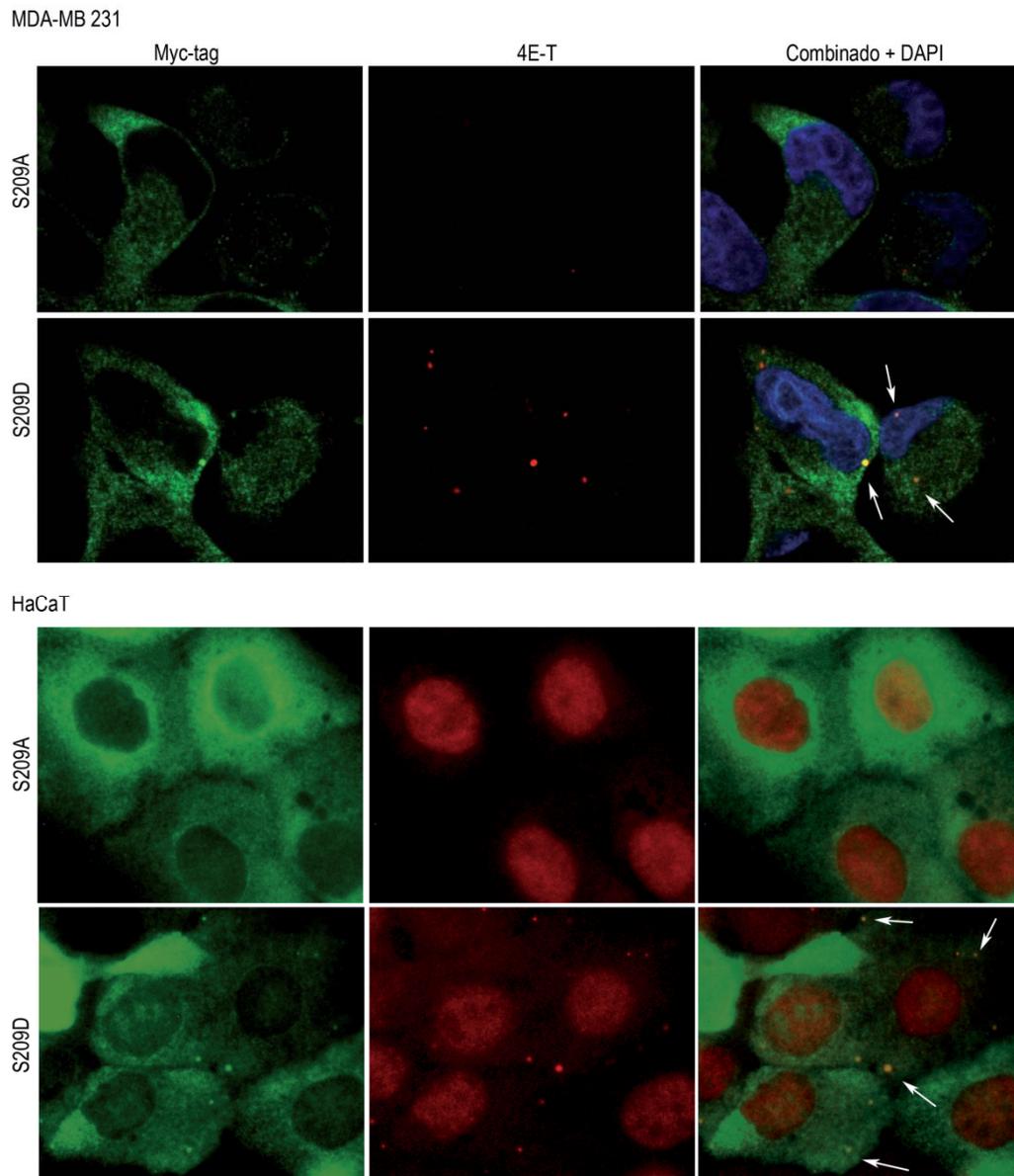
Es conocido que tanto eIF4E como su proteína transportadora 4E-T colocalizan con los marcadores de los PBs (*processing bodies*), reguladores importantes de la estabilidad, degradación y traducción de mRNAs durante el estrés (Dostie, Lejbkowitz et al. 2000). Ha sido descrito que el tratamiento con arsénico incrementa la fosforilación de eIF4E y es translocado a los PBs inhibiéndose así la traducción cap dependiente durante la situación de estrés. Por otro lado eIF4E también se ha descrito en GS (Gránulos de estrés), indicando que puede haber una relación entre estos dos tipos de cuerpos citoplasmáticos (Kedersha, Stoecklin et al. 2005). Quisimos estudiar si había alguna diferencia en la colocalización del mutante S209D con respecto al mutante S209A. Para ello realizamos inmunofluorescencias en diferentes líneas celulares sobreexpresando estos mutantes. En condiciones normales la sobreexpresión del mutante S209D inducía la formación de gránulos citoplasmáticos, estos gránulos colocalizaban con 4E-T. El mutante S209A no formaba estos cuerpos citoplasmáticos en condiciones normales (Figura 27).

Para confirmar la directa interacción entre eIF4E y 4E-T inmunoprecipitamos, el eIF4E exógeno con el anticuerpo anti-Myc. En condiciones normales observamos que el mutante S209D, y no el mutante S209A, es capaz de unirse a 4E-T, sugiriendo que la fosforilación de eIF4E incrementa la afinidad hacia 4E-T (Figura 28A). Para corroborar estos resultados y confirmar que hay una mayor afinidad entre peIF4E/4E-T que eIF4E/4E-T realizamos un estudio de la interacción de 4E-T con el eIF4E endógeno en la línea celular MAD-MB-231. Al realizar una inmunoprecipitación con el anticuerpo contra peIF4E, observamos que había unión entre peIF4E y 4E-T. Al tratar las células con arsénico, donde previamente habíamos visto un incremento de la fosforilación de eIF4E, vemos que esta interacción se incrementa. Al inhibir la fosforilación de eIF4E con CGP 57380 la interacción peIF4E/4E-T disminuye.

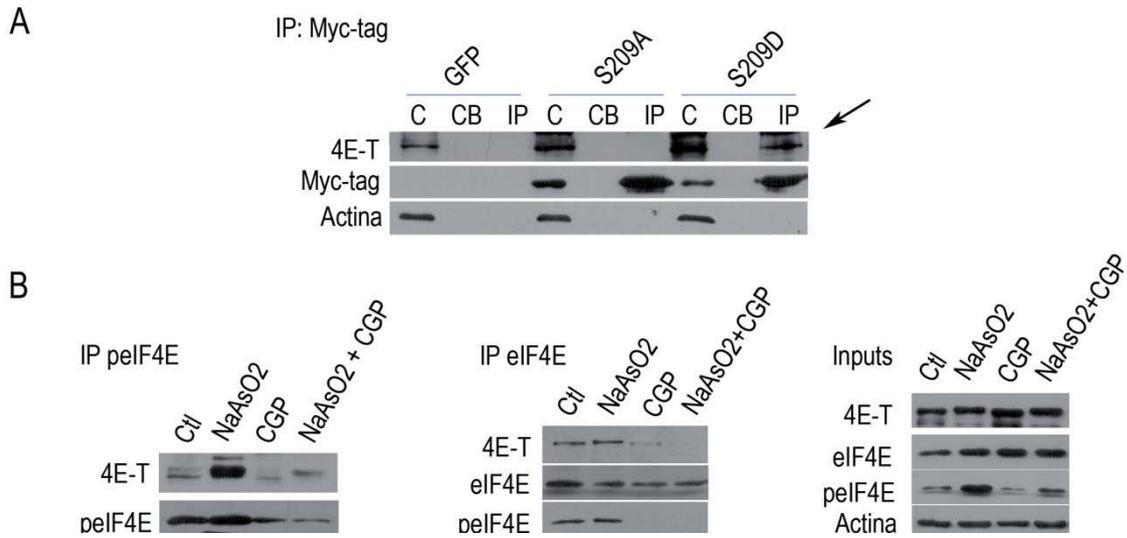
Para corroborar que para la formación de este complejo es necesaria la fosforilación de eIF4E, realizamos el mismo experimento pero inmunoprecipitando eIF4E total; observamos que tan solo donde bajamos peIF4E hay unión con 4E-T, indicándonos la mayor afinidad de 4E-T hacia peIF4E. El western blot del lisado total muestra el incremento de la fosforilación de eIF4E al tratar con arsénico, así como su disminución al tratar con CGP 57380 tanto en condiciones normales como con arsénico. Observamos también un cambio en el peso molecular de 4E-T, el cual se ve incrementado al tratar con arsénico, esto es debido a la fosforilación de 4E-T debida a la activación de Jnk (Figura 28B) (Cargnello, Tcherkezian et al. 2012). Mediante estas observaciones, podemos concluir que la fosforilación de eIF4E es importante para su unión con 4E-T.

Para ver si estos cuerpos citoplasmáticos formados por el mutante S209D y 4E-T correspondían a los PBs o GS formados en situaciones de estrés, tratamos la línea celular MDA-MB-231 con arsénico, y utilizando el marcador TIA-1 para GS y DCP1A para PBs, realizamos una inmunofluorescencia para ver la colocación con 4E-T (Figura 29). Se observó un incremento en la formación de gránulos al tratar las células con arsénico tanto en el mutante S209A como en el mutante S209D. Con ninguno de los mutantes se observó una colocalización de 4E-T con el marcador de GS de TIA-1; en el caso del marcador de PBs DCP1A se observó un 100 % de colocalización con el 4E-T del mutante S209A; el caso del mutante S209D la colocalización de 4E-

T con DCP1A no era del 100 %, se observaba que los cuerpos de 4E-T de tamaño más grande colocalizaban con DCP1A, en cambio los de menor tamaño no colocalizaban con DCP1A; no se realizó un conteo del tanto por ciento de colocalización. Este resultado nos correlaciona con resultados descritos anteriormente, donde describen que 4E-T puede ser una de las proteínas promotoras de la formación de PBs; a partir de la fosforilación de 4E-T debido al tratamiento con arsénico los PBs van creciendo de tamaño e incorporando otras proteínas como factores de degradación como las “decapping proteins” (DCPs) (Sheth and Parker 2003; Collier and Parker 2004).



**Figura 27: Colocalización del mutante S209D en las líneas celulares MDA-MB-231 y HaCaT con 4E-T.** Inmunofluorescencia de la expresión de 4E-T endógeno (canal rojo) y de la expresión de los dos mutantes de eIF4E marcados con el Myc-tag (canal verde) a un aumento de 60 X. El mutante S209D colocaliza en unos cuerpos citoplasmáticos con 4E-T en las dos líneas celulares; no observándose esta colocalización con el mutante S209A.



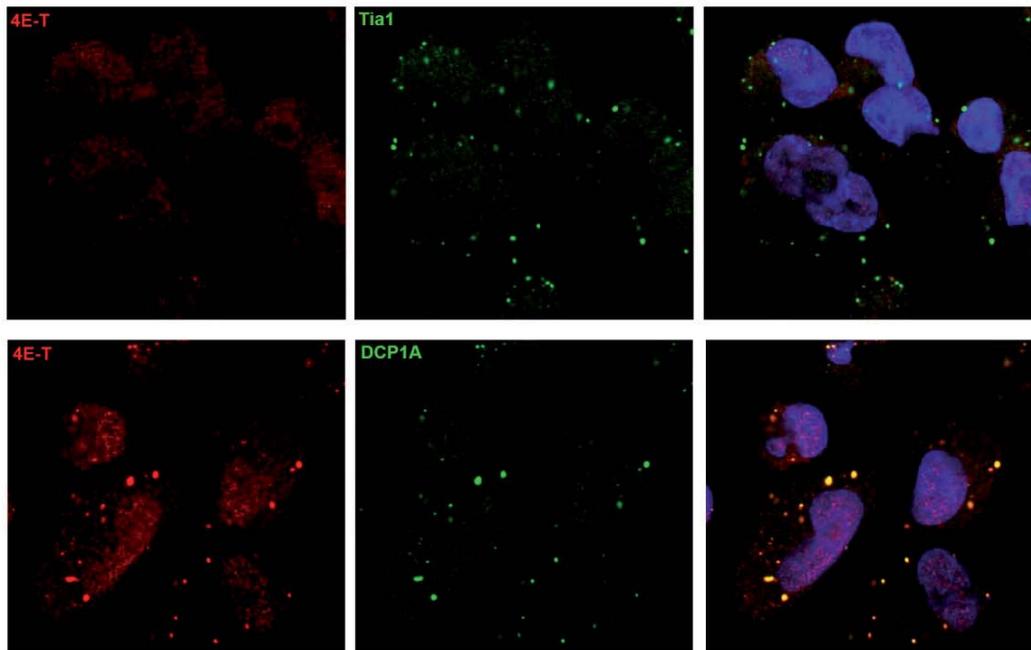
**Figura 28: Inmunoprecipitación de eIF4E y 4E-T.** A) El ensayo de inmunoprecipitación, en MDA-MB-231, con anticuerpo anti-Myc-tag contra eIF4E-S209A y eIF4E-S209D demuestra una específica interacción entre eIF4E-S209D y 4E-T (C: input; CB: control negativo, proteína G sefarosa; IP: inmunoprecipitación). B) Inmunoprecipitación de la línea celular MDA-MB-231 con pelf4E y eIF4E. A la derecha inputs correspondientes al 10 % del lisado total. El tratamiento con arsénico incrementa la fosforilación del eIF4E endógeno e incrementa su interacción con 4E-T, el tratamiento con CGP 57380 reduce esta interacción tanto en condiciones normales como al combinarlo con el tratamiento de arsénico.

### 5.1.1.6 El complejo pelf4E/4E-T interacciona con las proteínas HuR y Ago2

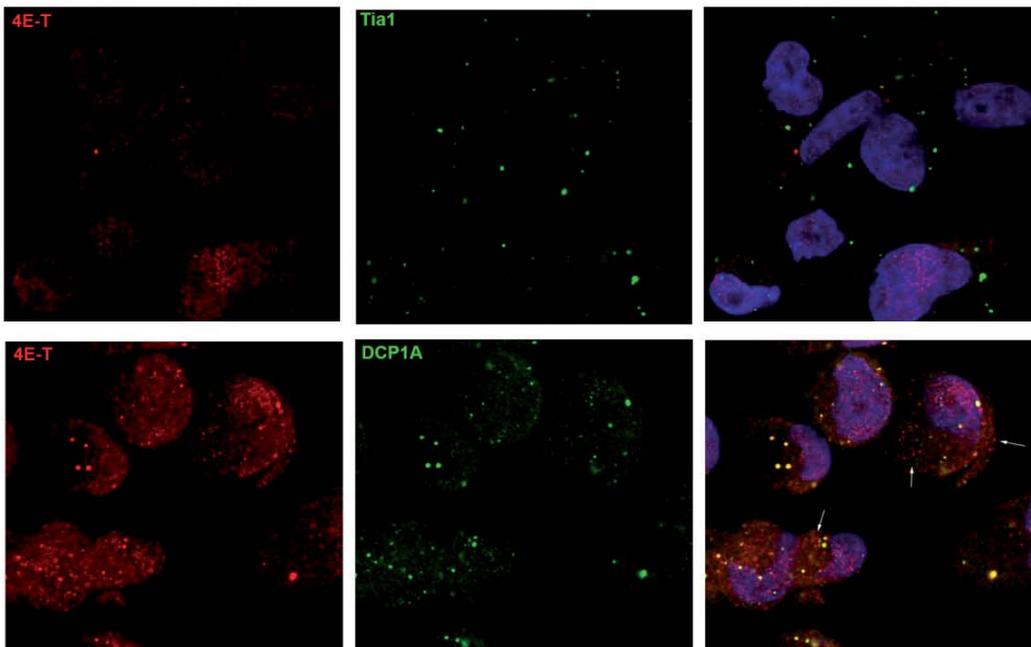
Teniendo en cuenta que tanto eIF4E como 4E-T pueden formar parte de los PBs y conociéndose que estos cuerpos citoplasmáticos son cuerpos móviles, quisimos estudiar si algunas de las proteínas que formaban parte del complejo PBs también interaccionaban con pelf4E/4E-T. Para ello realizamos una inmunoprecipitación con el anticuerpo de Myc-tag y comparamos el mutante S209D y el S209A. Tan solo en con el mutante S209D se observaba unión de este con las proteínas Ago2, HuR y 4E-T (Figura 30A).

Para confirmar que es la fosforilación del eIF4E la que permite la formación de este complejo, realizamos una inmunoprecipitación con Ago2 en condiciones normales, con arsénico e inhibiendo al fosforilación de eIF4E. Observamos que el pelf4E endógeno también se une a Ago2 y Ago2 se une tanto a 4E-T como HuR en condiciones normales y en situaciones de estrés oxidativo; al inhibir la fosforilación de eIF4E mediante el inhibidor CGP 57380 esta unión es inhibida (Figura 30B), indicando que la fosforilación de eIF4E es necesaria para que se forme el complejo.

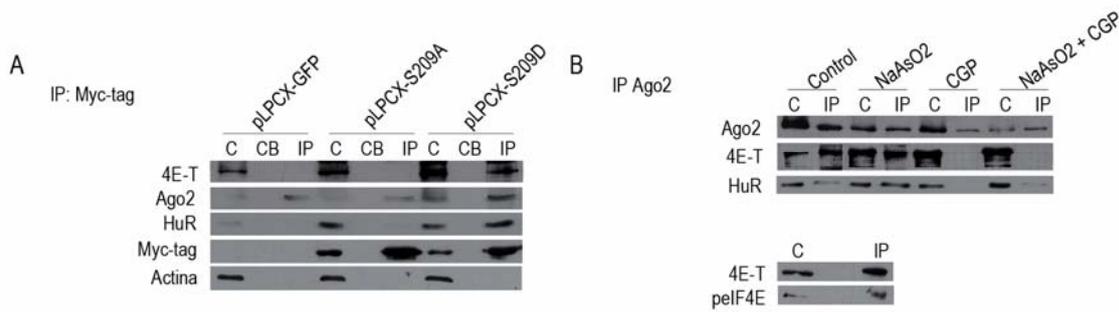
S209A



S209D



**Figura 29: Inmunofluorescencia en la línea celular MDA-MB-231 con la sobreexpresión de eIF4E-S209A y eIF4E-S209D, de 4E-T con los marcadores de GS (TIA-1) y PBs (DCP1A). Tratamiento con NaAsO<sub>2</sub>. Observamos el 4E-T endógeno en el canal rojo y los marcadores de PBs y GS en el canal verde a un aumento de 60 X. Al sobreexpresar el mutante S209D 4E-T no colocaliza con el marcador de GS TIA-1. Observamos una colocalización parcial con DCP1A, marcador de PBs.**



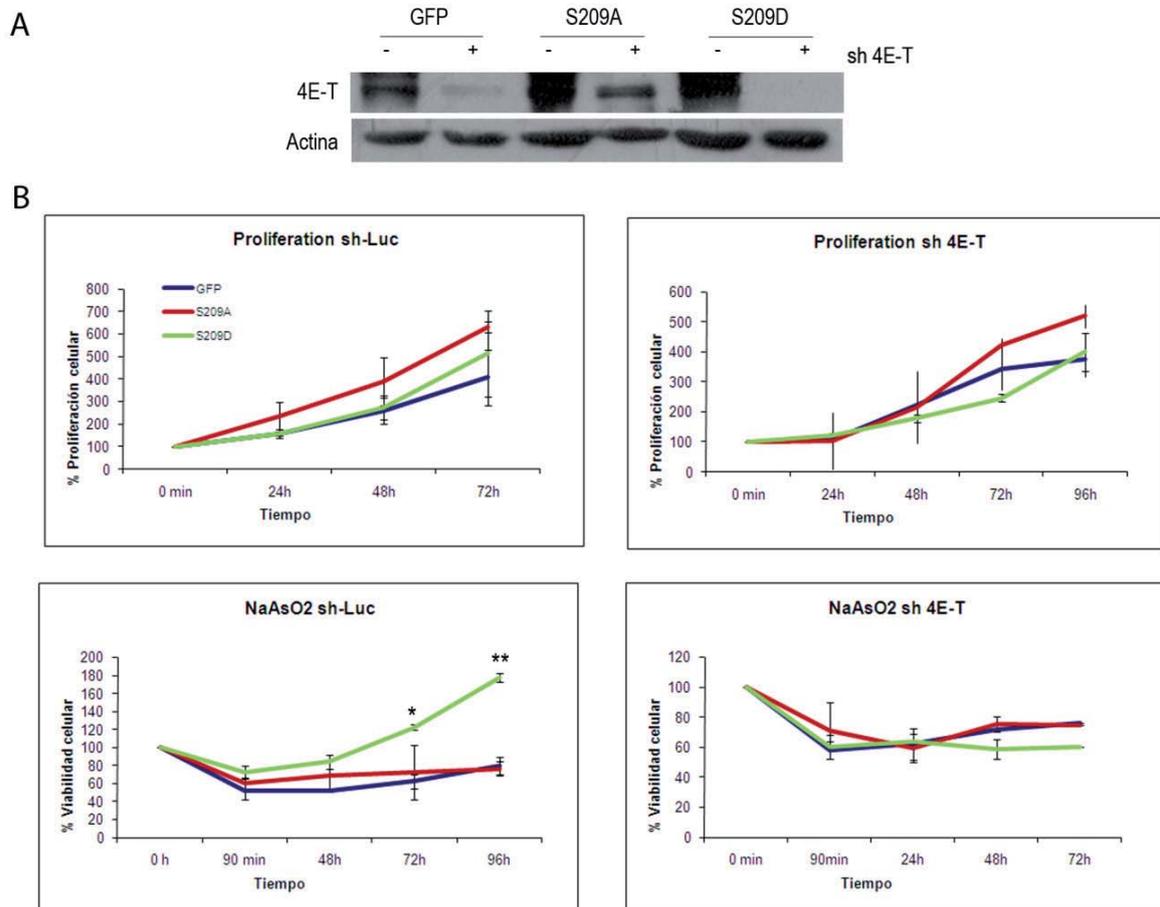
**Figura 30: Inmunoprecipitación de 4E-T, Ago2 y HuR.** En MDA-MB-231. A) Realizamos una inmunoprecipitación de los mutantes de eIF4E mediante el *pull down* del Myc-tag; se observó que tan solo el mutante fosfomimético interaccionaba con Ago2 y HuR (C: input; CB: control negativo, proteína G sefarosa; IP: inmunoprecipitación) B) Inmunoprecipitación anti Ago2, unión con 4E-T, HuR y peIF4E en condiciones normales y con el tratamiento con arsénico, no se observa unión al tratar las células con el inhibidor CGP 57380 tanto en condiciones normales como bajo el estrés producido por el arsénico.

### 5.1.1.7 El complejo peIF4E/4E-T juega un papel importante bajo situaciones de estrés

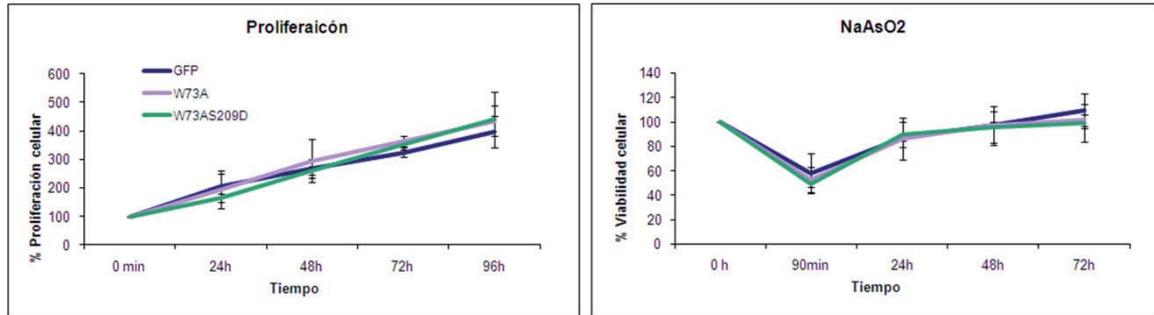
El siguiente paso fue el estudio de la formación del complejo peIF4E/4E-T, quisimos ver si juega un papel importante bajo situaciones de estrés. En primer lugar estudiamos el papel que juega 4E-T en situaciones de estrés. Para ello infectamos la línea celular MDA-MB-231, previamente infectada de manera estable con los mutantes S209A y S209D de eIF4E, con pLKP-sh 4E-T, para inhibir la expresión endógena de 4E-T, y como control pLKO-sh-Luc. Por western blot comprobamos que los niveles endógenos de 4E-T fueron inhibidos tras infectar las células con el sh 4E-T (Figura 31A). Mediante MTT miramos la proliferación celular, no se observó ninguna diferencia significativa entre los mutantes y el control. Para ver el efecto de 4E-T en situaciones de estrés realizamos un ensayo de MTT tratando las células con arsénico y estudiamos la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas. Con el *short hairpin* control, tal y como habíamos visto anteriormente observamos el incremento en la resistencia a estrés en el mutante S209D. Al infectar las células con el sh 4E-T observamos que la recuperación del mutante S209D tras el estrés queda inhibida (Figura 31B), indicando que posiblemente la unión peIF4E/4E-T sea necesaria para que la célula pueda recuperarse tras un estrés.

Para confirmar la importancia de la unión de peIF4E/4E-T en situaciones de estrés, utilizamos dos mutantes de eIF4E diferentes, el eIF4E W73A, incapaz de unirse a eIF4G, 4E-BPs y 4E-T, y el doble mutante eIF4E W73A/S209D, incapaz de unirse a eIF4G, 4E-BPs y 4E-T y fosfomimético (S209D). Al realizar el ensayo de MTT tras el tratamiento con estrés observamos que los dos mutantes tienen una recuperación similar que el control (Figura 32) indicando que es tanto necesaria la fosforilación de eIF4E como su unión a 4E-T para que se pueda dar una recuperación frente a una situación de estrés celular.

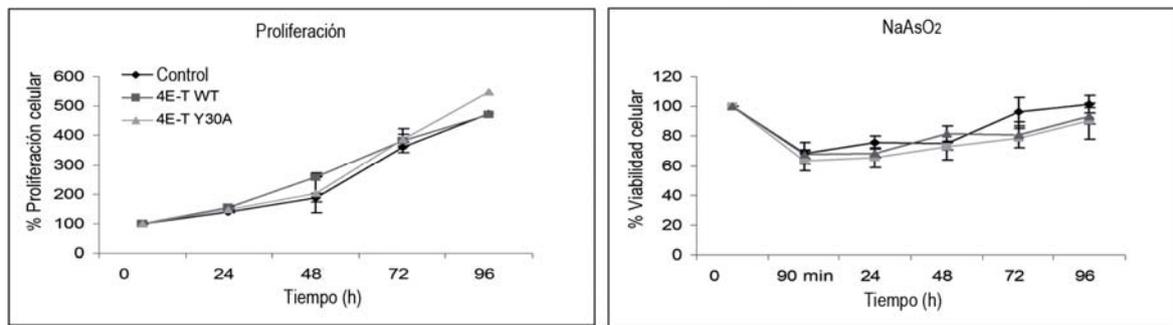
Por otro lado, utilizando un mutante de 4E-T incapaz de unirse a eIF4E, 4E-T Y30A, y sobreexpresando el 4E-T WT, observamos que no hay un incremento en la resistencia celular (Figura 33). Esto nos indica que la sobreexpresión de 4E-T por sí sola no incrementa la recuperación frente a estrés y que es necesaria la unión de 4E-T a pEIF4E para que haya una recuperación celular tras ciertas situaciones de estrés.



**Figura 31: La inhibición de 4E-T endógeno disminuye la capacidad de S209D de recuperarse tras un estrés celular.** A) Western blot de 4E-T en los mutantes de eIF4E con el sh 4E-T. Observamos una inhibición elevada de la expresión endógena de 4E-T en el control GFP y el mutante S209D, con el mutante S209A la inhibición de 4E-T no resulta tan elevada. B) No observamos diferencias en la proliferación celular entre los diferentes mutantes de eIF4E y el control al inhibir la expresión del 4E-T endógeno. La inhibición de 4E-T disminuye la capacidad del mutante S209D de recuperarse tras el tratamiento con arsénico. Significativo si \* $<0,05$  y \*\* $<0,01$ .



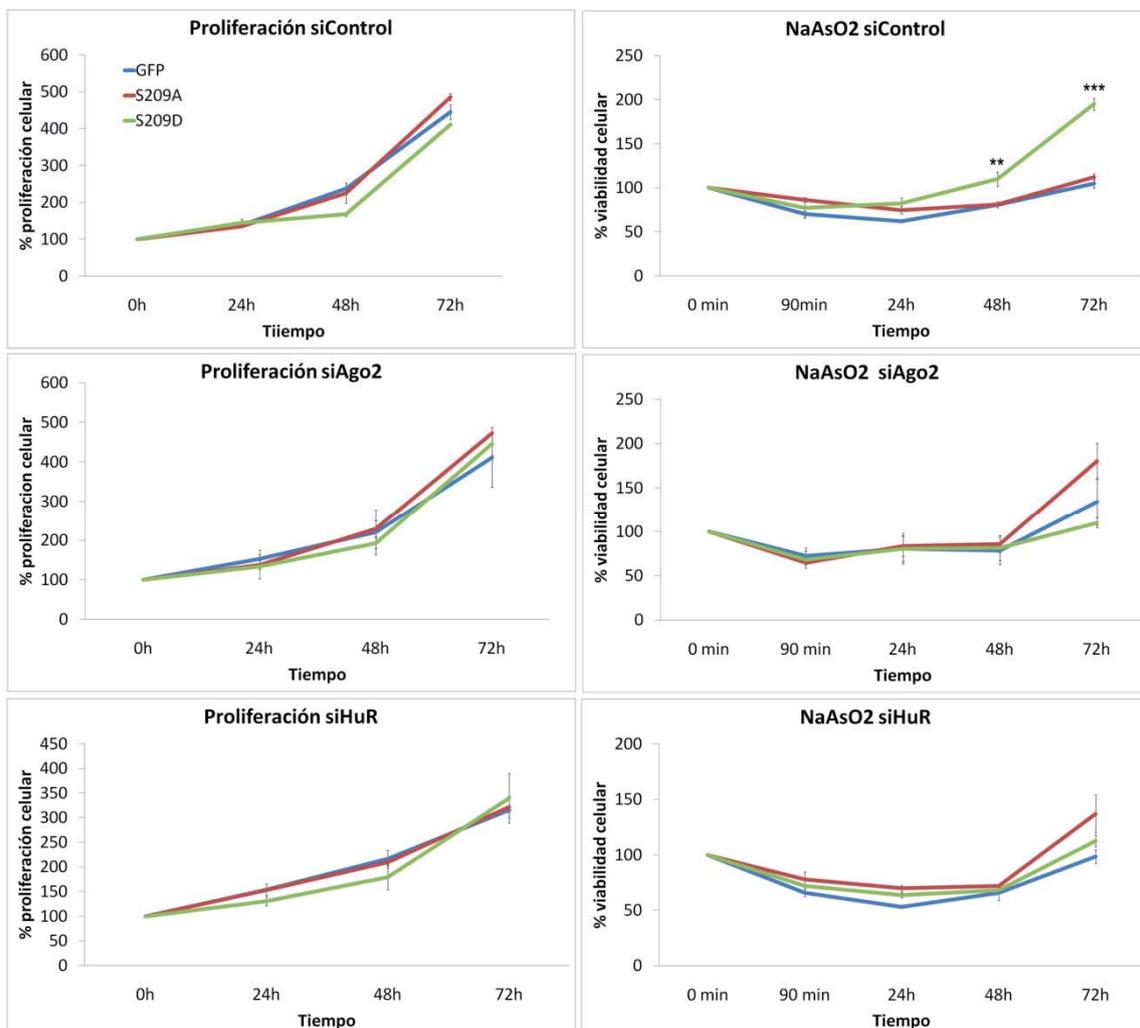
**Figura 32:** Es necesaria la unión de eIF4E a 4E-T y que eIF4E esté fosforilado para que se dé la recuperación tras el estrés celular. El mutante de eIF4E incapaz de unirse a 4E-T inhibe la recuperación tras el tratamiento con arsénico. El doble mutante incapaz de unirse a 4E-T y fosfomimético también inhibe la recuperación tras el estrés.



**Figura 33:** 4E-T por sí solo no permite la recuperación celular tras el tratamiento con arsénico. Tanto la sobreexpresión de 4E-T como de su mutante incapaz de unirse a eIF4E no favorecen la recuperación celular tras el tratamiento con arsénico.

### 5.1.1.8 Ago2 y HuR juegan un papel importante junto al complejo peIF4E/4E-T en la recuperación celular

Para saber si las proteínas Ago2 y HuR, las cuales inmunoprecipitan con el mutante S209D y con 4E-T juegan un papel importante en la recuperación celular tras el tratamiento con arsénico, inhibimos sus niveles endógenos de expresión en los dos mutantes y tratamos las células con arsénico (Figura 34). Observamos que tanto al inhibir Ago2 como HuR, el mutante S209D era incapaz de recuperarse tras el tratamiento con arsénico, indicándonos que estas dos proteínas que forman parte del complejo peIF4E/4E-T, son importantes para la recuperación tras un estrés celular.



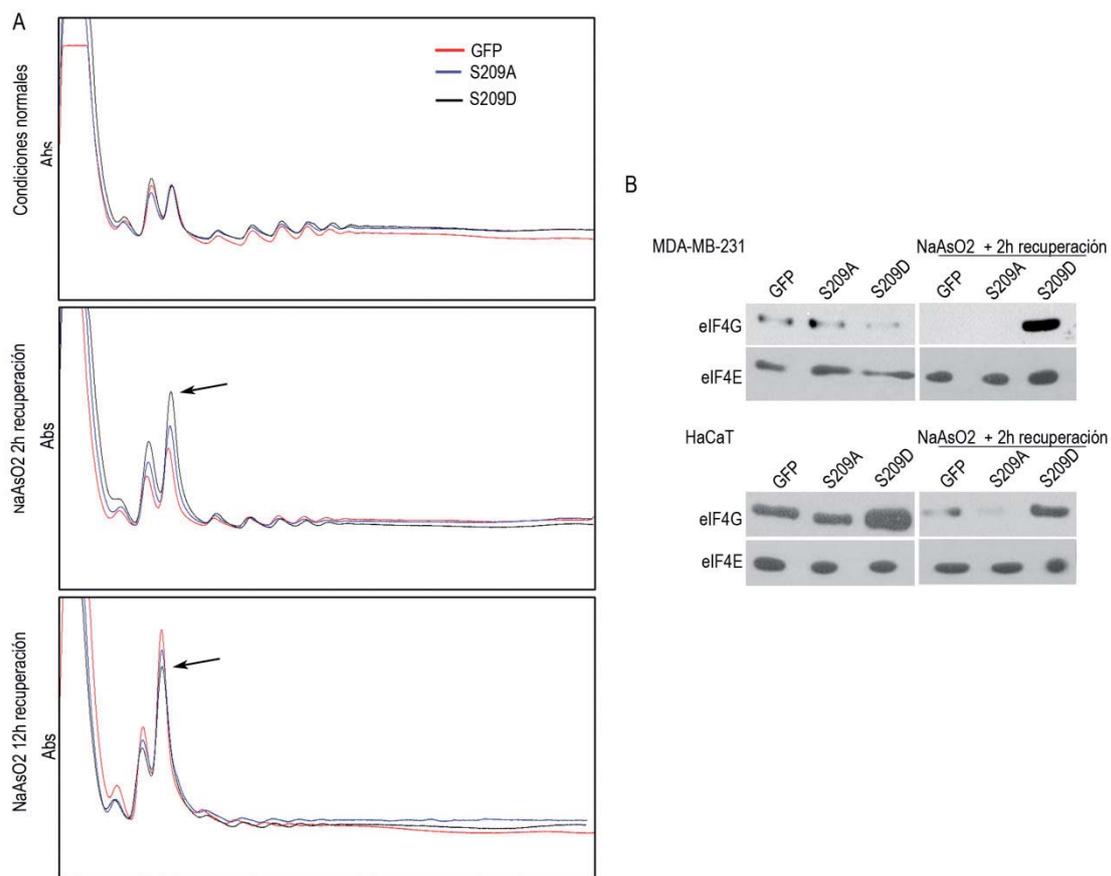
**Figura 34: La inhibici3n de Ago2 y HuR evita la recuperaci3n celular del mutante S209D tras el tratamiento con ars3nico.** Mediante el ensayo de MTT observamos que la proliferaci3n de la lnea celular MDA-MD-231 al utilizar un siRNA control no se ve afectada en ninguno de los mutantes de eIF4E ni en su control GFP. Al inhibir Ago2 y HuR mediante su siRNA no se observa una recuperaci3n del mutante S209D tras el tratamiento con ars3nico. Significativo si \*\*<0,01 y \*\*\*<0,001.

### 5.1.1.9 El mutante S209D de eIF4E media la sntesis proteica de ciertas prote3nas tras el estr3s.

eIF4E es un factor limitante de la regulaci3n de ciertos mRNAs. Viendo la recuperaci3n tras el estr3s en las c3lulas infectadas con el mutante S209D, quisimos ver si este mutante favorec3a un aumento en la sntesis proteica. Para ello realizamos un perfil polis3mico de los dos mutantes y el control en la lnea celular MDA-MB-231. Al realizar el perfil polis3mico medimos la cantidad de mRNA unida a ribosomas, esto nos indica los niveles de traducci3n en cada una de las condiciones. En condiciones normales, los dos mutantes y el control tienen un perfil polis3mico parecido, indicndonos una similitud en los niveles de traducci3n, no se ve un incremento de la traducci3n global al sobreexpresar los mutantes de eIF4E. Dos horas tras el tratamiento con ars3nico observamos un incremento en el pico 80 S, siendo m3s elevado en el mutante S209D, indicando una r3pida parada de la sntesis proteica. Doce horas despu3s del

tratamiento con arsénicos, el pico correspondiente al 80 S en las células que expresan el mutante S209D se mantiene, por el contrario se observa un incremento en el caso del mutante S209A y GFP en comparación con el mutante S209D (Figura 35A). Estos resultados pueden indicar que las células que expresan el mutante S209D de eIF4E son capaces de parar la síntesis proteica global, de forma moderada, posiblemente permitiendo la traducción de ciertas proteínas capaces de permitir la recuperación tras una situación de estrés.

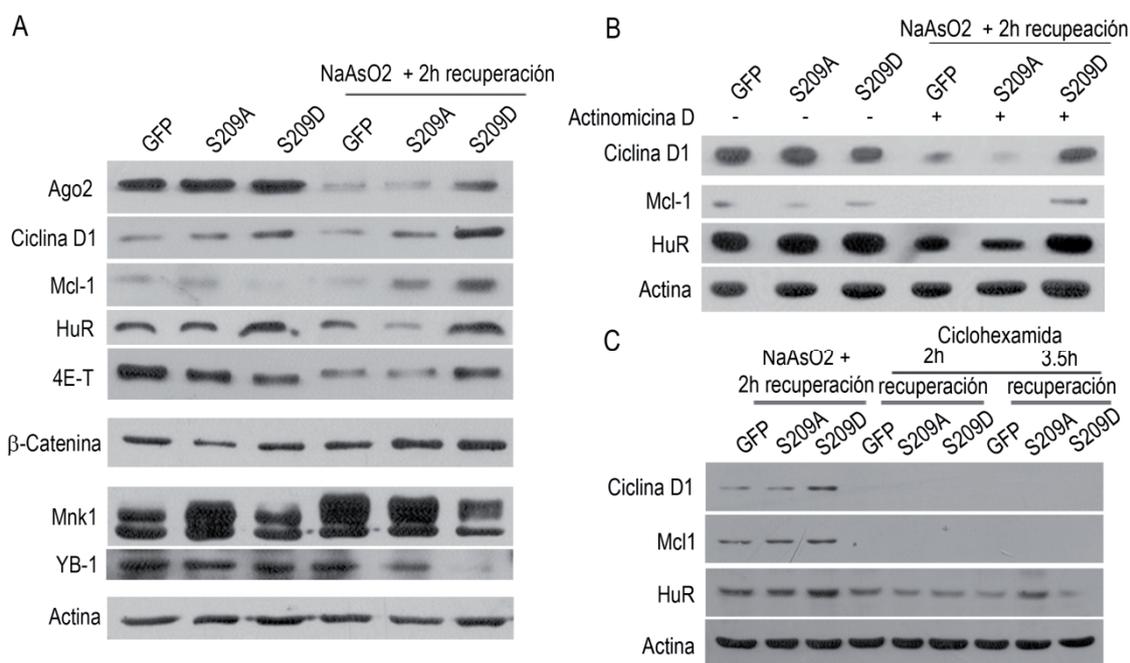
Mediante el ensayo *m7 GTP pull-down* observamos, tanto en la línea celular HaCaT como en la MDA-MB-231, una mayor recuperación de la unión del cap-mRNA con eIF4E tras el tratamiento con arsénico en las células que expresaban el mutante S209D de eIF4E (Figura 35B).



**Figura 35: eIF4E-S209D inhibe rápidamente la síntesis proteica tras el tratamiento con arsénico.** A) Análisis polisómico, por triplicado, de la línea celular MDA-MB-231 muestra que el mutante S209D, pero no el S209A o GFP, induce un incremento en el pico 80 S a las dos horas del tratamiento con arsénico. Doce horas después del tratamiento el pico 80 S en el mutante S209D se ve mantenido, y más incrementado en el mutante S209A y GFP. B) Ensayo *m7-GTP pull down* en condiciones normales y dos horas tras el tratamiento con arsénico indica que el mutante S209D se asocia con el cap-mRNA y eIF4G.

Para validar si la fosforilación de eIF4E media la síntesis de ciertas proteínas bajo situaciones de estrés, realizamos un estudio de ciertas proteínas por western blot en condiciones normales y 2 horas después del tratamiento con arsénico. La sobreexpresión del mutante S209D, pero no del S209A o el control GFP, causa un incremento en el nivel de ciertas proteínas dos horas después del tratamiento con arsénico. Algunas de las proteínas están implicadas en la resistencia a apoptosis, Mcl-1, o en la progresión del ciclo celular, Ciclina D1; 4E-

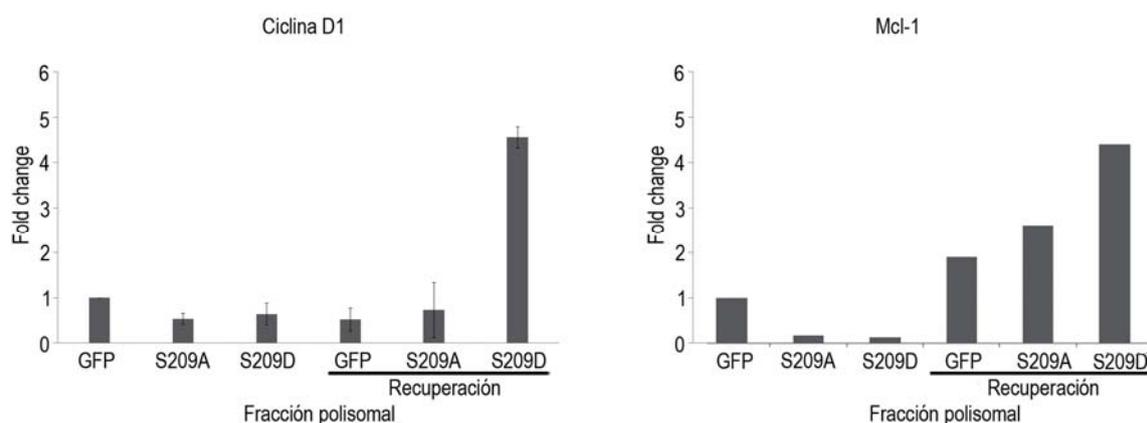
T, HuR y Ago2, que formarían parte del complejo, también se ven incrementadas. Otras proteínas como YB-1 o Mnk1 ven disminuidos sus niveles en comparación con el control GFP o el mutante S209A después de dos horas del tratamiento con arsénico (Figura 36A). Esto podría indicar una traducción selectiva de ciertas proteínas implicadas en la proliferación celular y la apoptosis. Para excluir la posibilidad de que el mutante S209D incrementa los niveles proteicos de ciertas proteínas de forma transcripcional, las células fueron tratadas con actinomicina D (inhibidor de la transcripción) durante 6 horas mientras se realizaba el tratamiento con arsénico y la recuperación. El mutante S209D previene la pérdida de los niveles proteicos de Ciclina D, Mcl-1 y HuR (Figura 36B), sugiriendo una regulación post-transcripcional. Para asegurarnos que este aumento de ciertas proteínas, a las dos horas después del estrés del mutante S209D con respecto al S209A o el control, no es debido a una estabilidad de los niveles iniciales de las proteínas, tratamos con ciclohexamida, la cual inhibe la síntesis proteica. Observamos que los niveles de Ciclina D1 y Mcl-1 no se veían incrementados después del tratamiento con estrés (Figura 36C), esto nos indica que no hay una estabilización proteica, sino que hay un aumento en la síntesis proteica de estas proteínas o no se produce el bloqueo de su síntesis.



**Figura 36: Se observa un incremento de la síntesis proteica en células que sobreexpresan el mutante S209D.** A) Mediante western blot se observa un incremento de los niveles proteicos de Ago2, Ciclina D1, Mcl-1, HuR y 4E-T, en el mutante S209D a las dos horas tras el tratamiento con arsénico, por el contrario hay una disminución en los niveles de Mnk1 y YB-1. B) Tratamiento con actinomicina D durante 6 horas en condiciones normales y dos horas después del tratamiento con arsénico, se observa una ventaja selectiva del mutante S209D en mantener los niveles proteicos de Ciclina D1, Mcl-1 y HuR tras el tratamiento con arsénico. C) El tratamiento con ciclohexamida tras el tratamiento con arsénico muestra que los niveles de proteína de Ciclina D1 y Mcl-1 están sujetos a regulación post-transcripcional.

Para acabar de validar estos datos, realizamos un análisis mediante Q-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) del mRNA extraído de las fracciones polisómicas antes y después del tratamiento de estrés. Realizamos el estudio de los niveles de RNA de Ciclina D1 y

de Mcl-1, los cuales habíamos visto aumentado a nivel proteico con el mutante S209D después de dos horas del estrés con arsénico. Tanto en los niveles de Ciclina D1 como de Mcl-1 observamos que hay un aumento de mRNA en la fracción polisomal, con respecto al control GFP en condiciones normales, en el caso del mutante S209D tras la recuperación después del estrés celular (Figura 37).

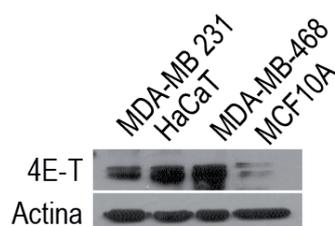


**Figura 37: Q-PCR del mRNA de Ciclina D1 y Mcl-1 de la fracción polisomal.** Análisis por Q-PCR del RNA polisomal, indica que el mutante S209D permite un incremento de la traducción de Ciclina D1 y Mcl-1 tras la recuperación después del estrés producido por el arsénico. La Q-PCR de la Ciclina D1 ha sido realizada por triplicado, obteniendo unos resultados significativos. La Q-PCR de Mcl-1 ha sido reproducida tan solo una vez.

## 5.2 Estudio *in vitro* de la función de eIF4E-Transporter (4E-T)

Poco es conocido de la función del transportador de eIF4E (4E-T). Tras observar una correlación positiva en la serie clínica de tumores de mama estudiada con N-cadherina (ver apartado 5.4 *4E-T en cáncer de mama*), decidimos realizar un estudio *in vitro* del efecto de 4E-T tanto en células tumorales como en células normales immortalizadas.

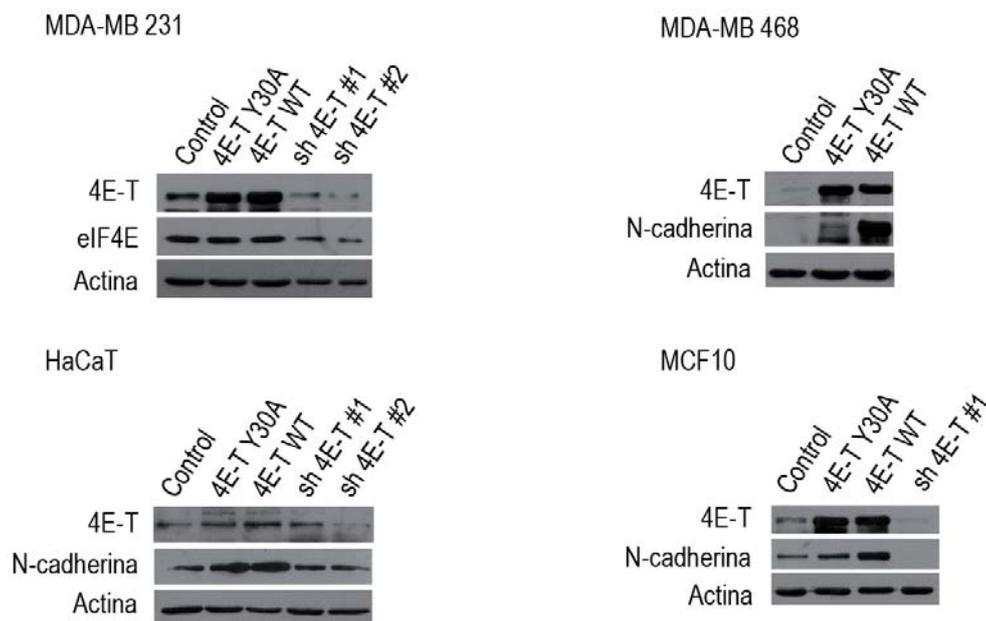
Primeramente miramos los niveles de expresión de 4E-T en cada una de las líneas celulares de estudio, MDA-MB-231, MDA-MB-468, HaCaT y MCF10A (Figura 38). Los niveles más elevados los encontramos en la línea celular tumoral MDA-MB-468 y en la línea celular de queratinocitos immortalizados HaCaT. En las líneas celulares de mama altos niveles de 4E-T se expresaban en las líneas más tumorigénicas (MDA-MB-231 y MDA-MB-468), encontrando niveles más reducidos en la línea celular MCF10A, línea no tumorigénica.



**Figura 38: Niveles basales de 4E-T en las diferentes líneas celulares.**

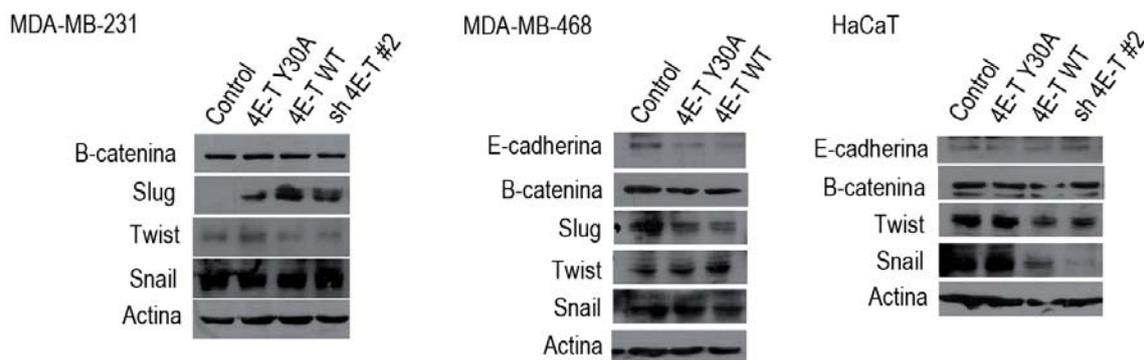
Para poder estudiar su efecto infectamos las diferentes líneas celulares con retrovirus que sobreexpresaban la forma *wild type* (WT) de 4E-T, así como su mutante 4E-T Y30A (incapaz de unirse a eIF4E) y su control de transfección con el vector vacío. Para ver el efecto de la inhibición de 4E-T utilizamos dos *short hairpin* de 4E-T (sh 4E-T) y como control el vector de transfección vacío.

Tras infectar las líneas celulares con 4E-T, 4E-T Y30A y sh 4E-T corroboramos por western blot la sobreexpresión y la inhibición de 4E-T en las cuatro líneas celulares. También se miraron los niveles de N-cadherina que correlacionaban positivamente con 4E-T en la serie clínica de mama estudiada (Figura 39). En las cuatro líneas celulares se observa un incremento de los niveles de 4E-T al sobreexpresar el mutante de 4E-T Y30A y su forma WT con respecto a los niveles endógenos de la línea parental. La inhibición mediante los dos sh 4E-T se observa de forma clara en la línea celular MDA-MB-231, siendo más efectivo el sh 4E-T #2; en el caso de la línea celular HaCaT el sh 4E-T#1 no parece afectar a los niveles endógenos de 4E-T, con el sh 4E-T#2 si vemos una disminución de los niveles endógenos de 4E-T. En el caso de la línea celular MDA-MB-468 no fue posible la infección con los sh 4E-T, las células no sobrevivían tras inhibir 4E-T. Observamos que en las líneas celulares MDA-MB-468, HaCaT y MCF10A al sobreexpresar 4E-T, tanto su forma mutante como su forma *wild type*, hay un incremento de los niveles basales de N-cadherina. En la línea celular MDA-MB-231 no podemos detectar los niveles de N-cadherina ya que tienen el promotor metilado y no la expresan.



**Figura 39: La sobreexpresión de 4E-T incrementa los niveles de N-cadherina.** En las cuatro líneas celulares se observa un incremento en la expresión de 4E-T al sobreexpresar su forma WT y su mutante 4E-T Y30A. En MDA-MB-231 observamos la inhibición de 4E-T con los dos sh 4E-T de estudio, siendo más eficiente el sh 4E-T#2, en el caso de la línea celular HaCaT tan solo el sh 4E-T #2 inhibe la expresión endógena de 4E-T. La sobreexpresión de 4E-T incrementa los niveles endógenos de N-cadherina de MDA-MB-468, HaCaT y MCF10A.

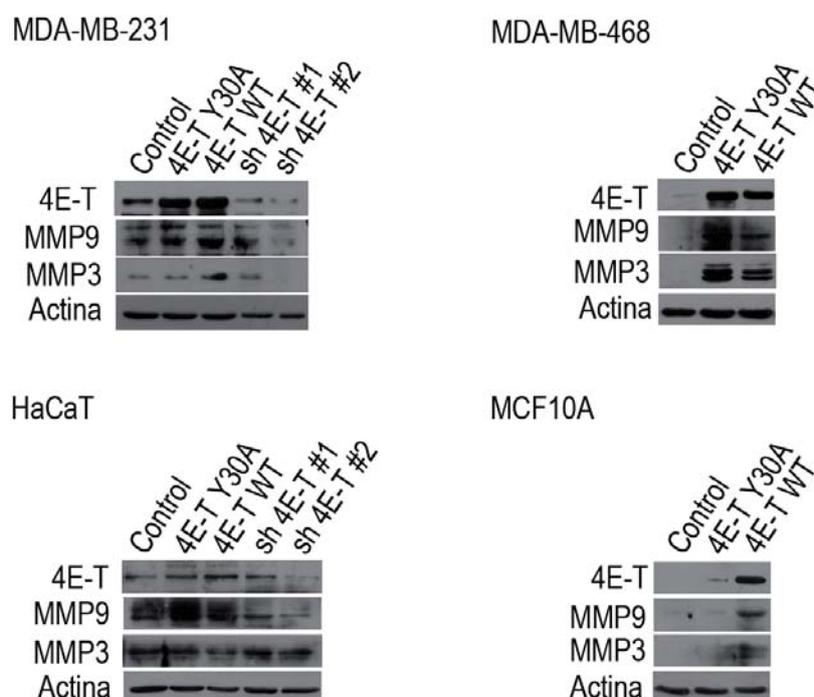
Debido a que el incremento de N-cadherina esta correlacionado con la transición epitelio-mesénquima (EMT) decidimos realizar un estudio de diferentes proteínas implicadas en este proceso, entre ellas analizamos los niveles de Slug, Twist y Snail, marcadores mesenquimales, y de E-cadherina y  $\beta$ -catenina, marcadores epiteliales. (Figura 40). Observamos una disminución de los niveles de E-cadherina en la línea celular MDA-MB-468, lo cual corresponde con artículos publicados anteriormente donde describen el switch entre N-cadherina y E-cadherina (Hazan, Qiao et al. 2004), confiriendo más capacidad migratoria e invasora (Buendia, Penafiel-Verdu et al. 2013; Breier, Grosser et al. 2014). El switch visto entre E-cadherina y N-cadherina se ha descrito que está implicado en la transición epitelio mesénquima (Leopold, Vincent et al. 2012). Con respecto a los otros marcadores de EMT observamos que no había ninguna correlación al sobreexpresar 4E-T con factores mesenquimales como Slug, Twist o Snail en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y HaCaT, y estos factores no se veían downregulados con el sh 4E-T en MDA-MB-231 y HaCaT; los niveles de los diferentes marcadores de EMT estudiados variaban según línea celular al sobreexpresar o downregular 4E-T. Por otro lado,  $\beta$ -catenina, un marcador epitelial, no veía modificada su expresión ni con la sobreexpresión de 4E-T Y30A, ni 4E-T WT ni con el sh 4E-T#2 (Figura 40). Estos resultados nos indicarían que el incremento de N-cadherina no está correlacionado con el proceso de EMT.



**Figura 40: Los marcadores de EMT Slug, Twist y Snail no se ven aumentados por la sobreexpresión de 4E-T.** En la línea celular MDA-MB-231 se observa un incremento de Slug tanto al sobreexpresar como al inhibir 4E-T, por el contrario Twist se encuentra downregulado; no se observa variación en el caso de Snail; en el caso de la  $\beta$ -catenina no se ven afectados sus niveles. En MDA-MB-468 se observa una downregulación de Slug al sobreexpresar 4E-T, en cambio Twist incrementa al sobreexpresar 4E-T; Snail no se ve afectado;  $\beta$ -catenina mantiene los mismos niveles de expresión y E-cadherina se ve disminuida al sobreexpresar WT 4E-T. En la línea celular HaCaT observamos una downregulación de Twist y Snail tanto al sobreexpresar 4E-T como al inhibirlo; los niveles de  $\beta$ -catenina y E-cadherina no se ven modificados en ninguna de las condiciones.

El incremento de N-cadherina se ha descrito que resulta en un incremento de la migración y la invasión celular, esto puede ser producido por la interacción de N-cadherina con FGF (Factor de crecimiento de fibroblastos), dicha interacción incrementa la actividad de metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y permite la invasión a otros tejidos (Gradl, Kuhl et al. 1999; Hult, Suyama et al. 2007). Para estudiar si el aumento de N-cadherina al sobreexpresar 4E-T puede estar relacionado con un incremento de la invasión celular vía un incremento de las metaloproteinasas, realizamos un western blot de las diferentes líneas

celulares para observar los niveles de MMP9 y MMP3 (Figura 41). Observamos que hay una correlación positiva entre 4E-T y MMP9, viéndose un aumento significativo al sobreexpresar 4E-T y una disminución al inhibir 4E-T en el caso de las líneas celulares MDA-MB-231 y HaCaT. En el caso de la MMP3 esta correlación se observa en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF10A, en el caso de la línea celular HaCaT no se observa diferencia ni al sobreexpresar ni al inhibir 4E-T.



**Figura 41: La sobreexpresión de 4E-T incrementa los niveles de MMP9 y MMP3.** En las cuatro líneas celulares de estudio se observa un incremento de MMP9 al sobreexpresar 4E-T, viéndose reducido al inhibir 4E-T en las líneas celulares MDA-MB-231 y HaCaT. MMP3 se ve incrementado al sobreexpresar 4E-T en MDA-MB-231, MDA-MB-468 y MCF10A; en el caso de la línea celular HaCaT no se ven diferencias ni al sobreexpresar ni al inhibir 4E-T con respecto al control. Lisados de las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 y HaCaT correspondientes al mismo western blot de la figura 39.

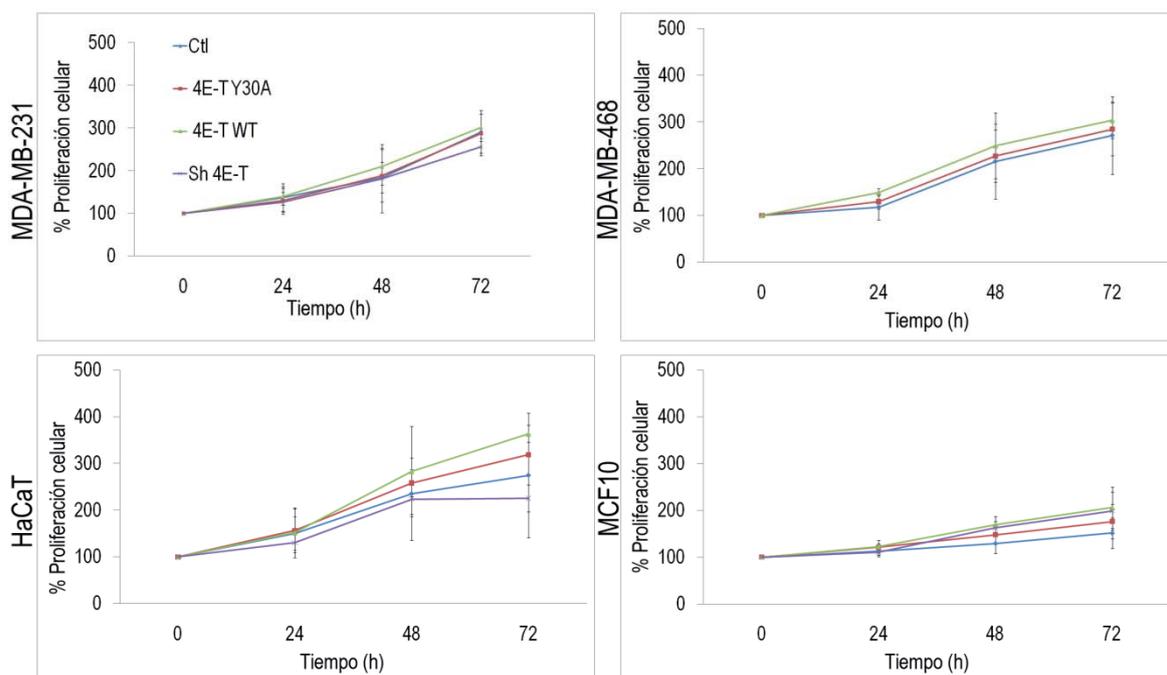
Para ver si su sobreexpresión u inhibición tenía algún efecto en la proliferación celular, realizamos ensayos de MTT en condiciones normales, realizando una lectura a las 24, 48 y 72 horas (Figura 42). No se observó ninguna diferencia significativa al sobreexpresar 4E-T o con el mutante que no se une a eIF4E (4E-T Y30A) o al inhibir la expresión de 4E-T con el sh 4E-T con respecto al control.

### 5.2.1 La sobreexpresión de 4E-T incrementa la migración y la invasión celular

Al haber una correlación positiva en la serie clínica entre N-cadherina y 4E-T, así como con otros factores implicados en el aumento de la capacidad invasora o migratoria, como YB-1, (ver capítulo 5.4 *4E-T en cáncer de mama*) nos preguntamos qué papel juega 4E-T en este proceso. Para ello realizamos diferentes estudios de migración e invasión.

Primeramente comparamos la sobreexpresión de 4E-T con respecto a su control en las cuatro líneas celulares. El análisis de la migración fue realizado mediante el ensayo de cierre de

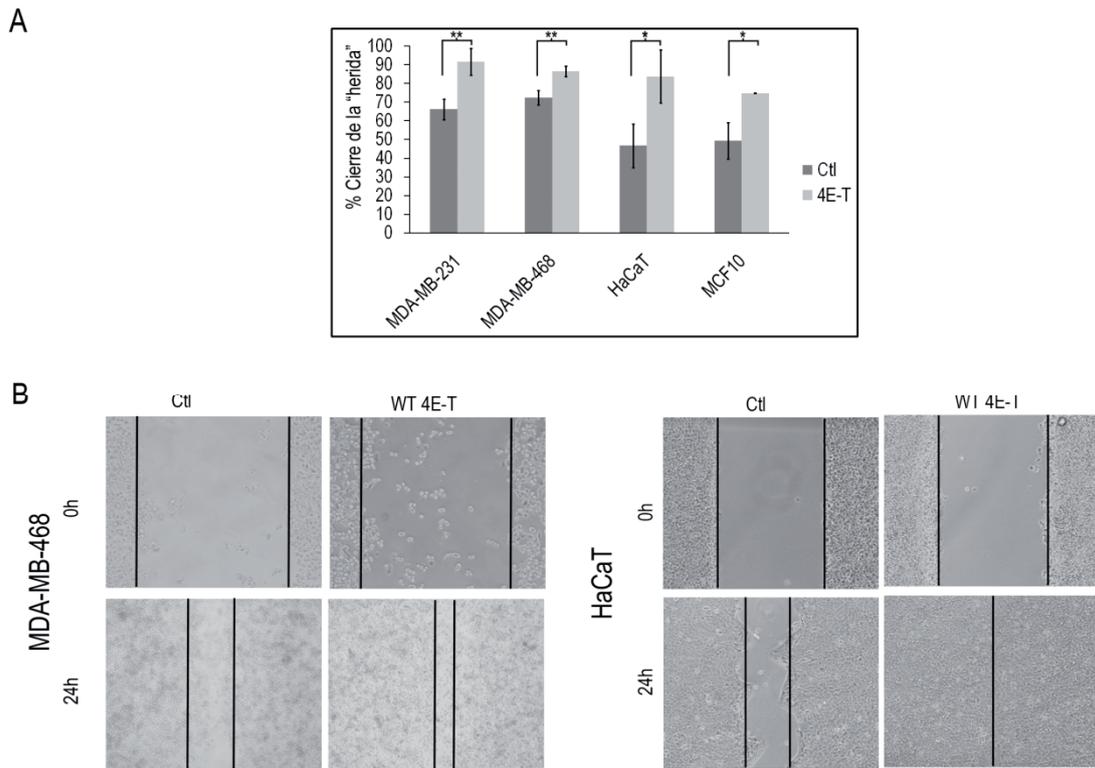
“herida” (*wound healing assay*). Inhibiendo la proliferación con mitomicina C se analizó la capacidad migratoria de las células a las 24 horas. En las cuatro líneas celulares de estudio se observó un incremento significativo de la migración al sobreexpresar el 4E-T, siendo más significativa en el caso de las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-468, líneas tumorales de mama; y con una significancia menor en el caso de las líneas HaCaT y MCF10A, líneas celulares normales inmortalizadas (Figura 43A). El avance de la migración celular fue observado mediante un microscopio tomando fotos a las 0 y 24 horas y calculando el avance de la migración con respecto a su control a las 0 horas. Visualmente se observa el avance de la migración en todos los casos a las 24 horas (Figura 43B).



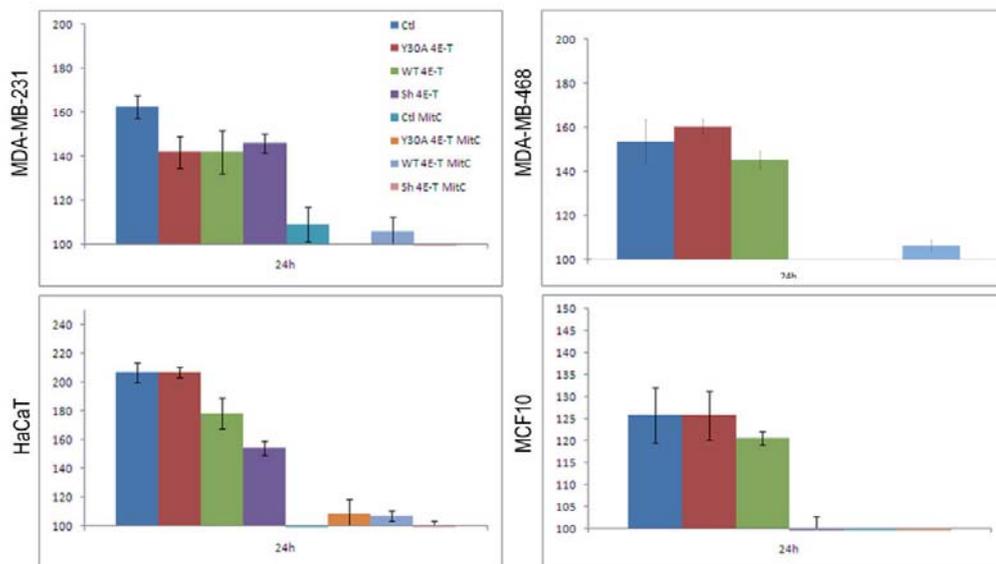
**Figura 42: Ensayo de proliferación celular mediante MTT del mutante de 4E-T Y30A, 4E-T WT y sh 4E-T.** No revela una diferencia significativa entre la sobreexpresión de 4E-T, el mutante 4E-T Y30A, el sh 4E-T y el control en ninguna de las cuatro líneas de estudio.

Para confirmar que realmente con el tratamiento con mitomicina C no hubiese proliferación celular y, por lo tanto, los resultados obtenidos en el ensayo de cierre de la “herida” fuesen debido a migración celular y no a proliferación, realizamos un MTT para ver si había una parada de la proliferación celular durante las 24 horas del experimento de migración (Figura 44). Observamos que en las cuatro líneas celulares de estudio al tratar con mitomicina C había una inhibición de la proliferación celular.

Para realizar el análisis de invasión se utilizaron cámaras de Boyden cubiertas con matrigel, a las 24 horas de la siembra de las células fueron contadas el número de células invasivas mediante un microscopio de fluorescencia tras su tinción con Hoetch. Se realizó la media de cuatro campos en cada uno de los casos. La sobreexpresión de 4E-T confiere más capacidad invasiva que respecto al control, siendo está más significativa que en el caso de la migración (Figura 45). En líneas celulares como HaCaT o MCF10A, en las cuales en condiciones normales no se observa invasión, al sobreexpresar 4E-T las células se volvían más invasivas.

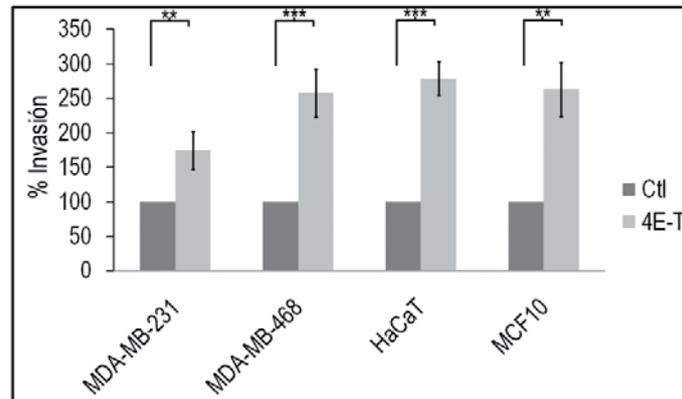


**Figura 43: La sobreexpresión de 4E-T confiere más capacidad migratoria.** A) Análisis de la media de tres ensayos de migración de la sobreexpresión de 4E-T con respecto al control en las cuatro líneas celulares, la sobreexpresión de 4E-T incrementa la invasión celular en las cuatro líneas de estudio. B) Imagen capturada del proceso de migración a las 0 y 24 horas en las líneas celulares MDA-MB-468 y HaCaT. Significativo si \* <0,05 y \*\* < 0,01.

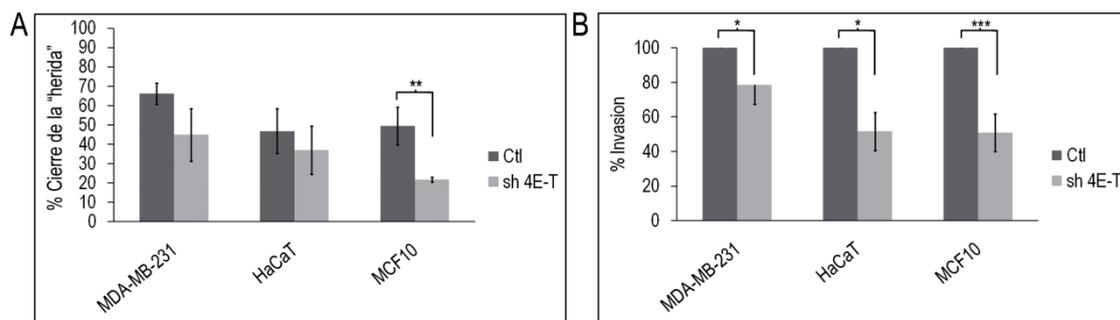


**Figura 44: MTT a las 24 horas con mitomicina C.** Se observa una parada de la proliferación a las 24 horas después del tratamiento con mitomicina C.

Para confirmar que la sobreexpresión de 4E-T confiere un aumento en la capacidad invasiva y migratoria, se realizó el mismo ensayo con un *short hairpin* para inhibir la expresión de 4E-T. En el caso del ensayo de migración se observó una disminución en la migración tan solo siendo significativa en el caso de las MCF10A y no en el caso de las líneas celulares MDA-MB-231 y HaCaT (Figura 46A). No se obtuvieron resultados con la línea celular MDA-MB-468 ya que no pudo ser infectada con el sh 4E-T. En el ensayo de invasión la inhibición del 4E-T endógeno se ve reflejada con una disminución en la capacidad invasiva de las células, siendo esta significativa en las tres líneas celulares de estudio (Figura 46B).



**Figura 45: La sobreexpresión de 4E-T confiere más capacidad invasiva.** Análisis del ensayo de invasión en las cuatro líneas celulares de estudio. La sobreexpresión de 4E-T incrementa la capacidad invasiva de las cuatro líneas celulares de estudio. Significativo si \*\*< 0,01 y \*\*\*<0,001.



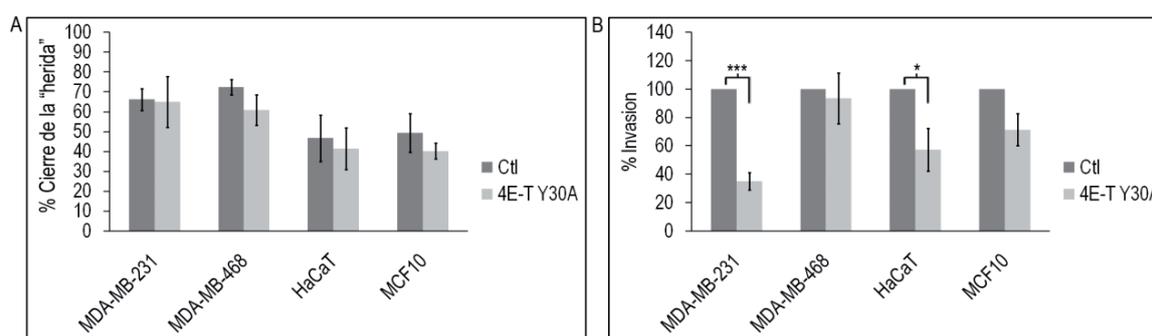
**Figura 46: La inhibición del 4E-T endógeno disminuye la capacidad migratoria e invasiva de las células.** A) Ensayo de migración, reducción de la migración con el sh 4E-T no significativo en el caso de MDA-MB-231 y HaCaT y significativo en el caso de las MCF10A. B) Ensayo de invasión, reducción de la capacidad invasiva al inhibir 4E-T en las tres líneas celulares mediante el sh 4E-T. Significativo si \* <0,05, \*\*< 0,01 y \*\*\*<0,001.

### 5.2.2 Se requiere la unión 4E-T /eIF4E para que se produzca un incremento en invasión y migración

Como hemos comentado anteriormente la unión eIF4E/4E-T es conocida, estando publicado hasta el momento la función de 4E-T de transportar eIF4E a núcleo y su unión en los PBs. Es conocida la implicación de la sobreexpresión de eIF4E en el incremento de la migración y

la invasión celular (Zimmer, DeBenedetti et al. 2000; Li, Fan et al. 2012) así como que su downregulación disminuye la migración y la invasión (Zhou, Yan et al.). Por ello quisimos comprobar si esta unión era necesaria para la capacidad invasiva y migratoria de 4E-T.

Para ello utilizamos el mutante 4E-T Y30A incapaz de unirse a eIF4E. La sobreexpresión de dicho mutante no incrementa la capacidad migratoria en ninguna de las cuatro líneas celulares de estudio (Figura 47A), se ve una tendencia a la disminución de la migración siendo esta no significativa. En el caso de la invasión la sobreexpresión de 4E-T Y30A no incrementa la capacidad invasiva (Figura 47A); se observa también una reducción en la invasión de las cuatro líneas celulares, siendo significativa en el caso de la línea celular MDA-MB-231 y las HaCaT. Estos resultados nos confirman que la unión 4E-T/eIF4E probablemente es necesaria para que se dé un incremento de la migración e invasión al sobreexpresar 4E-T.

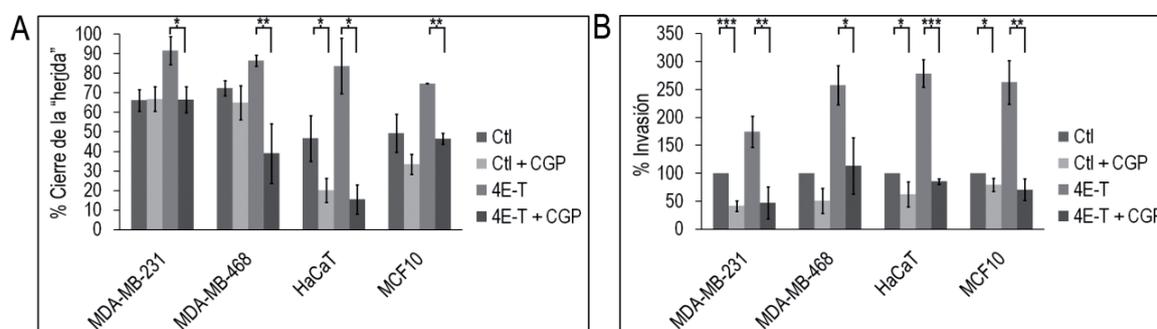


**Figura 47: La unión de 4E-T y eIF4E es necesaria para el incremento en migración e invasión debido a 4E-T.** A) Ensayo de migración, la sobreexpresión del mutante Y30A no incrementa la capacidad migratoria en ninguna de las cuatro líneas de estudio. B) Ensayo de invasión, la sobreexpresión del mutante Y30A 4E-T no incrementa la capacidad invasiva, en el caso de las MDA-MB 231 y HaCaT hay una disminución significativa en la capacidad invasiva con respecto al control. Significativo si \* <0,05, \*\*< 0,01 y \*\*\*<0,001.

### 5.2.3 eIF4E tiene que estar fosforilado en el complejo eIF4E/4E-T para que se produzca un aumento en la capacidad migratoria e invasiva de la célula.

En la primera parte de nuestro estudio observamos que la fosforilación de eIF4E incrementa la afinidad de dicha proteína hacia 4E-T. Tras observar que es necesaria la unión de 4E-T a eIF4E para que haya un incremento en la migración y la invasión celular al sobreexpresar 4E-T, quisimos mirar si era necesario que eIF4E estuviese fosforilado. Para ello utilizamos el inhibidor CGP 57380, el cual impide la fosforilación de eIF4E por inhibición de las Mnks. En el ensayo de migración (Figura 48A) observamos que al tratar las células control con CGP 57380 hay una disminución significativa de la migración en el caso de la línea celular HaCaT, siguiendo una tendencia en las líneas celulares MDA-MB-468 y MCF10A, siendo esta disminución no significativa. En el caso de la línea celular MDA-MB-231 no vemos esta reducción en la migración celular al tratar con CGP 57380. Al sobreexpresar 4E-T, en las cuatro líneas celulares vemos una reducción significativa al tratar con el inhibidor, se inhibe completamente el incremento de migración producido al sobreexpresar 4E-T. En el caso del ensayo de invasión (Figura 48B) al tratar las diferentes líneas celulares control con el inhibidor de Mnks, observamos una disminución significativa de la invasión en el caso de las MDA-MB-231, HaCaT y MCF10A, siguiendo la misma tendencia en las MDA-MB-468 siendo dicha reducción no significativa. La

sobreexpresión de 4E-T más CGP 57380 disminuye la invasión significativamente comparado con la sobreexpresión sola de 4E-T, en las cuatro líneas celulares de estudio. Estos resultados nos indican que, aparte de ser necesaria la unión de 4E-T con eIF4E para que se dé un incremento en la migración e invasión celular, es necesario que eIF4E esté fosforilado.



**Figura 48: La fosforilación de eIF4E es necesaria para que la unión 4E-T/eIF4E incremente la migración y la invasión celular.** A) Ensayo de migración celular, disminución significativa en HaCaT al tratar las células control con CGP 57380, tendencia en la disminución de la migración (no significativa) en el caso de las MDA-MB-468 y MCF10A, MDA-MB-231 no se ve afectada al tratar las células con CGP 57380. El tratamiento con CGP 57380 en las líneas que sobreexpresan 4E-T reduce significativamente la migración en las cuatro líneas de estudio. B) Ensayo de invasión, disminución significativa de la invasión al tratar las células control con CGP 57380, exceptuando en la línea celular MDA-MB-468, donde hay una tendencia a la disminución pero no es significativa. El tratamiento con CGP 57380 en las líneas que sobreexpresan 4E-T reduce significativamente la invasión. Significativo si \* <0,05, \*\* < 0,01 y \*\*\* <0,001.

### 5.3 pEIF4E en cáncer de mama

Para poder estudiar la expresión de pEIF4E en cáncer de mama y ver su correlación con otros factores de señalización y diferentes características clínicas, se seleccionaron 77 tumores de mama de pacientes y se realizó un análisis por inmunohistoquímica y por western blot. Las características de cada uno de los tumores la encontramos en la tabla 8.

En la serie de carcinomas escogidos encontramos un 74 % correspondía a pacientes mayores de 50 años; un 83.1 % y un 74 % de receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) positivo respectivamente, estos receptores contribuyen en la regulación de la proliferación y diferenciación celular; un 26 % de HER2/neu positivo, protooncogen que codifica un receptor de la tirosina quinasa transmembrana (ERB2), está asociado a un peor pronóstico; así como un 64.9 % con una expresión de Ki67 inferior al 14 %, marcador nuclear de proliferación celular, es un marcador pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento en cáncer de mama, altos niveles de Ki67 se asocian a un peor pronóstico.

Características clínico-patológicas en la serie de tumores de mama		
<b>Tamaño del tumor, cm</b>	pT1	23 (29,9 %)
	pT2	30 (39 %)
	pT3	16 (20,8 %)
	Desconocido	8 (10,4 %)
<b>Edad del paciente, años</b>	≤49	20 (26 %)
	>50	57 (74 %)
<b>Grado histológico</b>	I (bien diferenciado)	7 (9,1 %)
	II (moderado o parcialmente diferenciado)	39 (50,6 %)
	III (poco diferenciado)	28 (36,4 %)
	Desconocido	3 (3,9 %)
<b>Receptores de estrógeno</b>	Positivo	64 (83,1 %)
	Negativo	10 (13 %)
	Desconocido	31 (21,7 %)
<b>Receptores de progesterona</b>	Positivo	57 (74 %)
	Negativo	17 (22,1 %)
	Desconocido	3 (2,31 %)
<b>Her-2/neu</b>	Positivo	20 (26 %)
	Negativo	55 (71,4 %)
	Desconocido	2 (1,54 %)
<b>Subtipo intrínseco (St Gallen 2013)</b>	Luminal A	25 (32,5 %)
	Luminal B1 (Her2 negativo)	22 (28,6 %)
	Luminal B2 (Her2 positivo)	15 (19,5 %)
	HER2 positivo (no-luminal)	2 (2,6 %)
	Triple negativo	10 (13 %)
	Desconocido	3 (2,31 %)
<b>Ki67</b>	< 14%	50 (64,9 %)
	> 14 %	18 (23,4 %)
	Desconocido	9 (6,93%)
<b>Metástasis Ganglionar</b>	pN0	37 (48,1 %)
	pN1	19 (24,7 %)
	pN2	13 (16,9 %)
	pN3	4 (5,2 %)
	Desconocido	4 (5,2 %)

**Tabla 8: Características de la serie de tumores de mama analizados.**

En el caso de eIF4E dividimos el análisis de su expresión en eIF4E total, pEIF4E citoplasmático y pEIF4E nuclear. Observamos que hay una correlación negativa de pEIF4E citoplasmático con la edad del paciente ( $p=0,037$ ). Una correlación positiva de la forma fosforilada de eIF4E localizada en citoplasma y en núcleo, y de la forma total de eIF4E localizada en citoplasma, con el tamaño del tumor ( $p=0,019$ ;  $p=0,000$ ;  $p=0,037$  respectivamente); y por último, una correlación positiva de pEIF4E nuclear con Ki67 ( $p=0,016$ ). En la serie de estudio no se observó correlación entre eIF4E y metástasis ganglionar, expresión de Her2, grado del tumor,

receptores de estrógeno, receptores de progesterona y metástasis ganglionar (Tabla 9). Se ha de tener en cuenta que la mayoría de los tumores de estudio son Her2 negativo, un 48.1 % de los casos no presentaban metástasis ganglionar y la mayoría tienen niveles de expresión de Ki67 bajos. La serie de estudio constaba tan solo de 77 tumores de mama analizados, la mayoría triple negativo. Encontramos poca variedad en el número y tipo de tumor; para un análisis más detallado de la correlación de eIF4E con estos factores sería necesario ampliar la serie de estudio.

			peIF4E Citoplasmático	peIF4E Nuclear	eIF4E Total Citoplasmático
Spearman's rho	GRADO	Coeficiente de correlación	0,009	0,018	0,069
		Sig. (2-tailed)	0,946	0,885	0,568
	EDAD	Coeficiente de correlación	-0,260 <sup>*</sup>	-0,240	-0,013
		Sig. (2-tailed)	0,037	0,054	0,911
	TAMAÑO	Coeficiente de correlación	0,302 <sup>*</sup>	0,476 <sup>**</sup>	0,257 <sup>*</sup>
		Sig. (2-tailed)	0,019	0,000	0,037
	HER2	Coeficiente de correlación	-0,113	0,061	-0,059
		Sig. (2-tailed)	0,370	0,630	0,621
	RE	Coeficiente de correlación	0,027	0,137	0,037
		Sig. (2-tailed)	0,831	0,278	0,760
	RP	Coeficiente de correlación	0,100	0,116	0,203
		Sig. (2-tailed)	0,428	0,357	0,089
	Ki67	Coeficiente de correlación	0,205	0,313 <sup>*</sup>	-0,231
		Sig. (2-tailed)	0,119	0,016	0,062
	Metástasis ganglionar	Coeficiente de correlación	-0,081	-0,115	-0,076
		Sig. (2-tailed)	0,533	0,373	0,536

**Tabla 9: Test de coeficiente de correlación de Spearman de eIF4E total y fosforilado (nuclear y citoplasmático) con diferentes características clínico-patológicas.** Observamos una correlación negativa de peIF4E citoplasmático con la edad del paciente, una correlación positiva tanto de peIF4E nuclear como citoplasmático, como de eIF4E total citoplasmático con el tamaño del tumor y una correlación positiva de peIF4E nuclear con Ki67. No se encuentra ninguna correlación eIF4E con HER2, RE, RP, grado del tumor y metástasis ganglionar. Significativo si  $p < 0,05$ . Test de coeficiente de correlación de Spearman.

Se realizó un estudio de la expresión de los factores peIF4E, 4E-T, HuR y Ago2, de los cuales vimos su importancia *in vitro* en situaciones de estrés celular, mediante inmunohistoquímica; su sobreexpresión se definió con un Hscore donde el punto de corte era de 100 (positivos con un Hscore superior a 100 y negativos cuando es inferior a 100), en la tabla 10 se muestra el tanto por ciento encontrado de cada una de las proteínas en la serie de tumores. Observamos unos elevados niveles de expresión de eIF4E en un 79 % de los tumores

de estudio; en el caso de la fosforilación de eIF4E observamos que los niveles más elevados se encuentran en el citoplasma, habiendo un 70 % de los tumores con expresión elevada de pelf4E citoplasmático; por el contrario, la mayoría de los tumores presentan niveles de pelf4E nuclear bajos, tan solo un 8 % de la serie contienen altos niveles. En el caso de HuR el 100 % de los tumores presentan niveles elevados. Un 83 % de los tumores presentan niveles elevados de Ago2 y el 53 % de los tumores presentan niveles elevados de 4E-T. Observamos que las cuatro proteínas localizadas en el complejo estudiado in vitro (Ago2, HuR, pelf4E y 4E-T) se expresan de forma elevada en la serie de tumores de mama analizada.

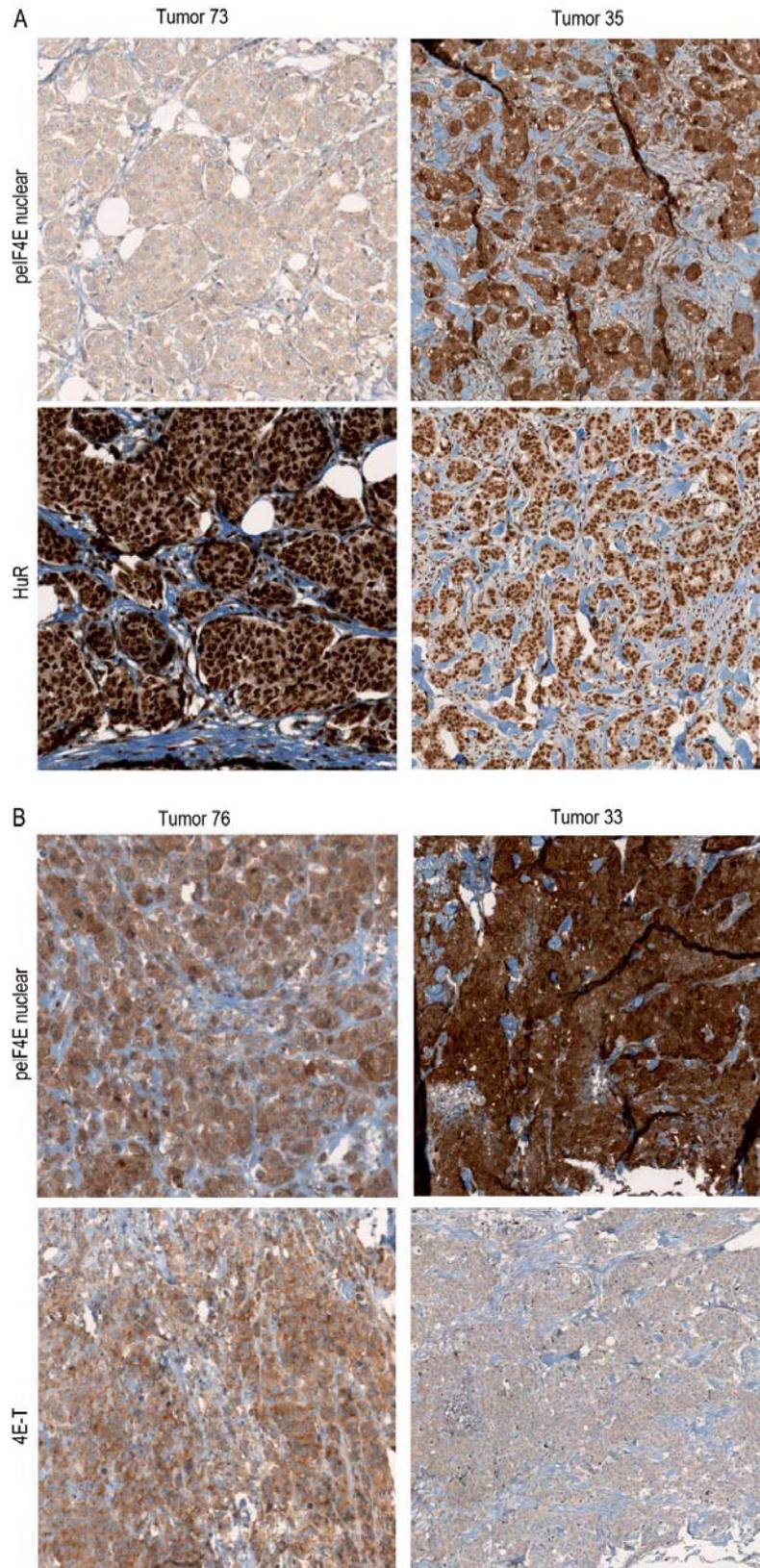
Mediante el análisis inmunohistoquímico se observó una correlación negativa de pelf4E nuclear con HuR ( $p=0,020$ ) y 4E-T ( $p=0,001$ ) (Test de coeficiente de correlación de Spearman) (Tabla 11 y Figura 49) No se encontró ninguna correlación en el caso del pelf4E citoplasmático o eIF4E total.

	Número de casos positivos %
eIF4E	79 %
pelf4E citoplasmático	70 %
pelf4E nuclear	8 %
HuR	100 %
Ago2	83 %
4E-T	53 %

Tabla 10: Niveles de expresión de marcadores analizados en la serie clínica de 77 tumores de mama.

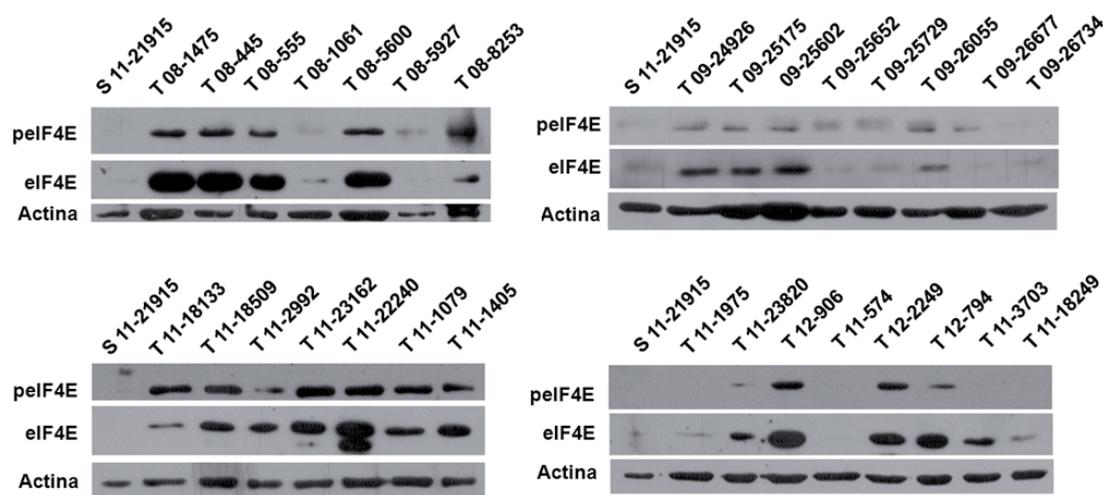
			pelf4E Citoplasmático Hscore	pelf4E Nuclear Hscore	eIF4E T Citoplasmático Hscore
Spearman's rho	4E-T Hscore	Coefficiente de correlación	0,014	-0,393*	-0,011
		Sig. (2-tailed)	0,914	0,001	0,924
	Ago2 Hscore	Coefficiente de correlación	0,064	-0,114	0,228
		Sig. (2-tailed)	0,612	0,364	0,054
	HuR Hscore	Coefficiente de correlación	0,078	-0,288*	0,188
		Sig. (2-tailed)	0,538	0,020	0,111

Tabla 11: Test de coeficiente de correlación de Spearman de eIF4E total y fosforilado (nuclear y citoplasmático) con 4E-T, Ago2 y HuR. Se observó una correlación negativa de los niveles de pelf4E nuclear con 4E-T y HuR. Significativo si  $p<0,05$ . Test de coeficiente de correlación de Spearman.



**Figura 49: Inmunohistoquímica de 4E-T, peIF4E nuclear y HuR.** A) Inmunohistoquímica de la expresión de peIF4E nuclear y HuR, correlación negativa en su expresión. B) Inmunohistoquímica de la expresión de peIF4E nuclear y 4E-T, correlación negativa en su expresión.

Por western blot se realizó también el análisis de los niveles proteicos de pelf4E y eIF4E, encontrándose tanto eIF4E total como su forma fosforilada incrementada en la mayoría de tumores con respecto a un tejido sano control (Figura 50).



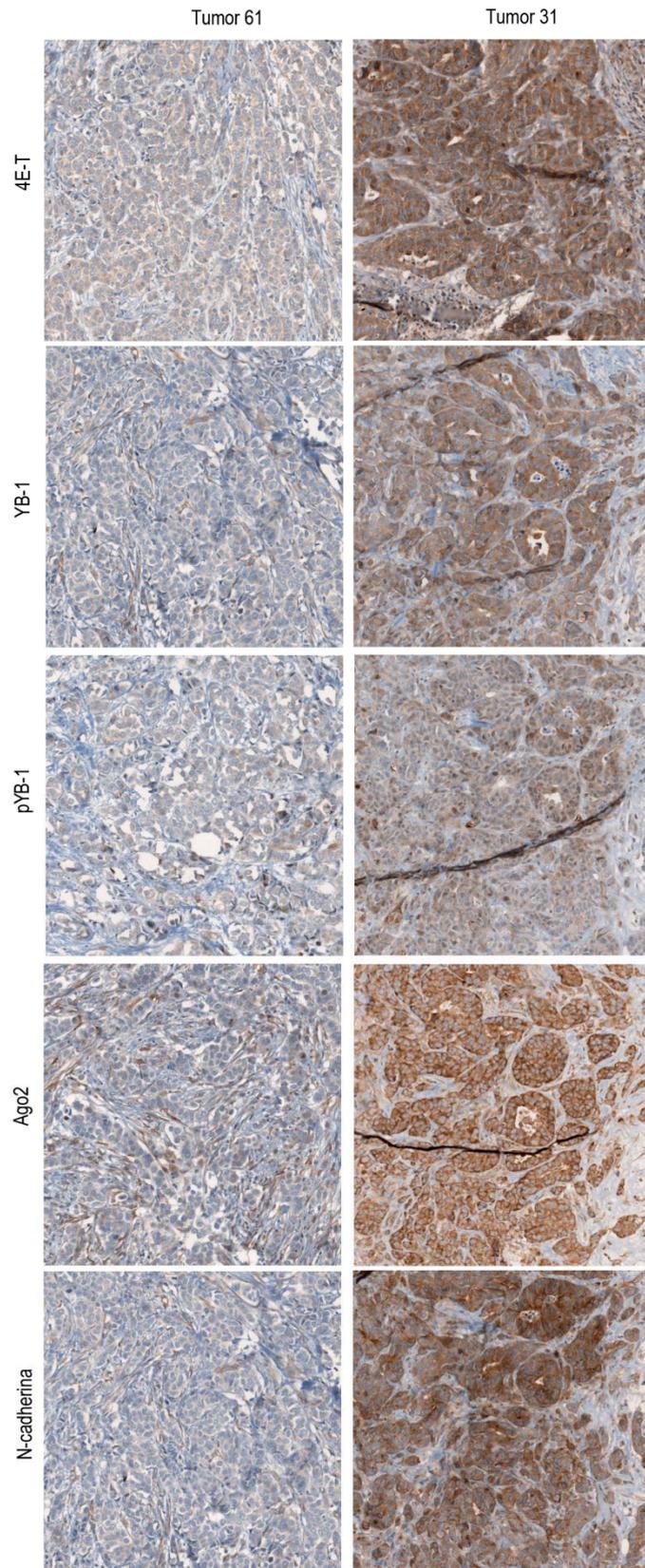
**Figura 50:** Análisis por western blot del grado de expresión de pelf4E y eIF4E en diferentes tumores de la serie clínica de estudio. Observamos un incremento de eIF4E total y pelf4E en los diferentes tumores (T) de estudio con respecto a un control sano (S).

## 5.4 4E-T en cáncer de mama

Ningún estudio se ha realizado hasta el momento sobre el transportador de eIF4E (4E-T) en tumores. Por ello decidimos realizar un estudio de este factor en la serie clínica de cáncer de mama. No se encontró ninguna correlación de 4E-T con ninguna de las variables clínico-patológicas de estudio. Se observó una correlación de 4E-T con diferentes factores (Tabla 12). Encontramos una correlación positiva entre 4E-T con YB-1 ( $p=0,044$ ), pYB-1 ( $p=0,042$ ), Ago2 ( $p=0,000$ ) y N-cadherina ( $p=0,0018$ ) así como una correlación negativa con pelf4E nuclear ( $p=0,001$ ) (Test de coeficiente de correlación de Spearman) (Figura 51). Los coeficientes de correlación obtenidos en todos los casos son de un valor bajo.

	4E-T	
	Sig. (2-tailed)	Coefficiente de correlación
YB-1	0,044	0,234
pYB-1	0,042	0,237
Ago2	0,000	0,436
N-cadherina	0,0018	0,278
pelf4E nuclear	0,001	-0,393

**Tabla 12:** Significancia y coeficiente de correlación de 4E-T con YB-1, pYB-1, Ago2, N-cadherina y pelf4E nuclear. 4E-T correlaciona positivamente con YB-1, pYB-1, Ago2 y N-cadherina, y negativamente con pelf4E nuclear. Estadísticamente significativo si  $p < 0,05$ . Test de coeficiente de correlación de Spearman.



**Figura 51: Inmunohistoquímica de la expresión de 4E-T, YB-1, pYB-1, Ago2 y N-cadherina en dos tumores de la serie clínica de estudio.** Niveles altos de 4E-T se correlacionan con niveles elevados de Y-1, pYB-1, Ago2 y N-cadherina; niveles bajos de 4E-T se correlacionan con niveles bajos de dichas proteínas.



---

# DISCUSIÓN

---



# 6. DISCUSIÓN

## 6.1 Estudio de la fosforilación de eIF4E en situaciones de estrés

El control de la síntesis proteica es un concepto importante en la regulación del desarrollo del tumor, en el pronóstico y en la respuesta terapéutica (Scheper and Proud 2002; Castellvi, Garcia et al. 2006; Armengol, Rojo et al. 2007; Bilanges and Stokoe 2007; Rojo, Najera et al. 2007). eIF4E es un factor limitante para la traducción de mRNAs y un potente oncogén, eIF4E regula el inicio de la traducción y se ha visto aumentado en muchos tipos de tumores humanos incluyendo cáncer de colon, mama, vejiga, pulmón, próstata, tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, linfomas de Hodgkin's y neuroblastoma (De Benedetti and Harris 1999; Nathan, Franklin et al. 1999; Rosenwald, Chen et al. 1999). A parte del incremento de eIF4E se ha visto que su fosforilación en la Ser209 favorece la progresión tumoral y contribuye a la invasión hacia otros tejidos. Como hemos descrito anteriormente, la fosforilación de eIF4E en la Ser209 es mediada por las quinasas Mnk1/2, las cuales pueden ser activadas vía p38, en situaciones de estrés (Hou, Lam et al. 2012). El mecanismo mediante el cual la fosforilación de eIF4E regula las propiedades oncogénicas de eIF4E no es conocido; pEIF4E promueve la tumorigénesis primeramente por la supresión de la apoptosis, por la activación de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1 o por incremento de proteínas implicadas en la proliferación, como Ciclina D1, o encargadas de la degradación de la matriz extracelular promoviendo invasión, como MMP3 (Wendel, Silva et al. 2007; Wheeler, Johnson et al. 2010). En nuestro estudio nos hemos centrado en el efecto de la fosforilación de eIF4E. Los resultados obtenidos a lo largo de la tesis doctoral aportan más información de cómo la fosforilación de eIF4E se ve implicada en la tumorigénesis así como a la resistencia a estrés celular *in vitro*. Algunos tipos de estrés son uno de los mayores inductores de la fosforilación de eIF4E; por lo tanto los resultados obtenidos pueden tener un papel importante en el tratamiento del cáncer. En las células tumorales podemos encontrar falta de nutrientes, hipoxia, estrés producido por diferentes tratamientos, como la quimioterapia o radioterapia. Nuestros resultados indican que la inhibición de la fosforilación de eIF4E puede ser una opción terapéutica a evaluar.

### 6.1.2 La fosforilación de eIF4E incrementa la resistencia a ciertas situaciones de estrés

Como hemos comentado, eIF4E se encuentra incrementado en un gran número de cánceres, así como su forma fosforilada, la cual está relacionada con un peor pronóstico en cáncer de mama, de pulmón, gástrico y colorrectal (Fan, Ramalingam et al. 2009; Flowers, Chu et al. 2009; Hiller, Chu et al. 2009; Yoshizawa, Fukuoka et al. 2010). A partir del estudio de los dos mutantes de eIF4E, fosfomimético y hipofosforilado, en diferentes líneas celulares, observamos que su sobreexpresión incrementa su capacidad de formación de colonias, indicando su capacidad de permitir que una célula única sea capaz de dividirse de forma más eficiente sin necesidad de señales de supervivencia de las células vecinas. Al tratar las células con estrés, en nuestro caso arsénico, el tamaño y número de estas colonias aumenta. En los dos

casos, tanto en situaciones normales como bajo estrés, el mutante fosfomimético tiene un mayor número y tamaño de colonias, indicándonos la ventaja de la forma fosforilada de eIF4E con respecto a su forma no fosforilada. No tan solo se ve reflejado el efecto de la fosforilación de eIF4E con los mutantes, en el caso del eIF4E endógeno, al tratar con arsénico, en donde está descrito que incrementa la fosforilación de eIF4E vía activación de p38 (Wang, Flynn et al. 1998), se observa un incremento del tamaño de las colonias, este puede ser debido al aumento de la fosforilación de eIF4E. Esta fosforilación da unas ventajas proliferativas frente a un tratamiento de estrés como el arsénico.

Estas ventajas se ven confirmadas al realizar un ensayo de recuperación celular tras diferentes tipos de estrés, como por ejemplo falta de nutrientes o un quimioterapéutico como el cisplatino. Las células que sobreexpresan el mutante fosfomimético son capaces de recuperarse a las pocas horas tras una situación de estrés, de forma más rápida que las células con el mutante hipofosforilado o el control.

Por otro lado tenemos que la simple sobreexpresión de eIF4E ya da unas ventajas a la células, ya sea permitiendo la activación de la síntesis proteica como por el transporte de ciertos mRNAs de núcleo a citoplasma. Tras analizar nuestros resultados, observamos que la fosforilación da una mayor ventaja frente determinadas situaciones de estrés.

Para corroborar que es debido a la fosforilación de eIF4E, el tratamiento con el inhibidor de las Mnks CGP 57380, nos permitió ver si al inhibir dicha fosforilación las células se hacían más sensibles al estrés. Los resultados nos confirmaron que era necesario pEIF4E para que las células se recuperasen. La inhibición de la fosforilación de eIF4E mediante el inhibidor de las Mnks CGP 57380 es suficiente para reducir la resistencia a estrés y a agentes quimioterapéuticos como el cisplatino. Utilizando las MEF Mnk1/2 KO acabamos de corroborar la necesidad de pEIF4E para la supervivencia celular. Hemos de tener en cuenta que el inhibidor de las Mnks CGP 57380 inhibe otras quinasas como MKK1, CK1 y BRSK2, las cuales afectan a diversas proteínas incluyendo proteínas implicadas en inhibir la muerte celular programada, regular la segregación cromosómica, envueltas en el tráfico de membranas, en la activación de ciertos canales de sodio (Bain, Plater et al. 2007); y por otro lado, las Mnks no solo afectan a la fosforilación de eIF4E, también se ha descrito un gran número de substratos que pueden fosforilar, incluyendo componentes de la maquinaria traduccional, algunos factores de unión a mRNA y factores de splicing; algunos de estos targets podrían afectar a la supervivencia celular y el resultado obtenido no es solo debido al efecto de la fosforilación de eIF4E. A pesar de ello, poniendo en conjunto todos los resultados obtenidos, parece ser necesaria la fosforilación de eIF4E para la resistencia a ciertos tipos de estrés.

El estrés medioambiental media la necesidad de las células a adaptarse para poder sobrevivir. Los mecanismos de adaptación pueden estar envueltos en la regulación de la estructura de la cromatina, en la transcripción, splicing, estabilidad o traducción de mRNAs. Se ha visto que eIF4E se ve desfosforilado después de un choque térmico, correlacionándose con una disminución en los niveles globales de traducción (Raught and Gingras 1999). Pero no siempre la fosforilación de eIF4E y el incremento de la traducción se ven correlacionados; produciendo un estrés celular como, por ejemplo, arsénico o anisomicina, se ve un aumento de la fosforilación de eIF4E y una disminución de la traducción global de proteínas, pero un incremento selectivo de ciertas proteínas (Morley and McKendrick 1997; Wang, Flynn et al. 1998). Es posible que la

fosforilación de eIF4E sea un efecto compensatorio del estrés inducido para que haya un aumento selectivo en la traducción de proteínas.

El papel biológico de eIF4E en tumores y su inhibición como un target terapéutico ya ha sido propuesto. Se han desarrollado inhibidores moleculares de la unión de eIF4E y eIF4G, como por ejemplo 4EG-1 (Moerke, Aktas et al. 2007). Estudios *in vivo* y *in vitro* han demostrado que inhibiendo eIF4E incrementa la sensibilidad a agentes anticancerígenos, incluyendo cisplatino y la doxorubicina (Dong, Wang et al. 2009; Zhou, Yan et al. 2011). Nosotros hemos visto que este efecto es mediado por los niveles de fosforilación de eIF4E y no por los niveles totales. En este estudio mostramos que la fosforilación de eIF4E está claramente asociada con la resistencia al tratamiento con cisplatino, estrés oxidativo y falta de nutrientes.

### **6.1.3 La fosforilación de eIF4E previene la activación de la apoptosis**

Poco se conoce del efecto de la fosforilación de eIF4E. Diferentes autores determinan que dicha fosforilación inhibe la unión a cap y por lo tanto la activación de la traducción cap-dependiente (Knauf, Tschopp et al. 2001), otros consideran que dicha fosforilación no afecta a los ratios globales de traducción pero si a un aumento selectivo de ciertos mRNAs, como Ciclina D1, Mcl-1 (Wendel, Silva et al. 2007; Li, Yue et al. 2010) debido a un aumento de síntesis o por un incremento del transporte de estos mRNAs de citoplasma a núcleo. Estudios realizados con la sobreexpresión de eIF4E y el mutante de eIF4E Trp73Ala (W73A), el cual no puede formar un complejo de inicio de la traducción activo (Sonenberg and Gingras 1998) pero si puede realizar el transporte de mRNAs, como la Ciclina D1, del núcleo al citoplasma (Cohen, Sharma et al. 2001), disminuyen la capacidad oncogénica de eIF4E. De forma similar en ratones se inyectaron células que contenían en mutante de eIF4E con la Ser209Ala (S209A) y observaron que la fosforilación de eIF4E era importante para que este mediara la tumorigénesis. Esta capacidad fue atribuida a la habilidad de eIF4E para incrementar la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Mcl-1, se observó que el incremento de fosforilación de eIF4E mediado por Mnk1, correspondía con un incremento en la expresión de Mcl-1 (Wendel, Silva et al. 2007).

Teniendo en cuenta que las células que sobreexpresaban el mutante fosfomimético eran capaces de recuperarse tras una situación de estrés es necesario encontrar el mecanismo por el cual la fosforilación de eIF4E permite esta ventaja de recuperación tras ciertas situaciones de estrés.

Observamos que el mutante fosfomimético es capaz de inhibir la activación de la apoptosis, esta inhibición podría ser debida a un incremento de proteínas antiapoptóticas y/o una disminución de proteínas proapoptóticas, debido a un incremento selectivo de la síntesis proteica o por la exportación de ciertos mRNAs a citoplasma donde podrán ser traducidos.

### **6.1.4 El mutante fosfomimético forma unos cuerpos citoplasmáticos con elevada afinidad hacia 4E-T**

Tanto el mutante fosfomimético como el pEIF4E endógeno son capaces de colocalizar con su proteína transportadora 4E-T en citoplasma, formando unos cuerpos citoplasmáticos. Es conocido que en situaciones de estrés se pueden formar dos tipos de gránulos citoplasmáticos, los gránulos de estrés (GS) o los *processing bodies* (PBs). El papel de cada uno de

ellos es diferente, los GS tienden al almacenamiento de los mRNAs y tras una situación de estrés estos pueden ser traducidos. Contienen muchos factores de inicio de la traducción, incluyendo eIF4E, lo cual indicaría que mientras los GS están formados la traducción cap-dependiente está inhibida; una vez se disocian tras la situación de estrés, los factores de inicio de la traducción pueden volver a formar el complejo eIF4F y volverse a dar la traducción dependiente de cap. En cambio los PBs están descritos como unos cuerpos móviles los cuales contienen diferentes proteínas encargadas de la degradación de mRNAs, como por ejemplo las *decapping proteins*, produciéndose la degradación de los mRNAs y por lo tanto estos no pueden ser traducidos. Se ha visto que los PBs contienen también el factor de inicio de la eIF4E así como su proteína transportadora 4E-T (Buchan and Parker 2009).

En nuestro estudio encontramos que la unión peIF4E/4E-T no formaba parte de los GS, pero si, aunque no al 100 %, del marcador de PBs DCP1A. Encontramos algún complejo peIF4E/4E-T que no colocalizaba con el marcador de PBs. Teniendo en cuenta que estos cuerpos son unidades móviles las cuales van madurando hasta formarse el complejo completo con todos sus factores, podría ser que el complejo peIF4E/4E-T fuese una forma inicial de la formación de los PBs.

Tras un estrés fisiológico se inducen cambios en la localización de eIF4E y su transportador 4E-T. Se produce una acumulación de eIF4E en el núcleo de la célula o en los PBs volviéndolo no disponible para la traducción en el citoplasma. La relocalización de eIF4E puede tener otros papeles a parte de la reducción de la traducción cap-dependiente, incluyendo efectos en el proceso, transporte y degradación de mRNAs (Koritzinsky, Magagnin et al. 2006).

Observamos que junto al complejo peIF4E/4E-T, en condiciones normales, podíamos observar presencia de las proteínas HuR y Ago2. HuR se encarga de la estabilización de mRNAs con elementos ARE en su RNA (Lopez de Silanes, Zhan et al. 2004), mayormente se encuentra en los GS, pero también se ha observado en PBs; teniendo en cuenta que es una proteína estabilizadora de mRNAs su papel en PBs, los cuales se encargan de la degradación de mRNAs, es todavía incierto. El hecho de encontrar proteínas estabilizadoras de mRNAs en el complejo peIF4E/4E-T, creemos que una de las posibles causas de la recuperación celular tras una situación de estrés es la estabilización de mRNAs que posteriormente serán traducidos, cuando se vuelvan a las condiciones normales; HuR jugaría un papel importante en la estabilización de mRNAs durante la situación de estrés. HuR y eIF4E tienen mRNAs diana comunes, como por ejemplo c-myc, Ciclina D1 y VEGF. HuR incrementa la estabilidad de estos transcritos y eIF4E puede incrementar la exportación del mRNA de núcleo a citoplasma, así como los niveles de traducción (Topisirovic, Siddiqui et al. 2009). El complejo peIF4E/4E-T/HuR, podría retener mRNAs que fuesen almacenados para ser traducidos al pasar la situación de estrés.

Por otro lado, otra proteína que vimos que formaba parte del complejo es Ago2, es uno de los componentes principales del complejo silenciador inducido por el RNA, aunque se ha visto que también puede estar envuelta en diferentes etapas del procesamiento del mRNA, como la maduración, el transporte y la regulación de la estabilidad (Hock, Weinmann et al. 2007), Ago2 puede formar parte tanto de los GS, cuando está en forma inactiva al producirse una situación de estrés, como en los PBs, en su forma activa en condiciones normales (Detzer, Engel et al. 2011). Su papel en estos dos tipos de gránulos no es muy conocido.

Hemos visto que la formación del complejo peIF4E/4E-T es importante para la supervivencia celular tras una situación de estrés como el arsénico. Inhibiendo la expresión de 4E-T endógena o utilizando mutantes de eIF4E que no pueden unirse a 4E-T o mutantes de 4E-T que no se unen

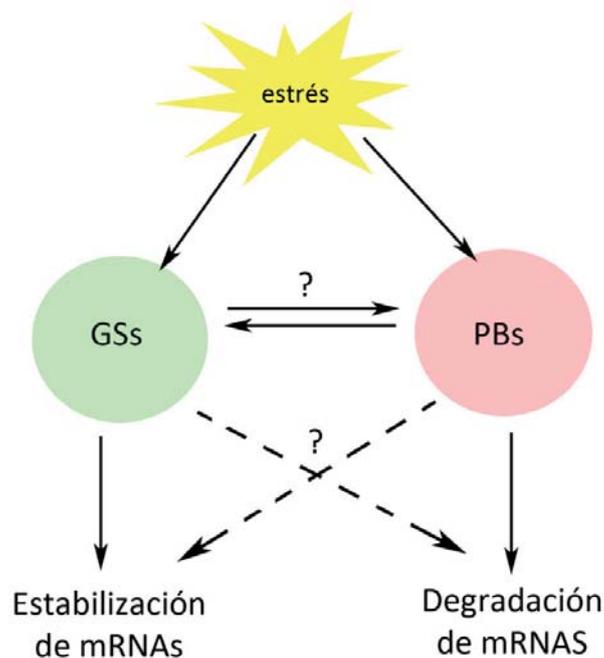
a eIF4E, no observamos la recuperación en la viabilidad celular aunque sobreexpresemos el mutante fosfomimético.

De la misma manera, si realizamos un ensayo de viabilidad celular inhibiendo la expresión de Ago2 y HuR, observamos que tampoco se da la recuperación celular tras el estrés. Por lo tanto la formación de este complejo es necesaria para que se produzca la recuperación tras un estrés celular.

El hecho que tres de las proteínas, HuR, Ago2 y eIF4E, que hemos encontrado en estos gránulos citoplasmáticos, posiblemente complejos proteicos de las primeras etapas de la formación de los PBs, puedan formar parte de los PBs como de los GS; y el hecho que los PBs sean unos cuerpos móviles capaces de desplazarse por el citoplasma, creemos que podría haber una relación entre estos dos cuerpos bajo situaciones de estrés, no quedando muy claro el papel definido de degradación de los PBs, pudiendo estos interactuar con GS y permitir el almacenamientos de ciertos mRNAs que posteriormente serán traducidos (Figura 52).

El estrés oxidativo incrementa la activación de las proteínas quinasas MAPK, las cuales incluyen la quinasa c-Jun N-terminal (JNK); también se inhibe la fosfatasa de JNK, que contribuye a una activación de JNK en respuesta al tratamiento de estrés y por lo tanto una fosforilación de 4E-T (Cavigelli, Li et al. 1996). La fosforilación de 4E-T permite que otras proteínas que forman parte del complejo de los PBs se vayan uniendo, haciendo que estos crezcan de tamaño y puedan llegar a interactuar con los GS. En respuesta a estrés, la formación de GS, el crecimiento de los PBs y la fusión entre estos dos cuerpos, apoya la idea que estos cuerpos juegan un papel importante en la supervivencia celular.

Tras un estrés celular algunos mRNAs pueden ser traducidos, otros degradados y otros almacenados para ser usados una vez haya pasado la situación de estrés. Con el fin de procesar los mRNAs, la comunicación entre GS y PBs debe ser muy dinámica e interrelacionada. La fusión entre estos dos gránulos citoplasmáticos no es extraña, ya que comparten diferentes moléculas en su estructura, como por ejemplo TTP, BRF1, Xrn1, Ago2, HuR y eIF4E. Por otro lado, mientras que los GS tienen muchos factores implicados en el inicio de la traducción en su estructura, los PBs contienen el factor de iniciación eIF4E, factor limitante del inicio de la traducción, aumentando la posibilidad que los mRNAs que contienen los PBs no necesariamente vayan directamente a degradación, ya que al unirse eIF4E al extremo 5' del mRNA los protege y evita la degradación de 5' a 3', del mismo modo que la unión de HuR. (Andrei, Ingelfinger et al. 2005; von Roretz, Di Marco et al. 2011). Existe una relación entre estos dos cuerpos citoplasmáticos, ya que proteínas que forman parte de los PBs, en situaciones de estrés se desplazan a los GS, como es el caso de eIF4E y Ago2 (Lindsay and McCaffrey 2011). Parker et al propusieron que los PBs sirven como un punto de clasificación de mRNAs, los cuales pueden ser almacenados, degradados o traducidos según se necesiten para la respuesta al estrés (Sheth and Parker 2006; Buchan and Parker 2009) .



**Figura 52: Posible relación entre GS y PBs.** En respuesta al estrés los mRNAs pueden ser traslocados a dos gránulos citoplasmáticos, GS y PBs, y pueden ser estabilizados para su posterior traducción o degradados. No es conocido de qué forma interaccionan estos dos tipos de gránulos para realizar estas dos funciones; y como pueden influenciar individualmente la estabilización o degradación de estos transcritos (von Roretz, Di Marco et al. 2011).

### 6.1.5 El mutante fosfomimético de eIF4E media la síntesis proteica de ciertas proteínas tras el estrés.

La asociación de eIF4E o pEIF4E con el estrés celular ha sido altamente estudiada. Por ejemplo, se ha visto que la Ser209 de eIF4E es fosforilada en respuesta a diferentes tipos de estrés (Duncan, Peterson et al. 2003; Dong, Wang et al. 2009). El incremento de la fosforilación de eIF4E juega un papel importante en la estimulación selectiva de la traducción de ciertos mRNAs bajo situaciones de estrés, donde generalmente la síntesis proteica es inhibida (Fraser, Pain et al. 1999; Duncan, Peterson et al. 2003).

Como eIF4E regula la resistencia a estrés tiene que ser estudiado en detalle; en nuestro estudio hemos visto diferentes posibles mecanismos. Por un lado, el mutante fosfomimético causa un rápido incremento del pico 80 S en el perfil polisómico dos horas después del tratamiento con arsénico, indicando un bloqueo de la traducción. Después del estrés, tras un tiempo de 12 horas, es el mutante fosfomimético el que permite la síntesis de ciertas proteínas ya que no se observa un bloqueo global de la traducción como en el caso del mutante hipofosforilado o el control. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos por western blot, donde tan solo el mutante fosfomimético permite la recuperación o previene la pérdida de los niveles de ciertas proteínas como Ciclina D1, Mcl-1 (Scheper and Proud 2002; Zhou, Yan et al. 2011).

Hemos observado que este incremento en los niveles de ciertas proteínas no es producido por un incremento en la síntesis de mRNAs, ya que al tratar las células con actinomicina D, inhibiendo la síntesis de mRNA, los niveles de estas proteínas en el mutante fosfomimético se ven también incrementados. Esto nos indica que dicho incremento es debido a un mecanismo

post-transcripcional. Estas proteínas pueden estar sintetizadas *de novo* a partir del mRNA que haya estado almacenado, o transportado de núcleo a citoplasma, o puede haber una estabilidad proteica al sobreexpresar el mutante fosfomimético y por ello que no disminuyan los niveles de ciertas proteínas. El tratamiento con ciclohexamida nos confirmó que no es debido a una estabilidad proteica, ya que al inhibir la síntesis de proteínas al sobreexpresar el mutante fosfomimético, tras una situación de estrés, no se detectan niveles de dichas proteínas. Además, los análisis del mRNA polisomal mediante Q-PCR indican un incremento de la traducción de estos genes.

El incremento de la expresión de eIF4E puede ser un importante marcador tumoral. eIF4E puede ser suficiente no solo para inducir transformación y tumorigénesis, sino también para permitir la metástasis. eIF4E promueve estos cambios por el incremento selectivo de ciertos mRNAs que codifican proteínas íntimamente envueltas en la malignidad. Estas proteínas promueven la supervivencia celular, la formación del tumor y el crecimiento (como c-myc y Ciclina D1), la angiogénesis (VEGF, FGF-2), la invasión y la metástasis (MMP-9). El incremento de eIF4E puede contribuir a cada uno de los aspectos de la progresión de la malignidad (De Benedetti and Graff 2004). Un gran punto de estudio sería identificar que mRNAs se ven preferentemente estimulados por el incremento de eIF4E y su fosforilación. Furic et al. mediante la utilización de ratones KI donde la serina 209 de eIF4E fue remplazada por una alanina realizaron microarrays donde observaron que los niveles de mRNAs implicados en la progresión tumoral, como Ccl2 y Ccl7, proteínas implicadas en la invasión como MMP3 y MMP9, y otros mRNAs que inhiben la apoptosis, se veían disminuidos en ratones KI en comparación con ratones WT, indicando que la fosforilación de eIF4E se ve implicada en la traducción selectiva de ciertos mRNAs.

En resumen, la forma fosforilada de eIF4E puede formar unos cuerpos citoplasmáticos al interactuar con su proteína transportadora 4E-T. Este complejo peIF4E/4E-T puede ser la forma inicial de la formación de los PBs. Al producirse una situación de estrés 4E-T es fosforilado vía Jnk, esta fosforilación permite el ensamblaje de otras proteínas al complejo y la formación de los PBs maduros. Estos pueden desplazarse por el citoplasma e interactuar con los GS. Los resultados del incremento de la traducción con el mutante fosfomimético, así como el incremento de determinados mRNAs en las fracciones polisómicas, nos indica que el complejo peIF4E/4E-T permite la recuperación a determinadas situaciones de estrés. El proceso mediante el cual permite dicha recuperación debe ser analizado, ya que tenemos dos posibilidades, por un lado al ser componentes de PBs y poder interactuar con GS, es posible que este complejo sirva como almacenamiento de ciertos mRNAs que serán estabilizados y traducidos una vez pase el estrés. Por otro lado se ha de tener en cuenta la función transportadora de 4E-T de eIF4E a núcleo, el hecho de que se incrementen los niveles de eIF4E en núcleo puede incrementar el transporte de ciertos mRNAs selectivos de núcleo a citoplasma, incrementando su traducción. Es desconocido si es la forma fosforilada o la no fosforilada de eIF4E la que se encarga del transporte de ciertos mRNAs a citoplasma. A pesar de todo, el hecho que proteínas como HuR y Ago2 jueguen un papel importante en este complejo y su inhibición no permita la recuperación por parte del mutante fosfomimético, hace pensar que la opción del almacenamiento de mRNAs en el complejo peIF4E/4E-T sea la más factible. El mecanismo mediante el cual se produce esta traducción selectiva de ciertos mRNAs tiene que ser estudiado con detalle, así como otros factores y mRNAs que puedan estar asociados al complejo peIF4E/4E-T.

Debido a que la fosforilación de eIF4E está asociada a la resistencia a estrés, al desarrollo del tumor en modelos animales de ratón y a peor prognosis en tumores humanos, el uso de inhibidores específicos de la fosforilación de eIF4E puede ser un enfoque prometedor en el tratamiento del cáncer. Recientes estudios sugieren que Mnk1/2 regulan positivamente la traducción de mRNAs y la unión a polisomas (Bianchini, Loiarro et al. 2008; Zhang, Fu et al. 2008). En ratones deficientes de Mnk1/2, donde no se observa peIF4E, se desarrollan de forma normal, y las células derivadas de estos animales tienen una traducción global vía cap normal de proteínas (Ueda, Watanabe-Fukunaga et al. 2004). Todo esto sugiere que el rol de la fosforilación de eIF4E no es evidente en condiciones normales, pero puede estar envuelto en funciones más específicas, como por ejemplo en respuesta a una activación oncogénica y en situaciones de estrés celular. Por lo tanto, la combinación de la inhibición de la fosforilación de eIF4E con otros tratamientos, como cisplatino u otros agentes que producen daño en el DNA podría ser eficaz en el tratamiento de diferentes tumores. Es importante el hecho que la pérdida de la fosforilación de eIF4E no está asociada con anomalías en el desarrollo de los ratones, y algunos inhibidores de las Mnk1/2, como la cercosporamida, se están empleando en diferentes entornos clínicos para el tratamiento de enfermedades, sin efectos secundarios clínicos. Por otra parte, la inhibición de la unión del complejo peIF4E/4E-T podría ser un punto de estudio para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, ya que es necesaria la unión de peIF4E con 4E-T para que se dé su efecto protector bajo situaciones de estrés. A pesar de todo, la unión eIF4E/4E-T parece ser necesaria para el transporte de eIF4E a núcleo y para que este haga su función de transportar mRNAs de núcleo a citoplasma. El efecto de interferir en la unión peIF4E/4E-T podrían afectar a ciertas funciones de la célula, ya que ciertos mRNAs no serían exportados al citoplasma y por lo tanto tampoco traducidos. Por ello creemos que la inhibición de la fosforilación de eIF4E sería un tratamiento eficaz para el tratamiento de paciente.

## **6.2 Estudio in vitro de la función de 4E-T**

Pocos estudios se han realizado sobre 4E-T y menos en su implicación cáncer. Los niveles de 4E-T en cada línea celular de estudio varían, líneas celulares tumorales como MDA-MB-231 o MDA-MB-468 expresan niveles elevados de 4E-T, y la línea epitelial de mama MCF10A expresa bajos niveles, correlacionándose estos datos con los resultados obtenidos en la serie clínica de tumores de mama. Por el contrario la línea celular HaCaT presenta elevados niveles de 4E-T. La expresión de 4E-T varía según el tipo celular y órgano, en el tejido mamario normal se ha descrito que hay una expresión moderada de dicha proteína y observamos que hay un incremento en las células tumorales. En la piel se encuentran niveles elevados de 4E-T (Uhlen M 2010), lo que concordaría con los resultados obtenidos con la línea celular HaCaT.

La correlación de 4E-T con N-cadherina observada en tumores también se observó en las diferentes líneas de estudio, así como el switch descrito con E-cadherina. Principalmente este incremento de N-cadherina y la downregulación de E-cadherina se ha descrito con el proceso de EMT por ese motivo se realizó un estudio de factores implicados en este proceso. No se observó ninguna correlación entre la sobreexpresión o downregulación de 4E-T con respecto a estos factores. Si el incremento de N-cadherina y la downregulación de E-cadherina estuviese correlacionado con EMT, al sobreexpresar 4E-T esperaríamos ver un incremento de factores

como Snail, Slug o Twist, los cuales se ven reactivados en cáncer promoviendo EMT, estos resultados nos indican que dicho switch no se ve correlacionado con EMT.

No se observó ninguna diferencia en la proliferación de dichas células al sobreexpresar 4E-T pero si un incremento en la invasión y migración celular viéndose este disminuido al inhibir la expresión endógena de 4E-T.

Una característica de las células tumorales es su capacidad de invadir tejidos adyacentes, diseminarse y dar lugar a focos metastáticos en otros lugares del organismo. La primera etapa para que se dé lugar a la metástasis, consiste en la invasión de los tejidos adyacentes del tumor, para ello es necesario que se produzca una degradación de la matriz extracelular subyacente, las células tumorales son capaces de degradar localmente esta barrera permitiendo la invasión celular. El potencial invasivo de las células tumorales depende de tres factores principales: alteraciones en la adhesión celular, degradación localizada en la matriz extracelular y movilidad de las células tumorales.

El proceso de invasión tumoral implica diversas alteraciones de los sistemas de adhesión celular, por un lado las células necesitan debilitar las uniones que estabilizan su localización normal y por otro lado necesitan desarrollar mecanismos de adhesión hacia otros tipos celulares adyacentes para poder avanzar e invadir otros tejidos. El switch visto entre N-cadherina y E-cadherina nos muestra la posible alteración de las adherencias entre células, la cual puede promover la invasión celular; E-cadherina garantiza la adhesión entre célula y célula mientras que N-cadherina se ve implicada en el proceso de mediar uniones menos estables y más dinámicas entre células. Hazan et al vieron que las células transfectadas con N-cadherina seguían manteniendo sus propiedades adherentes, sugiriendo que la reducción de la adhesión celular no era el mecanismo de acción de la N-cadherina al inducir invasividad. Parece ser que promueve un estadio dinámico en la adhesión que incluye tanto la unión como la desunión con células individuales del tumor primario, así como una asociación selectiva con ciertos tejidos como el estroma o el endotelio, permitiendo así la aparición de metástasis (Hazan, Phillips et al. 2000).

Se cree que otras vías incrementan la movilidad celular a parte de EMT; Marvin et al vieron que la transfección con N-cadherina en la línea celular de cáncer de mama BT-20, la cual expresa E-cadherina, no afecta a la morfología celular, las células no se volvían más mesenquimales, pero sí se veía afectado su comportamiento, las células se volvían más invasivas sin darse un fenotipo de EMT (Nieman, Prudoff et al. 1999). Por otro lado se ha observado que la unión de N-cadherina con FGFR-1 puede incrementar la invasión debido al incremento de metaloproteinasas, como por ejemplo la MMP9, debido a la activación de la vía MAPK/ERK (Hulit, Suyama et al. 2007). Esto nos llevaría a uno de los tres factores principales de las células tumorales para promover la invasión celular, la necesidad de la degradación de la matriz extracelular. En nuestro estudio observamos que la sobreexpresión de 4E-T, aparte de incrementar los niveles de N-cadherina, incrementaba los niveles de MMP9 en las cuatro líneas de estudio y de MMP3 en las tres líneas de mama analizadas, viéndose una disminución de este al inhibir la expresión endógena de 4E-T. Estos resultados nos indican que posiblemente hay una correlación entre el incremento de estas proteínas con un posible incremento de la invasión celular, por ese motivo pasamos a realizar un estudio de la invasión y migración celular al sobreexpresar 4E-T.

Se observó que las células que sobreexpresaban 4E-T mostraban características más invasivas y migratorias que las células control o al inhibir la expresión del 4E-T endógeno.

El como 4E-T incrementa los niveles de N-cadherina tiene que ser estudiado en detalle, basándonos en nuestros resultados solo observamos que la sobreexpresión de 4E-T incrementa los niveles endógenos de N-cadherina, este incremento se ve correlacionado con una disminución de los niveles de E-cadherina y un incremento de los niveles de metaloproteinasas como MMP3 y MMP9, las cuales promueven la degradación de la matriz extracelular permitiendo la invasión celular gracias a la formación de nuevas uniones mediante, posiblemente la N-cadherina, con otras células adyacentes.

### **6.2.1 Se requiere la unión 4E-T /eIF4E para que se produzca un incremento en invasión y migración**

Para poder estudiar con más detalle la relación de 4E-T con el incremento de la invasión y la migración celular y teniendo en cuenta que 4E-T forma un complejo con eIF4E decidimos estudiar si había alguna relación de este complejo con la capacidad invasora y migratoria al sobreexpresar 4E-T. Para ello utilizamos el mutante de 4E-T incapaz de unirse a eIF4E, observamos que al inhibir la unión eIF4E/4E-T se veía reducida la capacidad invasora y migratoria de las células. Mediante el tratamiento con el inhibidor de las Mnks CGP 57380 observamos que la fosforilación de eIF4E era necesaria, ya que a pesar de sobreexpresar 4E-T, si inhibíamos la fosforilación de eIF4E, se veía disminuida la invasión y la migración celular.

La vía MAPK/ERK, que activa la síntesis de metaloproteinasas, también está implicada en el incremento de la fosforilación de eIF4E, artículos previos han visto una correlación entre la fosforilación de eIF4E y el incremento en la invasión y la migración celular (Ramalingam, Gediya et al. 2014).

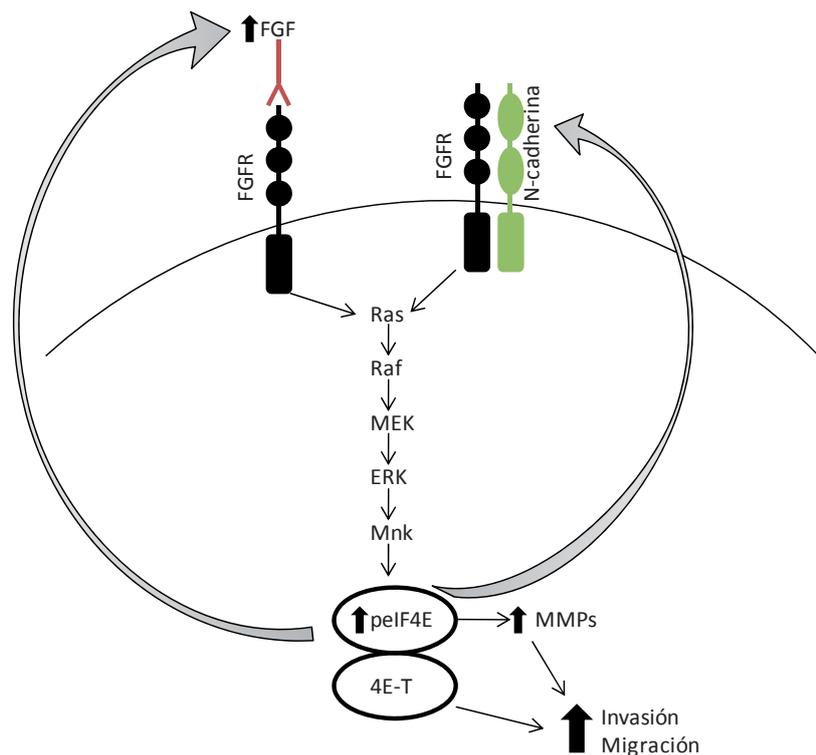
La expresión de eIF4E puede jugar un papel importante en la adquisición de factores de crecimiento de forma autónoma, un fenotipo crítico para que se produzca la metástasis (Graff and Zimmer 2003). Hay varios estudios que correlacionan niveles altos de eIF4E con factores implicados en la invasión celular, por ejemplo se ha visto que en células transformadas con eIF4E se ve incrementada la expresión de FGF; se ha observado un incremento de FGF en carcinoma de mama invasivos, el cual se correlaciona con niveles elevados de eIF4E (Nathan, Liu et al. 1997; De Benedetti and Harris 1999). Por otro lado se ha visto que la disminución de eIF4E inhibe la expresión de MMP9 correlacionándose con una reducción de la capacidad metastática (Graff, Boghaert et al. 1995).

Por un lado la expresión de eIF4E puede incrementar niveles de metaloproteinasas que degradarán la matriz extracelular y permitirán la invasión (Robichaud, Del Rincon et al. 2014), a parte incrementa la expresión de FGF (Nathan, Carter et al. 1997). Por otro lado niveles altos de N-cadherina estimulan la actividad de FGFR1 que regula la activación de la vía MAPK-ERK, lo que resulta con un incremento de la producción de MMP9 (Gradl, Kuhl et al. 1999; Hult, Suyama et al. 2007; van Roy 2014).

La activación de la vía MAPK-ERK incrementa la fosforilación de eIF4E vía Mnks. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la inhibición de la fosforilación de eIF4E por CGP 57380 produce un incremento de los niveles de  $\beta$ -catenina y E-cadherina, provocando la aparición de un fenotipo más epitelial (Pons, Peg et al. 2011), por lo tanto el incremento de

peIF4E puede estar implicado en el incremento de N-cadherina (Figura 53). Por otro lado hemos visto que el incremento de la fosforilación de eIF4E permite una mayor interacción con 4E-T. El papel que juega 4E-T debe ser analizado con más detalle, ya que la sobreexpresión del mutante 4E-T Y30A permite un incremento de MMP3 y MMP9 en ciertas líneas celulares, como en las MDA-MB-468, esto nos indicaría que este incremento no se ve relacionado con la unión de 4E-T a eIF4E. Se ha de determinar si el incremento observado de N-cadherina, MMP9 y MMP3 es debido de forma transcripcional o traduccional. Tanto los niveles de peIF4E como de 4E-T por si solos juegan un papel importante en el inicio de la expresión de proteínas implicadas en la invasión y la migración celular, pero es la formación del complejo peIF4E/4E-T el que permite un incremento en la invasión y migración celular.

A lo largo de los últimos 25 años se han dedicado abundantes recursos y esfuerzos en la investigación de las etapas iniciales de la progresión tumoral. Se ha conseguido acumular una gran cantidad de información acerca de los mecanismos moleculares responsables de este proceso, sin embargo existe una necesidad de profundizar en la comprensión de las etapas más avanzadas del cáncer. Por ello consideramos de gran importancia el estudio de diferentes factores que puedan estar envueltos en la progresión tumoral y proponemos el complejo peIF4E/4E-T como una parte clave en el proceso tumoral, podría ser una diana a futuras terapias contra el cáncer.



**Figura 53: Modelo de la posible vía de activación de la invasión y migración celular.** eIF4E incrementa los niveles de FGF, el cual mediante la interacción con su receptor activa la vía MAPK/ERK, la cual activa la fosforilación de eIF4E. eIF4E fosforilado incrementa su afinidad hacia 4E-T, esto permite un incremento de la invasión y la migración celular. Por otro lado, 4E-T incrementa los niveles de N-cadherina de forma directa o indirecta; N-cadherina se puede asociar al receptor FGFR activando así la vía MAPK/ERK. Por otro lado la fosforilación de eIF4E incrementa la síntesis de MMPs encargadas de degradar la matriz extracelular, lo cual permitirá un incremento en la invasión y migración celular.

### 6.3 pEIF4E en cáncer de mama

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en mujeres. A pesar que la esperanza de vida de las mujeres con cáncer de mama ha aumentado en los últimos años, un 40 % de las pacientes mueren. Por este motivo continuamente se están buscando nuevos factores relevantes para el pronóstico de estos tumores. Se ha visto que los niveles de eIF4E más elevados y de forma más reproducible se han encontrado en tumores de mama; los niveles de eIF4E en tejido normal de mama son más bajos que en otros tejidos, por este motivo la sobreexpresión anormal de eIF4E en carcinomas de mama es más obvia, se ha visto que eIF4E esta elevada de 3 a 30 veces más en tumores de mama que en el tejido normal (Kerekatte, Smiley et al. 1995), esto sugiere que la sobreexpresión de eIF4E es una transición necesaria en la progresión de tumores de mama en lugar de una causa directa (De Benedetti and Harris 1999). Benjamin Li et al. analizaron los datos clínicos de eIF4E en relación con los parámetros de la enfermedad, y vieron que un aumento igual o superior a 7 veces más que en tejido normal de la expresión de eIF4E era un indicador de reaparición y muerte para pacientes con cáncer de mama (Nathan, Liu et al. 1997). Los tumores comúnmente muestran un incremento de eIF4E tanto de forma directa como resultado de la activación de las vías PI3K/Akt/mTOR y Ras-ERK. En numerosos estudios se ha visto que el bloqueo de la expresión de eIF4E tiene un profundo efecto en la malignidad. Por este motivo hay un gran número de estudios enfocándose en eIF4E como medida terapéutica. La sobreexpresión de eIF4E en tumores está todavía bajo estudio, viendo los resultados obtenidos *in vitro*, donde la fosforilación de eIF4E incrementaba la resistencia a estrés, en principio por la formación del complejo pEIF4E/4E-T, nos centramos en el estudio de su papel en tumores de mama.

Los resultados del presente estudio muestran que los niveles de eIF4E están correlacionados con el tamaño del tumor. Se ha de mencionar que el número de casos de estudio, 77, es bajo, teniendo un número bajo de casos con metástasis ganglionar, la mayoría Her2 positivo y con receptores de estrógeno y progesterona positivos. Con un mayor número de casos se podrían encontrar correlaciones de los niveles de eIF4E y pEIF4E con el grado y pronóstico del cáncer de mama como se ha descrito anteriormente con niveles elevados de eIF4E total (De Benedetti and Harris 1999; De Benedetti and Graff 2004). Se observó que un 79 % de los tumores de estudio presentan elevados niveles de eIF4E, un 70 % elevados niveles de pEIF4E citoplasmático y un 8 % de pEIF4E nuclear. Los elevados niveles de eIF4E en tumores de mama se correlacionan con estudios previos, donde muestran que eIF4E se encuentra elevado en tumores de mama (Kerekatte, Smiley et al. 1995).

En relación con el estudio de proteínas implicadas en el complejo pEIF4E/4E-T observamos que el 100 % de los tumores muestran elevados niveles de HuR, un 83 % de Ago2 y un 53 % de 4E-T. Los altos niveles de expresión de estas proteínas en la serie clínica de estudio nos hacen pensar de la importancia de su papel en tumores de mama. Se han encontrado que elevados niveles de HuR en citoplasma de tumores de mama con un tamaño de tumor superior a 2 cm, con metástasis en linfomas y con un elevado grado histológico; HuR es un importante factor pronóstico (Heinonen, Fagerholm et al. 2007); HuR se une selectivamente y estabiliza mRNAs que contienen elementos ARE los cuales codifican para protooncogenes, proteínas reguladoras del ciclo celular, citoquinas y factores de crecimiento; debido al papel fundamental

que desempeña HuR en la estabilidad de mRNAs de factores clave o citoquinas que participan en la carcinogénesis y la progresión tumoral, su implicación y su potencial terapéutico en cáncer es una fuente de estudio (Yuan, Sanders et al. 2010). En el caso de Ago2 se ha visto que está implicada en los tumores más agresivos de cáncer de mama, pero su papel en la tumorigénesis sigue siendo un punto de estudio (Adams, Claffey et al. 2009; Kwon, Lee et al. 2014).

Hay una correlación positiva entre Ago2 y 4E-T, los dos componentes de PBs; así como una correlación negativa entre pelf4E nuclear con HuR y 4E-T. Teniendo en cuenta que la interacción pelf4E/4E-T que observamos *in vitro* se localiza en el citoplasma, en los PBs, es de esperar que cuanto más 4E-T haya en citoplasma menos pelf4E habrá en núcleo, si pelf4E queda retenido en citoplasma por 4E-T en lugar de ser transportado, a pesar de ello no observamos ninguna correlación positiva entre los niveles de pelf4E citoplasmático y 4E-T. Es necesario el estudio de una serie clínica más elevada para poder determinar bien las correlaciones entre estos factores. A pesar de ello el tanto por ciento de pelf4E localizado en los cuerpos citoplasmáticos con 4E-T es bajo en comparación con los niveles de pelf4E total, teniendo en cuenta que 4E-T se encarga del transporte de eIF4E de citoplasma a núcleo y una vez en núcleo 4E-T vuelve a citoplasma, podría ser que tan solo una parte pequeña del pelf4E se encontrase retenido en estos cuerpos citoplasmáticos y que la mayoría de pelf4E estuviese en núcleo, obteniendo así esta correlación negativa entre el pelf4E nuclear y 4E-T. La fosforilación de eIF4E y 4E-T producido por el estrés ambiental en las células tumorales puede afectar la localización de estas dos proteínas. El estudio de eIF4E es relevante para el tratamiento de cáncer de mama, así como el estudio de proteínas implicadas en su regulación o que interaccionan con él incrementando o colaborando en su actividad tumorigénica.

## 6.4 4E-T en cáncer de mama

Poco se conoce de la proteína transportadora de eIF4E (4E-T) y hasta el momento no se ha realizado ningún estudio en series clínicas en ningún tipo de tumor. Los pocos estudios que han abordado de esta proteína, se centran en su funcionamiento como transportador de eIF4E o como componente de los PBs.

Se ha descrito que se encuentra expresado de forma elevada a nivel proteico en el páncreas, el intestino, la mucosa oral, en el sistema reproductivo tanto masculino como femenino (testículos y ovarios), en la piel y en el cerebelo. En el tejido mamario se encuentra expresado de forma moderada según los datos de “*The human protein atlas*” (Uhlen M 2010).

Debido a los resultados *in vitro* obtenidos durante nuestro estudio, donde veíamos que la interacción pelf4E/4E-T incrementaba la resistencia a estrés, decidimos estudiar el papel de esta proteína en la serie clínica de mama.

No se observo ninguna correlación con ninguna de las variables clínico-patológicas de estudio, y 4E-T se encontraba expresado en un 53 % de los tumores de estudio. Como hemos comentado anteriormente 4E-T tiene una correlación positiva con Ago2, y una correlación negativa con pelf4E nuclear.

Realizamos un screening de algunos marcadores que se encuentran elevados en cáncer de mama, observamos una correlación positiva con YB-1 y su forma fosforilada, y con N-cadherina.

La correlación positiva encontrada con N-cadherina se correlaciona con los resultados obtenidos con pEIF4E nuclear, el cual se correlaciona negativamente con N-cadherina.

No hay resultados previos de la relación de 4E-T con N-cadherina o YB-1. YB-1 se considera un factor de transcripción encargado de la transcripción de muchos genes, regulados de forma directa o indirecta por YB-1; regula la traducción y estabilización de ciertos mRNAs, algunos implicados en la transición epitelio mesénquima; participa en la reparación de DNA y en el splicing de pre-mRNAs; así como puede ser excretado por las células para realizar funciones extracelulares. YB-1 es un marcador de la transformación de células malignas y la progresión tumoral, es considerado un target en la terapia contra el cáncer y la inflamación (Lyabin, Eliseeva et al. 2014). Debido a las numerosas funciones de YB-1 y los pocos datos obtenidos con YB-1, tan solo podemos afirmar que observamos una correlación positiva entre estas dos proteínas, sin poder explicar una posible relación entre ellas, sería necesario un estudio más detallado de la relación *in vitro* de estas dos proteínas, para saber si la correlación positiva de estas dos proteínas es el resultado de una interacción directa o indirecta entre ellas.

En el caso de la N-cadherina tampoco hay estudios previos de la correlación de esta proteína con 4E-T. N-cadherina se ve elevada en muchos tipos de tumores, se conoce como una cadherina mesenquimal, la cual reemplaza la E-cadherina durante la transición epitelio mesénquima, se produce una disminución de E-cadherina y un incremento de N-cadherina (Hazan, Qiao et al. 2004). No se observó ninguna correlación con otros factores implicados en la transición epitelio mesénquima en las series clínicas, como es el caso de Snail o Slug; esto nos indicaría que el incremento de N-cadherina no está relacionado con otros factores implicados con la transición epitelio-mesénquima.

---

# **CONCLUSIONES**

---



# 7. CONCLUSIONES

**A)** En el estudio *in vitro* del efecto de la fosforilación de eIF4E se ha observado que:

1. La sobreexpresión del mutante fosfomimético de eIF4E aumenta la resistencia celular a diversas situaciones de estrés, tales como la capacidad de formar colonias en situaciones de baja densidad celular, al tratamiento con cisplatino, a la falta de nutrientes y al estrés oxidativo.
2. La inhibición de la fosforilación de eIF4E disminuye la resistencia celular al estrés oxidativo, falta de nutrientes y al tratamiento con cisplatino.
3. La sobreexpresión del mutante fosfomimético de eIF4E disminuye la activación de apoptosis en situaciones de estrés oxidativo. Se asocia con el aumento de los niveles de proteínas asociadas con proliferación, como Ciclina D1, y resistencia a apoptosis, como Mcl-1. Dichos incrementos se observan asimismo tras la inhibición de la síntesis de mRNAs tras la adición de actinomicina D, indicando que este incremento es debido a un mecanismo post-transcripcional.
4. El mutante fosfomimético colocaliza con la proteína transportadora 4E-T en citoplasma, formando unos cuerpos citoplasmáticos en condiciones normales. Este complejo interacciona con las proteínas HuR y Ago2. El pEIF4E endógeno interacciona con 4E-T así como con HuR y Ago2.
5. La inhibición de 4E-T, Ago2 y HuR disminuye la resistencia celular al estrés oxidativo producida por la sobreexpresión del mutante fosfomimético, indicando que la formación de dicho complejo es importante para la supervivencia celular tras una situación de estrés oxidativo.
6. El mutante fosfomimético de eIF4E se asocia con un incremento precoz de la fracción 80 S en el perfil polisómico tras 2 horas de la adición de estrés oxidativo en las células, indicando un bloqueo precoz de la síntesis proteica global. A las 12 horas tras el tratamiento con arsénico este bloqueo es mantenido e incrementado en el caso del mutante hipofosforilado y el control. El mutante fosfomimético permite la síntesis selectiva de ciertas proteínas.

**B)** En el estudio *in vitro* del efecto de la proteína transportadora de eIF4E (4E-T) se ha observado que:

1. Un incremento de los niveles de N-cadherina al sobreexpresar 4E-T en las diferentes líneas de estudio, así como una disminución en los niveles de N-cadherina al inhibir la expresión endógena de 4E-T. Este incremento no se correlacionaba con un aumento

en la expresión de factores implicados en la transición epitelio mesénquima, como sería el caso de Snail, Slug o Twist. Se observó un incremento de los niveles de MMP9 en las cuatro líneas de estudio y de MMP3 en las tres líneas de mama analizadas, viéndose una disminución de éste al inhibir la expresión endógena de 4E-T.

2. No se observó ninguna diferencia en los niveles de proliferación al sobreexpresar o inhibir 4E-T. Se observó un incremento de la invasión y la migración celular en las líneas que sobreexpresaban 4E-T y no en aquellas que tenían inhibido el 4E-T endógeno.
3. La inhibición de la unión eIF4E/4E-T mediante la sobreexpresión del mutante 4E-T Y30A reduce la capacidad invasora y migratoria de las células.
4. Mediante el tratamiento con el inhibidor de las Mnks CGP 57380 observamos que la fosforilación de eIF4E es necesaria para la inducción del efecto proinvasor y promigratorio de las células. El incremento de la migración e invasión al sobreexpresar 4E-T se ve reducido al inhibir la fosforilación de eIF4E.

**C)** En el estudio clínico-patológico de la serie de tumores de mama estudiados se ha observado que los niveles de eIF4E:

1. Se correlacionan positivamente con el tamaño del tumor.
2. Altos niveles de pEIF4E nuclear, se correlacionan con tumores con alto índice proliferativo (Ki 67)
3. Se observó correlación negativa entre los niveles del pEIF4E nuclear con HuR y 4E-T.

**D)** En el estudio clínico-patológico de la serie de tumores de mama estudiado se ha observado que los niveles de 4E-T:

1. Se encontraba sobreexpresado, con patrón granular predominante en más del 50 % de los tumores.
2. En la serie estudiada no se observó correlación clínico-patológica con ninguna de las variables estudiadas, grado, tamaño y metástasis linfáticas.
3. Se observó una correlación positiva con los niveles de N-Cadherina, YB1 y pYB1.
4. Se observó una correlación positiva entre los niveles del factor 4E-T con Ago2 y una correlación negativa con los niveles de pEIF4E nuclear.

Como conclusión final decir que del estudio realizado se destaca que el factor eIF4E fosforilado induce una clara resistencia a múltiples situaciones de estrés celular, y en dicho efecto es indispensable la unión con el factor 4E-T. La formación del complejo, así como el estudio de otras proteínas y mRNAs asociados tales como HuR, Ago2 y otros, abren la puerta a la detección de proteínas y mRNAs que pueden ser traducidos de forma más selectiva tras situación de estrés celular en células con sobreexpresión del factor fosforilado eIF4E.

Por otro lado observamos que la sobreexpresión de 4E-T incrementa la invasión y la migración celular, abriendo un nuevo campo de estudio y pudiendo ser una nueva diana terapéutica.



---

# **BIBLIOGRAFÍA**

---



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, B. D., K. P. Claffey, et al. (2009). "Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells." Endocrinology **150**(1): 14-23.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2008). "Stress granules: the Tao of RNA triage." Trends Biochem Sci **33**(3): 141-50.
- Andrei, M. A., D. Ingelfinger, et al. (2005). "A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies." RNA **11**(5): 717-27.
- Andrews, J. L., A. C. Kim, et al. (2012). "The role and function of cadherins in the mammary gland." Breast Cancer Res **14**(1): 203.
- Ansieau, S. (2013). "EMT in breast cancer stem cell generation." Cancer Lett **338**(1): 63-8.
- Armengol, G., F. Rojo, et al. (2007). "4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications." Cancer Res **67**(16): 7551-5.
- Avdulov, S., S. Li, et al. (2004). "Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells." Cancer Cell **5**(6): 553-63.
- Bain, J., L. Plater, et al. (2007). "The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update." Biochem J **408**(3): 297-315.
- Banerjee, A. K. (1980). "5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids." Microbiol Rev **44**(2): 175-205.
- Banko, J. L., L. Hou, et al. (2004). "NMDA receptor activation results in PKA- and ERK-dependent Mnk1 activation and increased eIF4E phosphorylation in hippocampal area CA1." J Neurochem **91**(2): 462-70.
- Bauer, C., I. Diesinger, et al. (2001). "Translation initiation factor eIF-4G is immunogenic, overexpressed, and amplified in patients with squamous cell lung carcinoma." Cancer **92**(4): 822-9.
- Beghi, E., A. Azzoni, et al. (1990). "[Study group: "Evaluation of the efficacy of therapeutic treatments in epilepsy"]." Epidemiol Prev **12**(43): 21-7.
- Bianchini, A., M. Loiarro, et al. (2008). "Phosphorylation of eIF4E by MNKs supports protein synthesis, cell cycle progression and proliferation in prostate cancer cells." Carcinogenesis **29**(12): 2279-88.
- Bilanges, B. and D. Stokoe (2007). "Mechanisms of translational deregulation in human tumors and therapeutic intervention strategies." Oncogene **26**(41): 5973-90.
- Braun, J. E., E. Huntzinger, et al. (2012). "A molecular link between miRISCs and deadenylases provides new insight into the mechanism of gene silencing by microRNAs." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(12).
- Breier, G., M. Grosser, et al. (2014). "Endothelial cadherins in cancer." Cell Tissue Res.
- Brenner, S., A. O. Stretton, et al. (1965). "Genetic code: the 'nonsense' triplets for chain termination and their suppression." Nature **206**(988): 994-8.
- Bu, X. and C. H. Hagedorn (1992). "Phosphoprotein phosphatase 2A dephosphorylates eIF-4E and does not alter binding to the mRNA cap." FEBS Lett **301**(1): 15-8.
- Buchan, J. R. and R. Parker (2009). "Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation." Mol Cell **36**(6): 932-41.
- Buendia, A. J., C. Penafiel-Verdu, et al. (2013). "N-cadherin Expression in Feline Mammary Tumors Is Associated With a Reduced E-cadherin Expression and the Presence of Regional Metastasis." Vet Pathol.

- Bundschu, K., U. Walter, et al. (2006). "The VASP-Spred-Sprouty domain puzzle." *J Biol Chem* **281**(48): 36477-81.
- Buxade, M., N. Morrice, et al. (2008). "The PSF.p54nrb complex is a novel Mnk substrate that binds the mRNA for tumor necrosis factor alpha." *J Biol Chem* **283**(1): 57-65.
- Buxade, M., J. L. Parra, et al. (2005). "The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1." *Immunity* **23**(2): 177-89.
- Byrnes, K., S. White, et al. (2006). "High eIF4E, VEGF, and microvessel density in stage I to III breast cancer." *Ann Surg* **243**(5): 684-90; discussion 691-2.
- Cargnello, M., J. Tcherkezian, et al. (2012). "Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-transporter (4E-T) by c-Jun N-terminal kinase promotes stress-dependent P-body assembly." *Mol Cell Biol* **32**(22): 4572-84.
- Caron, S., M. Charon, et al. (2004). "Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E." *Mol Cell Biol* **24**(11): 4920-8.
- Carroll, M. and K. L. Borden (2013). "The oncogene eIF4E: using biochemical insights to target cancer." *J Interferon Cytokine Res* **33**(5): 227-38.
- Castellvi, J., A. Garcia, et al. (2006). "Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer." *Cancer* **107**(8): 1801-11.
- Castellvi, J., A. Garcia, et al. (2009). "Cell signaling in endometrial carcinoma: phosphorylated 4E-binding protein-1 expression in endometrial cancer correlates with aggressive tumors and prognosis." *Hum Pathol* **40**(10): 1418-26.
- Cavigelli, M., W. W. Li, et al. (1996). "The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase." *EMBO J* **15**(22): 6269-79.
- Clemens, M. J. (2004). "Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation." *Oncogene* **23**(18): 3180-8.
- Cohen, N., M. Sharma, et al. (2001). "PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA." *EMBO J* **20**(16): 4547-59.
- Coldwell, M. J., U. Sack, et al. (2012). "Multiple isoforms of the translation initiation factor eIF4GII are generated via use of alternative promoters, splice sites and a non-canonical initiation codon." *Biochem J* **448**(1): 1-11.
- Coller, J. and R. Parker (2004). "Eukaryotic mRNA decapping." *Annu Rev Biochem* **73**: 861-90.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (1996). "Matrix metalloproteinases and the development of cancer." *Chem Biol* **3**(11): 895-904.
- Cuenda, A., J. Rouse, et al. (1995). "SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1." *FEBS Lett* **364**(2): 229-33.
- Culjkovic, B., K. Tan, et al. (2008). "The eIF4E RNA regulon promotes the Akt signaling pathway." *J Cell Biol* **181**(1): 51-63.
- Culjkovic, B., I. Topisirovic, et al. (2007). "Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E." *Cell Cycle* **6**(1): 65-9.
- Culjkovic, B., I. Topisirovic, et al. (2006). "eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation." *J Cell Biol* **175**(3): 415-26.
- Chaudhry, Y., A. Nayak, et al. (2006). "Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components." *J Biol Chem* **281**(35): 25315-25.
- Chaudhuri, J., D. Chowdhury, et al. (1999). "Distinct functions of eukaryotic translation initiation factors eIF1A and eIF3 in the formation of the 40 S ribosomal preinitiation complex." *J Biol Chem* **274**(25): 17975-80.
- Chen, Y. C., S. Y. Lin-Shiau, et al. (1998). "Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis." *J Cell Physiol* **177**(2): 324-33.
- De Benedetti, A. and J. R. Graff (2004). "eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases." *Oncogene* **23**(18): 3189-99.
- De Benedetti, A. and A. L. Harris (1999). "eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies." *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1): 59-72.

- De Benedetti, A., S. Joshi-Barve, et al. (1991). "Expression of antisense RNA against initiation factor eIF-4E mRNA in HeLa cells results in lengthened cell division times, diminished translation rates, and reduced levels of both eIF-4E and the p220 component of eIF-4F." Mol Cell Biol **11**(11): 5435-45.
- De Benedetti, A. and R. E. Rhoads (1990). "Overexpression of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in HeLa cells results in aberrant growth and morphology." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8212-6.
- DeFatta, R. J., C. O. Nathan, et al. (2000). "Antisense RNA to eIF4E suppresses oncogenic properties of a head and neck squamous cell carcinoma cell line." Laryngoscope **110**(6): 928-33.
- Detzer, A., C. Engel, et al. (2011). "Cell stress is related to re-localization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells." Nucleic Acids Res **39**(7): 2727-41.
- Dobrikov, M., E. Dobrikova, et al. (2011). "Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1) by protein kinase C{alpha} regulates eIF4G1 binding to Mnk1." Mol Cell Biol **31**(14): 2947-59.
- Dong, K., R. Wang, et al. (2009). "Tumor-specific RNAi targeting eIF4E suppresses tumor growth, induces apoptosis and enhances cisplatin cytotoxicity in human breast carcinoma cells." Breast Cancer Res Treat **113**(3): 443-56.
- Dostie, J., M. Ferraiuolo, et al. (2000). "A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E." EMBO J **19**(12): 3142-56.
- Dostie, J., F. Lejbkiewicz, et al. (2000). "Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles." J Cell Biol **148**(2): 239-47.
- Doudna, J. A. and V. L. Rath (2002). "Structure and function of the eukaryotic ribosome: the next frontier." Cell **109**(2): 153-6.
- Duncan, R., S. C. Milburn, et al. (1987). "Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F." J Biol Chem **262**(1): 380-8.
- Duncan, R. F., H. Peterson, et al. (2003). "Oxidative stress increases eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation in vascular cells." Biochem J **369**(Pt 2): 213-25.
- Fan, S., S. S. Ramalingam, et al. (2009). "Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues." Cancer Biol Ther **8**(15): 1463-9.
- Feoktistova, K., E. Tuvshintogs, et al. (2013). "Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(33): 13339-44.
- Ferraiuolo, M. A., S. Basak, et al. (2005). "A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay." J Cell Biol **170**(6): 913-24.
- Filipowicz, W., Y. Furuichi, et al. (1976). "A protein binding the methylated 5'-terminal sequence, m7GpppN, of eukaryotic messenger RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(5): 1559-63.
- Flowers, A., Q. D. Chu, et al. (2009). "Eukaryotic initiation factor 4E overexpression in triple-negative breast cancer predicts a worse outcome." Surgery **146**(2): 220-6.
- Flynn, A. and C. G. Proud (1995). "Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **270**(37): 21684-8.
- Flynn, A. and G. Proud (1996). "Insulin-stimulated phosphorylation of initiation factor 4E is mediated by the MAP kinase pathway." FEBS Lett **389**(2): 162-6.
- Fournier, M. J., L. Coudert, et al. (2013). "Inactivation of the mTORC1-eukaryotic translation initiation factor 4E pathway alters stress granule formation." Mol Cell Biol **33**(11): 2285-301.
- Fraser, C. S., V. M. Pain, et al. (1999). "Cellular stress in xenopus kidney cells enhances the phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor (eIF)4E and the association of eIF4F with poly(A)-binding protein." Biochem J **342 Pt 3**: 519-26.
- Frixen, U. H., J. Behrens, et al. (1991). "E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells." J Cell Biol **113**(1): 173-85.

- Fujimura, K., A. T. Sasaki, et al. (2012). "Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules." Nucleic Acids Res **40**(16): 8099-110.
- Fukunaga, R. and T. Hunter (1997). "MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates." EMBO J **16**(8): 1921-33.
- Furic, L., L. Rong, et al. (2010). "eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(32): 14134-9.
- Gallouzi, I. E., C. M. Brennan, et al. (2000). "HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3073-8.
- Gingras, A. C., B. Raught, et al. (1999). "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." Annu Rev Biochem **68**: 913-63.
- Gradl, D., M. Kuhl, et al. (1999). "The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression." Mol Cell Biol **19**(8): 5576-87.
- Graff, J. R., E. R. Boghaert, et al. (1995). "Reduction of translation initiation factor 4E decreases the malignancy of ras-transformed cloned rat embryo fibroblasts." Int J Cancer **60**(2): 255-63.
- Graff, J. R., B. W. Konicek, et al. (2008). "Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy." Cancer Res **68**(3): 631-4.
- Graff, J. R., B. W. Konicek, et al. (2007). "Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity." J Clin Invest **117**(9): 2638-48.
- Graff, J. R. and S. G. Zimmer (2003). "Translational control and metastatic progression: enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs." Clin Exp Metastasis **20**(3): 265-73.
- Gray, N. K. and M. Wickens (1998). "Control of translation initiation in animals." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 399-458.
- Grille, S. J., A. Bellacosa, et al. (2003). "The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines." Cancer Res **63**(9): 2172-8.
- Haghighat, A., S. Mader, et al. (1995). "Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E." EMBO J **14**(22): 5701-9.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-74.
- Harris, T. E., A. Chi, et al. (2006). "mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin." EMBO J **25**(8): 1659-68.
- Hazan, R. B., L. Kang, et al. (1997). "N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma." Cell Adhes Commun **4**(6): 399-411.
- Hazan, R. B., G. R. Phillips, et al. (2000). "Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis." J Cell Biol **148**(4): 779-90.
- Hazan, R. B., R. Qiao, et al. (2004). "Cadherin switch in tumor progression." Ann N Y Acad Sci **1014**: 155-63.
- Heesom, K. J., A. Gampel, et al. (2001). "Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1)." Curr Biol **11**(17): 1374-9.
- Heinonen, M., R. Fagerholm, et al. (2007). "Prognostic role of HuR in hereditary breast cancer." Clin Cancer Res **13**(23): 6959-63.
- Herbert, T. P., A. R. Tee, et al. (2002). "The extracellular signal-regulated kinase pathway regulates the phosphorylation of 4E-BP1 at multiple sites." J Biol Chem **277**(13): 11591-6.
- Hershey, J. W., N. Sonenberg, et al. (2012). "Principles of translational control: an overview." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(12).

- Hiller, D. J., Q. Chu, et al. (2009). "Predictive value of eIF4E reduction after neoadjuvant therapy in breast cancer." *J Surg Res* **156**(2): 265-9.
- Hinnebusch, A. G. (2011). "Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes." *Microbiol Mol Biol Rev* **75**(3): 434-67, first page of table of contents.
- Hock, J., L. Weinmann, et al. (2007). "Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells." *EMBO Rep* **8**(11): 1052-60.
- Hou, J., F. Lam, et al. (2012). "Targeting Mnks for cancer therapy." *Oncotarget* **3**(2): 118-31.
- Hsieh, A. C., Y. Liu, et al. (2012). "The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis." *Nature* **485**(7396): 55-61.
- Hu, Z., C. Fan, et al. (2006). "The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms." *BMC Genomics* **7**: 96.
- Hulit, J., K. Suyama, et al. (2007). "N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation." *Cancer Res* **67**(7): 3106-16.
- Imataka, H., A. Gradi, et al. (1998). "A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation." *EMBO J* **17**(24): 7480-9.
- Irigoyen, M. A., F. V. Garcia, et al. (2011). "[Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics]." *An Sist Sanit Navar* **34**(2): 219-33.
- Jankowska-Anyszka, M., B. J. Lamphear, et al. (1998). "Multiple isoforms of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in *Caenorhabditis elegans* can distinguish between mono- and trimethylated mRNA cap structures." *J Biol Chem* **273**(17): 10538-42.
- Jaramillo, M., T. E. Dever, et al. (1991). "RNA unwinding in translation: assembly of helicase complex intermediates comprising eukaryotic initiation factors eIF-4F and eIF-4B." *Mol Cell Biol* **11**(12): 5992-7.
- Jones, R. M., J. Branda, et al. (1996). "An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc." *Mol Cell Biol* **16**(9): 4754-64.
- Joshi, B., A. L. Cai, et al. (1995). "Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209." *J Biol Chem* **270**(24): 14597-603.
- Joshi, B., A. Cameron, et al. (2004). "Characterization of mammalian eIF4E-family members." *Eur J Biochem* **271**(11): 2189-203.
- Joshi, B., K. Lee, et al. (2005). "Phylogenetic analysis of eIF4E-family members." *BMC Evol Biol* **5**: 48.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." *J Clin Invest* **119**(6): 1420-8.
- Kamenska, A., W. T. Lu, et al. (2014). "Human 4E-T represses translation of bound mRNAs and enhances microRNA-mediated silencing." *Nucleic Acids Res* **42**(5): 3298-313.
- Kapp, L. D. and J. R. Lorsch (2004). "GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2." *J Mol Biol* **335**(4): 923-36.
- Kapp, L. D. and J. R. Lorsch (2004). "The molecular mechanics of eukaryotic translation." *Annu Rev Biochem* **73**: 657-704.
- Kedersha, N. and P. Anderson (2002). "Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability." *Biochem Soc Trans* **30**(Pt 6): 963-9.
- Kedersha, N., G. Stoecklin, et al. (2005). "Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling." *J Cell Biol* **169**(6): 871-84.
- Kedersha, N. L., M. Gupta, et al. (1999). "RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules." *J Cell Biol* **147**(7): 1431-42.
- Kerekatte, V., K. Smiley, et al. (1995). "The proto-oncogene/translation factor eIF4E: a survey of its expression in breast carcinomas." *Int J Cancer* **64**(1): 27-31.

- Klann, E. and J. D. Sweatt (2008). "Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation." Neurobiol Learn Mem **89**(3): 247-59.
- Kleiner, H. E., P. Krishnan, et al. (2009). "Tissue microarray analysis of eIF4E and its downstream effector proteins in human breast cancer." J Exp Clin Cancer Res **28**: 5.
- Knauf, U., C. Tschopp, et al. (2001). "Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2." Mol Cell Biol **21**(16): 5500-11.
- Koritzinsky, M., M. G. Magagnin, et al. (2006). "Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control." EMBO J **25**(5): 1114-25.
- Koromilas, A. E., A. Lazaris-Karatzas, et al. (1992). "mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E." EMBO J **11**(11): 4153-8.
- Kozak, M. (1984). "Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs." Nucleic Acids Res **12**(2): 857-72.
- Kozak, M. (1989). "The scanning model for translation: an update." J Cell Biol **108**(2): 229-41.
- Kozak, M. (1999). "Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes." Gene **234**(2): 187-208.
- Kulkarni, M., S. Ozgur, et al. (2010). "On track with P-bodies." Biochem Soc Trans **38**(Pt 1): 242-51.
- Kwon, S. Y., J. H. Lee, et al. (2014). "Complexity in Regulation of microRNA Machinery Components in Invasive Breast Carcinoma." Pathol Oncol Res.
- Labelle, M., H. J. Schnittler, et al. (2008). "Vascular endothelial cadherin promotes breast cancer progression via transforming growth factor beta signaling." Cancer Res **68**(5): 1388-97.
- Lamphear, B. J., R. Kirchweger, et al. (1995). "Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation." J Biol Chem **270**(37): 21975-83.
- Larsson, O., S. Li, et al. (2007). "Eukaryotic translation initiation factor 4E induced progression of primary human mammary epithelial cells along the cancer pathway is associated with targeted translational deregulation of oncogenic drivers and inhibitors." Cancer Res **67**(14): 6814-24.
- Larue, L. and A. Bellacosa (2005). "Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways." Oncogene **24**(50): 7443-54.
- Lazaris-Karatzas, A., K. S. Montine, et al. (1990). "Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap." Nature **345**(6275): 544-7.
- Lee, H. C., H. Cho, et al. (2008). "Ectopic expression of eIF4E-transporter triggers the movement of eIF4E into P-bodies, inhibiting steady-state translation but not the pioneer round of translation." Biochem Biophys Res Commun **369**(4): 1160-5.
- Lejbkovicz, F., C. Goyer, et al. (1992). "A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9612-6.
- Leopold, P. L., J. Vincent, et al. (2012). "A comparison of epithelial-to-mesenchymal transition and re-epithelialization." Semin Cancer Biol **22**(5-6): 471-83.
- Li, B. D., L. Liu, et al. (1997). "Overexpression of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) in breast carcinoma." Cancer **79**(12): 2385-90.
- Li, S., T. Takasu, et al. (2003). "Translation factor eIF4E rescues cells from Myc-dependent apoptosis by inhibiting cytochrome c release." J Biol Chem **278**(5): 3015-22.
- Li, Y., S. Fan, et al. (2012). "Elevated expression of eukaryotic translation initiation factor 4E is associated with proliferation, invasion and acquired resistance to erlotinib in lung cancer." Cancer Biol Ther **13**(5): 272-80.

- Li, Y., P. Yue, et al. (2010). "Protein phosphatase 2A negatively regulates eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and eIF4F assembly through direct dephosphorylation of Mnk and eIF4E." Neoplasia **12**(10): 848-55.
- Lin, L., T. Holbro, et al. (2001). "Molecular interaction between human tumor marker protein p150, the largest subunit of eIF3, and intermediate filament protein K7." J Cell Biochem **80**(4): 483-90.
- Lindsay, A. J. and M. W. McCaffrey (2011). "Myosin Va is required for P body but not stress granule formation." J Biol Chem **286**(13): 11519-28.
- Lobo, M. V., M. E. Martin, et al. (2000). "Levels, phosphorylation status and cellular localization of translational factor eIF2 in gastrointestinal carcinomas." Histochem J **32**(3): 139-50.
- Lopez de Silanes, I., M. Zhan, et al. (2004). "Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2987-92.
- Lyabin, D. N., I. A. Eliseeva, et al. (2014). "YB-1 protein: functions and regulation." Wiley Interdiscip Rev RNA **5**(1): 95-110.
- Mader, S., H. Lee, et al. (1995). "The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins." Mol Cell Biol **15**(9): 4990-7.
- Majumdar, R., A. Bandyopadhyay, et al. (2003). "Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex." J Biol Chem **278**(8): 6580-7.
- Makkinje, A., H. Xiong, et al. (1995). "Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E by insulin-stimulated protamine kinase." J Biol Chem **270**(24): 14824-8.
- Mamane, Y., E. Petroulakis, et al. (2004). "eIF4E--from translation to transformation." Oncogene **23**(18): 3172-9.
- Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, et al. (1997). "X-ray studies of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP." Nucleic Acids Symp Ser(36): 8-11.
- Mazan-Mamczarz, K., S. Galban, et al. (2003). "RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8354-9.
- McClusky, D. R., Q. Chu, et al. (2005). "A prospective trial on initiation factor 4E (eIF4E) overexpression and cancer recurrence in node-positive breast cancer." Ann Surg **242**(4): 584-90; discussion 590-2.
- McGraw-Hill (2012). "Biosíntesis de las proteínas: Traducción." 361-379.
- McKendrick, L., S. J. Morley, et al. (2001). "Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) at Ser209 is not required for protein synthesis in vitro and in vivo." Eur J Biochem **268**(20): 5375-85.
- Micalizzi, D. S., S. M. Farabaugh, et al. (2010). "Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression." J Mammary Gland Biol Neoplasia **15**(2): 117-34.
- Mignatti, P. and D. B. Rifkin (1993). "Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion." Physiol Rev **73**(1): 161-95.
- Minich, W. B., M. L. Balasta, et al. (1994). "Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7668-72.
- Minshall, N., M. H. Reiter, et al. (2007). "CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early *Xenopus* oocytes." J Biol Chem **282**(52): 37389-401.
- Mochizuki, K., A. Oguro, et al. (2005). "High affinity RNA for mammalian initiation factor 4E interferes with mRNA-cap binding and inhibits translation." RNA **11**(1): 77-89.
- Moerke, N. J., H. Aktas, et al. (2007). "Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G." Cell **128**(2): 257-67.

- Mokas, S., J. R. Mills, et al. (2009). "Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition." *Mol Biol Cell* **20**(11): 2673-83.
- Morley, S. J. and L. McKendrick (1997). "Involvement of stress-activated protein kinase and p38/RK mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the enhanced phosphorylation of initiation factor 4E in NIH 3T3 cells." *J Biol Chem* **272**(28): 17887-93.
- Morley, S. J. and S. Naegele (2002). "Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 4E is not required for de novo protein synthesis following recovery from hypertonic stress in human kidney cells." *J Biol Chem* **277**(36): 32855-9.
- Munroe, D. and A. Jacobson (1990). "mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation." *Mol Cell Biol* **10**(7): 3441-55.
- Murray, R., B. D., et al. (1997). *Bioquímica de Harper*.
- Nabors, L. B., G. Y. Gillespie, et al. (2001). "HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs." *Cancer Res* **61**(5): 2154-61.
- Nabors, L. B., E. Suswam, et al. (2003). "Tumor necrosis factor alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells: a role for RNA stabilization and HuR." *Cancer Res* **63**(14): 4181-7.
- Nathan, C. O., P. Carter, et al. (1997). "Elevated expression of eIF4E and FGF-2 isoforms during vascularization of breast carcinomas." *Oncogene* **15**(9): 1087-94.
- Nathan, C. O., S. Franklin, et al. (1999). "Expression of eIF4E during head and neck tumorigenesis: possible role in angiogenesis." *Laryngoscope* **109**(8): 1253-8.
- Nathan, C. O., L. Liu, et al. (1997). "Detection of the proto-oncogene eIF4E in surgical margins may predict recurrence in head and neck cancer." *Oncogene* **15**(5): 579-84.
- Nielsen, P. J. and H. Trachsel (1988). "The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed." *EMBO J* **7**(7): 2097-105.
- Nieman, M. T., R. S. Prudoff, et al. (1999). "N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression." *J Cell Biol* **147**(3): 631-44.
- O'Loughlen, A., V. M. Gonzalez, et al. (2007). "Characterization of the activity of human MAP kinase-interacting kinase Mnk1b." *Biochim Biophys Acta* **1773**(9): 1416-27.
- Oridate, N., H. J. Kim, et al. (2005). "Growth inhibition of head and neck squamous carcinoma cells by small interfering RNAs targeting eIF4E or cyclin D1 alone or combined with cisplatin." *Cancer Biol Ther* **4**(3): 318-23.
- Parker, R. and U. Sheth (2007). "P bodies and the control of mRNA translation and degradation." *Mol Cell* **25**(5): 635-46.
- Parra, J. L., M. Buxade, et al. (2005). "Features of the catalytic domains and C termini of the MAPK signal-integrating kinases Mnk1 and Mnk2 determine their differing activities and regulatory properties." *J Biol Chem* **280**(45): 37623-33.
- Pause, A., G. J. Belsham, et al. (1994). "Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function." *Nature* **371**(6500): 762-7.
- Peifer, M. and P. Polakis (2000). "Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus." *Science* **287**(5458): 1606-9.
- Peinado, H., D. Olmeda, et al. (2007). "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" *Nat Rev Cancer* **7**(6): 415-28.
- Pelletier, J. and N. Sonenberg (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA." *Nature* **334**(6180): 320-5.
- Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* **406**(6797): 747-52.
- Pincheira, R., Q. Chen, et al. (2001). "Identification of a 170-kDa protein over-expressed in lung cancers." *Br J Cancer* **84**(11): 1520-7.
- Pons, B., V. Peg, et al. (2011). "The effect of p-4E-BP1 and p-eIF4E on cell proliferation in a breast cancer model." *Int J Oncol* **39**(5): 1337-45.

- Poulin, F., A. C. Gingras, et al. (1998). "4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family." *J Biol Chem* **273**(22): 14002-7.
- Proud, C. G. (1992). "Protein phosphorylation in translational control." *Curr Top Cell Regul* **32**: 243-369.
- Proud, C. G. (2002). "Control of the translational machinery in mammalian cells." *Eur J Biochem* **269**(22): 5337.
- Ptushkina, M., T. von der Haar, et al. (1999). "Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state." *EMBO J* **18**(14): 4068-75.
- Pyronnet, S., H. Imataka, et al. (1999). "Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E." *EMBO J* **18**(1): 270-9.
- Ramalingam, S., L. Gediya, et al. (2014). "First MNKs degrading agents block phosphorylation of eIF4E, induce apoptosis, inhibit cell growth, migration and invasion in triple negative and Her2-overexpressing breast cancer cell lines." *Oncotarget* **5**(2): 530-43.
- Ramirez-Valle, F., S. Braunstein, et al. (2008). "eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy." *J Cell Biol* **181**(2): 293-307.
- Rao, G. N. (2000). "Oxidant stress stimulates phosphorylation of eIF4E without an effect on global protein synthesis in smooth muscle cells. Lack of evidence for a role of H2O2 in angiotensin II-induced hypertrophy." *J Biol Chem* **275**(22): 16993-9.
- Raught, B. and A. C. Gingras (1999). "eIF4E activity is regulated at multiple levels." *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1): 43-57.
- Rhoads, R. E. (2009). "eIF4E: new family members, new binding partners, new roles." *J Biol Chem* **284**(25): 16711-5.
- Robichaud, N., S. V. Del Rincon, et al. (2014). "Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3." *Oncogene*.
- Rogers, G. W., Jr., A. A. Komar, et al. (2002). "eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 307-31.
- Rojo, F., L. Najera, et al. (2007). "4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis." *Clin Cancer Res* **13**(1): 81-9.
- Rom, E., H. C. Kim, et al. (1998). "Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein." *J Biol Chem* **273**(21): 13104-9.
- Rosenwald, I. B., J. J. Chen, et al. (1999). "Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis." *Oncogene* **18**(15): 2507-17.
- Rosenwald, I. B., R. Kaspar, et al. (1995). "Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels." *J Biol Chem* **270**(36): 21176-80.
- Rosenwald, I. B., D. B. Rhoads, et al. (1993). "Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 6175-8.
- Rousseau, D., R. Kaspar, et al. (1996). "Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3): 1065-70.
- Rozen, F., I. Edery, et al. (1990). "Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F." *Mol Cell Biol* **10**(3): 1134-44.
- Ruggero, D., L. Montanaro, et al. (2004). "The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis." *Nat Med* **10**(5): 484-6.
- Ruud, K. A., C. Kuhlrow, et al. (1998). "Identification and characterization of a novel cap-binding protein from Arabidopsis thaliana." *J Biol Chem* **273**(17): 10325-30.
- Savagner, P. (2010). "The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon." *Ann Oncol* **21** Suppl 7: vii89-92.
- Scheper, G. C., N. A. Morrice, et al. (2001). "The mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase Mnk2 is a eukaryotic initiation factor 4E kinase with high levels of basal activity in mammalian cells." *Mol Cell Biol* **21**(3): 743-54.

- Scheper, G. C., J. L. Parra, et al. (2003). "The N and C termini of the splice variants of the human mitogen-activated protein kinase-interacting kinase Mnk2 determine activity and localization." *Mol Cell Biol* **23**(16): 5692-705.
- Scheper, G. C. and C. G. Proud (2002). "Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation?" *Eur J Biochem* **269**(22): 5350-9.
- Shaw, G. and R. Kamen (1986). "A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation." *Cell* **46**(5): 659-67.
- Shenberger, J. S., L. Zhang, et al. (2007). "Roles of mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinases 1 and 2 in oxidant-mediated eIF4E phosphorylation." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(10): 1828-42.
- Sheth, U. and R. Parker (2003). "Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies." *Science* **300**(5620): 805-8.
- Sheth, U. and R. Parker (2006). "Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies." *Cell* **125**(6): 1095-109.
- Silva, R. L. and H. G. Wendel (2008). "MNK, EIF4E and targeting translation for therapy." *Cell Cycle* **7**(5): 553-5.
- Sonenberg, N. (2008). "eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research." *Biochem Cell Biol* **86**(2): 178-83.
- Sonenberg, N. and A. C. Gingras (1998). "The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth." *Curr Opin Cell Biol* **10**(2): 268-75.
- Sonenberg, N. and A. G. Hinnebusch (2009). "Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets." *Cell* **136**(4): 731-45.
- Sonenberg, N., M. A. Morgan, et al. (1978). "A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10): 4843-7.
- Sorrells, D. L., C. Meschonat, et al. (1999). "Pattern of amplification and overexpression of the eukaryotic initiation factor 4E gene in solid tumor." *J Surg Res* **85**(1): 37-42.
- Stratton, M. R., P. J. Campbell, et al. (2009). "The cancer genome." *Nature* **458**(7239): 719-24.
- Takeichi, M. (1993). "Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis." *Curr Opin Cell Biol* **5**(5): 806-11.
- Takeichi, M. (2011). "Self-organization of animal tissues: cadherin-mediated processes." *Dev Cell* **21**(1): 24-6.
- Tarun, S. Z., Jr. and A. B. Sachs (1995). "A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast." *Genes Dev* **9**(23): 2997-3007.
- Thiery, J. P., H. Acloque, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." *Cell* **139**(5): 871-90.
- Topisirovic, I., B. Culjkovic, et al. (2003). "The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth." *EMBO J* **22**(3): 689-703.
- Topisirovic, I., M. Ruiz-Gutierrez, et al. (2004). "Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities." *Cancer Res* **64**(23): 8639-42.
- Topisirovic, I., N. Siddiqui, et al. (2009). "The eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) and HuR RNA operons collaboratively regulate the expression of survival and proliferative genes." *Cell Cycle* **8**(7): 960-1.
- Topisirovic, I., N. Siddiqui, et al. (2009). "Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP." *EMBO J* **28**(8): 1087-98.
- Topisirovic, I., N. Siddiqui, et al. (2009). "Stability of eukaryotic translation initiation factor 4E mRNA is regulated by HuR, and this activity is dysregulated in cancer." *Mol Cell Biol* **29**(5): 1152-62.

- Tschopp, C., U. Knauf, et al. (2000). "Phosphorylation of eIF-4E on Ser 209 in response to mitogenic and inflammatory stimuli is faithfully detected by specific antibodies." Mol Cell Biol Res Commun **3**(4): 205-211.
- Tsukiyama-Kohara, K., F. Poulin, et al. (2001). "Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1." Nat Med **7**(10): 1128-32.
- Ueda, T., R. Watanabe-Fukunaga, et al. (2004). "Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development." Mol Cell Biol **24**(15): 6539-49.
- Uhlen M, O. P., Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S, Wernerus H, Björling L, Ponten F. (2010). "Towards a knowledge-based Human Protein Atlas." Nat Biotechnol. **28**(12): 1248-50.
- van Roy, F. (2014). "Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer." Nat Rev Cancer **14**(2): 121-34.
- Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., et al. (1991). "Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role." Cell **66**(1): 107-19.
- von Roretz, C., S. Di Marco, et al. (2011). "Turnover of AU-rich-containing mRNAs during stress: a matter of survival." Wiley Interdiscip Rev RNA **2**(3): 336-47.
- Walther, T. N., T. H. Wittop Koning, et al. (1998). "A 5'-3' exonuclease activity involved in forming the 3' products of histone pre-mRNA processing in vitro." RNA **4**(9): 1034-46.
- Wang, S., I. B. Rosenwald, et al. (1999). "Expression of the eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha in non-Hodgkin's lymphomas." Am J Pathol **155**(1): 247-55.
- Wang, W., M. C. Caldwell, et al. (2000). "HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation." EMBO J **19**(10): 2340-50.
- Wang, X., A. Beugnet, et al. (2005). "Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins." Mol Cell Biol **25**(7): 2558-72.
- Wang, X., A. Flynn, et al. (1998). "The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways." J Biol Chem **273**(16): 9373-7.
- Wang, X., P. Yue, et al. (2007). "Inhibition of mammalian target of rapamycin induces phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Mnk-mediated eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation." Mol Cell Biol **27**(21): 7405-13.
- Waskiewicz, A. J., A. Flynn, et al. (1997). "Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2." EMBO J **16**(8): 1909-20.
- Waskiewicz, A. J., J. C. Johnson, et al. (1999). "Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo." Mol Cell Biol **19**(3): 1871-80.
- Wendel, H. G., R. L. Silva, et al. (2007). "Dissecting eIF4E action in tumorigenesis." Genes Dev **21**(24): 3232-7.
- Westermarck, J. and W. C. Hahn (2008). "Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation." Trends Mol Med **14**(4): 152-60.
- Wheater, M. J., P. W. Johnson, et al. (2010). "The role of MNK proteins and eIF4E phosphorylation in breast cancer cell proliferation and survival." Cancer Biol Ther **10**(7): 728-35.
- Wickens, M. (1990). "How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus." Trends Biochem Sci **15**(7): 277-81.
- Xu, X., J. Vatsyayan, et al. (2010). "Sumoylation of eIF4E activates mRNA translation." EMBO Rep **11**(4): 299-304.
- Yang, D. Q. and M. B. Kastan (2000). "Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1." Nat Cell Biol **2**(12): 893-8.
- Yilmaz, M. and G. Christofori (2009). "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 15-33.

- Yoshizawa, A., J. Fukuoka, et al. (2010). "Overexpression of phospho-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **16**(1): 240-8.
- Yuan, Z., A. J. Sanders, et al. (2010). "HuR, a key post-transcriptional regulator, and its implication in progression of breast cancer." Histol Histopathol **25**(10): 1331-40.
- Zeisberg, M. and E. G. Neilson (2009). "Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions." J Clin Invest **119**(6): 1429-37.
- Zhang, M., W. Fu, et al. (2008). "Inhibition of polysome assembly enhances imatinib activity against chronic myelogenous leukemia and overcomes imatinib resistance." Mol Cell Biol **28**(20): 6496-509.
- Zhou, F. F., M. Yan, et al. "Knockdown of eIF4E suppresses cell growth and migration, enhances chemosensitivity and correlates with increase in Bax/Bcl-2 ratio in triple-negative breast cancer cells." Med Oncol **28**(4): 1302-7.
- Zhou, F. F., M. Yan, et al. (2010). "Knockdown of eIF4E suppresses cell growth and migration, enhances chemosensitivity and correlates with increase in Bax/Bcl-2 ratio in triple-negative breast cancer cells." Med Oncol **28**(4): 1302-7.
- Zhou, F. F., M. Yan, et al. (2011). "Knockdown of eIF4E suppresses cell growth and migration, enhances chemosensitivity and correlates with increase in Bax/Bcl-2 ratio in triple-negative breast cancer cells." Med Oncol **28**(4): 1302-7.
- Zhou, S., G. P. Wang, et al. (2006). "Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and angiogenesis: prognostic markers for breast cancer." BMC Cancer **6**: 231.
- Zimmer, S. G., A. DeBenedetti, et al. (2000). "Translational control of malignancy: the mRNA cap-binding protein, eIF-4E, as a central regulator of tumor formation, growth, invasion and metastasis." Anticancer Res **20**(3A): 1343-51.
- Zuberek, J., J. Jemielity, et al. (2004). "Influence of electric charge variation at residues 209 and 159 on the interaction of eIF4E with the mRNA 5' terminus." Biochemistry **43**(18): 5370-9.

---

# **ANEXO**

---



# ANEXO

Los resultados de este trabajo forman parte del siguiente artículo:

**Phosphorylation of eIF4E confers resistance to cellular stress and DNA-damaging agents through an interaction with 4E-T: a rationale for novel therapeutic approaches**

Alba Martínez<sup>1</sup>, Marta Sesé<sup>1</sup>, Javier Hernandez Losa<sup>2</sup>, Nathaniel Robichaud<sup>3</sup>, Nahum Sonenberg<sup>3</sup>, Trond Aasen<sup>1</sup>, and Santiago Ramón y Cajal<sup>1,2</sup>

En revisión

**TITLE:**

**Phosphorylation of eIF4E confers resistance to cellular stress and DNA-damaging agents through an interaction with 4E-T: a rationale for novel therapeutic approaches**

Alba Martinez<sup>1</sup>, Marta Sesé<sup>1</sup>, Javier Hernandez Losa<sup>2</sup>, Nathaniel Robichaud<sup>3</sup>, Nahum Sonenberg<sup>3</sup>, Trond Aasen<sup>1</sup>, and Santiago Ramón y Cajal<sup>1,2</sup>

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Molecular Pathology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut de Recerca, VHIR, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain; and <sup>3</sup>McGill University, Department of Biochemistry, Goodman Cancer Research Centre, Montréal, Québec, Canada.

**RUNNING TITLE:**

eIF4E confers resistance to cellular stress

**KEYWORDS:**

eIF4E, protein translation, 4E-T, stress resistance, DNA damage

**Corresponding Authors:**

Santiago Ramón y Cajal, Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain; Phone: +34-934896824; E-mail: [sramon@vhebron.net](mailto:sramon@vhebron.net); and Trond Aasen, Molecular Pathology Lab, Collserola, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain; Phone: +37-934894168; E-mail: [trond.aasen@vhir.org](mailto:trond.aasen@vhir.org)

## Abstract

Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E is associated with malignant progression and poor cancer prognosis. Accordingly, here we have analyzed the association between eIF4E phosphorylation and cellular resistance to oxidative stress, starvation, and DNA-damaging agents *in vitro*. Using immortalized and cancer cell lines, retroviral expression of a phosphomimetic (S209D) form of eIF4E, but not phospho-dead (S209A) eIF4E or GFP control, significantly increased cellular resistance to stress induced by DNA-damaging agents (cisplatin), starvation (glucose+glutamine withdrawal), and oxidative stress (arsenite). *De novo* accumulation of eIF4E-containing cytoplasmic bodies colocalizing with the eIF4E-binding protein 4E-T was observed after expression of phosphomimetic S209D, but not S209A or wild-type eIF4E. Increased resistance to cellular stress induced by eIF4E-S209D was lost upon knockdown of endogenous 4E-T or use of an eIF4E-W73A-S209D mutant unable to bind 4E-T. Cancer cells treated with the Mnk1/2 inhibitor CGP57380 to prevent eIF4E phosphorylation and mouse embryonic fibroblasts derived from Mnk1/2 knockout mice were also more sensitive to arsenite and cisplatin treatment. Polysome analysis revealed an 80S peak 2 hours after arsenite treatment in cells overexpressing phosphomimetic eIF4E, indicating translational stalling. Nonetheless, a selective increase was observed in the translation of some proteins (cyclin D, HuR, and Mcl-1). We conclude that phosphorylation of eIF4E confers resistance to various cell stressors and that a direct interaction or regulation of 4E-T by eIF4E is required. Further delineation of this process may identify novel therapeutic avenues for cancer treatment, and these results support the use of modern Mnk1/2 inhibitors in conjunction with standard therapy.

## Introduction

Regulation of protein translation has recently been linked to a central role in cancer development and malignant progression. The eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E mediates association of the eIF4F complex (consisting of eIF4E, eIF4A, and eIF4G) with the 5'-methylated guanosine cap structure of mRNA and is an essential and rate-limiting factor of canonical protein translation initiation [1, 2]. eIF4E also contributes to nuclear-cytoplasmic export of certain mRNAs by binding a 50-nt element in the 3'UTR known as the eIF4E-sensitivity element (4E-SE) [3, 4]. Nuclear import of eIF4E is mediated by the transporter protein 4E-T, which binds to eIF4E through a conserved binding motif (YXXXXLΦ) that is also found in eIF4G and in the family of translational suppressors known as eIF4E-binding proteins (4E-BPs) [5].

eIF4E is an oncogene with prognostic value in various human cancers, including head and neck squamous cell carcinoma and breast cancer [6-8]. *In vitro*, eIF4E induces malignant transformation through the regulation of multiple cell features, such as by increasing cell proliferation, cell survival, and anchorage-independence [9] [6, 9, 10]. This is at least partly due to eIF4E enhancing the translation of mRNAs with long and highly structured 5' untranslated regions (UTRs), such as *C-MYC*, *BCL2*, *FGF2*, and *BIRC5* (survivin), referred to as eIF4E-sensitive mRNAs [11]. However, the exact molecular mechanisms of how eIF4E contributes to malignancy and, in particular, the role of eIF4E phosphorylation remain unclear.

Phosphorylation of eIF4E at Ser-209 by the kinases Mnk1 and Mnk2 in response to mitogens, tumor promoters, and growth factors [12-15] is critical for its oncogenic activity [16]. Phosphorylation of eIF4E appears to selectively control the translation of a subset of mRNAs that encode proliferation and pro-survival proteins (such as *BIRC2* and *Mcl-1*), several paracrine factors involved in inflammation (*Smad2*, the chemokines *CCL2*, *CCL7*, and *CCL9*), extracellular matrix proteins (*MMP3*, *MMP9*), and proteins related to angiogenesis (*VEGFC*) [17]. Moreover, phosphorylated eIF4E seems to be involved in export of a set of RNAs from the nucleus to the cytoplasm (including *cyclin D1*, *HDM2*, and *ODC*) and has been related with a weak affinity for capped RNA. This lower affinity probably allows mRNA release and confers a faster turnover of certain RNAs [18, 19].

The oncogenic features mediated through eIF4E phosphorylation have also been analyzed in *in vivo* models. In the Eu-myc mouse lymphoma model [16, 20, 21], expression of wild-type eIF4E, the phosphomimetic eIF4E-S209D mutant, or activation of the eIF4E kinase Mnk1 all accelerated tumor development. In contrast, the phospho-null mutant S209A or dominant negative Mnk1/2 suppressed lymphomagenesis [16]. In PTEN-null mouse lymphoma and prostate cancer models, disruption of eIF4E phosphorylation abrogates tumor development.

Similar results were observed in mice harboring knockout (KO) Mnk1/2 genes. Curiously, Mnk1/2 KO mice do not exhibit any conspicuous phenotype, indicating that phosphorylation of eIF4E is not required for normal tissue function or development [17].

Various cytoplasmic bodies are formed when cells are stressed, such as stress granules (SGs) and processing bodies (also known as P-bodies; PBs). Although eIF4E and 4E-T have been described as components of both SGs and PBs, the role of eIF4E phosphorylation in the formation of these intracellular structures has not been sufficiently studied. Curiously, arsenite treatment induces both phosphorylation of eIF4E and assembly of PBs and SGs, and results in physically associated SG-PB structures [22]. SGs sequester mRNAs in a protein complex that includes preinitiation and translation-related factors and mRNA-binding proteins and which can act as a site for mRNA storage and subsequent re-entry to translation. On the other hand, mammalian PBs contain components of the 5' to 3' decay machinery, nonsense-mediated decay pathways, RNA-induced silencing machinery, and activators of mRNA decay pathways [23]. However, some protein components of PBs are also implicated in translational repression, and mRNAs that are associated with PBs may re-enter translation either directly or through SGs [24, 25].

The relationship between the phosphorylation of eIF4E and cellular stress, survival, and malignant progression remains to be studied in detail. Here, we demonstrate that phosphorylation of eIF4E at Ser-209 increases resistance to cellular stress, including oxidative stress (arsenite), starvation (glucose/glutamine), and cytotoxic stress (cisplatin), leading to enhanced cell survival and subsequent cell recovery, proliferation, and tumor progression. This process appears to act through an interaction with 4E-T and a qualitative regulation of translation, processes that could potentially be exploited therapeutically to target certain cancers.

## Results

### **Phosphorylation of eIF4E augments clonogenic formation ability and resistance to oxidative stress, nutrient starvation, and DNA-damaging chemotherapeutic drugs**

Phosphorylation of eIF4E Ser-209 by Mnk1/2 is known to affect cell proliferation and tumor malignancy [26]. To further understand the role of eIF4E phosphorylation in these processes, we infected immortalized and malignant cell lines with retrovirus to overexpress GFP (control) or Myc-tagged phosphomimetic (S209D) or phospho-dead (S209A) versions of eIF4E. The levels of protein expression between the two mutants were similar, and were

approximately the same as that of endogenous eIF4E in MDA-MB-231 and HaCaT cells, indicating a physiologically relevant expression system (Fig. 1A). Analysis of cell proliferation did not reveal any statistically significant differences between the three expression constructs (Fig. 1B).

In an anchorage-dependent clonogenic assay, however, expression of S209D (and to a lesser extent S209A) clearly increased both colony size and number in MDA-MB-231 malignant breast cancer cells as well as in non-tumorigenic HaCaT keratinocytes (Fig. 1C), consistent with previous reports [16]. Similar results were observed in other cell lines, including MDA-MB-468 breast cancer cells (Supplementary Fig. 1).

Since clonogenic assays subject cells to stress conditions, we reasoned that phosphorylation of eIF4E confers a positive survival advantage during and/or after stress situations. We therefore treated the cells with arsenite, a well-known inducer of oxidative stress [27]. As expected, the overall number of colonies was reduced, but we still observed a statistically significant increase in colony formation in cells expressing phosphomimetic S209D. Curiously, the surviving colonies were bigger compared to untreated conditions (Fig. 1D), which may be due to both endogenous phosphorylation of eIF4E and reduced nutrient competition due to fewer surviving colonies following arsenite treatment.

For a more detailed analysis, we assessed proliferation and viability after exposing cells to a variety of stress signals: arsenite (250  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 90 minutes); cisplatin (33  $\mu$ M CDDP for 3 hours), a DNA-damaging chemotherapeutic agent; and nutrient starvation (lack of glucose and glutamate for 24 hours). Cell viability and recovery after restoration to normal culture conditions was measured at 24, 48, and 72 hours. As seen in Figure 2A, both MDA-MB-231 and HaCaT cells overexpressing S209D clearly showed increased resistance and recovery to oxidative, nutrient, and DNA damage stress conditions compared with control cells. Similar results were observed in various other cancer cell lines, including MDA-MB-468 and HeLa cells (Supplementary Fig. 2).

Cellular stress, including oxidative stress from arsenite, is known to induce apoptosis [28]. In addition, it has been demonstrated in mouse models that phosphorylated eIF4E mainly promotes tumorigenesis by suppressing apoptosis [20]. In accordance with the previous results, expression of S209D—but not S209A or GFP—completely prevented arsenite-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells, as measured by caspase-3/-7 activation (Fig. 2B). These results suggest that the presence of phosphorylated eIF4E at a time of stress provides an additional survival advantage.

### **Prevention of endogenous eIF4E phosphorylation increases the sensitivity of cells to stress *in vitro***

To corroborate these data, we treated cells with the Mnk inhibitor CGP 57380, which effectively blocks phosphorylation of endogenous eIF4E (Fig. 3A) [29]. MDA-MB-231 cells express phosphorylated eIF4E under normal conditions (Fig. 3A) and blocking Mnk1/2-mediated eIF4E phosphorylation with CGP 57380 indeed reduce proliferation slightly, reaching significance at 96h. Blocking Mnk1/2 significantly reduces cell viability already after 48 hours upon treatment with cell stressors such as arsenite and cisplatin however (Fig. 3B). We performed a similar analysis in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) isolated from wild-type, as well as from Mnk1/2 KO mice that are unable to phosphorylate eIF4E (Fig. 3C). Although having a very slight reduced growth rate under normal conditions, Mnk1/2 KO MEFs were significantly less resistant to both arsenite and cisplatin treatment compared to wild-type MEFs (Fig. 3D). Concordantly, a significant reduction in viability was observed in wild-type MEFs when blocking eIF4E phosphorylation with CGP 57380 treatment (Fig. 3E).

Thus, from these observations, in conjunction with our phosphomimetic overexpression data, we conclude that phosphorylated eIF4E by Mnk1/2 likely enhances cellular resistance to stress and subsequently increases cell recovery after stress removal.

#### **Phosphomimetic eIF4E forms *de novo* cytoplasmic bodies and shows high affinity for 4E-T**

eIF4E, as well as the eIF4E transporter 4E-T, has been shown to colocalize with markers of PBs, important regulators of mRNA stability and translation during stress [30]. Surprisingly, expression of phosphomimetic eIF4E-S209D, but not the control wild-type or S209A mutant, caused *de novo* formation of cytoplasmic bodies in MDA-MB-231 cells—even in the absence of external stress. These *de novo* formed bodies partially colocalized with the eIF4E-binding protein 4E-T (Fig. 4A). These *de novo* forming bodies colocalizing to 4E-T were consistently observed in other cell line tested including HaCaT cells (Supplementary Fig. 3). To determine whether these *de novo* formed bodies are PBs or SGs, we examined the interaction between 4E-T and markers of PBs (DCP1A) and SGs (TIA-1). In cells overexpressing the S209D mutant, endogenous 4E-T formed novel cytoplasmic bodies that colocalized with the PB marker DCP1A, but not the SG marker TIA-1, confirming previous results that 4E-T can localize to PBs (Fig. 4B and data not shown).

To confirm the direct eIF4E/4E-T interaction, we immunoprecipitated exogenous eIF4E with an anti-Myc antibody in MDA-MB-231 cells. Strikingly, eIF4E-S209D, but not -S209A, was able to pull down 4E-T under normal conditions, suggesting that phosphorylation of eIF4E increases its affinity for or proximity to 4E-T (Fig. 4C). To corroborate these data with endogenous eIF4E, we treated the MDA-MB-231 cell line with arsenite (inducing eIF4E phosphorylation) with or without CGP 57380 treatment (to prevent eIF4E phosphorylation).

Arsenite-induced phosphorylation increased the interaction between eIF4E and 4E-T (as shown by increased pull-down with the phospho-specific antibody of eIF4E and total eIF4E), whereas CGP 57380 reduced this interaction (Fig. 4D), confirming our results obtained with the phosphomimetic overexpression studies. Total inputs also indicate that arsenite induces phosphorylation of eIF4E, which is prevented by CGP 57380, as expected, with no change in total eIF4E (Fig. 4E). From these observations, we conclude that phosphorylation of eIF4E is important for its binding with 4E-T and that this complex is required for the formation of *de novo* cytoplasmic bodies.

### **Interplay between 4E-T and phospho-eIF4E confers resistance to cellular stress**

We speculated that the association between 4E-T and phosphorylated eIF4E might regulate resistance to stress. We therefore analyzed the role of the eIF4E/4E-T complex in MDA-MB-231 cells by knocking down 4E-T and by using eIF4E mutants unable to bind 4E-T. 4E-T protein levels were downregulated by over 80% following transfection with shRNA plasmids targeting 4E-T (Supplementary Fig. 4). Knockdown of 4E-T in MDA-MB-231 cells did not affect proliferation (Fig. 5A). However, it completely abolished the resistance to arsenite mediated by eIF4E-S209D (Fig. 5A). It thus appears that 4E-T is crucial for the protection against cellular stress conferred by phosphorylated eIF4E. To confirm that a specific interplay between phospho-eIF4E and 4E-T is required for stress resistance, we used the eIF4E-S209D-W73A mutant that does not bind 4E-T (Fig. 5B and Supplementary Fig 5). The inability of eIF4E to interact with 4E-T completely abolished the increased resistance to stress mediated by the S209D mutant (Fig. 5B). Overall, the results from our 4E-T knockdown experiments and the eIF4E-W73A mutants unable to bind 4E-T strongly support the theory that an association between 4E-T and the eIF4E protein is crucial for stress resistance.

### **Phosphomimetic eIF4E mediates a rapid and dynamic regulation of protein synthesis after stress**

As eIF4E is a rate-limiting regulator of mRNA translation, we sought to analyze changes in mRNA translation and protein synthesis in response to stress. We thus performed polysome profiling to assess overall mRNA translation in MDA-MB-231 cells. Under normal conditions, both phosphomimetic and phospho-dead forms of eIF4E, as well as control GFP-expressing cells, displayed the same polysome profile. Two hours after arsenite treatment, however, the S209D-expressing cells, in comparison to those expressing S209A and GFP, showed an increase in the 80S peak, indicating a rapid impediment to translation. Twelve hours after stress, the 80S peak in S209D-expressing cells was maintained, whereas the S209A- and GFP-expressing cells now

displayed an even higher 80S peak (Fig. 6A). These results may indicate that cells expressing the phosphomimetic form of eIF4E are able to halt protein synthesis more quickly after a stress situation—but in a moderate manner—thus allowing a more selective translation of proteins important to survival to continue. m7 GTP pull-down assays, in both MDA-MB-231 and HaCaT cells, clearly showed a more rapid recovery of cap-mRNA binding and association with eIF4G after arsenite stress in cells expressing phosphomimetic eIF4E (Fig. 6B).

To validate whether phosphorylation of eIF4E mediates a selective synthesis of proteins under stress (as shown under normal conditions by other researchers [31]), we screened a number of proteins by western blot under normal conditions and after arsenite treatment. Indeed, S209D expression, but not that of S209A or GFP, caused an increase in the level of some proteins 2 hours after arsenite stress, including proteins associated with resistance to apoptosis (Mcl-1) and cell cycle progression (cyclin D1) whereas other proteins were either maintained or decreased (Fig. 7A). To exclude the possibility that S209D works through transcriptional pathways, we treated cells with actinomycin D before and after arsenite stress to block *de novo* transcription. As seen in Figure 7B, S209D prevented the loss of HuR, Mcl-1, and cyclin D1 also in the presence of actinomycin D, strongly suggesting post-transcriptional regulation, possibly by maintenance of mRNA translation. After cycloheximide treatment, blocking protein synthesis, the levels of some proteins, like cyclin D1, Mcl1, and HuR, was significantly reduced after 2 hours of recovery from arsenite treatment (Fig. 7C), indicating that phosphomimetic eIF4E indeed acts by maintaining mRNA translation rather than stabilizing these proteins through an alternative mechanism.

To validate this further, we performed Q-PCR analysis of mRNA isolated from polysomal mRNA isolated before or after arsenite treatment. As seen in Figure 7D, cyclin D1 expression clearly increases (relative to total mRNA) after stress specifically in cells overexpressing S209D (Fig. 7D). A plausible explanation for these results is that phosphorylation of eIF4E allows for a more rapid re-initiation of protein translation following stress.

## Discussion

Recently, control of protein synthesis has emerged as an important concept in the regulation of cancer development, cancer prognosis, and therapeutic response [18, 32-36]. eIF4E, a rate-limiting factor for mRNA translation and a potent oncoprotein, plays a central role in this process. Phosphorylation of the eIF4E residue Ser-209 is mediated by the Mnk1/2 kinases, and, although phosphorylation of eIF4E does not appear to be important for normal development (as shown in various mouse models), it appears to control many of features

related to malignancy. The underlying mechanism by which phosphorylation regulates the oncogenic properties of eIF4E is unclear, although several studies have reported increased translation of various proteins involved in tumorigenesis, such as Mcl-1 (anti-apoptotic), MMP3 (matrix degradation and invasion), and cyclin D1 (proliferation). The present results shed further light on this process, demonstrating that phosphorylation of eIF4E augments resistance to *in vitro* cellular stress, including oxidative stress, DNA-damaging agents, and nutrient starvation. Indeed, stress appears to be one of the major inducers of eIF4E phosphorylation. This result has profound implications for cancer therapy. Cellular stress is frequently encountered by tumor cells during cancer progression, with sources of stress that include lack of nutrients, cellular crowding, and hypoxia, as well as that encountered during therapeutic interventions, such as during chemo- and radiotherapy. Our results indicate that inhibiting eIF4E phosphorylation is therefore a therapeutic option worth evaluating. Indeed, there are already safe and orally available drugs, such as cercosporamide, that inhibit eIF4E phosphorylation via Mnk1/2 kinases. Our *in vitro* data indicate that blocking eIF4E phosphorylation with CGP 57380 is indeed sufficient to reduce cellular resistance to stress and chemotherapeutic reagents such as cisplatin.

How eIF4E regulates stress resistance remains to be studied in detail, although we have uncovered several possible mechanisms. S209D appears to cause a rapid translational block in the 80S complex (polysomal profiles) after stress, followed by a qualitative regulation of translation of certain proteins involved in resistance to apoptosis and proliferation, such as cyclin D1, Mcl-1, and MMP3, in line with previous reports [18, 34, 37]. Q-PCR analysis of polysomal mRNA indicate increased translation of these genes. Furthermore, we have demonstrated that resistance to stress requires a direct interaction with the eIF4E-binding protein 4E-T, because knockdown of 4E-T or the use of eIF4E mutants unable to bind 4E-T prevents the stress-protective effect of eIF4E. The factors and mRNA associated with these complexes of phospho-eIF4E and 4E-T remain to be determined.

The association of eIF4E and phospho-eIF4E with stress resistance has been described in several biochemical settings in the literature. For example, Ser-209 of eIF4E is phosphorylated in response to different types of cyto- or genotoxic stresses [38], as well as after treatment with cisplatin [39]. Increased phosphorylation of eIF4E may play a positive role in selectively stimulating mRNA translation of low efficiency proteins under stress conditions where general protein synthesis is inhibited [38, 40]. In fact, phospho-eIF4E has been associated with enhanced replication of some viruses [41], with playing a significant role in anisomycin-induced translation of CHOP under stress [42], and with exerting a key role in the antiviral host defense [43]. Moreover, in previous work, we showed that high levels of phospho-eIF4E in malignant cells

were associated with resistance to an unphosphorylated 4E-BP1 mutant [33]. This mutant binds to eIF4E and exerts a suppressor effect in cell lines [44], but many malignant cell lines with high levels of phospho-eIF4E could escape this inhibition [33].

Finally, the biological role of eIF4E in tumors and its inhibition as a therapeutic target have already been proposed. A phase I clinical trial recently reported mild side-effects, without clinical response, probably due to inefficient *in vivo* knockdown of eIF4E [45]. Other approaches have been developed, including those that use small molecular inhibitors of the binding of eIF4E and eIF4G, such as 4EG-1 [46]. In addition, *in vitro* and *in vivo* studies have shown that knocking down eIF4E enhances sensitivity to anticancer agents, including cisplatin and doxorubicin [37, 39]. Importantly, we show that this effect is mediated by the level of phosphorylated eIF4E and not the total level of eIF4E. Regarding inhibition of the Mnks, data with the inhibitor CGP 57380 have shown a decrease in the cell growth of breast cell lines and BCR-ABL-dependent cell lines [47]. Interestingly, other inhibitors, such as cercosporamide, have been shown to exert antitumor effects *in vivo* and prevent lung metastasis in a melanoma model [48]. In this paper, we show that phospho-eIF4E is clearly associated with resistance to treatment with cisplatin and arsenite and that inhibition of Mnk1/2 significantly increases sensitivity to cisplatin and oxidative stress. Moreover, it is important to realize that treatment with cisplatin and other genotoxic agents increases eIF4E phosphorylation through Mnks and p38. Similarly, treatment with rapamycin enhances eIF4E phosphorylation by activating MNK2a [49].

In summary, because phosphorylation of eIF4E is associated with resistance to cellular stress, with tumor development in mice models, and worse prognosis in human tumors, the use of specific inhibitors of eIF4E phosphorylation may be a promising approach in cancer treatment. We propose combining eIF4E phosphorylation inhibition with other therapeutic approaches, with our data supporting the rationale for combining inhibitors of eIF4E phosphorylation with cisplatin or other DNA-damaging agents. Importantly, lack of eIF4E phosphorylation is not associated with anomalies in mice development and some inhibitors of Mnk1/2, such as cercosporamide, are already employed in several clinical settings to treat diseases, without major clinical side-effects. Moreover, inhibition of this phospho-eIF4E/4E-T complex could be a valuable approach for the development of novel therapeutic strategies.

## **Material and Methods**

### **Cell culture**

Immortalized keratinocytes, HeLa cells (ATCC® CCL-2™, American Type Culture Collection, Middlesex, UK, Ref ), the breast carcinoma cell lines MDA-MB-231 (ATCC® CRM-HTB-26™) and

MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™) [33], and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and MEFs derived from Mnk1/2 KO [50] mice were grown in standard DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) growth medium supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin. Approved by the *Vall d'Hebron Institut de Recerca* ethical committee (PR(SC)92/2011). MDA-MB-231 cells were treated overnight with 40  $\mu$ M of MNK inhibitor (CGP 57380; Tocris Bioscience).

### **Cellular stress**

Either 2,000 (MEF WT and MEF KO) or 5,000 cells/well (HaCaT and MDA-MB-231) were seeded in 96-well plates and exposed to different types of stress: 250  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 90 minutes, 33  $\mu$ M cisplatin (CDDP) for 3 hours, or nutrient starvation (glucose and glutamine deprivation) for 24 hours. After stress was induced, the medium was changed to normal medium.

### **Plasmid constructs**

pLPCX-S209A-eIF4E, pLPCX-S209D-eIF4E, pLPCx-W73A, pLPCX-W73AS209D, and pLPKo-sh4E-T constructs were kindly provided by Dr. N. Sonenberg (McGill University, Montreal, Canada). Both eIF4E mutants contain one Myc tag.

### **Cell transfection and retroviral transduction**

Retroviral production and infection were essentially performed as previously described [51] except that Phoenix packaging cells were transfected with JetPEI according to the manufacturer's protocol. Viral production and infection were performed at 37°C. Twenty-four hours after the second infection, cells were selected with puromycin (0.7  $\mu$ g/mL for MDA-MB-231 and 1.5  $\mu$ g/mL for HaCaT cells) for 3 days to eliminate uninfected cells.

### **Anchorage-dependent clonogenic assay**

Ten thousand cells were plated in 100-mm plates and cultured for 12 days prior to fixation with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). After fixation, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stained with 0.1% crystal violet (Sigma) for 30 minutes, rinsed thoroughly, and dried. Each cell type was plated in duplicate for each experiment.

### **MTT assay**

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-25-yl]-2.5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) was added to the medium to a final concentration of 0.5 mg/mL and incubated for 4 hours at 37°C. The medium was then removed and 0.2 mL DMSO was added. Absorbance was measured at 590 nm

by using a Synergy spectrophotometer (Biotek). Readings were taken 0, 24, 48, 72, and 96 hours after cell treatment.

### **Caspase assay**

To measure caspase-3 and -7 activity, the Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega) was used. Five thousand cells in 200  $\mu$ L were seeded in white-walled 96-well plates and treated with 250  $\mu$ M NaAsO<sub>2</sub> for 90 minutes. Then 100  $\mu$ L Caspase-Glo® 3/7 reagent was added to each well and the cells were incubated at room temperature for 1 hour. Luminescence was measured in the Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader.

### **Immunofluorescence**

Cells were plated in 24-well plates, fixed for 30 minutes with 4% formaldehyde in PBS, blocked with 5% bovine serum albumin (BSA)/PBS, and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 1 hour. Cells were incubated with primary antibodies for 2 hours at room temperature and washed three times with PBS both before and after incubation with Alexa Fluor 488- or 594-conjugated secondary antibodies (1:200; Molecular Probes) for 1 hour at room temperature. Cells were mounted in 50% glycerol in PBS. Images were taken with an Espectral FV1000 Olympus confocal microscope.

### **Western blot analysis**

Western blotting was performed as previously described [33]. The primary antibodies used were as follows: anti-Myc-tag antibody (#2276; 1:1000), anti-peIF4E Ser-209 (#9741; 1:1000), anti-Mnk1 C4C1 (#2195; 1:1000), anti-eIF4G (#2498; 1:1000), anti-YB1 (#4202; 1:1000), anti-mTOR 7C10 (#2983; 1:1000), anti- $\beta$ -catenin (#9562; 1:1000; all from Cell Signaling); anti-EIF4ENIF1 (1:500; Sigma); anti-cyclin D1 M-20 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology); anti-MCL1 Y37 (1:500), anti-Ago2 (1:500), anti-GAPDH 6C5 (1:2000; all from Abcam); and anti-HuR (1:500; Millipore). Anti-actin CP01 (1:500; Calbiochem, Darmstadt, Germany) was used as a loading control. The secondary antibodies used were donkey anti-rabbit IgG-HRP (NA9340; 1:2000) and donkey anti-mouse IgG-HRP (NA9340; 1:2000; both from Amersham Pharma-Biotech, Uppsala, Sweden). Bound antibodies were visualized with an enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Pharma-Biotech).

### **Immunoprecipitation**

Cells were harvested in lysis buffer (250 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, and 5 mM EDTA). Lysed cells were incubated with anti-Myc tag antibody (diluted 1:2000), eIF4E antibody (diluted 1:500), or 4E-T antibody (diluted 1:500) overnight at 4°C. The following day Protein G Sepharose 4 Fast Flow (17-0618-01; Amersham Pharma-Biotech) was added and the

solution was gently mixed for 1 hour at 4°C. Samples were centrifuged at 3000 rpm for 3 minutes. The pellet was washed 3 times with 1 mL lysis buffer and resuspended in 50 µL sample buffer (1% SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris, pH7.5). The suspension was heated to 95°C for 5 minutes and centrifuged at 3000 rpm for 3 minutes to remove the beads.

### **7-methyl-GTP-Sepharose pull-down assays**

Cells were lysed in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 10% glycerol). Cell extracts were incubated overnight with anti-Myc tag primary antibody (diluted 1:2000). 7-methyl-GTP-Sepharose or control Sepharose (GE Healthcare) was added for 1 hour at 4°C under constant shaking. Beads were washed three times with lysis buffer and absorbed proteins were eluted in SDS-PAGE sample buffer.

### **Polysome profiling**

For polysome analysis, 400 mg of cell lysate was frozen in liquid nitrogen and then resuspended in 1 mL of polysome extraction lysis buffer (1.5 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.0 mM Tris, pH 7.4, 1.0% Triton X-100, 1.0% Na-deoxycholate, a protease inhibitor mix, 100 U/mL RNase OUT, and 100 µg/mL cycloheximide). Cell extracts were analyzed in a 10%–50% sucrose gradient (200 mM HEPES, 1 M KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µg/mL cycloheximide, a protease inhibitor mix, and 200 U/mL RNase OUT). Extracts were centrifuged in an SW41Ti rotor for 2 hours and 30 minutes at 37000 rpm at 4°C. Gradients were sampled by using an ISCO UV detector.

### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflicts of interest and affirm that the manuscript has not been published previously and is not being considered for publication by any other journal. For your convenience, we would also like to mention that the manuscript has already been subject to English language and style correction by a professional scientific editing company.

### **Acknowledgements**

The authors thank Teresa Moline and Rosa Somoza for their excellent technical assistance. We appreciate the helpful comments and suggestions of Nadeem Siddiqui and Ivan Topisirovic.

## References

1. Duncan R, Milburn SC and Hershey JW (1987) Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem* 262: 380-388.
2. Sonenberg N and Gingras AC (1998) The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 10: 268-275.
3. Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L and Sonenberg N (1996) Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1065-1070.
4. Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M and Borden KL (2006) eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J Cell Biol* 175: 415-426.
5. Dostie J, Ferraiuolo M, Pause A, Adam SA and Sonenberg N (2000) A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J* 19: 3142-3156.
6. De Benedetti A and Rhoads RE (1990) Overexpression of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in HeLa cells results in aberrant growth and morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8212-8216.
7. Yoshizawa A, Fukuoka J, Shimizu S, Shilo K, Franks TJ, et al. (2010) Overexpression of phospho-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 16: 240-248.
8. Kerekatte V, Smiley K, Hu B, Smith A, Gelder F, et al. (1995) The proto-oncogene/translation factor eIF4E: a survey of its expression in breast carcinomas. *Int J Cancer* 64: 27-31.
9. Lazaris-Karatzas A, Montine KS and Sonenberg N (1990) Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* 345: 544-547.
10. Larsson O, Li S, Issaenko OA, Avdulov S, Peterson M, et al. (2007) Eukaryotic translation initiation factor 4E induced progression of primary human mammary epithelial cells along the cancer pathway is associated with targeted translational deregulation of oncogenic drivers and inhibitors. *Cancer Res* 67: 6814-6824.
11. Lazaris-Karatzas A, Smith MR, Frederickson RM, Jaramillo ML, Liu YL, et al. (1992) Ras mediates translation initiation factor 4E-induced malignant transformation. *Genes Dev* 6: 1631-1642.
12. Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG and Cooper JA (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16: 1909-1920.
13. Fukunaga R and Hunter T (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J* 16: 1921-1933.
14. Joshi B, Cai AL, Keiper BD, Minich WB, Mendez R, et al. (1995) Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. *J Biol Chem* 270: 14597-14603.
15. Flynn A and Proud CG (1995) Serine 209, not serine 53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF-4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 270: 21684-21688.

16. Wendel HG, Silva RL, Malina A, Mills JR, Zhu H, et al. (2007) Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev* 21: 3232-3237.
17. Furic L, Rong L, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, et al. eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14134-14139.
18. Scheper GC and Proud CG (2002) Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur J Biochem* 269: 5350-5359.
19. Slepnev SV, Darzynkiewicz E and Rhoads RE (2006) Stopped-flow kinetic analysis of eIF4E and phosphorylated eIF4E binding to cap analogs and capped oligoribonucleotides: evidence for a one-step binding mechanism. *J Biol Chem* 281: 14927-14938.
20. Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, et al. (2004) Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 428: 332-337.
21. Ruggiero D, Montanaro L, Ma L, Xu W, Londei P, et al. (2004) The translation factor eIF4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* 10: 484-486.
22. McInerney GM, Kedersha NL, Kaufman RJ, Anderson P and Liljestrom P (2005) Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol Biol Cell* 16: 3753-3763.
23. Anderson P and Kedersha N (2006) RNA granules. *J Cell Biol* 172: 803-808.
24. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, et al. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169: 871-884.
25. Buchan JR, Muhlrads D and Parker R (2008) P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 183: 441-455.
26. Wang X, Yue P, Chan CB, Ye K, Ueda T, et al. (2007) Inhibition of mammalian target of rapamycin induces phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Mnk-mediated eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation. *Mol Cell Biol* 27: 7405-7413.
27. Patel J, McLeod LE, Vries RG, Flynn A, Wang X, et al. (2002) Cellular stresses profoundly inhibit protein synthesis and modulate the states of phosphorylation of multiple translation factors. *Eur J Biochem* 269: 3076-3085.
28. Chen YC, Lin-Shiau SY and Lin JK (1998) Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 177: 324-333.
29. Wheeler MJ, Johnson PW and Blaydes JP The role of MNK proteins and eIF4E phosphorylation in breast cancer cell proliferation and survival. *Cancer Biol Ther* 10: 728-735.
30. Dostie J, Lejbkowitz F and Sonenberg N (2000) Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. *J Cell Biol* 148: 239-247.
31. Clemens MJ and Bommer UA (1999) Translational control: the cancer connection. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 1-23.
32. Rojo F, Najera L, Lirola J, Jimenez J, Guzman M, et al. (2007) 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clin Cancer Res* 13: 81-89.

33. Pons B, Peg V, Vazquez-Sanchez MA, Lopez-Vicente L, Argelaguet E, et al. The effect of p-4E-BP1 and p-eIF4E on cell proliferation in a breast cancer model. *Int J Oncol* 39: 1337-1345.
34. Bilanges B and Stokoe D (2007) Mechanisms of translational deregulation in human tumors and therapeutic intervention strategies. *Oncogene* 26: 5973-5990.
35. Castellvi J, Garcia A, Rojo F, Ruiz-Marcellan C, Gil A, et al. (2006) Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cancer* 107: 1801-1811.
36. Armengol G, Rojo F, Castellvi J, Iglesias C, Cuatrecasas M, et al. (2007) 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer Res* 67: 7551-7555.
37. Zhou FF, Yan M, Guo GF, Wang F, Qiu HJ, et al. Knockdown of eIF4E suppresses cell growth and migration, enhances chemosensitivity and correlates with increase in Bax/Bcl-2 ratio in triple-negative breast cancer cells. *Med Oncol* 28: 1302-1307.
38. Duncan RF, Peterson H, Hagedorn CH and Sevanian A (2003) Oxidative stress increases eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation in vascular cells. *Biochem J* 369: 213-225.
39. Dong K, Wang R, Wang X, Lin F, Shen JJ, et al. (2009) Tumor-specific RNAi targeting eIF4E suppresses tumor growth, induces apoptosis and enhances cisplatin cytotoxicity in human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* 113: 443-456.
40. Fraser CS, Pain VM and Morley SJ (1999) Cellular stress in xenopus kidney cells enhances the phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor (eIF)4E and the association of eIF4F with poly(A)-binding protein. *Biochem J* 342 Pt 3: 519-526.
41. Walsh D and Mohr I (2004) Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells. *Genes Dev* 18: 660-672.
42. Chen YJ, Tan BC, Cheng YY, Chen JS and Lee SC Differential regulation of CHOP translation by phosphorylated eIF4E under stress conditions. *Nucleic Acids Res* 38: 764-777.
43. Herdy B, Jaramillo M, Svitkin YV, Rosenfeld AB, Kobayashi M, et al. Translational control of the activation of transcription factor NF-kappaB and production of type I interferon by phosphorylation of the translation factor eIF4E. *Nat Immunol* 13: 543-550.
44. Avdulov S, Li S, Michalek V, Burchrichter D, Peterson M, et al. (2004) Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell* 5: 553-563.
45. Hong DS, Kurzrock R, Oh Y, Wheler J, Naing A, et al. A phase 1 dose escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of eIF-4E antisense oligonucleotide LY2275796 in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 17: 6582-6591.
46. Moerke NJ, Aktas H, Chen H, Cantel S, Reibarkh MY, et al. (2007) Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell* 128: 257-267.
47. Volpon L, Osborne MJ, Zahreddine H, Romeo AA and Borden KL Conformational changes induced in the eukaryotic translation initiation factor eIF4E by a clinically relevant inhibitor, ribavirin triphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 434: 614-619.
48. Konicek BW, Stephens JR, McNulty AM, Robichaud N, Peery RB, et al. Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E

- phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases. *Cancer Res* 71: 1849-1857.
49. Stead RL and Proud CG Rapamycin enhances eIF4E phosphorylation by activating MAP kinase-interacting kinase 2a (Mnk2a). *FEBS Lett* 587: 2623-2628.
  50. Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S and Fukunaga R (2004) Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol Cell Biol* 24: 6539-6549.
  51. Aasen T and Belmonte JC (2010) Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 5: 371-382.

## Figure Legends

**Figure 1.** Overexpression of phosphomimetic eIF4E-S209D does not affect proliferation but increases clonogenic cell survival. A, Western blot analysis showed similar, moderate levels of Myc-tagged exogenous eIF4E-S209D or -S209A and endogenous eIF4E expression in MDA-MB-231 and HaCaT cell lines. B, MTT cell proliferation assays revealed no significant difference in cell growth between GFP- or eIF4E-mutant-expressing cells under normal conditions. C, Crystal violet staining of clonogenic colony formation assays demonstrated a dramatic and statistically significant increase in both colony number and size upon eIF4E-S209D expression compared with GFP control cells. A moderate but not statistically significant increase in eIF4E-S209A-expressing cells was noted. Graphs depict the overall cell growth as measured in a crystal violet absorption assay. D, The survival and growth advantage after expression of eIF4E-S209D was even more noticeable in both HaCaT and MDA-MB-231 cells treated with arsenite for 90 minutes to induce oxidative stress before being plated. \* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$  and \*\*\* =  $P < 0.001$ , compared to control,  $n = 3$ .

**Figure 2.** MDA-MB-231 and HaCaT cells show increased resistance to stress after overexpression of phosphomimetic eIF4E. A, MDA-MB-231 and HaCaT cells were subjected to either arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ), nutrient starvation, or cisplatin (CDDP) treatment, and cell viability was measured by an MTT assay after 24, 48, and 72 hours. In all cases, eIF4E-S209D significantly increased cell viability. B, Apoptotic activity measured by a caspase-3/-7 luminescence assay. Significant activation of caspase-3/-7 activity was observed following arsenite treatment in eIF4E-S209A- and GFP-expressing cells, which was completely prevented by eIF4E-S209D. \* =  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\* =  $P < 0.001$  compared to control,  $n = 3$ .

**Figure 3.** Phosphorylation of endogenous eIF4E increases cellular resistance to stress. A, Expression of phospho-eIF4E with and without CGP57380 treatment and with arsenite or cisplatin treatment in MDA-MB-231 cells. B, MDA-MB-231 cells treated with CGP57380 to inhibit Mnk1/2-mediated phosphorylation of eIF4E displayed slightly decreased cell proliferation under normal conditions, whereas cell recovery after oxidative stress by arsenite (and to less extent cisplatin) was dramatically reduced. C, Western blotting showed a lack of phospho-eIF4E in MEFs from Mnk1/2 null mice and significantly reduced phospho-eIF4E in wild-type MEFs treated with CGP57380. D, MTT growth assays demonstrated a slight decrease in the proliferation of MEFs from Mnk1/2 null mice compared to wild-type MEFs and a significant reduction in cell recovery following either arsenite or cisplatin treatment. E, Inhibiting Mnk1/2 in wild-type MEFs with CGP 57380 significantly reduced cellular recovery from arsenite or cisplatin treatment. \* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P = < 0.001$  compared to control,  $n = 3$ .

**Figure 4.** Phospho-eIF4E interacts with 4E-T and induces *de novo* cytoplasmic bodies. A, Confocal immunofluorescence analysis of MDA-MB-231 cells demonstrated *de novo* formation of cytoplasmic 4E-T bodies after overexpression of eIF4E-S209D, with partial colocalization. Formation of cytoplasmic 4E-T bodies was not observed upon overexpression of eIF4E-S209A. B, The 4E-T bodies in the eIF4E-S209D-expressing cells colocalized with a marker of P-bodies (DCP1A) in normal conditions. C, Immunoprecipitation assays with anti-Myc-tag antibodies

against eIF4E-S209A or -S209D demonstrated a specific interaction between phosphomimetic eIF4E-S209D and 4E-T. D, Arsenite treatment increased the phosphorylation of endogenous eIF4E and dramatically increased the interaction between eIF4E and 4E-T, whereas treatment with CGP57380 reduced phospho-eIF4E and significantly diminished the amount of 4E-T interacting with eIF4E. 10% inputs used in the immunoprecipitations is shown on the side.

**Figure 5.** Phospho-eIF4E/4E-T binding is necessary for recovery after stress. A, Cells stably expressing eIF4E-S209D or -S209A were transfected with scramble or specific short hairpins to knockdown 4E-T expression. eIF4E-S209D significantly enhanced cell recovery from arsenite stress in scramble-transfected cells, whereas knockdown of 4E-T completely abolished any protective effect of eIF4E-S209D. B, Expression of the eIF4E mutants W73A and W73A/S209D, both unable to bind 4E-T, did not confer any resistance to arsenite treatment. \* =  $P < 0.05$  and \*\* =  $P < 0.01$  compared to control,  $n = 3$ .

**Figure 6.** eIF4E-S209D rapidly modulates protein translation after arsenite treatment. Polysome analysis of MDA-MB-231 cells showed that cells expressing eIF4E-S209D, but not -S209A or GFP, induced a peak in the 80S fraction 2 hours after arsenite treatment, indicating translational stalling. Twelve hours after recovery from arsenite treatment, the 80S peak in S209D-expressing cells was more moderate compared with that of S209A- or GFP-expressing cells, indicating a slightly higher level of protein synthesis. B, m7-GTP pull-down assays in normal conditions and 2 hours after arsenite treatment indicate that eIF4E-S209D strongly associates with the mRNA cap in a complex with eIF4G in the recovery period after arsenite treatment, which may allow re-initiation of protein synthesis.

**Figure 7.** Selective increase in protein synthesis in cells expressing eIF4E-S209D. A, Western blotting analysis showed that eIF4E-S209D was able to maintain the expression levels of some proteins, such as cyclin D, after stress caused by arsenite treatment (compared to S209A- or GFP-expressing cells). Other proteins showed reduced levels or no changes. B, Treatment with actinomycin D for 6 hours in normal conditions and 2 hours after stress indicated that the selective advantage of eIF4E-S209D in maintaining protein expression was due to post-transcriptional events. C, Treatment with cycloheximide after arsenite treatment showed that cyclin D and Mcl-1 are subjected to translational regulation by eIF4E-S209D, rather than modulation of protein stability. D, Quantitative PCR analysis of polysomal RNA indicated that eIF4E-S209D after stress permits a dramatic increase in actively translated cyclin D1 (expressed as a fraction of total mRNA).

**Supplementary figure 1:** MDA-MB-468 cells expressing eIF4E-S209D showed greater clonogenic colony formation ability under normal conditions than -S209A- or GFP-expressing cells.

**Supplementary figure 2:** MTT assays in MDA-MB-468 and HeLa cell lines after arsenite treatment and nutrient starvation indicated significantly faster recovery after stress in cells expressing eIF4E-S209D than in those expressing -S209A or GFP. \* =  $P < 0.05$  and \*\* =  $P < 0.01$  compared to control,  $n = 3$ .

**Supplementary figure 3:** Immunofluorescence analysis of HaCaT cells expressing either S209A or S209D mutants of eIF4E under normal conditions indicated the specific spontaneous formation of cytoplasmic bodies in S209D-expressing cells. These bodies partially colocalized with 4E-T.

**Supplementary figure 4:** 4E-T depletion in normal conditions in eIF4E mutants. MDA-MB-231 stably expressing either GFP or S209A or S209D mutants of eIF4E were cotransfected with sh4E-T. Endogenous 4E-T levels were reduced in all three cases.

**Supplementary figure 5:** Immunoprecipitation assays with anti-Myc-tag antibodies against eIF4E-W73A and -W73A/S209D confirmed previous findings that the W73A mutation prevents the direct interaction with 4E-T.

Figure 1

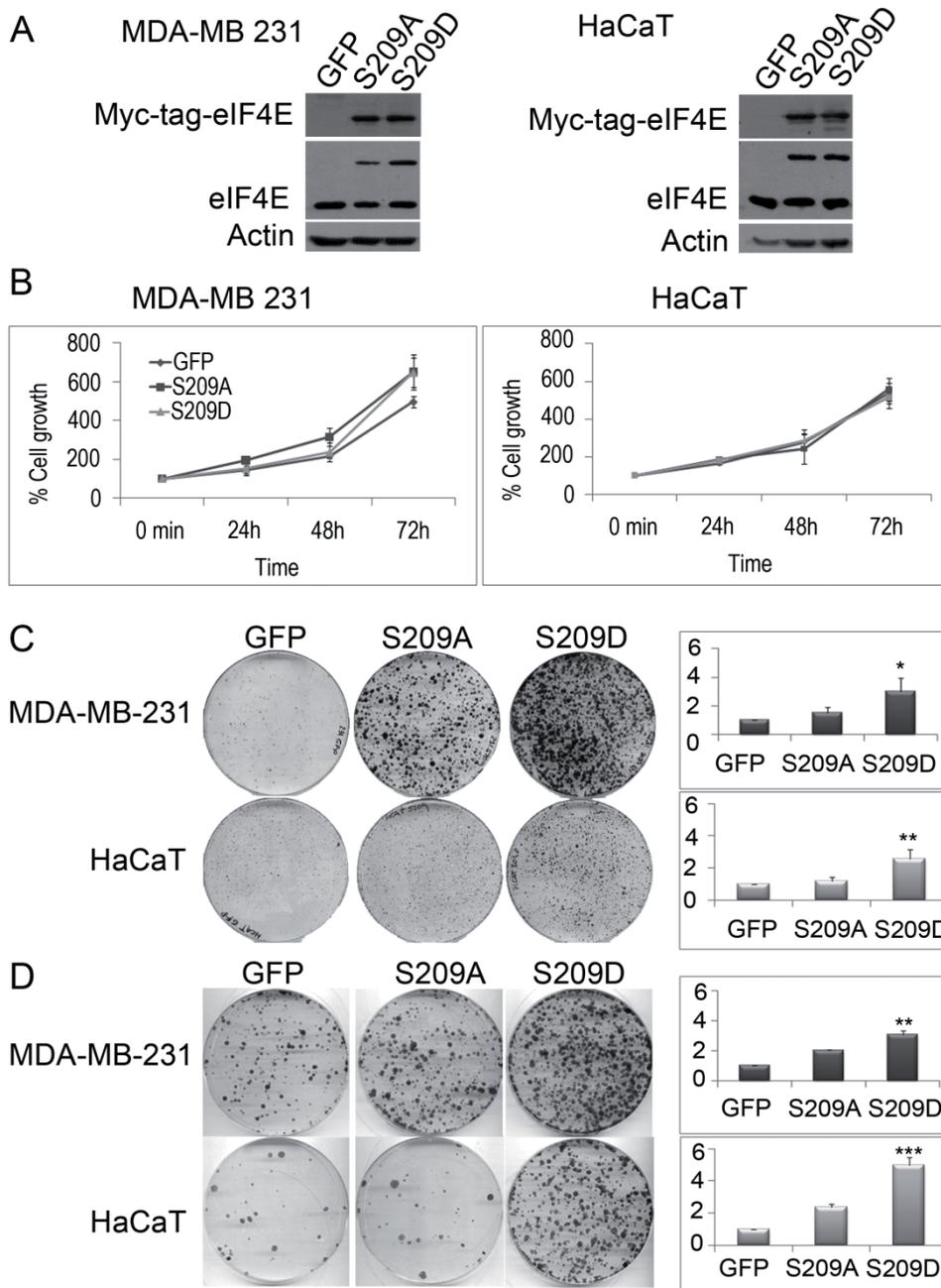


Figure 2

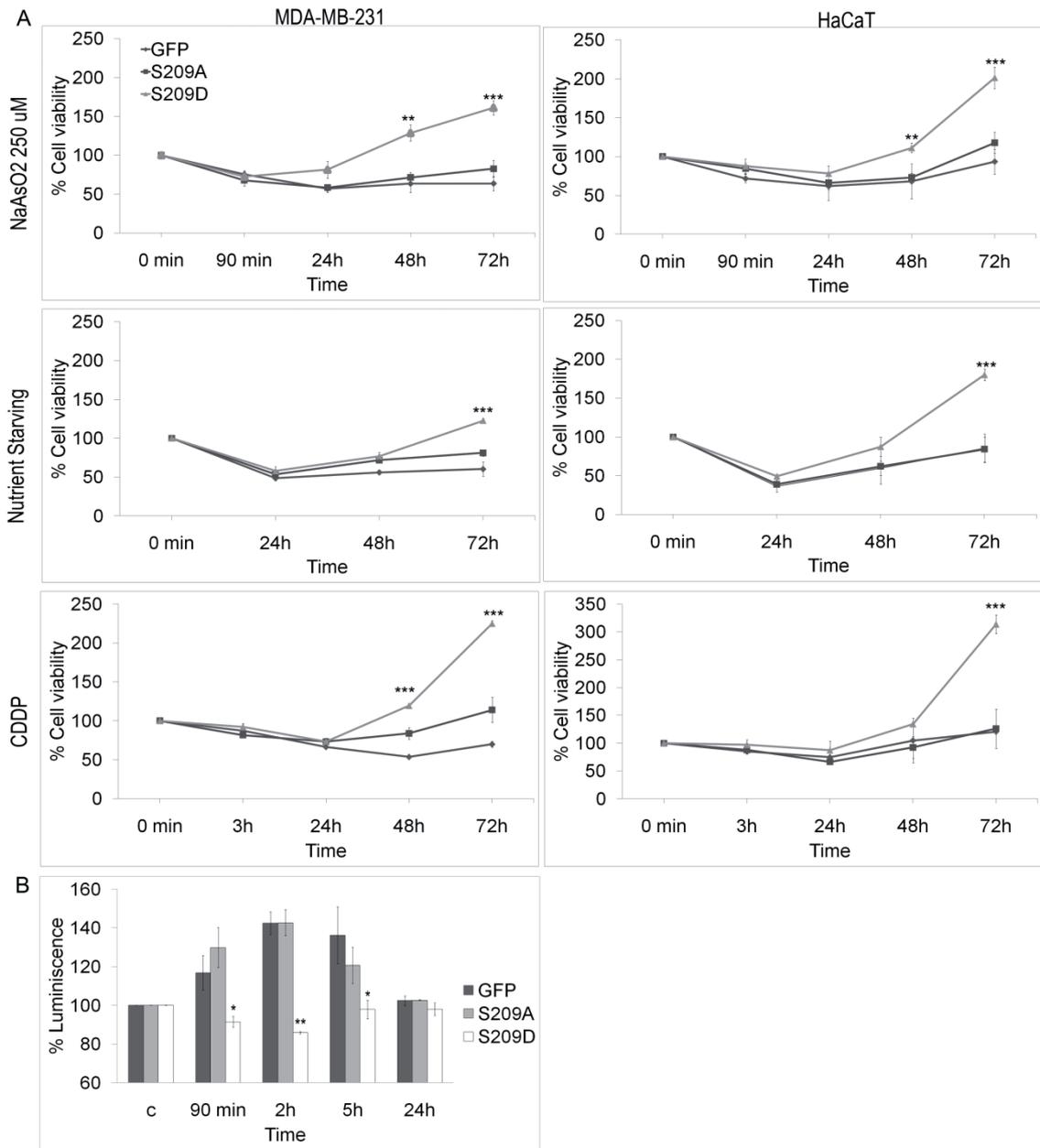


Figure 3

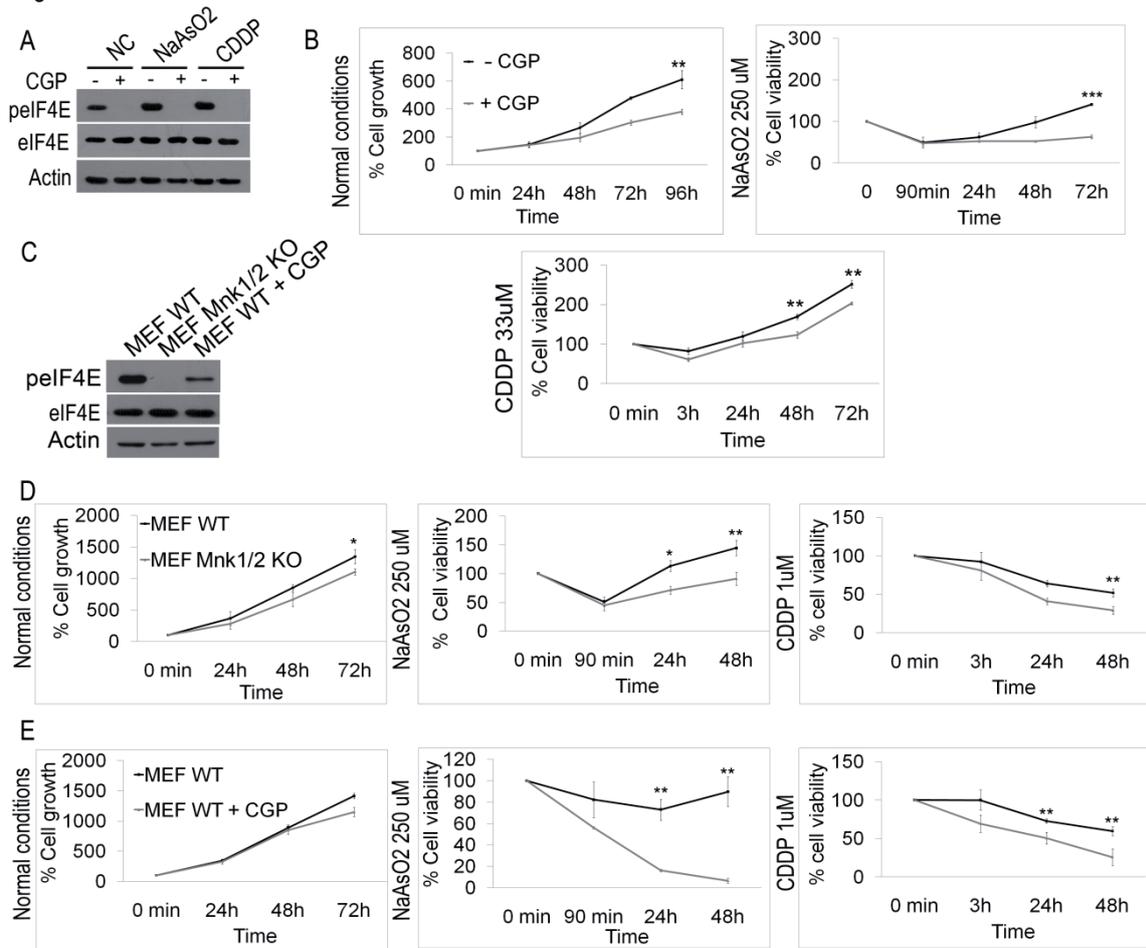


Figure 4

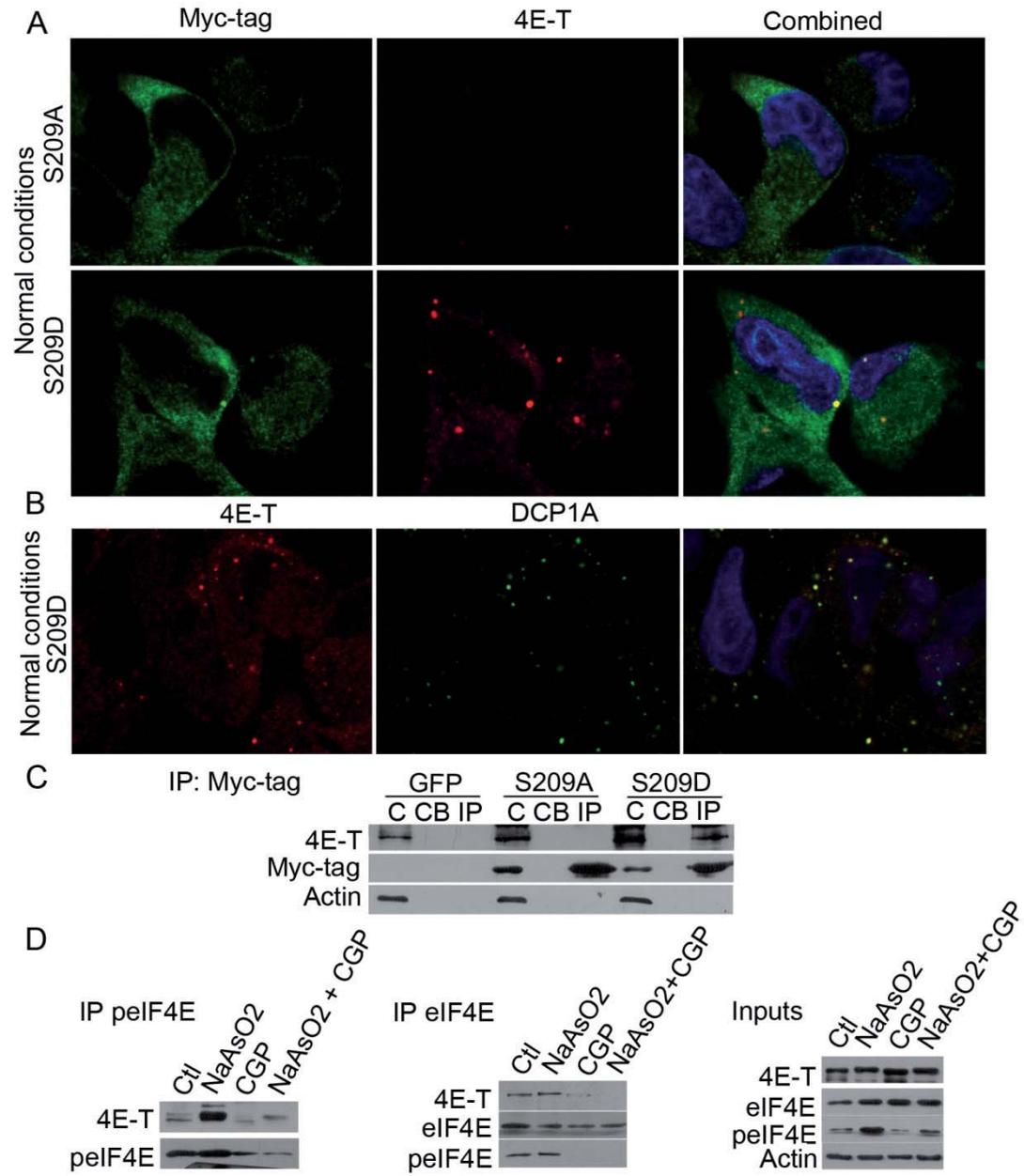


Figure 5

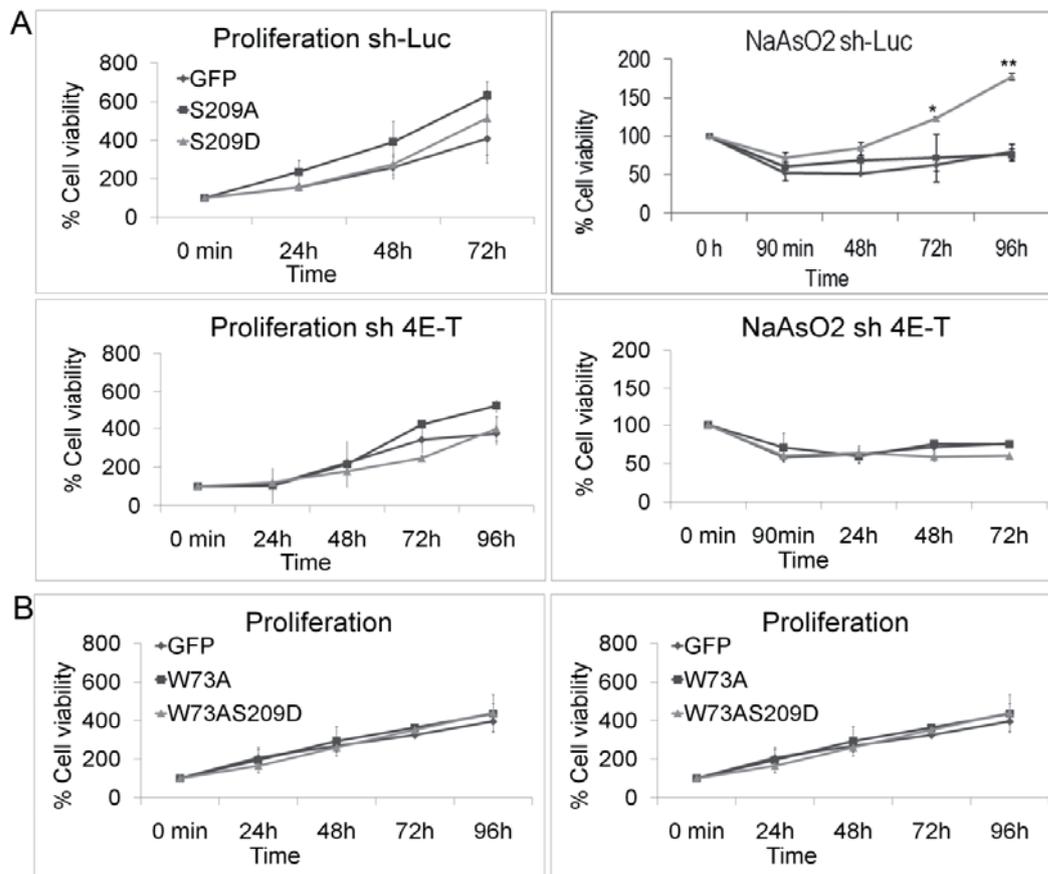


Figure 6

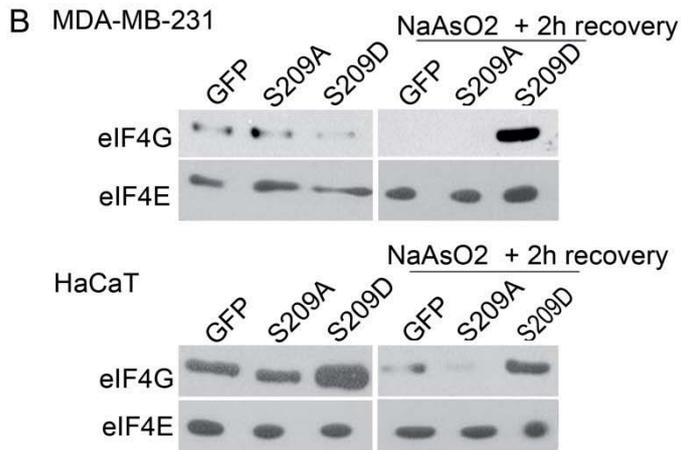
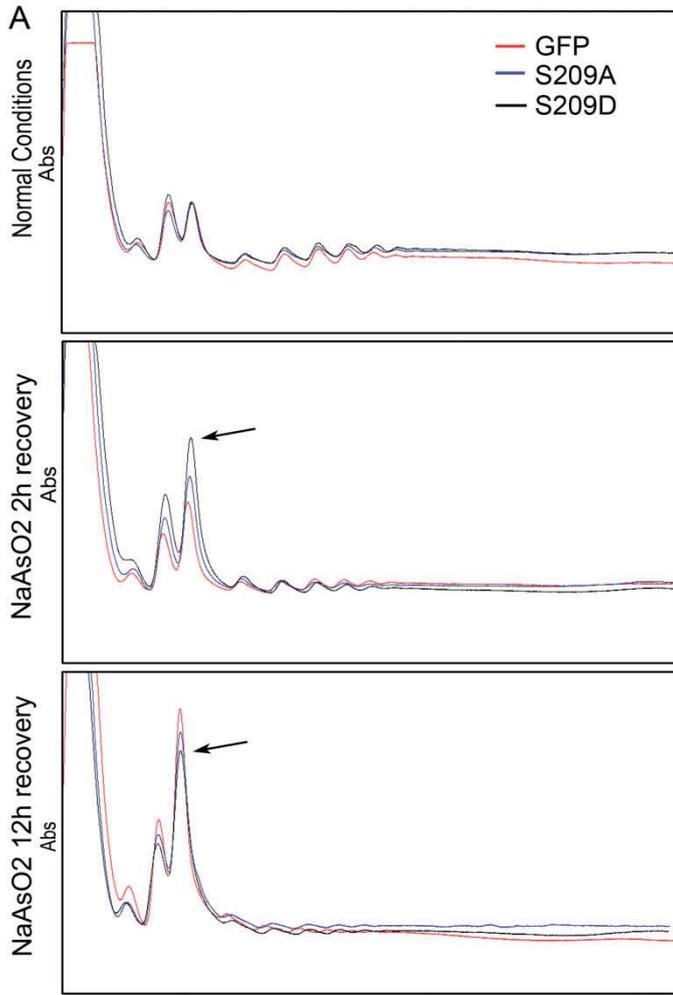
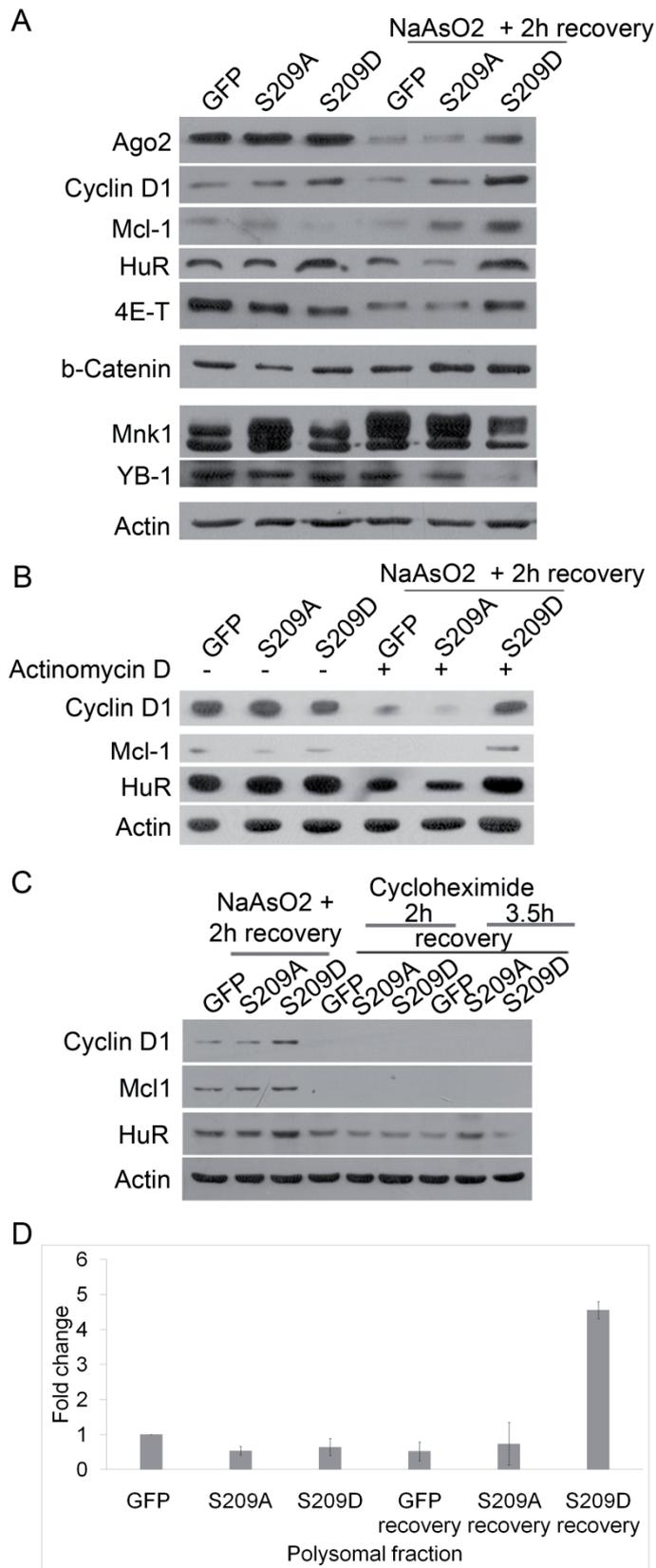
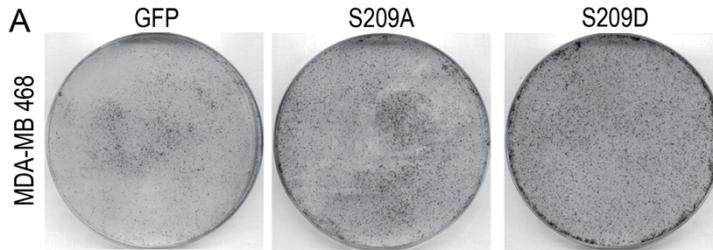


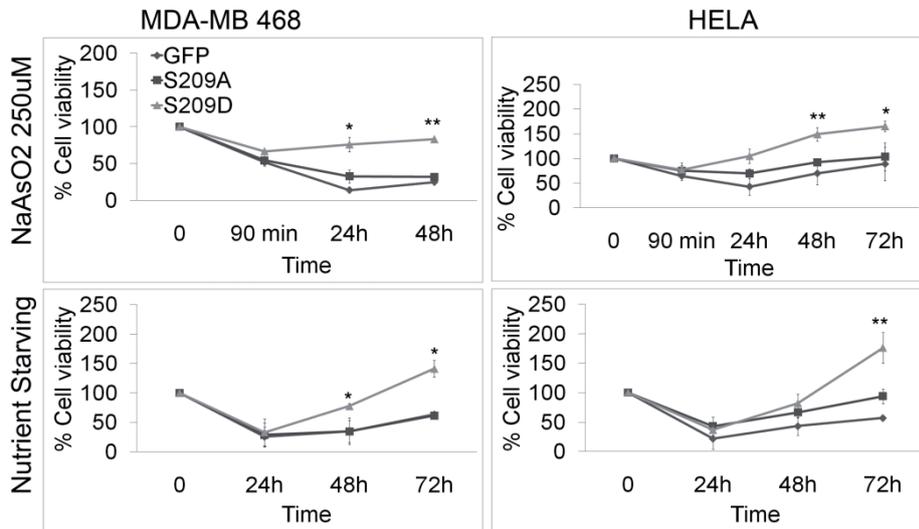
Figure 7



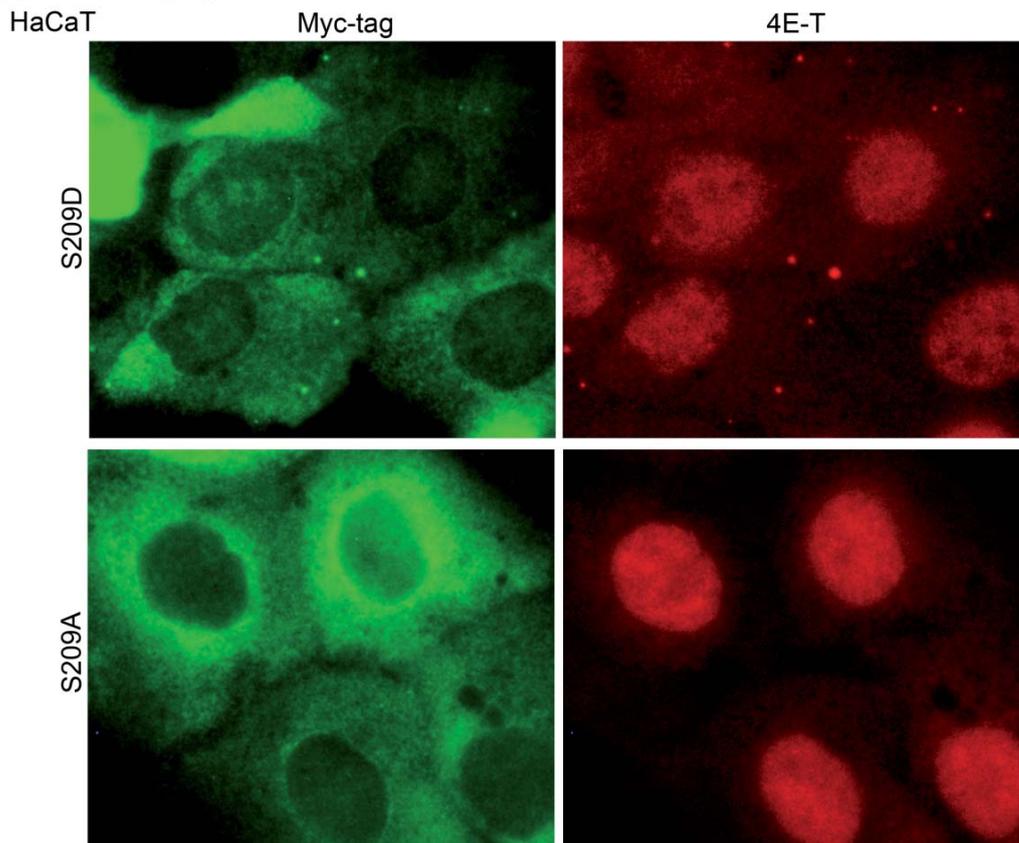
Supplementary figure 1



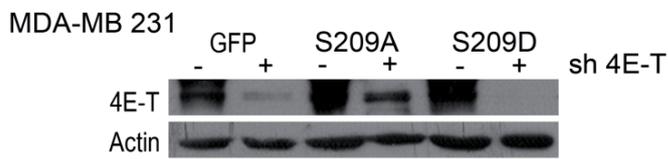
Supplementary figure 2



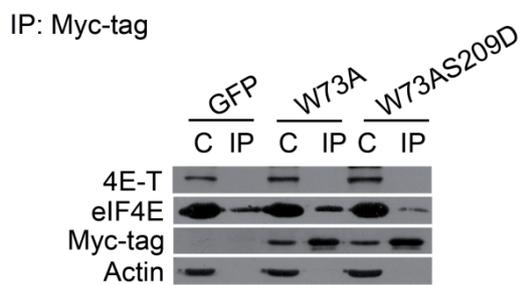
Supplementary figure 3



Supplementary figure 4



Supplementary figure 5



---

# **AGRADECIMIENTOS**

---



# AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecer al Dr. Santiago Ramón y Cajal la oportunidad de poder realizar la tesis doctoral en su grupo, así como su dirección junto al Dr. Trond Aasen. Muchas gracias por la oportunidad que me habéis brindado y por todo lo que me habéis enseñado.

También dar las gracias al Dr. Nahum Sonenberg por darme la oportunidad de realizar una estancia doctoral en su laboratorio en Canadá.

También quiero dar las gracias a todos los del laboratorio de AP. Javi, fuiste tú quien me animó a realizar la tesis doctoral, durante mis prácticas de carrera y máster me enseñaste y me transmitiste el entusiasmo por la investigación, muchas gracias. Rosa, Tere i Laura, veu ser de les primeres que vaig conèixer al entrar al lab, m'heu ensenyat, meu aconsellat i heu estat al meu costat en tot moment! Moltes gràcies!!

Biologuetes!! Vero, Yara i Cris! Amb vosaltres va començar tota aquesta aventura científica! Ens varem conèixer a la carrera i hem viscut mil i una aventura juntes!!! Ha estat un plaer començar aquesta etapa amb vosaltres, i encara més plaer que seguim estan juntes!!

I ara us toca a vosaltres!! Pinchitos!!! La meva estimada secta!! Mai m'hagués imaginat que durant la tesis trobaria a companyes i amigues tant increïbles!! I menys que ens uníssim tant i encara que ja no treballem juntes ens seguim veient i fen cosetes!! Aquest apartat va per vosaltres pinchitos, per tota la secta! Tinc molt de dir de totes vosaltres, us vaig conèixer als meus inicis... Laura, Berta, Ana, veu ser les primeres que estàveu quan vaig arribar a recerca, vosaltres em veu ensenyar, em veu acollir, veu ser les meves companyes... i el més important, les meves amigues!!

Laura, poco coincidimos juntas en el lab, justo cuando yo entraba a hacer la tesis tu ya acababas. Fuiste la primera persona que vi defender su tesis, recuerdo el día que viniste unas horas antes de defenderla, desprendías calma y seguridad y pensé, cuando me llegué el momento quiero estar como ella! Muchas gracias por tus consejos y por esa alegría!!

Bertus!! La meva primera Postdoc!!!! Em vas ensenyar tot! Com fer els experiments, com tirar endavant el projecte!! Quan estava sola, vas ser tu qui va aconseguir que el projecte triés endavant!! Gràcies a tu això ha estat possible!!!

Laureta!! Que haig de dir de tu.. que ets un encant! Gràcies per la teva calma i tranquil·litat, m'hagués encantat haver acabat la tesis juntes al mateix lab, però encara que estiguem a labs diferents quasi ho fem juntes! Jeje

Rosó!!! Encara que estiguis a AP tu ets un pinchito!!! Es un plaer haver-te conegut i que formis part de la meva vida! Gràcies per las tardes de cervetas, desconexió i de desfogar-nos! Van de conya per començar al dia següent!! Jejejeje

Andriu!! Mi madrileña!!!! Muchas gracias por tu alegría, por esos saludos por la mañana y por las risas que nos pegamos! Como se te echa en falta el día que no estás por aquí!!

Cris!! Tú tienes dos apartados!!! Biologuitas y pinchitos!!! Realmente eres la persona que ha pasado más tiempo a mi lado en este camino, fue un placer estudiar contigo y más placer pasar un tiempo trabajando a tu lado, con las risas que nos pegábamos, las tonterías que hacíamos y los momentos de charlas se hacían los días más cortos y agradables! Muchas gracias por tu compañía!!

Anuski!!! Mil gracias por tus consejos y tu alegría!! Como se te echa de menos aquí!!! Tanto en el lab como fuera de él! Por esos momentos de risas y gracias a Ángel por su alegría! Aunque estemos separados por kilómetros siempre querré saber de vosotros!

A todas vosotras, pinchitos, daros las gracias por los momentos compartidos, por enseñarme tantísimo, por ser tan buenas compañeras!! Y sobre todo, por ser tan grandes amigas!! Gracias por los cafés cafés, por las cervezas hasta tarde, por esas cenas y por todos los momentos de risas!! Creo que esta etapa nos ha unido mucho y espero que sigamos haciendo cosas juntas!! Os aprecio muchísimo!!

I ara a la gent que avui en dia estan amb mi al lab: Gràcies Bàrbara per els consells i els riures, gràcies per aquesta etapa viscuda al lab juntes.

Gràcies Marta! Gràcies per ajudar-me tantíssim en el meu projecte (no et pots imaginar quan!!), per ser tant bona companya, per estar amb mi a Canadà i per un miler de coses mes!!! He après moltíssim amb tu i sense voler-ho m'has estat dirigint com la que més! Gràcies també per els moments fora del lab, las birretes i els soparets!! Encara que ara vingui en Bernat hem de fer algun soparet o cerveceta!!!

Claudiaaa!! La nova incorporació!! I que gran incorporació!!! Gràcies per compartir amb mi el final de la meva tesis!! Per els moments de "locura" que ens entren i per tots els riures que hem fet!! Jo me'n vaig però ens seguirem veient! No ho dubtis!! Recorda que l'any que bé toca Patum!!!

Muchos habéis pasado por mi lado en el lab durante estos cuatro años. Muchas gracias por compartir esos momentos conmigo, aunque fuese poco tiempo habéis aportado algo. Gracias Milly, Guillem, Antonio, Lala, Aida.... Gracias a todos.

Y por último agradecer a toda mi familia todo el apoyo que me han dado:

A ti Agus, por apoyarme siempre en cada una de mis etapas, apoyarme en mi estancia en Canadá, en los momentos duros de horas y horas de trabajo, en los momentos de escribir la tesis... muchas gracias por haber estado a mi lado, eres la mejor persona que nunca hubiese soñado de tener a mi lado. Mil gracias!

Sobre todo tengo que dar un agradecimiento especial a vosotros, papa y mama, este trabajo en parte es vuestro, sin vosotros no hubiese estado posible. Gracias por vuestro apoyo, por vuestros ánimos en los momentos duros, por estar a mi lado siempre! Muchas gracias a los dos por ser tan increíbles y maravillosos!! Sois los mejores y esta Tesis ha sido posible gracias a vosotros!!!

Gracias a mi abuela Felisa por sus comidas de los sábados que trabajaba y por preocuparse tanto por mí. Gracias a mi tía Emilia, mi segunda mamá, por su encanto y su amor, por creer tanto

en mi, por darme ánimos siempre y por sus maravillosas comidas de entre semana que me permitían desconectar un ratito!!

Y en especial dar las gracias a mis yayos, Avelino y Félix, esta tesis es para vosotros. Me hubiese encantado que pudieseis estar a mi lado en este momento, pero el destino no lo ha querido así. Gracias por todos estos años a mi lado y por todo lo que me habéis enseñado. Sé que ahí donde estés os sentiréis orgullosos de mí.

Muchísimas gracias a todos!! Todos vosotros habéis contribuido en este trabajo y cada uno de vosotros a aportado su granito de arena, sin vosotros no hubiese sido posible!!

¡¡Muchas gracias!!









**Universitat Autònoma de Barcelona**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**Institut de Recerca Vall d'Hebron**  
**Departamento de Patología Molecular**