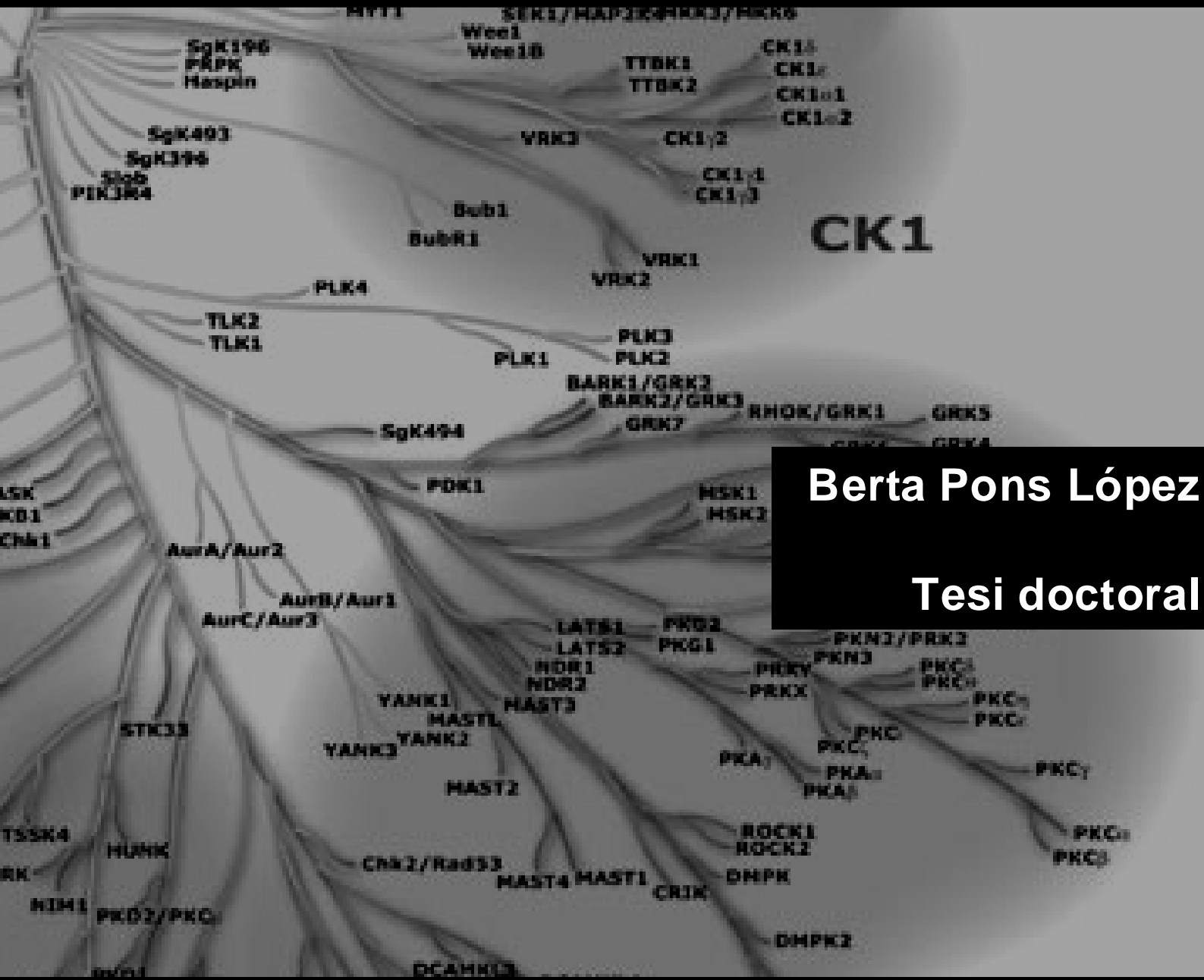
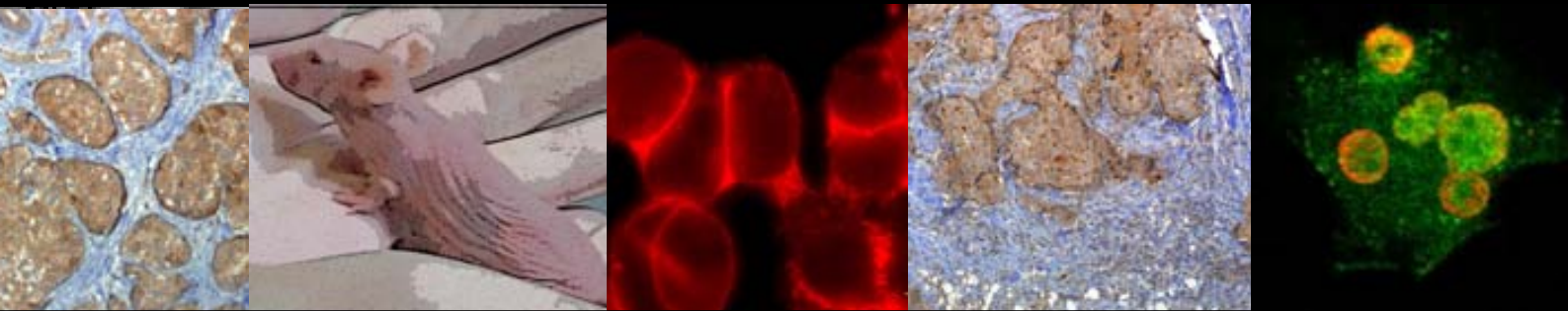




# Estudi de 4E-BP1 i la seva regulació en càncer de mama



**Berta Pons López**  
**Tesi doctoral**









**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina

## **Estudi de 4E-BP1 i la seva regulació en càncer de mama**

Memòria de tesi doctoral presentada per Berta Pons López per optar al grau de doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Treball realitzat al Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Vall Hebrón, sota la direcció del Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras i de la Dra. Gemma Armengol Rosell.

Barcelona, 2010

Doctoranda

Director

Codirector

Tutor

Berta  
Pons

Santiago  
Ramón y Cajal

Gemma  
Armengol

Anna  
Meseguer



**Als meus pares  
i germà**





**A la Pilar,**

Perquè et sento a prop  
i sé que avui estàs al meu costat



No consideris mai l'estudi com una obligació,  
sinó com una oportunitat per penetrar  
en el meravellós món del saber.

**Albert Einstein**



---

# ÍNDEX

---



<b>ÍNDIX .....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUM .....</b>	<b>XIX</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>1</b>
1.1 – MAQUINÀRIA TRADUCCIONAL.....	3
1.2- INICI DE LA TRADUCCIÓ DEPENDENT DE CAP .....	5
1.3- RECLUTAMENT DEL RIBOSOMA A L'mRNA.....	5
1.4- DESCRIPCIÓ DELS FACTORS IMPLICATS EN LA FORMACIÓ DEL COMPLEX eIF4F.....	8
1.4.1- eIF4G .....	8
- Descripció i funció .....	8
- Regulació de les eIF4Gs per fosforilació .....	10
1.4.2- eIF4E .....	11
- Descripció i proteïnes d'unió .....	11
– Funció de l'eIF4E.....	13
-Fosforilació d'eIF4E.....	14
- Significat biològic de la fosforilació d'eIF4E.....	15
1.4.3- 4E-BPs.....	18
- Descripció 4E-BPs.....	18
- Funció.....	19
- Regulació de 4E-BP1 per fosforilació.....	19
- Regulació per fosforilació de les altres 4E-BPs: 4E-BP2 i 4E-BP3 .....	22
- 4E-BP1 i transformació cel·lular .....	23
1.5- REGULACIÓ DE LA TRADUCCIÓ DEPENDENT DE CAP.....	24
1.5.1- Vies de transducció de senyal implicades en el control de la traducció.....	25
- Via d'mTOR .....	25
-mTORC1.....	25
- mTORC2.....	28
- Via MAPK.....	29
1.6.- CÀNCER .....	32
1.6.1.- Alteracions en el control de la traducció de proteïnes i càncer .....	33

1.6.2- mTOR i càncer.....	34
1.6.3- Factors de la iniciació de la traducció i càncer.....	35
- eIF4E, eIF4G i càncer .....	35
- 4E-BP1 i càncer .....	36
<b>2.- HIPÒTESI DE TREBALL.....</b>	<b>39</b>
<b>3.- OBJECTIUS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.- MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>47</b>
4.1.- OBTENCIÓ DE MOSTRES DE TUMORS.....	49
4.2.- IMMUNOHISTOQUÍMICA .....	49
4.2.1- Avaluació immunohistoquímica.....	50
4.3.- EXTRACCIÓ D'RNA.....	51
4.4- PCR AMB RETROTRANSCRIPTASA (RT-PCR) A TEMPS REAL.....	51
4.5.- MANTENIMENT DE CULTIUS CEL·LULARS .....	53
4.6.- CONSTRUCCIÓ DE pBABE, pBABE 4E-BP1 wt I pBABE-4E-BP1 mut (4 Ala) .....	54
4.7.- GENERACIÓ DE RETROVIRUS I INFECCIÓ.....	54
4.8.- TRANSFECCIÓ DE siRNAS .....	55
4.9.- CONSTRUCCIÓ DE pLKO-shLRRK2 i PLKO-shNT .....	57
4.10.- GENERACIÓ DE LENTIVIRUS .....	58
4.11.- CORBES DE CREIXEMENT .....	58
4.12.- FORMACIÓ DE TUMORS EN RATOLINS .....	59
4.13.- TRACTAMENT DE LES CÈL·LULES AMB PRODUCTES QUÍMICS. 59	
4.14.- EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES I <i>WESTERN BLOT</i> .....	60
4.15.- IMMUNOPRECIPITACIÓ .....	61
4.16.- IMMUNOCITOFUORESCÈNCIA.....	62
4.17.- ANÀLISI ESTADÍSTICA. ....	63
<b>5.- RESULTATS.....</b>	<b>65</b>
5.1- p4E-BP1 COM A BIOMARCADOR EN CÀNCER DE MAMA.....	67
5.1.1 -Patrons d'expressió de diverses proteïnes a tumors de mama.....	68
5.1.2 -Correlacions entre els diferents factors de senyalització analitzats	69



5.1.3 -Correlacions entre els perfils d'expressió i les variables clíniques i patològiques.....	71
5.1.4 -Anàlisi de supervivència.....	73
5.1.5 - Anàlisi dels nivells d'RNA de 4E-BP1 en tumors de mama.....	74
5.2.- ESTUDI <i>IN VITRO</i> DE LA FUNCIO DE 4E-BP1.....	75
5.2.1- Formació del complex eIF4F.....	75
5.2.2.- Efecte de la sobreexpressió de 4E-BP1 wt i un 4E-BP1 mutant sobre la proliferació cel·lular.....	77
5.2.3.- Fosforilació d'eIF4E i agressivitat cel·lular.....	79
5.3.- ESTUDI <i>IN VIVO</i> DE LA FUNCIO DE 4E-BP1.....	82
5.3.1- Efecte de la sobreexpressió de 4E-BP1 en xenografts.....	82
5.4.- ESTUDI DE LA REGULACIO DE 4E-BP1 PER FOSFORILACIO.....	83
5.4.1.- Anàlisi de la fosforilació de 4E-BP1 sota l'efecte de quinases ja descrites anteriorment (CDK1 i mTOR).....	85
- El Taxol indueix la hiperfosforilació de 4E-BP1.....	85
- La rapamicina actua defosforilant 4E-BP1 a les línies MDA-MB 231 i HEK 293T.....	85
- El Purvalanol, un inhibidor de la CDK1, inhibeix la fosforilació de 4E-BP1 causada pel Taxol.....	87
5.4.2.- Estudi de noves quinases que podrien estar implicades en la fosforilació de 4E-BP1.....	88
- Selecció de 48 quinases cel·lulars que poden estar implicades en la fosforilació de 4E-BP1.....	88
- Anàlisi de l'estat de fosforilació de 4E-BP1 un cop inhibida la quinasa corresponent.....	89
- Anàlisi de la localització cel·lular de l'eIF4E un cop inhibida la quinasa corresponent.....	95
5.5- ANÀLISI DE LA INHIBICIO D'LRRK2 I p38BETA EN DIFERENTS TIPUS CEL·LULARS.....	96
5.6.- LRRK2.....	99
5.6.1.- Inhibició estable d'LRRK2.....	99
5.6.2- Anàlisi de diferents mecanismes a través dels quals LRRK2 podria estabilitzar 4E-BP1.....	102

<b>6.- DISCUSSIÓ .....</b>	<b>105</b>
6.1.- p4E-BP1 COM A BIOMARCADOR EN CÀNCER DE MAMA.....	107
6.2.- REGULACIÓ DELS NIVELLS DE 4E-BP1 I eIF4E I LA SEVA ESTABILITZACIÓ.....	109
6.3- IMPORTÀNCIA DE 4E-BP1 COM A MECANISME DE REGULACIÓ A NIVELL TRADUCCIONAL .....	110
6.4.- FOSFORILACIÓ D'eIF4E I AGRESSIVITAT CEL·LULAR.....	112
6.5. – LOCALITZACIÓ CEL·LULAR DE L'EIF4E .....	114
6.6.- HIPERFOSFORILACIÓ DE 4E-BP1 I LA SEVA CORRELACIÓ AMB mTOR, CDK1 I ALTRES FACTORS CEL·LULARS .....	115
6.7 - p38 $\beta$ i LRRK2 .....	121
<b>7.- CONCLUSIONS.....</b>	<b>125</b>
<b>8.- BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>131</b>
<b>9.- ANNEX.....</b>	<b>147</b>
<b>10.- AGRAÏMENTS .....</b>	<b>187</b>

---

# RESUM

---



Nombroses malalties presenten alteracions en el procés de traducció de proteïnes; això ha fet que en els darrers anys incrementi la recerca sobre els mecanismes que regulen l'expressió gènica dels organismes a nivell traduccional. Donat que el procés de traducció és elevadament costós des del punt de vista energètic, les cèl·lules mantenen molt regulat el pas d'iniciació de la síntesi de proteïnes. 4E-BP1 és una proteïna que juga una paper important en la regulació de la síntesi proteica. Mitjançant la unió al factor d'iniciació eIF4E, impedeix la formació del complex eIF4F inhibint així la síntesi de proteïnes. La unió de 4E-BP1 a l'eIF4E es regula per fosforilació, quan 4E-BP1 és hiperfosforilat allibera el factor d'iniciació eIF4E i es pot donar la traducció de proteïnes. Són molts els estudis fets sobre 4E-BP1 i en els darrers anys se l'ha relacionat amb diversos tipus de càncer, on s'ha vist que es troba sobreexpressat, sobretot en la seva forma fosforilada.

En aquest estudi es va estudiar una sèrie de 96 tumors de mama on es va veure que nivells elevats de proteïna total de 4E-BP1 i la seva forma fosforilada, p-4E-BP1, es troben associats amb el grau de malignitat del tumor en càncer de mama. A més a més, la ràtio de p-4E-BP1:4E-BP1 total correlacionava significativament amb la presència de metàstasi en els nòduls limfàtics. També es va estudiar *in vitro*, els efectes bioquímics, moleculars i biològics de la sobreexpressió de 4E-BP1, així com d'una forma mutant de 4E-BP1 que no es pot fosforilar. Amb aquests resultats es va constatar que la sobreexpressió d'aquesta proteïna provocava una parada del creixement cel·lular, almenys en alguns tipus cel·lulars. Aquests resultats també es van confirmar en experiments *in vivo* on es va veure que la sobreexpressió de 4E-BP1 suprimia la tumorigènesi. Finalment, per mitjà de l'estudi de noves quinases candidates a fosforilar 4E-BP1 es va veure que 4E-BP1 es pot regular a través de diverses vies de senyalització cel·lular. Amb aquests resultats proposem que p-4E-BP1 podria ser un factor clau candidat per establir el pronòstic en càncer de mama. A més a més, la regulació de la síntesi proteica, a través de la inhibició de la fosforilació de 4E-BP1, podria evitar la proliferació de les cèl·lules tumorals, almenys en alguns tipus cel·lulars. Proposem 4E-BP1 com a factor clau on convergeixen les principals vies de senyalització que es troben alterades en càncer i podria ser considerada com a possible proteïna diana en futures teràpies contra el càncer.





---

# INTRODUCCIÓ

---





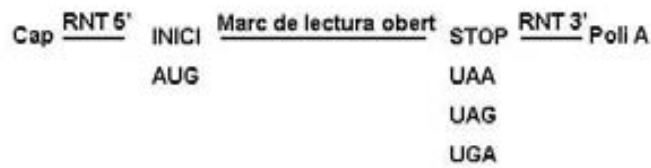
## **1.1 – MAQUINÀRIA TRADUCCIONAL.**

La traducció és el mecanisme mitjançant el qual la informació continguda a l'RNA missatger (mRNA) es tradueix a proteïnes. Aquest procés té lloc en els ribosomes del citoplasma cel·lular. El procés de síntesi de proteïnes o traducció d'mRNA es divideix principalment en tres etapes: la iniciació, l'elongació i la terminació. Cada pas requereix factors de traducció que paulatinament s'associen amb el ribosoma. La majoria dels mRNA dels eucariotes són funcionalment monocistrònics, és a dir, cada mRNA codifica una proteïna. Des del punt de vista estructural, contenen en el seu extrem 5' terminal una guanina metilada o estructura Cap, que és el lloc on inicialment s'uneix el ribosoma. La regió de l'RNA entre l'estructura Cap i el codó d'inici de la síntesi de proteïnes, que generalment és un AUG, s'anomena regió no traduïda (RNT) 5'. La seva longitud, composició nucleotídica i estructura, determinen l'eficiència amb la qual es tradueix cada mRNA. El codó AUG indica l'inici de la proteïna mentre que el codó de parada, que pot ser UAA, UAG o UGA indica la terminació de la mateixa. Tot seguit es troba l'RNT 3' seguida d'una seqüència de diverses A, coneguda com a cua de poli A (Figura 1).

La regulació de la iniciació de la traducció en cèl·lules de mamífers, es dona per uns factors que s'anomenen factors eucariòtics d'iniciació i són coneguts com eIFs. Els eIFs són proteïnes cel·lulars que tenen la capacitat de realitzar diverses funcions durant la síntesi de proteïnes, com per exemple la de reconèixer el Cap, dirigir la unió del ribosoma a l'mRNA, etc. Els eIFs poden ser un factor limitant per a l'inici de la traducció, ja que són els que reconeixen els mRNA madurs que poden ser traduïts. Malgrat tot hi ha alguns mRNA cel·lulars i virals que poden traduir-se en ambients en els que un o diversos d'aquests factors canònics es troben en concentracions limitades. En aquest mecanisme alternatiu de la iniciació de la traducció, la unió del ribosoma no depèn del reconeixement del Cap, sinó de la unió del ribosoma a una regió específica dins de la RNT 5', anomenada lloc d'unió interna del ribosoma o IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), un lloc proper al codó d'inici (Pelletier and Sonenberg 1988). A aquest mecanisme alternatiu d'inici de la traducció se'l coneix com a traducció independent de Cap.

# INTRODUCCIÓ

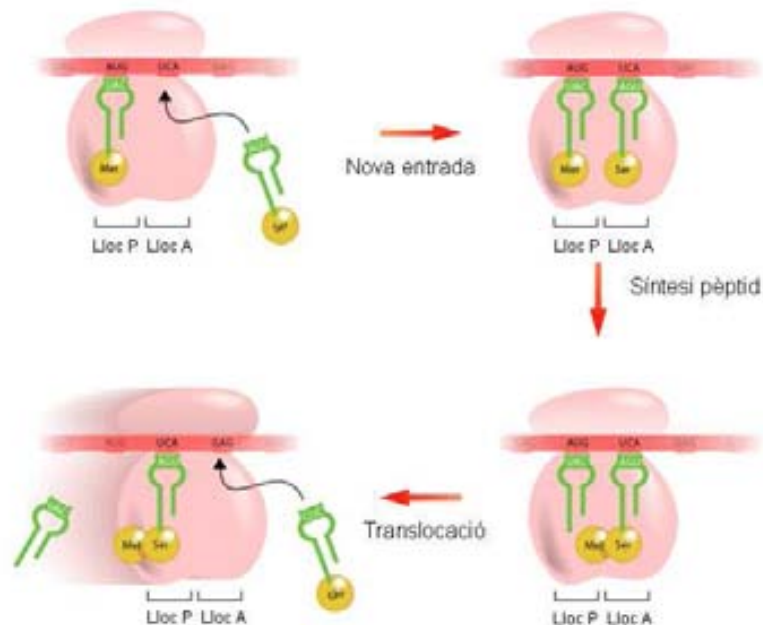
## A. Estructura d'un mRNA eucariòtic



## B. Iniciació



## C. Elongació



**Figura 1. Traducció de l'mRNA a proteïna (Megan Simmer, 2003)**

a) Representació esquemàtica d'un mRNA eucariòtic: Cap o guanina metilada; RNT (regió no traduïda); AUG: lloc d'iniciació de la traducció; marc de lectura obert o regió codificant; STOP (codó de parada); regió poli A (regió poliadenilada).

b) Procés d'iniciació de la traducció on hi intervenen el ribosoma, l'mRNA i un segon tipus d'RNA anomenat RNA de transferència (tRNA).

c) El ribosoma és la maquinària cel·lular responsable de sintetitzar la proteïna i ho fa a través de 2 llocs d'aminoàcids, coneguts com lloc A i lloc P. El primer aminoàcid de la proteïna és portat al lloc P pel tRNA, que correspon a la seqüència de tres nucleòtids, coneguts com a codó, dins la seqüència de l'mRNA, mentre que la seqüència del codó en el lloc A determina la identitat del següent aminoàcid per ser incorporat a la proteïna que s'està sintetitzant. El cicle de l'elongació es repeteix de forma contínua amb un lliscament gradual del ribosoma sobre l'mRNA en el sentit 5'-3', fins a arribar a trobar el triplet de terminació.

Els IRES van ser inicialment identificats en els genomes d'alguns virus d'RNA de cadena positiva, però poc temps després la seva presència es va confirmar també en alguns mRNA cel·lulars amb característiques peculiars i amb funcions crítiques en la regulació de molts processos cel·lulars (Kozak 1989).

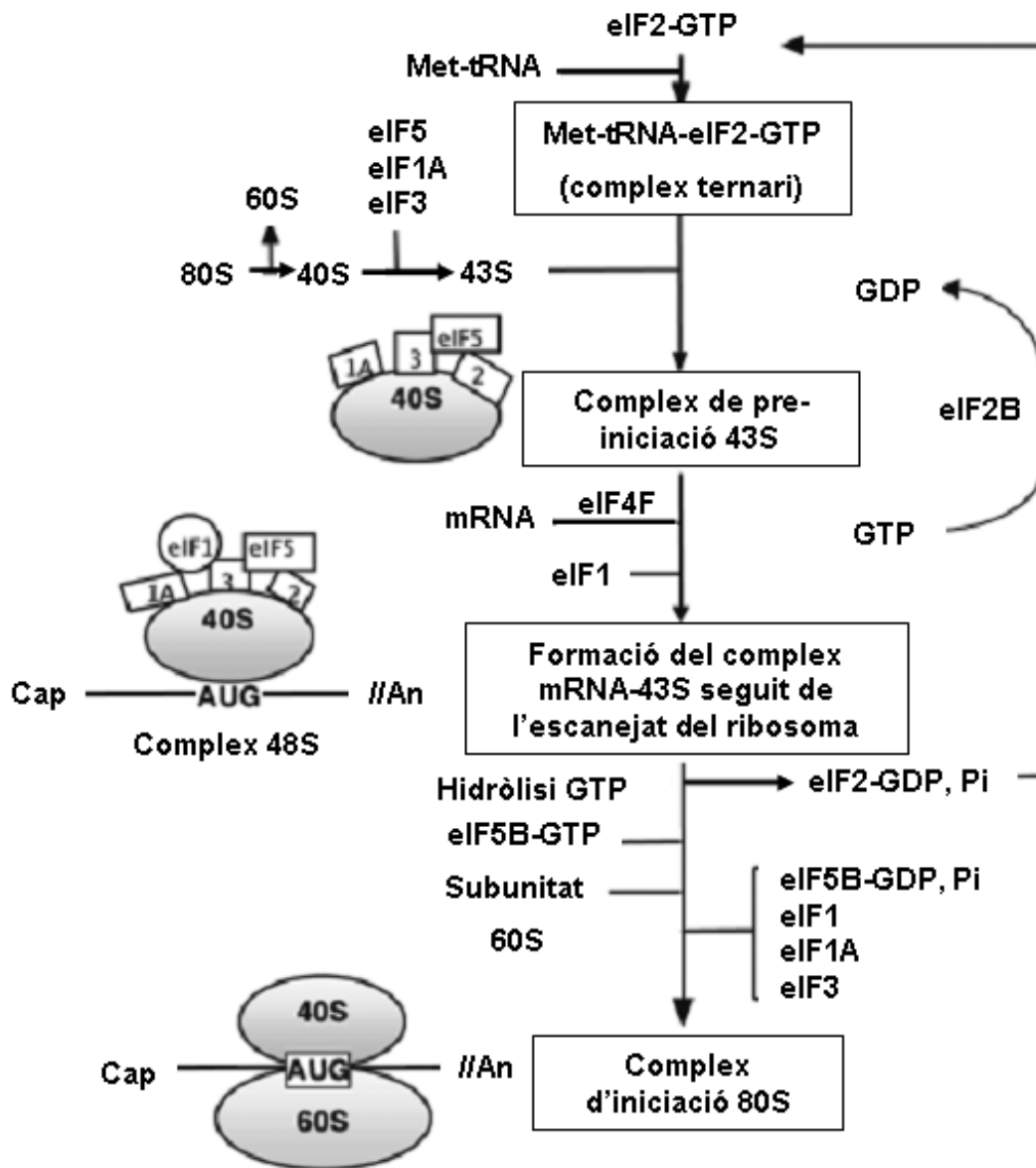
## **1.2- INICI DE LA TRADUCCIÓ DEPENDENT DE CAP**

El pas de la iniciació de la traducció implica el reclutament de la subunitat 40S del ribosoma a l'mRNA i la identificació del codó d'inici (Figura 2). La iniciació és un dels passos més regulats de la traducció de proteïnes. En aquest punt es troben implicats la majoria de processos, incloent el reclutament del tRNA iniciador (Met-tRNA<sub>i</sub>) a la subunitat 40S del ribosoma. Aquest procés requereix l'eIF2, una proteïna d'unió al GTP heterotrimèrica la qual s'uneix al Met-tRNA i forma el complex ternari eIF2/GTP/Met-tRNA, que junt amb altres eIFs (eIF1, eIF5 i eIF3) s'uneixen a la subunitat 40S per formar el complex de preiniciació 43S. Un canvi de conformació al complex de preiniciació 43S activa la hidròlisi del GTP. Seguidament el reconeixement del codó d'iniciació AUG desencadena l'alliberament de l'eIF1 i el posterior alliberament de l'eIF2-GDP permet el reclutament de la subunitat 60S ribosomal (Kozak 1978; Kozak 1989).

La regeneració de la forma activa eIF2·GTP per la subsegüent ronda de traducció, requereix un GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) l'heteropentàmer ( $\alpha$ - $\epsilon$ ) anomenat eIF2B (Lopez-Lastra et al. 2005) (Figura 2).

## **1.3- RECLUTAMENT DEL RIBOSOMA A L'mRNA**

En el procés de reclutament del ribosoma a l'mRNA hi juguen un paper important varies proteïnes: PABP [*poly(A) binding protein*], eIF3 i la formació del complex eIF4F (Figura 3). Aquest complex es troba compost per 3 subunitats: l'eIF4E, l'eIF4A i l'eIF4G. L'eIF4E és una proteïna d'unió a l'estructura Cap de l'mRNA i és un factor indispensable perquè es pugui començar la traducció dependent de Cap. L'eIF4E té un únic lloc de fosforilació a mamífers, la Ser209 i es pot unir a diverses proteïnes, incloent l'eIF4GI i

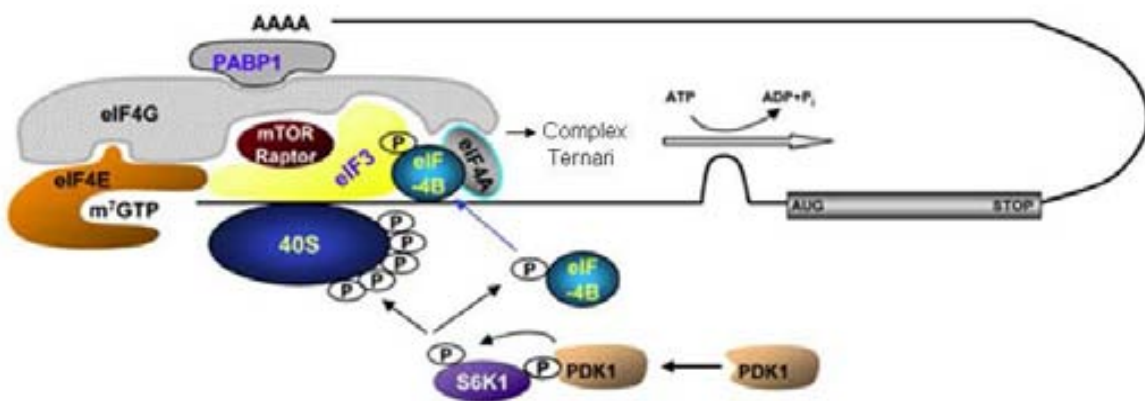


**Figura 2. Esquema de la iniciació de la traducció a eucariotes. (Lopez-Lastra et al. 2005)**

La traducció d'mRNA a proteïnes comença després de la unió del tRNA iniciador, l'mRNA i les dues subunitats ribosomals. El procés que du a la formació del complex ribosomal 80S consisteix en diversos passos que són mediatos pels factors d'iniciació eucariòtics. La subunitat 40S ribosomàlica és capturada per formar el complex de pre-iniciació 43S. En el procés de traducció dependent de Cap, el complex de pre-iniciació s'uneix al Cap de l'extrem 5' de l'mRNA amb l'ajuda del complex proteic eIF4F i llavors migra al llarg de l'mRNA fins que troba el codó d'iniciació; seguidament s'alliberen els factors d'iniciació eIFs i són reciclats. Posteriorment es dona la unió de la subunitat 60S i comença el procés d'elongació.

l'eIF4GII, dues proteïnes d'ancoratge (sovint referides genèricament com a eIF4G). L'eIF4G interacciona també amb altres components de la maquinària traduccional, com l'eIF4A, una RNA helicasa que es troba implicada en el desenrotllament de les estructures secundàries de les regions 5'-UTRs (regions no traduïdes) de l'RNA missatger. L'eIF4A per si sol té activitat ATPasa i helicasa molt dèbil, però aquestes són estimulades per l'eIF4G i l'eIF4B (Rogers et al. 2002). L'eIF4B interacciona amb l'eIF4A i amb l'eIF3.

L'extrem N-terminal de l'eIF4G s'uneix a PABP, aquesta unió implica la circularització de l'mRNA i promou la traducció. eIF4G també s'uneix a l'eIF3 (Harris et al. 2006). L'eIF3 és una proteïna que té 12 subunitats i s'uneix a la subunitat 40S del ribosoma. És un factor que fa de pont entre l'mRNA i la subunitat 40S (Figura 3).

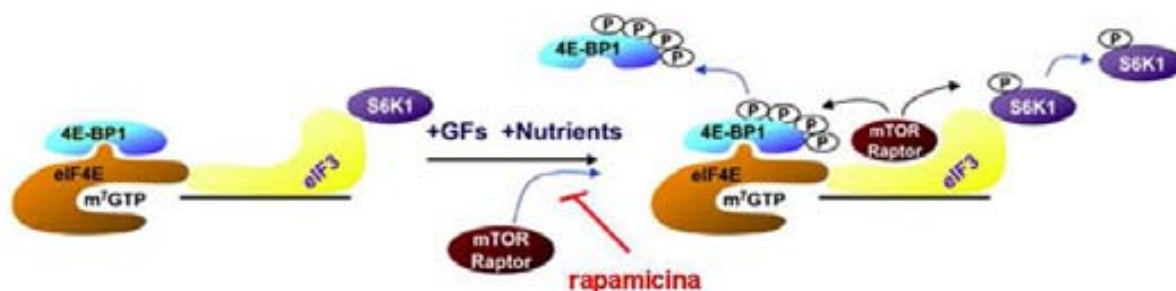


**Figura 3. Interacció entre els factors d'iniciació de la traducció eIF4Gs, eIF4A i eIF4E durant el procés de traducció dependent de Cap (Lopez-Lastra et al. 2005).**

Representació esquemàtica de la circularització de l'mRNA. En aquest model el complex eIF4F interacciona amb l'extrem 5' de l'mRNA (via eIF4E) i la cua de poli(A) (via PABP) i recluta la subunitat ribosomal 40S via interacció amb l'eIF3.

L'activitat biològica de l'eIF4E pot ser regulada per una sèrie de proteïnes d'unió, les 4E-BPs (*eIF4E-binding proteins*). A mamífers trobem tres tipus de 4E-BPs (4E-BP1, 4E-BP2 i 4E-BP3) on 4E-BP1 és la majoritària i la més estudiada. 4E-BP1 interacciona amb l'eIF4E a través d'un domini d'unió que s'assembla al domini trobat a l'eIF4GI i l'eIF4GII, amb una seqüència  $\Phi\text{XXXX}\Phi\Phi$ , on  $\Phi$  és un residu hidrofòbic i X és qualsevol aminoàcid. A través

d'aquesta unió a l'eIF4E les 4E-BPs bloquegen la interacció amb l'eIF4G, fent que l'eIF4E no es trobi disponible per la formació del complex d'iniciació (Mader et al. 1995; Gingras et al. 1999) (Figura 4). Les 4E-BPs són fosfoproteïnes. 4E-BP1 conté com a mínim set llocs de fosforilació, quatre dels quals se sap que es troben *up-regulats* a través de vies de senyalització (Thr37,46, Ser65 i Thr70 en 4E-BP1 humà) (Proud 2004; Wang et al. 2005)



**Figura 4. Esquema del bloqueig de la traducció de proteïnes dependent de Cap. (Lopez-Lastra et al. 2005)**

La unió de 4E-BP1 a l'eIF4E impedeix la interacció amb l'eIF4G bloquejant així la traducció de proteïnes. La unió de 4E-BP1 amb l'eIF4E és regulada per fosforilació. Quan el complex mTOR-Raptor s'uneix al complex eIF3/eIF4E, 4E-BP1 és fosforilat i alliberat.

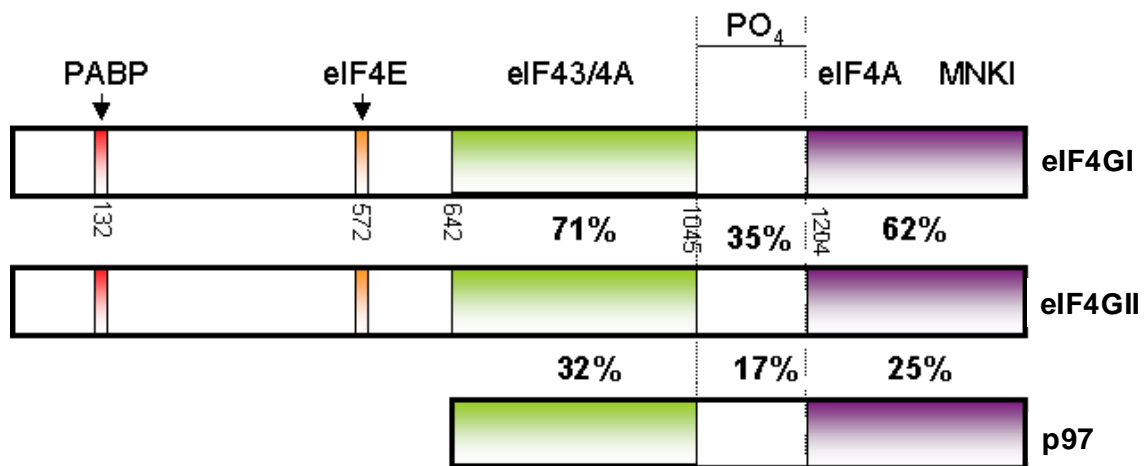
## **1.4- DESCRIPCIÓ DELS FACTORS IMPLICATS EN LA FORMACIÓ DEL COMPLEX eIF4F**

### **1.4.1- eIF4G**

#### **- Descripció i funció**

L'eIF4G és una proteïna d'ancoratge que juga un paper important pel que fa al reclutament del ribosoma a l'mRNA. Com s'ha comentat anteriorment, tots els eucariotes tenen dues proteïnes eIF4G (eIF4GI i eIF4GII). Les eIF4Gs tenen tres dominis estructurals funcionals, que es troben connectats entre sí. Els tres dominis interactuen amb diferents factors d'iniciació (Figura 5). A l'eIF4GI el domini N-terminal interacciona directament amb l'eIF4E (Lamphear et al. 1995; Mader et al. 1995) i la PABP (Imataka et al. 1998). El domini del centre de la proteïna té llocs d'unió per l'eIF3 i l'eIF4A (Lamphear et al. 1995; Imataka and Sonenberg 1997); aquesta regió també té un lloc d'unió a l'RNA (Pestova et al. 1996). El fragment C-terminal de l'eIF4GI conté un segon lloc

independent d'unió a l'eIF4A (Lamphear et al. 1995; Imataka and Sonenberg 1997) i interacciona amb MNK1 (Fukunaga and Hunter 1997), una serina/threonina quinasa, activada per la via de les MAPK i que fosforila l'eIF4E *in vitro* (Waskiewicz et al. 1997). Pel que fa a l'eIF4GII, comparteix un 46% d'identitat amb l'eIF4GI a nivell d'aminoàcids (Figura 5). eIF4GI i eIF4GII són funcionalment homòlegs i, per tant, totes les característiques descrites anteriorment per l'eIF4GI es conserven en l'eIF4GII (Gradi et al. 1998; Imataka et al. 1998; Pyronnet et al. 1999)



**Figura 5.** La regió fosforilada de l'eIF4GI es troba altament conservada a la família eIF4G en humans (Raught et al. 2000)

Alineament de les diferents proteïnes de la família eIF4G. S'indiquen les localitzacions dels llocs d'unió de diferents proteïnes, així com el percentatge d'identitat que correspon amb la regió d'eIF4GI.

A través de la interacció proteïna-proteïna i proteïna-RNA, les eIF4Gs realitzen diverses funcions dins la iniciació de la traducció. Entre elles hi trobem: a) el reclutament del ribosoma a l'extrem 5' de l'mRNA, mitjançant interaccions amb l'eIF4E i l'eIF3; b) el desenrotllament de l'estructura secundària de l'mRNA 5' UTR, a través de la unió de l'eIF4A a la regió corresponent (Rozen et al. 1990); c) circularització de l'mRNA a través de les interaccions amb eIF4E i PABP (Wells et al. 1998); i d) acostament de la quinasa MNK1 al seu substrat eIF4E (Pyronnet et al. 1999; Waskiewicz et al. 1999). Encara no està del tot clar com l'eIF4G regula i coordina totes aquestes funcions.

La família eIF4G a humans consta de dos membres més, la proteïna p97 i la proteïna PAIP-1. p97 és homòloga amb les altres eIF4Gs només a l'extrem

C-terminal (Figura 5). Com les altres eIF4Gs, conté llocs d'unió per eIF3, eIF4A i MNK1. Malgrat tot, p97 no interacciona amb eIF4E o PABP (Imataka et al. 1997) i inhibeix tant la traducció dependent de Cap com la independent de Cap *in vivo*, probablement per la formació d'un complex no funcional (Imataka et al. 1997). Un altre homòleg de la família, ja més distant, és PAIP-1, que té llocs d'unió per PABP i per eIF4A, i sembla actuar com un promotor de la traducció *in vivo* (Craig et al. 1998).

S'han identificat homòlegs per eIF4Gs en diverses espècies (Hernandez et al. 1998) i només el domini central és el que conserva més homologia amb les eIF4Gs a mamífers. A més, a *Drosophila* es troba un extrem C-terminal complet (Hernandez et al. 1998), al peix zebra es troba un extrem C-terminal més curt i a *Saccharomyces cerevisiae* (Goyer et al. 1993) els homòlegs no tenen aquesta regió. Aquestes observacions suggereixen que la regió central de les eIF4Gs és l'única requerida per la traducció de proteïnes. Malgrat tot, a mamífers s'ha vist que els extrems N- i C-terminal juguen un paper important promovent o modulant la traducció. Per exemple, la interacció eIF4G-PABP mediada per l'extrem N-terminal (Imataka et al. 1998) inhibeix la síntesi de proteïnes truncades d'mRNAs que no contenen la seva llargada completa (Sachs et al. 1997). La interacció entre eIF4A i eIF4GI a l'extrem C-terminal sembla ser important, ja que la mutació a l'extrem C-terminal, on s'uneix l'eIF4A, fa decreixer l'activitat de l'eIF4GI (Morino et al. 2000). De totes maneres encara no se sap massa bé com es regula l'activitat de l'extrem terminal de l'eIF4G.

### **- Regulació de les eIF4Gs per fosforilació**

Ambdues proteïnes, eIF4GI i eIF4GII, són fosfoproteïnes (Tuazon et al. 1989; Raught et al. 2000), però sembla que la seva fosforilació es regula de manera diferent (Raught et al. 2000). La fosforilació d'eIF4GI incrementa en resposta a estímuls extracel·lulars (sèrum, insulina i factors de creixement) i promou el creixement cel·lular (Tuazon et al. 1989; Raught et al. 2000). eIF4GI té dos llocs de fosforilació, un es troba a l'extrem N-terminal, la Ser314. A dia d'avui, les condicions que promouen la fosforilació d'aquest residu encara no són del tot clares (Raught et al. 2000). L'altre lloc de fosforilació es troba situat



entre el centre i l'extrem C-terminal . Aquesta regió de fosforilació conté els llocs: Ser 1148, Ser 1188 i Ser 1232, els quals són sensibles a inhibidors de la PI3K i mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Raught et al. 2000). S'ha vist que la regió N-terminal sembla modular la fosforilació de l'eIF4GI als residus C-terminals, perquè formes truncades d'eIF4GI a l'extrem N-terminal són resistents a tractaments amb inhibidors de quinases (Raught et al. 2000). L'efecte de la fosforilació de l'eIF4GI encara no ha estat determinat, ja que no hi ha cap evidència de canvis en la seva activitat o associació amb altres factors d'iniciació. De totes maneres és possible que la fosforilació de l'eIF4GI provoqui un canvi conformacional a la proteïna i que aquest afecti a la seva activitat. Pel que fa a l'eIF4GII i p97, la fosforilació total és menor que la de l'eIF4GI i la seva fosforilació no és regulada per sèrum ni mitògens. A més a més, el seu extrem C-terminal no és fosforilat, suggerint que aquesta regió ha tingut un origen evolutiu divergent. CaMKI fosforila eIF4GII *in vitro* i *in vivo* a la Ser1156, la qual es troba localitzada en el segment que s'alinea amb la regió fosforilada de l'eIF4GI (Qin et al. 2003).

#### **1.4.2- eIF4E**

##### **- Descripció i proteïnes d'unió**

L'eIF4E és una proteïna de 24 kDa que s'uneix a l'estructura Cap de l'mRNA i participa en el reclutament del ribosoma a l'mRNA. Inicialment l'eIF4E es va descriure com una proteïna promotora de la iniciació de la traducció, afavorint l'expressió de diverses proteïnes dins la cèl·lula (De Benedetti and Rhoads 1990; Lazaris-Karatzas et al. 1990). A dia d'avui, la seva estructura, funció i regulació encara segueix sent objecte d'estudi. Durant l'última dècada s'han realitzat diversos avenços pel que fa a l'estudi d'aquesta proteïna. Quasi tots els eucariotes expressen múltiples membres de la família eIF4E i aquests tenen diferents funcions dins la cèl·lula. Recentment també s'han descobert noves parelles d'unió a l'eIF4E, alguns dels quals s'uneixen a l'eIF4E només a mRNAs específics (Marcotrigiano et al. 1999; Dostie et al. 2000; Gross et al. 2003; Nakamura et al. 2004; Nelson et al. 2004; Cho et al. 2005; Richter and Sonenberg 2005; Cho et al. 2006; Napoli et al. 2008). És habitual trobar famílies de proteïnes amb múltiples membres, malgrat tot l'eIF4E va ser

inicialment descrit com a una única proteïna. A finals dels anys 80, el laboratori del Dr. Ravel, va identificar dues formes d'eIF4E en el blat, anomenades eIF4E i eIF(iso)4E (Browning et al. 1987); aquest descobriment semblava ser una peculiaritat d'aquest organisme. Però una dècada més tard es van publicar, gairebé simultàniament, noves formes d'eIF4E a tres espècies diferents. Una d'elles era l'espècie *Arabidopsis thaliana* que, a més a més de l'expressió d'eIF4E i eIF(iso)4E, expressava també nCBP (Ruud et al. 1998); per altra banda també es va trobar un segon membre de la família, 4EHP (Rom et al. 1998), a *Homo sapiens* i, per últim, es va trobar que *Caenorhabditis elegans*, expressava tres membres de la família d'eIF4E. Molts altres membres de diferents famílies han estat trobats per altres factors d'iniciació de la traducció, com per exemple eIF4A i eIF4G. Després que el laboratori de Joshi et al (Joshi et al. 2005) identifiqués 411 membres de la família d'eIF4E de 230 espècies diferents es va veure que no tots els membres de la família eIF4E conservaven la capacitat d'unir-se a l'estructura cap de l'mRNA, a l'eIF4G o a les 4E-BPs. Per exemple, a mamífers, l'eIF4E-1 s'uneix al Cap, a l'eIF4G i a les 4E-BPs, però l'eIF4E-2 s'uneix només a l'estructura Cap i a les 4E-BPs, mentre que l'eIF4E-3 s'uneix només al Cap i a l'eIF4G (Joshi et al. 2004).

Els treballs pioners dels laboratoris dels Drs. Sonenberg i Lawrence van demostrar que hi havia altres proteïnes d'unió a l'eIF4E, a més a més de l'eIF4G; aquestes proteïnes eren les 4E-BPs (4E-BP1, -2 i -3) (Gingras et al. 2004). La proteïna transportadora 4E-T també s'uneix a l'eIF4E en una regió similar a la que s'uneixen l'eIF4G i les 4E-BPs. En les darreres dècades, el nombre de proteïnes d'unió a l'eIF4E ha anat augmentant. Moltes de les noves funcions d'aquesta proteïna han vingut determinades per la seva interacció amb aquestes noves parelles. Per exemple, durant la neurogènesi, la neuroguidina s'uneix a l'eIF4E i impedeix la traducció de CPE (Jung et al. 2006). El tancament del tub neural i la migració de la cresta neural es para en embrions de *Xenopus* si no hi ha neuroguidina, suggerint que la neuroguidina regula la traducció de CPE per dirigir el desenvolupament embrionari.

### - Funció de l'eIF4E

Hernández i Vázquez-Pianzola (2005) van suggerir que hi ha un membre de la família d'eIF4E a cada organisme que s'expressa constitutivament i és l'encarregat de regular la traducció de proteïnes. Els altres membres de la família estarien involucrats en funcions més especialitzades (Rhoads 2009).

Aquesta proteïna sembla tenir un paper important en la regulació del creixement cel·lular. S'ha vist que la sobreexpressió d'eIF4E provoca la transformació cel·lular i que aquesta pot ser revertida per l'expressió de 4E-BP1 o 4E-BP2 (De Benedetti and Rhoads 1990; Lazaris-Karatzas et al. 1990; Smith et al. 1990; Rousseau et al. 1996; Avdulov et al. 2004). La sobreexpressió de l'eIF4E no condueix a un increment global de traducció d'mRNAs, però sí que es veuen incrementats alguns mRNAs específics, com *ODC*, *MYC* i ciclina D1. Aquests mRNAs tenen un 5'-RNT llarg i estructurat i la seva traducció es troba estretament lligada a la formació del complex eIF4F (Clemens 2004; Mamane et al. 2004). La majoria d'aquests mRNAs codifiquen proteïnes involucrades en tumorigènesi (Mamane et al. 2004). L'mRNA de l'oncogen *MYC*, particularment, ha estat molt estudiat. Ruggero et al (Ruggero et al. 2004) van demostrar que la sobreexpressió d'eIF4E provocava la formació de tumors. Semblava que la sobreexpressió d'eIF4E no només incrementava l'expressió de *MYC* sinó que l'eIF4E cooperava amb ell en el procés de transformació cel·lular.

S'ha descrit que una fracció de l'eIF4E es troba dins del nucli (Strudwick and Borden 2002; Rong et al. 2008). L'eIF4E nuclear pot estar associat a l'exportació de certs mRNAs al citoplasma (Rousseau et al. 1996; Culjkovic et al. 2005). S'ha vist que la sobreexpressió de l'eIF4E promou l'expressió de ciclina D1 però no incrementant directament la traducció d'aquest mRNA sinó incrementant el nivell d'mRNA de ciclina D1 al citoplasma (Rousseau et al. 1996). La proteïna de transport 4E-T (Dostie et al. 2000) es creu que és l'encarregada de transferir l'eIF4E al nucli, on sembla ser important en el transport de l'mRNA de la ciclina D1 al citoplasma (Rousseau et al. 1996). L'increment de l'expressió de ciclina D1 promou el pas de fase G1 a S en el cicle cel·lular, i d'acord amb això s'ha vist que l'expressió d'eIF4E promou la progressió de la cèl·lula a fase S (Smith et al. 1990). Com que 4E-T també s'uneix a l'eIF4E a través del lloc tapat per les 4E-BPs, es creu que la

rapamicina interfereix en el transport nuclear de l'eIF4E (Rong et al. 2008). Això podria explicar el mecanisme pel qual la rapamicina para la progressió del cicle cel·lular ja que la ciclina D1 es requereix per passar de fase G1 a fase S. L'exportació des del nucli de l'mRNA de la ciclina D1 mitjançant l'eIF4E és modulada per la unió de la proteïna PML (*promyelocytic leukaemia protein*) a l'eIF4E (Cohen et al. 2001). PML sembla unir-se a la part dorsal de l'eIF4E, així que la interacció es pot suprimir mutant el Trp73 de l'eIF4E per una alanina com s'havia mostrat anteriorment per les interaccions eIF4E-eIF4G i eIF4E-4E-BP1. La interacció PML-eIF4E sembla que fa disminuir l'afinitat d'eIF4E pel Cap d'mRNA, aquest efecte podria ser important pel que fa als efectes antitumorigènics de PML.

### **-Fosforilació d'eIF4E**

eIF4E podria actuar com a punt convergent de dues vies de senyalització, la via de la PI3K i de les MAPK. La via de la PI3K regula l'activitat de l'eIF4E a través de la fosforilació de les 4E-BPs, d'aquesta manera s'incrementa la seva activitat. Per altra banda, ERK o p38/MAPK poden incrementar la fosforilació d'eIF4E a través de la via MNK1/2 (Waskiewicz et al. 1997) (veure més avall vies de senyalització, apartat 1.5.1).

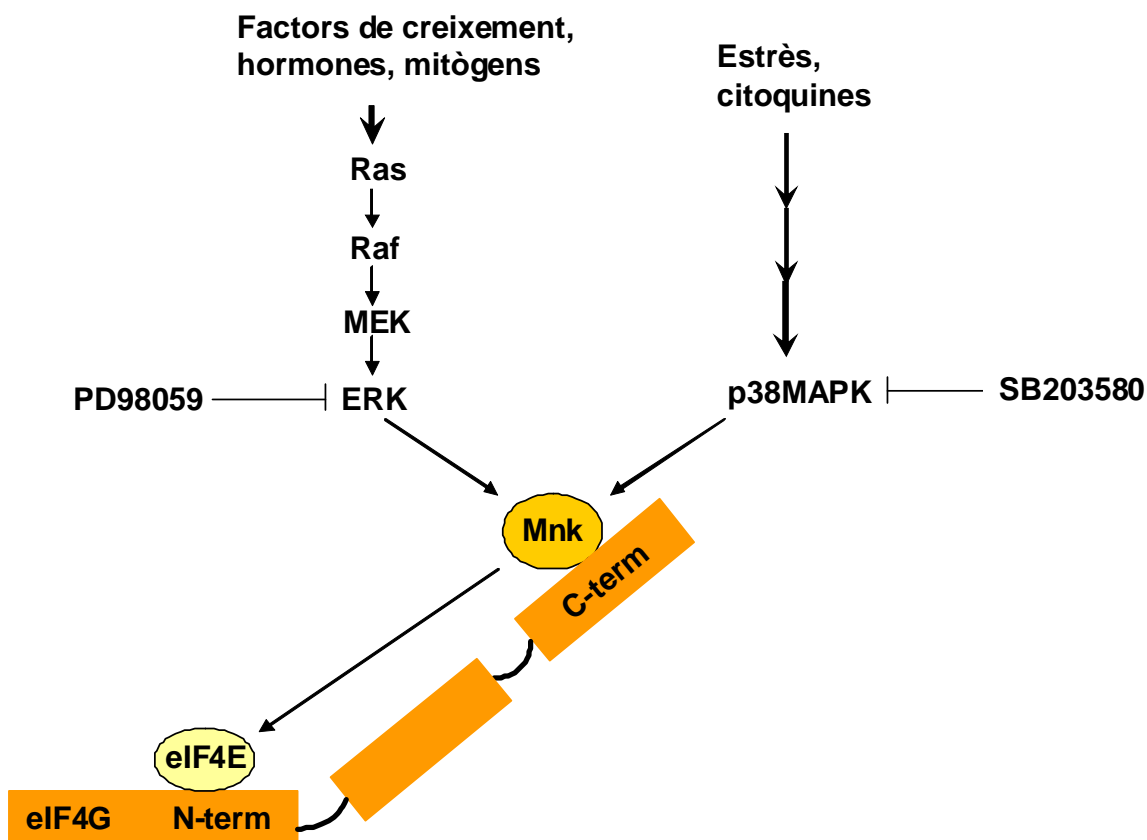
L'eIF4E és fosforilat en un únic lloc *in vivo*, la Ser209 a mamífers, el qual es troba proper a l'extrem C-terminal (Flynn and Proud 1995; Joshi et al. 1995). Hi ha hagut algunes confusions pel que fa a l'existència d'altres llocs de fosforilació d'aquesta proteïna, com la Ser53, que va ser inicialment identificada com un residu de fosforilació. Es va generar un mutant d'eIF4E on la Ser53 es va mutar per una alanina. Aquest mutant no provocava la transformació cel·lular que s'observava al sobreexpressar la forma *wild type* (wt) d'aquesta proteïna i això va fer pensar, en un principi, que la fosforilació de l'eIF4E era essencial per la funció de la transformació cel·lular (De Benedetti and Rhoads 1990). Ara per ara es creu que el fet que la mutació a la Ser53 no causi transformació cel·lular es deu a que aquesta mutació afecta a l'estructura de l'eIF4E, fet que provoca una alteració de la seva funció.

La fosforilació de l'eIF4E es troba incrementada en resposta a una varietat de condicions (Proud 1992), entre elles tractament de les cèl·lules amb

sèrum, factors de creixement, ésters de forbol, i en alguns tipus cel·lulars, la insulina (Flynn and Proud 1996) (Figura 6). S'ha demostrat que aquests efectes es produeixen a través de la via MEK/ERK, ja que es bloqueja a través d'inhibidors de MEK (Waskiewicz et al. 1999; Tschopp et al. 2000). Algunes citoquines i condicions d'estrès també incrementen la fosforilació d'eIF4E (Morley and McKendrick 1997) i sembla que aquest efecte es dona a través de la via p38 MAPK. L'ús d'inhibidors específics de les isoformes  $\alpha$  i  $\beta$  de p38 van demostrar que aquestes dues isoformes de p38 són les responsables d'incrementar la fosforilació d'eIF4E i no les isoformes  $\delta$  o  $\gamma$  (Cuenda et al. 1995; Davies et al. 2000). Són les isoformes  $\alpha$  i  $\beta$  les que poden fosforilar i activar les MNKs (Waskiewicz et al. 1997; Tschopp et al. 2000) (Figura 6). Malgrat que altres tipus d'estrès, com per exemple el xoc tèrmic, estrès oxidatiu o estrès osmòtic, també activen la via de p38 MAPK, aquests no causen un increment en la fosforilació d'eIF4E (Wang et al. 1998). Això probablement indica que aquests tipus d'estrès impedeixen la formació del complex eIF4F a causa de la defosforilació de 4E-BP1, el qual segresta l'eIF4E i el separa físicament de les MNKs unides a l'eIF4G. D'una manera similar la defosforilació de l'eIF4E induïda per infecció de cèl·lules amb adenovirus (Feigenblum and Schneider 1996) sembla que és deguda a la separació física del complex eIF4F de la MNK1, per una proteïna de 100kDa que competeix amb MNK1 per la unió a l'eIF4G (Cuesta et al. 2000). Per contra, la infecció de cèl·lules amb un coronavirus murí activa la MNK1 i incrementa la fosforilació d'eIF4E d'una manera dependent de la via de p38 MAP quinasa (Banerjee et al. 2002).

### **- Significat biològic de la fosforilació d'eIF4E**

Avui en dia, el significat biològic de la fosforilació de l'eIF4E i el seu efecte en la traducció és controvertit (Scheper and Proud 2002). Donat que els estímuls que incrementen la traducció de proteïnes generalment incrementen l'estat de fosforilació de l'eIF4E, el pensament general és que la fosforilació podria augmentar la seva activitat incrementant la seva afinitat per l'estructura Cap de l'mRNA. Minich et al (1994) van ser els primers en intentar donar resposta a aquest fet. El seu treball es va realitzar abans que s'identifiquessin les MNKs. Per mitjà d'una cromatografia sobre sefarosa d'RNA van separar la



**Figura 6. Vies de senyalització que afecten a la fosforilació de l'eIF4E. (Sonenberg, Hershey and Mathews; Cold Spring harbor laboratory press)**

Factors de creixement, hormones, mitògens o altres estímuls cel·lulars activen la via de quinases Ras/Raf/MEK/ERK. L'estrès i les citoquines activen la via de p38MAPK. Les dues vies poden activar MNK1, una quinasa associada a eIF4G. MNK1 activada fosforila l'eIF4E a la Ser209. Per delinear aquestes vies de senyalització s'han usat inhibidors químics PD98059 i SB203580.

forma fosforilada de l'eIF4E de la seva forma no fosforilada, un cop purificades aquestes dues formes, utilitzant mètodes de fluorescència, van trobar que la fracció que contenia la forma fosforilada d'eIF4E mostrava de 3 a 4 vegades més afinitat per l'estructura Cap de l'mRNA. Dos fets a tenir en compte amb aquest procediment és que la base de la resolució d'aquestes dues formes sobre la sefarosa d'RNA no és del tot clara i que és possible que alguna o les dues fraccions separades estiguessin contaminades amb altres proteïnes que poden influenciar l'afinitat de l'eIF4E pel Cap d'RNA. Per exemple, les 4E-BPs,

que incrementen notablement la seva afinitat pel Cap (Ptushkina et al. 1999), encara no es coneixien en aquella època i en cap cas es van detectar pels mètodes utilitzats en el seu estudi.

Amb el descobriment de les MNKs va ser possible fosforilar l'eIF4E *in vitro* i es va utilitzar aquest material per veure l'efecte de la seva fosforilació en la seva funció. Scheper et al (2002) van utilitzar aquests avenços i utilitzant un anàleg del Cap ( $m^7GTP$ ) van veure, contràriament al que havien vist Minich et al (1994), que la forma fosforilada de l'eIF4E tenia menys afinitat per l'estructura Cap que la proteïna no fosforilada (Scheper et al. 2002). Scheper et al (2002) van demostrar també que la fosforilació de l'eIF4E no afectava la seva unió amb 4E-BP1. Donat que 4E-BP1 i eIF4G s'uneixen a la mateixa regió de l'eIF4E, es podria generalitzar que la fosforilació de l'eIF4E tampoc afecta la seva unió amb l'eIF4G. Aquest fet es podria explicar a través de l'estructura de l'eIF4E, ja que la regió a on s'uneixen 4E-BP1 i eIF4G es troba llunyana a la Ser209 a l'estructura 3D de la proteïna (Marcotrigiano et al. 1997; Matsuo et al. 1997; Ptushkina et al. 1998; Ptushkina et al. 1999). La unió d'eIF4G/4E-BP1 a l'eIF4E incrementa la seva afinitat per l'estructura Cap de l'mRNA (Ptushkina et al. 1999). Aquest efecte és mantingut per la forma fosforilada de l'eIF4E. Altres estudis que concorden amb l'observació que la fosforilació de l'eIF4E fa decreixer la seva afinitat per l'estructura Cap són els fets per Knauf et al (2001) que van trobar que l'expressió de mutants d'MNK1 o MNK2, els quals incrementaven la fosforilació de l'eIF4E, impedièen la traducció dependent de Cap. El fet que alguns estudis afirmen que la fosforilació de l'eIF4E fa decreixer la seva afinitat per l'estructura Cap de l'mRNA és difícil d'explicar tenint en compte que la fosforilació de l'eIF4E es dona en condicions que activen la síntesi de proteïnes.

Una altra opció és que la fosforilació de l'eIF4E no sigui el mecanisme per mitjà del qual es regula l'activitat d'aquesta proteïna, la qual, probablement no afecta a la unió de l'eIF4G (Knauf et al. 2001; Morley and Naegele 2002; Scheper et al. 2002). D'acord amb això, la sobreexpressió d'MNK1 en cèl·lules embrionàries de ronyó (HEK 293) (Herbert et al. 2000; Knauf et al. 2001) o en cardiomiòcits (Saghir et al. 2001) incrementava la fosforilació de l'eIF4E sense incrementar la formació del complex eIF4E/eIF4G. En aquests estudis l'increment de fosforilació de l'eIF4E tampoc incrementava la síntesi de

proteïnes. Aquests resultats concorden amb els estudis previs que afirmen que la fosforilació de l'eIF4E no afecta la seva afinitat per l'eIF4G i indica que per si sola és insuficient per promoure l'activació de la maquinària traduccional. A més a més a les HEK 293, la insulina incrementa la síntesi de proteïnes sense mostrar cap efecte sobre la fosforilació de l'eIF4E, la qual es manté molt baixa (Herbert et al. 2000). Això, probablement es deu al fet que la insulina no activa d'una manera significant a ERK en aquest tipus cel·lular. Així doncs, la fosforilació de l'eIF4E sembla que no és essencial per l'increment de la síntesi de proteïnes provocat per l'efecte de la insulina. D'acord amb això McKendrick i els seus col·laboradors (2001) van demostrar que un mutant de l'eIF4E, Ser206Ala, era igual d'eficient que la proteïna wt a l'hora de promoure la síntesi de proteïnes.

Per últim, en estudis fets a *Drosophila* es va veure que la fosforilació de l'eIF4E semblava ser important perquè es pogués donar un desenvolupament normal (Lachance et al. 2002); malgrat tot, ratolins amb delecions en les dues MNKs es desenvolupaven d'una manera normal sense fosforilació detectable d'eIF4E (Ueda et al. 2004). Així doncs, l'efecte que provoca la fosforilació de l'eIF4E és altament controvertit i són nedaris més estudis per veure la implicació que dita fosforilació pot causar sobre la funcionalitat de la proteïna.

### **1.4.3- 4E-BPs**

#### **- Descripció 4E-BPs**

Per mitjà de la tècnica d'hibridació de *Far-western*, Pause et al (Pause et al. 1994) van aïllar dos cDNAs humans que codificaven dues proteïnes d'unió a l'eIF4E. Aquestes proteïnes, anomenades 4E-BP1 i 4E-BP2 (*eIF4E Binding proteins 1 and 2*) comparteixen un 65% d'identitat i inhibeixen la traducció dependent de Cap en assajos *in vivo* (Pause et al. 1994), mentre que la traducció independent de Cap no es veu afectada per les 4E-BPs. Al 1998 es va descobrir una tercera proteïna de la família de les 4E-BPs, la 4E-BP3 i es va veure que comparteix un 57% i un 59% d'identitat amb 4E-BP1 i 4E-BP2, respectivament (Poulin et al. 1998). 4E-BP3 conté un alt grau d'homologia amb les altres 4E-BPs en la regió central de la proteïna (Poulin et al. 1998), la qual conté el lloc d'unió a l'eIF4E. 4E-BP3 també inhibeix la traducció dependent de Cap, però no la traducció independent de Cap (Poulin et al. 1998). La raó per la



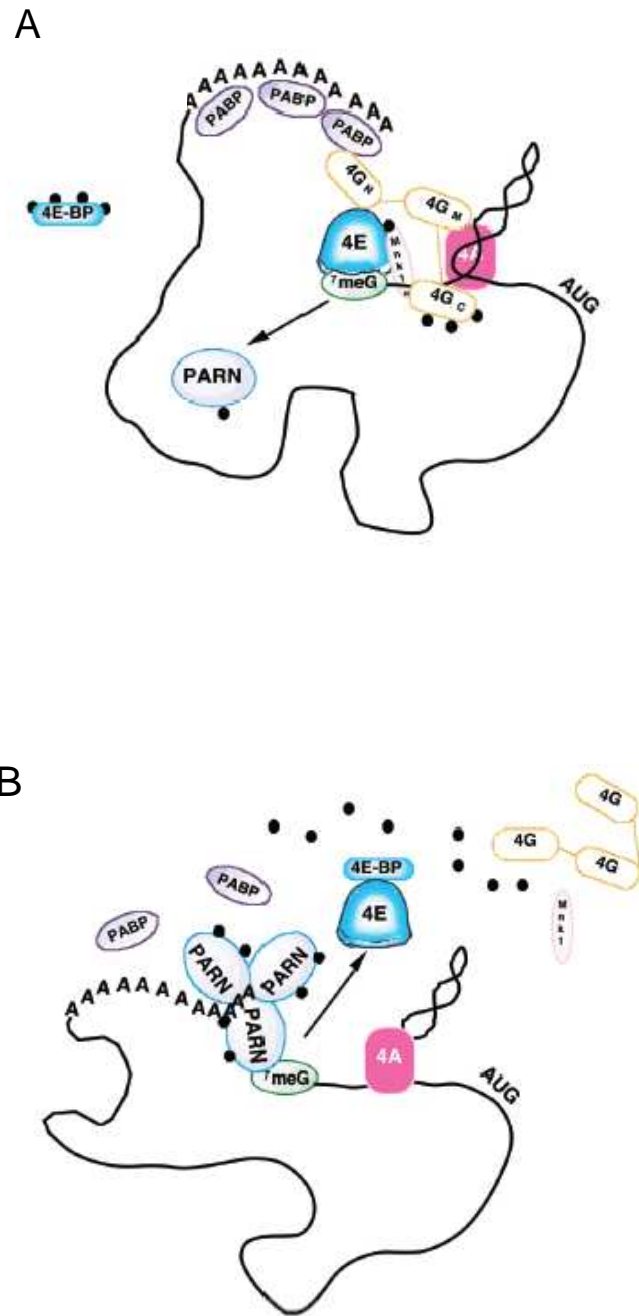
qual existeixen tres 4E-BPs a mamífers, i perquè totes tenen la mateixa funció, és encara desconeguda. Les 4E-BPs no s'expressen de la mateixa manera en tots els teixits; per exemple, l'mRNA de 4E-BP1 s'expressa d'una manera elevada en múscul esquelètic, pàncrees i teixit adipós (Hu et al. 1994; Tsukiyama-Kohara et al. 1996), l'mRNA de 4E-BP2 s'expressa de la mateixa manera que 4E-BP1 (Tsukiyama-Kohara et al. 1996) i 4E-BP3 sembla tenir una distribució tissular més limitada (Poulin et al. 1998; Tsukiyama-Kohara et al. 2001).

### **- Funció**

La unió de les 4E-BPs a l'eIF4E es controla a través de la fosforilació de les 4E-BPs (Pause et al. 1994; Gingras et al. 1998). Les formes hipofosforilades de 4E-BP s'uneixen a l'eIF4E impeding la formació del complex d'iniciació, d'aquesta manera la traducció queda bloquejada (Haghighat et al. 1995) (Figura 7). Per contra, en resposta a nutrients o a cèl·lules estimulades amb sèrum, les 4E-BPs s'hiperfosforilen i es redueix l'afinitat d'unio a l'eIF4E, de manera que aquest s'allibera i es pot iniciar la traducció dependent de Cap.

### **- Regulació de 4E-BP1 per fosforilació**

De les tres 4E-BPs conegudes, 4E-BP1 ha estat la més ben caracteritzada i estudiada. 4E-BP1 presenta sis llocs de fosforilació, entre ells cal destacar-ne quatre: Thr37, Thr46, Thr70 (aquesta fosforilació permet l'alliberament de l'eIF4E) i Ser 65 (la seva fosforilació impedeix la reassociació de 4EBP1 i eIF4E). Les diferents fosforilacions de 4E-BP1 presenten un seguiment jeràrquic. mTOR (quinasa regulada per rapamicina) ha estat descrita com la principal via de fosforilació de 4E-BP1 (Wang et al. 2005). Aquesta quinasa interaccionaria amb els dos dominis descrits de 4E-BP1, l'RAIP, a través d'alguna proteïna encara no coneguda i el TOS, a través de la proteïna raptor (Figura 8).



**Figura 7. Control de la traducció dependent de Cap.** (Seal et al. 2005).

A. Interacció entre els factors d'iniciació de la traducció eIF4Gs, eIF4A i eIF4E durant el procés de traducció dependent de Cap.

B. Inhibició de la formació del complex d'iniciació de la traducció eIF4F a causa de la interacció entre eIF4E i 4E-BP1.

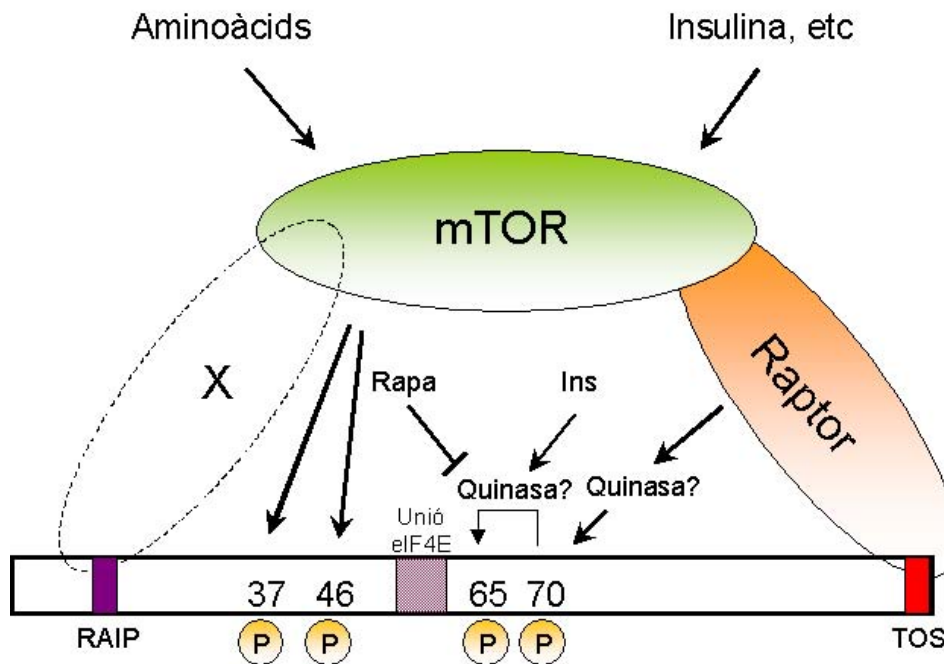


Figura 8. Model de regulació de la fosforilació de 4E-BP1 descrit per Wang et al (2005) (Proud 2004)

Wang et al (2005) van proposar un model per la regulació dels 4 llocs principals de fosforilació de 4E-BP1 (Figura 8). Hi ha dos llocs de fosforilació a l'extrem N-terminal que són regulats per presència d'aminoàcids en el medi però no per rapamicina. Aquesta insensibilitat a rapamicina podria suggerir que no es troben regulats per mTOR *in vivo*. Malgrat això, s'ha descrit que mTOR té un paper essencial en la seva fosforilació. La fosforilació d'aquests dos residus és dependent del domini RAIP. Aquest domini interaccionaria amb algun tipus de proteïna que es trobaria formant un complex amb mTOR. Això es podria interpretar com que la quinasa responsable de la fosforilació de 4E-BP1 *in vivo* no és en sí mTOR però sí algun enzim l'activitat o l'activació del qual requereix l'activitat quinasa d'mTOR. Un cop s'han fosforilat els residus N-terminals es pot donar la fosforilació dels residus C-terminals. Aquí hi intervé el domini TOS al qual s'hi uneix el complex mTOR-Raptor; aquest complex permet la interacció amb algun tipus de quinasa, encara no coneguda, que seria la responsable de fosforilar el residu Thr 70. Un cop fosforilat aquest residu es pot donar la fosforilació de la Ser 65 a través d'alguna altra quinasa tampoc coneguda avui en dia. La fosforilació d'aquest últim residu és estimulada per insulina i inhibida per rapamicina (Wang et al. 2005).

Malgrat s'ha descrit que la fosforilació de 4E-BP1 es dona d'una manera jeràrquica, és a dir, perquè es pugui donar la fosforilació dels residus carboxi-terminal s'han de fosforilar primer els residus de l'extrem N-terminal, s'ha trobat que el residu Thr 70 podria ser no del tot dependent de la fosforilació prèvia dels residus Thr 37/46 (Mothe-Satney et al. 2000; Tee and Proud 2002).

Els altres llocs de fosforilació presents a 4E-BP1 són la Ser 101 i la Ser 112. La Ser 101 es troba fosforilada constitutivament *in vivo*; l'estat d'aquest residu afecta a la fosforilació de Ser 65 directament sense afectar la fosforilació dels altres residus. La Ser 112 també es troba fosforilada constitutivament *in vivo* i és necessària, junt amb la Thr 70, per l'alliberament de l'eIF4E.

Malgrat que mTOR és la via principal de fosforilació de 4E-BP1, altres quinases podrien estar-hi implicades, com CDK1 (Heesom et al. 2001; Greenberg and Zimmer 2005), ATM (Yang and Kastan 2000), ERK (Herbert et al. 2002) i probablement altres quinases encara desconegudes.

### **- Regulació per fosforilació de les altres 4E-BPs: 4E-BP2 i 4E-BP3**

Pel que fa a la regulació per fosforilació de 4E-BP2 i 4E-BP3, són pocs els estudis realitzats fins el moment. Totes dues proteïnes contenen el domini C-terminal TOS, que és idèntic al de 4E-BP1. Per contra, el domini RAIP només s'ha trobat a 4E-BP2. Dels pocs estudis que hi ha sobre la regulació de 4E-BP2, tots suggereixen que aquesta proteïna es regula d'una manera similar a 4E-BP1 (Lin and Lawrence 1996; Wang et al. 2005). Contràriament, 4E-BP3 no conté el domini RAIP i només conté el domini IP (és difícil alinear aquestes seqüències ja que l'extrem N-terminal de 4E-BP3 és molt més curt i diferent al de 4E-BP1 (Tee and Proud 2002)). Un estudi fet per Tee i Proud (2002) va demostrar que la fosforilació de 4E-BP3 en resposta a insulina no era suficient per separar 4E-BP3 de l'eIF4E, això indica que la seva regulació és diferent a la de 4E-BP1 i que la manca del domini RAIP podria ser la causa de que 4E-BP3 es reguli d'una manera diferent a les altres 4E-BPs. Tee i Proud van generar proteïnes quimera de 4E-BP3 i l'extrem N-terminal de 4E-BP1 i van veure que incrementava la fosforilació de 4E-BP3. Aquest efecte era totalment dependent de la presència del domini RAIP de 4E-BP1 a la proteïna quimera

(Tee and Proud 2002). Aquest experiment remarca la importància del domini RAIP per la fosforilació de les 4E-BPs.

### **- 4E-BP1 i transformació cel·lular**

En els darrers anys la forma fosforilada de la proteïna 4E-BP1 ha estat relacionada amb la progressió i el desenvolupament tumoral (Zhou et al. 2004). Diversos estudis experimentals han demostrat que la fosforilació de 4E-BP1 és essencial per a la transformació cel·lular. La sobreexpressió a cèl·lules de carcinoma de mama d'una forma mutant de 4E-BP1 en els diferents llocs de fosforilació suprimia la seva tumorigènesi (Avdulov et al. 2004).

Diversos estudis han relacionat la forma no fosforilada de 4E-BP1 (i potser les altres 4E-BPs) amb la mort cel·lular programada o apoptosi (Proud 2005). Per exemple, l'expressió de 4E-BP1 promou l'apoptosi en fibroblasts transformats amb RAS (Polunovsky et al. 2000). El tractament de les cèl·lules amb pèptids que inhibeixen eIF4E, d'una manera similar a 4E-BP1, condueixen a una ràpida mort cel·lular (Herbert et al. 2000). Contràriament, com s'ha detallat anteriorment, l'expressió d'eIF4E provoca efectes antiapoptòtics.

El dany cel·lular que pot causar apoptosi té dos efectes sobre 4E-BP1. Primer, abans de l'inici de l'apoptosi, la senyalització d'mTOR és inhibida, provocant un increment d'unió de 4E-BP1 amb l'eIF4E i provocant, per tant, la inhibició de la formació del complex eIF4F (Tee and Proud 2000). A més a més, durant l'apoptosi, a través de l'activació de caspases, 4E-BP1 és tallat a prop de l'extrem N-Terminal i es generen 2 fragments, un dels quals s'uneix a eIF4E (Bushell et al. 2000). Aquest fragment conserva el lloc d'unió a l'eIF4E i tots els llocs de fosforilació però no el domini RAIP i, per tant, no es troba subjecte a una regulació normal, no es dissocia de l'eIF4E sota efectes de la insulina i actua com a un potent inhibidor de la formació de l'eIF4F i la traducció dependent de Cap en cèl·lules apoptòtiques (Tee and Proud 2002). La formació del complex eIF4F no és requerida per la traducció a través d'IRES i, d'acord amb això, el fragment de 4E-BP1 generat durant l'apoptosi no afectaria a la traducció per IRES. Això podria implicar que la traducció per IRES podria ser mantinguda, o fins i tot activada, en cèl·lules apoptòtiques que tenen el fragment de 4E-BP1, el qual permet una expressió incrementada de mediadors

apoptòtics com MYC, APAF-1 i DAP5/p97, els mRNAs dels quals contenen regions IRES (Clemens et al. 2000; Holcik et al. 2000).

### **1.5- REGULACIÓ DE LA TRADUCCIÓ DEPENDENT DE CAP**

Nombroses malalties presenten alteracions en el procés de traducció de proteïnes; això ha fet que en els darrers anys incrementi la recerca sobre els mecanismes que regulen l'expressió gènica dels organismes a nivell traduccional. S'han aconseguit grans avenços pel que fa a la comprensió del control de la traducció dels mRNAs, ja sigui a través de la regulació de les proteïnes que s'uneixen a mRNAs específics i regulen la seva traducció, o a través del control de les activitats dels components de la maquinària traduccional. El control de l'expressió gènica a nivell traduccional permet una regulació coordinada de la producció de proteïnes. Aquest control de la síntesi específica de proteïnes té papers crítics en el desenvolupament, diferenciació, progressió del cicle cel·lular i apoptosi a eucariotes. A diferents organismes s'han realitzat nombrosos estudis relacionats amb el control de la síntesi de proteïnes, confirmant-se la importància d'aquest nivell de regulació d'expressió gènica. Donat que el procés de traducció és elevadament costós des del punt de vista energètic, les cèl·lules mantenen molt regulat el pas d'iniciació de la síntesi de proteïnes. És aquí on s'han realitzat més estudis. En aquesta etapa es regula no només el procés cinètic sinó que de forma selectiva es pot regular la traducció d'mRNAs específics d'acord amb les necessitats de la cèl·lula, especialment a etapes determinades del desenvolupament, o com a resposta a senyals ambientals (Proud 2007). Aquests mecanismes de regulació primer impliquen ràpids canvis (en minuts) en l'activitat o associació dels components de la maquinària traduccional, els quals són primàriament mediat per canvis en estats de fosforilació de factors de traducció i proteïnes específiques d'unió a l'RNA (Figura 9). Ja a temps més llargs (d'hores a dies) el control de la síntesi de proteïnes implica canvis en els nivells cel·lulars de factors de transcripció i ribosomes. Les vies que controlen la capacitat traduccional es coordinen amb les que controlen l'activitat dels factors de traducció i d'aquesta manera es garanteix un control coordinat de la síntesi de proteïnes. Recentment s'han

realitzat nombrosos avenços pel què fa al control de la maquinària traduccional i les vies de transducció de senyal implicades.

### **1.5.1- Vies de transducció de senyal implicades en el control de la traducció**

#### **- Via d'mTOR**

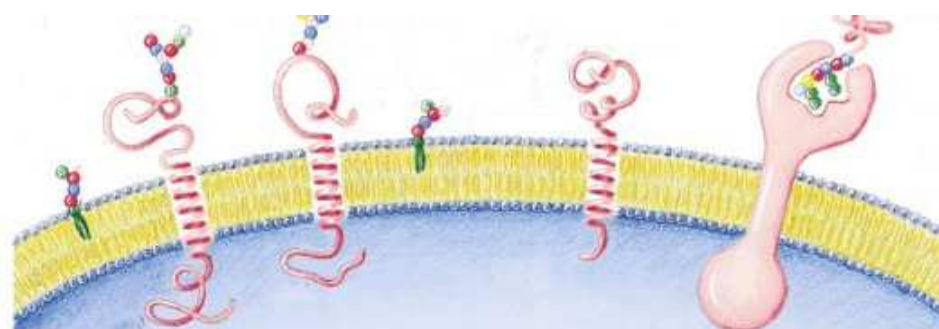
La via de senyalització d'mTOR ha estat relacionada amb el control de la traducció de l'mRNA. mTOR és una proteïna amb múltiples dominis que forma complexos amb altres proteïnes (Figura 10). Moltes d'aquestes unions semblen regular l'activitat d'mTOR, com per exemple la proteïna Rheb, mentre que d'altres, com raptor i rictor, es troben involucrades mediant la senyalització *downstream* d'mTOR. Les interaccions de raptor i rictor amb mTOR semblen ser mútuament exclusives. Els complexos en els quals participen són anomenats mTORC1 i mTORC2, respectivament (Sarbasov et al. 2005).

mTOR és regulat per múltiples vies de senyalització relacionades amb diverses oncoproteïnes o supressors de tumors, incloent la PI3K, PTEN, LKB1, RAS i RAF. Aquests efectes impliquen la senyalització a través de PKB, AMPK, o la clàssica MAP quinasa ERK (Guertin and Sabatini 2005). La senyalització d'mTOR es troba activada en cèl·lules amb mutacions de pèrdua de funció en certes proteïnes, com per exemple, TSC1/2 o PTEN. La funció d'mTORC1 requereix aminoàcids i s'ha vist que mTOR funciona de lligam entre la disponibilitat d'aminoàcids i la regulació de la traducció.

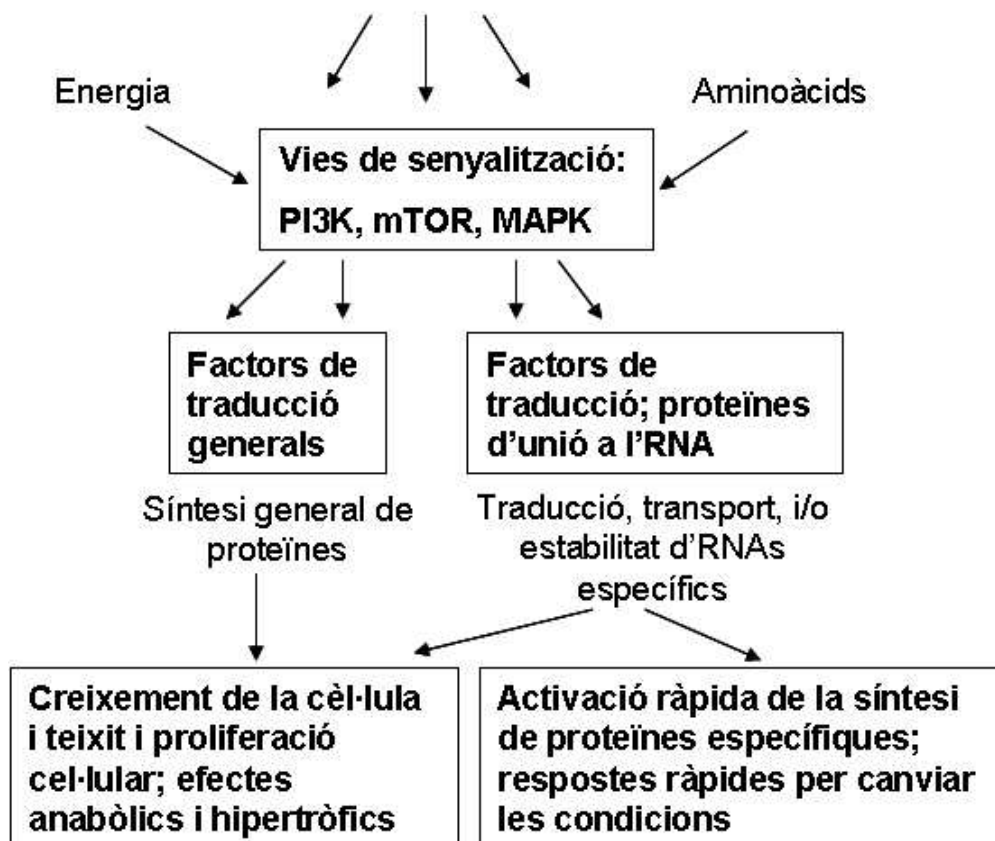
Una altra diana d'mTOR és la fosfatasa PP2A. De fet s'ha demostrat que mTOR fosforila PP2A *in vitro*, inhibint la seva activitat, mentre que la rapamicina incrementa l'activitat fosfatasa *in vivo* (Peterson et al. 1999).

#### **-mTORC1**

El complex mTORC1 promou la traducció i, conseqüentment, el creixement cel·lular i la proliferació en resposta a factors de creixement, els quals activen receptors tirosina quinasa i proteïnes G acoblades a receptors que activen diverses vies de transducció de senyal (Figura 10). Aquest complex mTORC1 es troba compost per diverses proteïnes, entre elles mTOR, raptor



**Receptors superfície cel·lular**



**Figura 9. Esquema del control de la síntesi de proteïnes a través de diferents vies de transducció de senyals. (Proud 2007)**

Les vies de senyalització activades per receptors a la membrana cel·lular regulen la traducció de factors necessaris per la traducció en general i que modulen la síntesi total de proteïnes. Podrien també regular certs factors de traducció i mRNAs específics i llavors controlar la traducció d'una manera mRNA específica. La disposició d'energia metabòlica i d'aminoàcids també són punts importants en els processos de senyalització que controlen la traducció de l'mRNA.

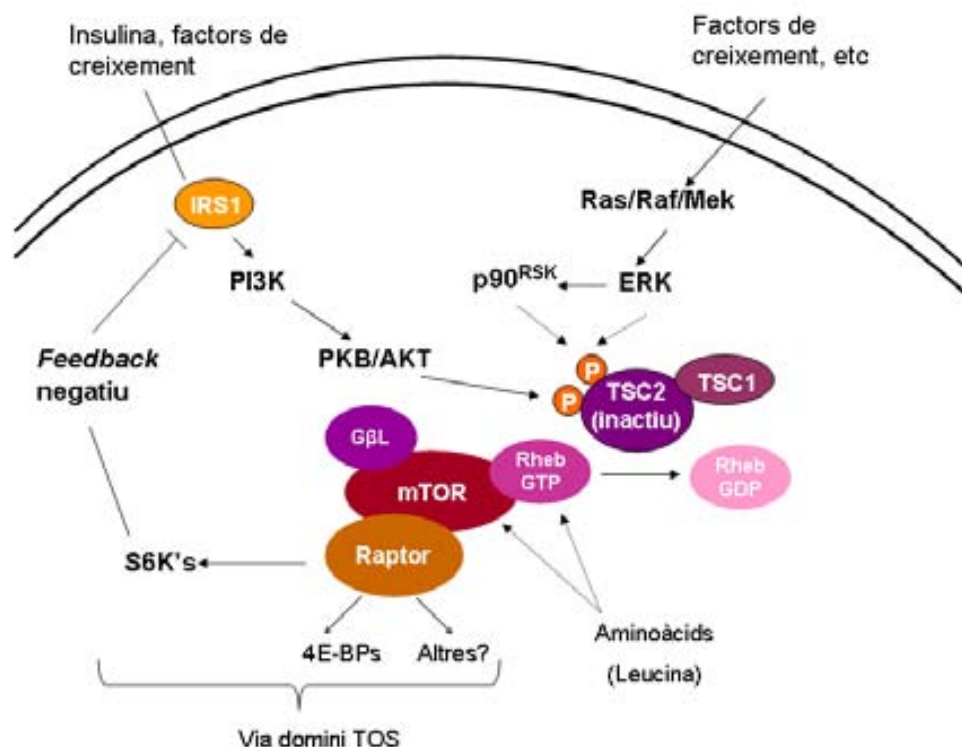
(una proteïna adaptadora que interacciona amb proteïnes que són fosforilades per mTOR), Rheb (una proteïna G petita que sembla activar mTOR quan es troba unida a GTP) i mLST8/GBL (*mammalian lethal with Sec13 protein 8*). La senyalització a través de receptors de la superfície cel·lular en resposta a



insulina, factors de creixement i mitògens activen mTORC1 provocant la inactivació del complex TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*), el qual es troba compost per TSC1 i TSC2. Quan es troba associat a TSC1, TSC2 actua com una proteïna activadora GTPasa (GAP), la qual converteix Rheb-GTP a la seva forma inactiva Rheb-GDP.

La via PI3K-AKT i la via RAS-ERK estimulen la senyalització d'mTORC1 a través de diverses quinases upstream d'mTOR (com per exemple, AKT, ERK i RSK) que fosforilen TSC2. AKT, quinasa downstream de la PI3K, fosforila directament TSC2. Aquesta fosforilació es creu que inactiva la funció GAP (Manning and Cantley 2003; Cai et al. 2006). Quan les concentracions intracel·lulars d'ATP són baixes, l'activitat d'mTORC1 és suprimida a través d'una via que implica LKB1 i AMPK.

La proteïna raptor sembla que promou la senyalització *downstream* d'mTORC1 a través de la unió a dominis curts (anomenats dominis TOS) trobats en proteïnes on la seva fosforilació és regulada positivament per mTORC1 (Hara et al. 2002; Beugnet et al. 2003; Choi et al. 2003). Les primeres proteïnes descrites amb domini TOS van ser les proteïnes quinases ribosomals (S6Ks) i les proteïnes d'unió al factor d'iniciació de la traducció eIF4E, les 4E-BPs (Schalm and Blenis 2002). Cada una d'aquestes proteïnes es troba subjecte a una fosforilació a diversos llocs, sensible a rapamicina. La interacció d'aquestes proteïnes amb raptor, via el seu domini TOS, promou la seva fosforilació per mTOR *in vitro*. Aquests dos tipus de proteïnes es troben implicades en el control de la maquinària traduccional (Wang and Proud 2006). El complex mTORC1 també controla altres funcions cel·lulars, encara que les dianes implicades en aquests efectes encara no han sigut del tot identificades. Darrerament sí que s'han identificat dues proteïnes amb domini TOS: el factor 1 $\alpha$  induït per hipòxia, l'HIF1 $\alpha$  (Land and Tee 2007), i el substrat d'AKT ric en prolins de 40 kDa, PRAS40 (Wang et al. 2007). Malgrat que els dominis TOS trobats en aquestes proteïnes són dominis semblants, hi ha nombroses diferències entre ells i encara no se sap ben bé quins són els requeriments reals perquè un domini TOS sigui funcional. Així, encara no està massa clar si el domini TOS és suficient per la seva interacció amb raptor, o si es requereixen altres característiques.



**Figura 10. Senyalització *upstream* i *downstream* del complex mTORC1 (Wang and Proud 2006).**

La insulina, a través de la PI3K i PKB/AKT, induïx la fosforilació del TSC2, component del complex TSC1/2, que actua com a GAP de Rheb. Es creu que la inactivació del complex TSC1/TSC2 permet l'acumulació de Rheb en la seva forma activa unida a GTP i activar mTORC1. A través de raptor, mTORC1 s'uneix a dominis TOS de les seves proteïnes diana, com 4E-BP1 i S6Ks, i les fosforila. Alguns factors de creixement actuen a través de la via d'ERK per inactivar el complex TSC1/TSC2 a través de diferents fosforilacions. Encara no se sap ben bé si ERK és la responsable directe d'aquesta fosforilació o bé si aquesta es troba mediada pel seu efector downstream p90<sup>RSK</sup>. Les S6Ks poden fosforilar IRS-1 i impedir la senyalització de la PI3K, per exemple a través del receptor d'insulina, provocant un *feedback* negatiu.

### - mTORC2

mTORC2 és un complex que està format per mTOR, rictor (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*), Sin1 (*stress activated protein kinase-interacting protein-1*), mLST8 i protor (*protein associated with rictor*). La seva activitat és controlada per la PI3K i, a diferència d'mTORC1, és extremadament insensible a nutrients i rapamicina (Figura 11). Per tant, no totes les funcions d'mTOR són inhibides per rapamicina. A més a més, hi ha un altre efecte

d'mTOR que no és regulat per rapamicina i que sembla no estar mediat per mTORC2, es tracta de la fosforilació de certs residus de 4E-BP1/2 (Wang et al. 2005). Aquest fet demostra la complexitat de la senyalització *downstream* d'mTOR.

mTORC2 juga un paper crític en la regulació de la proliferació i el control del creixement cel·lular. Aquest complex promou l'activació de la SGK (*serum glucocorticoid-induced protein kinase*), així com la fosforilació d'AKT i les isoformes de la proteïna quinasa C (PKC) (Alessi et al. 2009). També es troba implicat en la regulació de l'organització del citoesquelet. mTORC2 es podria considerar com upstream d'mTORC1, ja que fosforila AKT a la Ser473. Aquesta fosforilació junt amb la fosforilació que PDK1 fa sobre AKT és requerida per la total activació de la proteïna. La reducció d'mTORC2 du a una forta inhibició de la senyalització d'AKT.

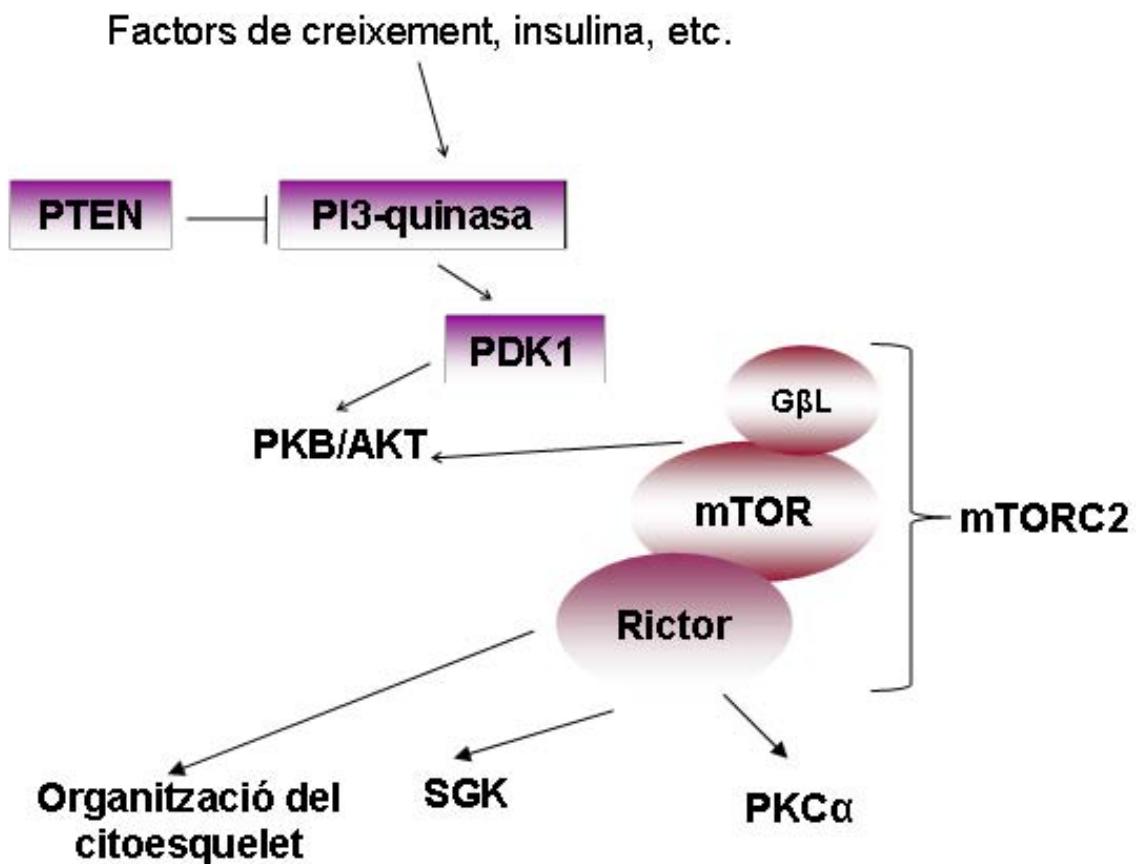
De manera anàloga que mTORC1 i raptor, rictor podria unir-se a regions específiques de les seves proteïnes diana, però encara no s'ha identificat cap regió proteica associada a la unió de rictor.

### **- Via MAPK**

Les cèl·lules dels mamífers tenen la via de les MAPK dividida en diversos mòduls de senyalització; aquests mòduls són la via clàssica de les MAPK (ERK), p38 MAPK  $\alpha/\beta$  i JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). Hi ha una clara relació entre els dos primers mòduls i el control de la maquinària traduccional. Cada un es troba implicat en la regulació de diverses quinases *downstream* que fosforilen components de la maquinària traduccional i/o altres proteïnes que regulen la traducció de l'mRNA (Figura 12). Ambdues vies, la d'ERK1/2 i la de p38 MAPK  $\alpha/\beta$ , es troben implicades en la fosforilació d'MNK1 i 2. Aquestes quinases activades s'uneixen a través de la regió N-terminal a l'extrem C-terminal d'eIF4G i també medien la fosforilació de l'eIF4E *in vivo*.

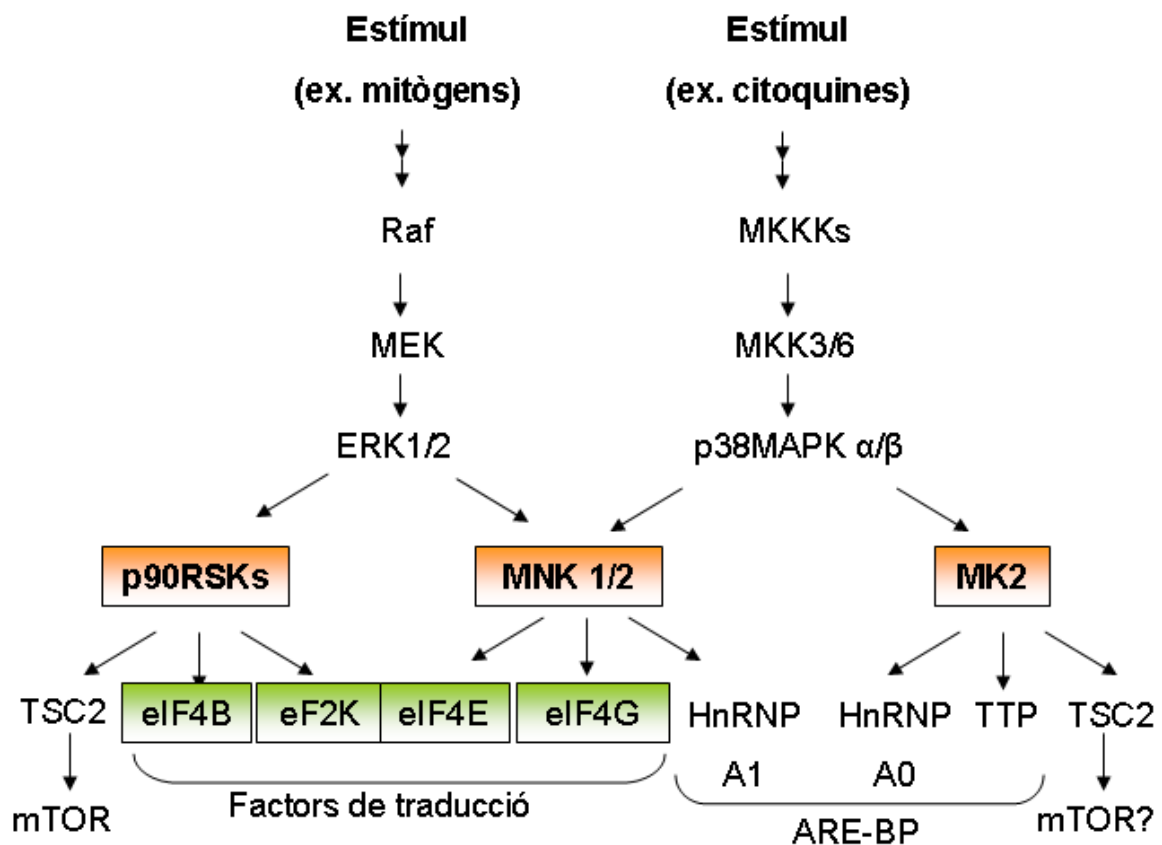
El mòdul ERK1/2 s'activa en resposta a mitògens i activa membres del grup de les quinases p90RSKs (RSK1-RSK4), les quals fosforilen diversos factors de traducció o bé els seus reguladors. Per altra banda, p38 MAPK  $\alpha/\beta$  s'activa en resposta a diferents estressos, com irradiació per llum ultraviolada (UV), hipòxia, isquèmia i diverses citoquines. p38 MAPK  $\alpha/\beta$  activa MK-2, el qual regula l'estabilitat d'mRNAs, com TNF $\alpha$  (*Tumor necrosis factor*),

probablement via la fosforilació de les proteïnes d'unió als elements desestabilitzants ARE (elements rics en adenina i uridina) dels mRNAs (Dean et al. 2004; Ronkina et al. 2007). Estudis recents suggereixen que les MNKs podrien ser importants en el control de les proteïnes d'unió a les regions ARE (Buxade et al. 2005; Andersson and Sundler 2006) (Figura 13).



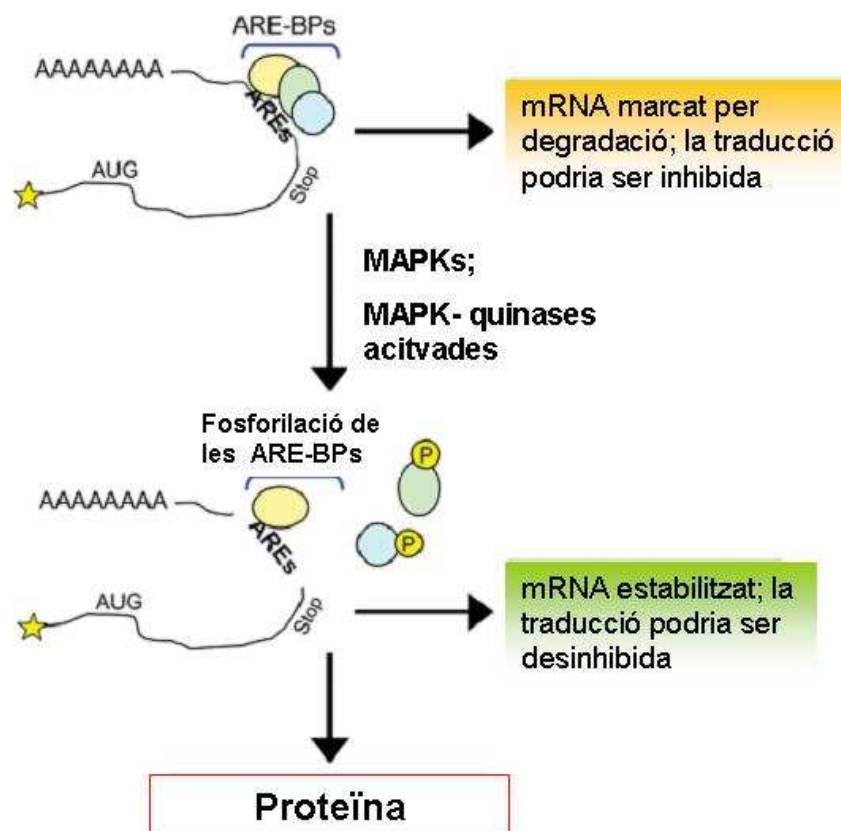
**Figura 11. Senyalització *upstream* i *downstream* del complex mTORC2. (Averous and Proud 2006).** mTORC2 actua com a efector *upstream* d'mTORC1 per mitjà de la fosforilació i activació de PKB, un regulador positiu de la senyalització d'mTOR.

El control de l'mRNA a nivells postranscripcionals, com per exemple per mitjà de l'estabilitat de l'mRNA en la traducció, permet respostes ràpides. Això és probablement important sota un ampli rang de condicions, com per exemple en el cas de TNF $\alpha$ , per combatre infeccions.



**Figura 12. Activació de les MNKs a través de la via d'ERK i p38MAPK (Proud 2007).**

Activació de la maquinària traduccional a través de la via d'ERK i p38MAPK  $\alpha/\beta$ . Les MNKs són activades per les dues vies. MKKKs indica que moltes MAPK *upstream* podrien activar MKK3 (MAPK quinasa 3) i/o MKK6.



**Figura 13. Control dels mRNA a través de regions ARE (Proud 2007).**

Esquema on s'observa la regió codificant de l'mRNA (entre l'AUG i el codó stop), el Cap 5' (marcat amb una estrella) i la cua de poly(A). A l'extrem 3' RNT s'observa la regió AREs. Les ARE-BPs s'uneixen a les regions AREs induint la desestabilització i, probablement, impedit la traducció de l'mRNA. Algunes ARE-BP1 són substrats de quinases *downstream* d'ERK i p38 MAPK. La fosforilació de les ARE-BPs podrien alterar la seva afinitat per l'mRNA o , per altra banda, remodelar els complexos mRNA-proteïna, facilitant l'estabilització dels mRNAs i la seva traducció.

## 1.6.- CÀNCER

El càncer a Espanya ja és la primera causa de mortalitat entre els homes, i la segona entre les dones rere les malalties cardiovasculars. El 31% dels homes i el 20% de les dones que moren a Espanya ho fan per un càncer, o el que és el mateix: un de cada tres homes i una de cada 5 dones moren per un càncer. De totes maneres, en els darrers anys hi ha hagut una millora dels mètodes de diagnòstic i tractament que han permès un augment de la supervivència d'aproximadament un 10% entre la dècada dels 80 i dels 90. S'espera que aquesta tendència continuï per a la majoria dels tumors.

El càncer es caracteritza per la replicació i el creixement descontrolat de les cèl·lules somàtiques de l'organisme. Un càncer és el resultat d'un augment

de la proliferació cel·lular (tumor) i d'una adquisició de capacitat invasiva que permeti a les cèl·lules escapar del seu lloc natural i colonitzar i proliferar a altres teixits o òrgans (metàstasi). Si només succeeix la primera part es considera un tumor benigne. En el segon cas es denomina tumor maligne. Les metàstasis són les responsables de la gran majoria de morts per càncer. El procés de formació d'un tumor a partir d'una cèl·lula implica l'acumulació successiva d'alteracions en els gens fins que el tumor es fa aparent. Aquestes alteracions proporcionen a les cèl·lules tumorals avantatges pel que fa al creixement enfront de les cèl·lules normals, de manera que les cèl·lules tumorals són seleccionades i al final seran majoritàries del tumor. Així, el procés de carcinogènesi tumoral es troba compost per alteració genètica (mutació) més competició i selecció cel·lular i té lloc durant anys.

Hanahan i Weinberg (2000) van proposar sis capacitats compartides en comú per la majoria i potser tots els tipus tumorals humans: autosuficiència en senyals de creixement, insensibilitat a senyals antiproliferatives, evasió de l'apoptosi, potencial replicatiu il·limitat, angiogènesi sostinguda, i capacitat d'invasió i de metàstasi. Cada un d'aquests canvis a la fisiologia cel·lular pot comprendre desenes de vies, rutes i cascades cadascuna amb els seus corresponents gens i proteïnes implicats, moltes vegades amb una marcada interrelació entre ells. Per tant, per adquirir una de les capacitats, els tumors poden fer-ho a través d'una, o més d'una, de les possibles vies alternatives.

### **1.6.1.- Alteracions en el control de la traducció de proteïnes i càncer**

D'acord amb tot el que s'ha explicat anteriorment podem dir que l'inici de la traducció és un procés altament regulat, on múltiples vies de senyalització convergeixen controlant l'activitat dels diferents factors descrits anteriorment i que intervenen en la traducció de proteïnes. Una disfunció o desregulació de la maquinària traduccional du a alteracions diverses, com la hipertròfia de teixits, la neurodegeneració, la inflamació i el càncer. És cert que els components de la traducció de proteïnes no són ben bé oncogens, però sí que són importants en la síntesi de proteïnes, i, per tant, tenen efecte sobre la proliferació cel·lular, el creixement, l'apoptosi i la senescència prematura. D'acord amb això, molts dels

gens relacionats amb càncer són capaços d'activar d'una manera aberrant la traducció dependent de Cap.

### **1.6.2- mTOR i càncer**

Les vies de senyalització que regulen l'activitat d'mTOR es troben freqüentment activades en càncers humans. Per exemple, mutacions amb pèrdua de funció del supressor tumoral *PTEN* en càncers humans es troben amb quasi tanta freqüència com mutacions en *p53* (Cantley and Neel 1999; Simpson and Parsons 2001). A més a més, els gens que codifiquen per la subunitat catalítica de PI3K i AKT es troben amplificats en aproximadament un 30% de tumors epitelials (Downward 2003). Un fort lligam entre la traducció d'mRNAs i la gènesi del càncer va ser demostrat per Rajasekhar et al (2003), el qual va demostrar que l'expressió constitutiva de RAS i AKT en cèl·lules primàries glials causaven glioblastomes. Aquestes alteracions en les vies de senyalització que regulen l'activitat d'mTOR, òbviament, afecten altres efectors *downstream* d'aquestes vies. Les observacions que pacients amb mutacions a TSC1 i TSC2 desenvolupen hamartomes (Jones et al. 1999) i que l'expressió de Rheb i la seva activitat és elevada en línies cel·lulars de càncer (Im et al. 2002), evidencien que l'activitat d'mTOR contribueix al desenvolupament del càncer. D'acord amb aquestes dades, un derivat de la rapamicina, CCI-779, inhibeix la hiperfosforilació de cèl·lules deficientes en PTEN (Neshat et al. 2001). També, l'administració de CCI-779 a ratolins heterozigòtics per PTEN, els quals desenvolupen neoplàsia múltiple, atenua el desenvolupament tumoral (Podsypanina et al. 2001). A partir d'aquí es generen dues qüestions: com mTOR contribueix a la gènesi del càncer i com succeeix això a través de l'*upregulació* de la traducció d'mRNAs associats al creixement. Un dels mecanismes pel qual mTOR pot contribuir al desenvolupament del càncer és a través del seu efecte en la progressió del cicle cel·lular i d'acord amb això, amb la seva possible activitat anti-apoptòtica. Hi ha grans evidències que mTOR és necessari perquè es doni la progressió del cicle cel·lular i que la inhibició de l'activitat d'mTOR mitjançant rapamicina para les cèl·lules en fase G1 (Abraham and Wiederrecht 1996; Jacinto and Hall 2003). L'expressió de mutants d'mTOR resistents a rapamicina atenua l'efecte de la rapamicina en l'aturada del cicle



cel·lular i és evident que l'efecte de la rapamicina en la progressió del cicle cel·lular es dona via la inhibició dels efectors *downstream* d'mTOR, SK6 i eIF4E (Fingar et al. 2004). Aquest efecte d'mTOR en la progressió del cicle cel·lular és mediat, en part, per un increment de la traducció d'mRNAs que codifiquen per reguladors positius de la progressió del cicle cel·lular, com ciclina D1 i MYC, i per la reducció de la traducció de reguladors negatius, com p27 (Gera et al. 2004). A més a més, sota certes circumstàncies, l'efecte de la inhibició d'mTOR per rapamicina, accelera l'apoptosi (Shi et al. 1995; Huang et al. 2001).

### **1.6.3- Factors de la iniciació de la traducció i càncer**

D'acord amb el potencial oncogènic de l'eIF4E i de l'eIF4G és lògic esperar que aquests i altres factors implicats en la iniciació de la traducció (com eIF4A i eIF3) es trobin sobreexpressats en tumors humans (De Benedetti and Harris 1999; Ruggero and Pandolfi 2003). Per altra banda, 4E-BP1, al ser un supressor de la formació tumoral, també podria estar implicat en la biologia del càncer.

### **- eIF4E, eIF4G i càncer**

S'han trobat elevats nivells d'eIF4E i eIF4G1 en un ampli espectre de càncers humans, i sovint s'associen amb agressivitat i tumors pobrement diferenciats (Clemens and Bommer 1999; De Benedetti and Harris 1999; Willis 1999; Zimmer et al. 2000; Clemens 2004; Mamane et al. 2004; Rosenwald 2004). Els increments més pronunciats d'eIF4G1 es troben a carcinomes escamosos de pulmó (Bauer et al. 2001); aquest factor probablement es troba sobreexpressat com a resultat d'una amplificació del gen. Recentment, el grup del Dr. Schneider, ha descrit que l'eIF4G pot ser rellevant promovent la formació d'embòlia en carcinomes de mama inflamatoris per mitjà de l'activació d'IRES que contenen mRNAs p120 (Silvera et al. 2009; Silvera and Schneider 2009). L'eIF4E es troba *upregulat* en carcinoma bronquioalveolar de pulmó, en càncer de mama i en carcinomes escamosos de cap i coll, així com en altres neoplàsies (De Benedetti and Harris 1999; Rosenwald et al. 1999; Zimmer et al. 2000; Rosenwald et al. 2001; McClusky et al. 2005). Una expressió

incrementada d'eIF4E és un fet primerenc en la tumorigènesi del càncer de mama (Nathan et al. 1997); també s'ha vist que el nivell d'expressió d'eIF4E serveix com un factor independent de pronòstic en càncer de mama (Li et al. 1997).

També s'ha demostrat l'activitat oncogènica de l'eIF4E utilitzant ratolins transgènics que sobreexpressen aquesta proteïna (Ruggero et al. 2004). Els ratolins desenvolupaven tumors tardans, als 14-16 mesos, però quan es co-expressava eIF4E i MYC, els tumors apareixien molt més aviat, als 2-3 mesos. Aquestes observacions suggereixen que els components del complex d'iniciació eIF4F són els efectors més crítics *downstream* d'mTOR en la gènesi del càncer. Els nivells i l'activitat d'aquests components són altament regulats i l'eIF4F és un factor limitant de la maquinària traduccional en el reclutament del ribosoma. De manera que quan aquests components no es troben ben regulats, la traducció de diferents mRNAs pot ser constitutivament promoguda i conduir a la producció de proteïnes que podrien incrementar el creixement cel·lular i la proliferació. Així doncs, els efectes tumorigènics *upstream* d'mTOR són mediatos pels seus efectors *downstream* (Wendel et al. 2004).

### **- 4E-BP1 i càncer**

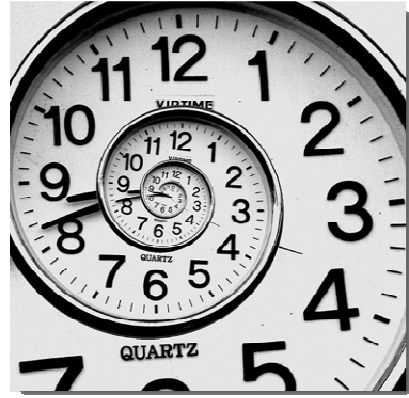
Estudis preliminars del nostre grup han associat p-4E-BP1 amb prognosi en càncer de mama, càncer d'ovari, i càncer de pròstata (Armengol et al. 2007). En aquests estudis es va caracteritzar l'expressió d'alguns dels factors més rellevants implicats en les vies de senyalització implicades en creixement cel·lular (com EGFR, HER2/neu [*human epidermal growth factor receptor*], ERK1/2, AKT, 4E-BP1, p70S6K1 i S6) en una àmplia sèrie de tumors sòlids de mama (Rojo et al. 2007), ovari (Castellvi et al. 2006; Castellvi et al. 2009), pròstata i còlon per immunohistquímica i *Western Blot*. Els estudis fets en mama i ovari van mostrar que p-4E-BP1 es trobava expressat en un alt percentatge de tumors i s'associava significativament amb pitjor prognosi independentment d'altres factors. P-4E-BP1 es trobava principalment expressat en tumors pobrement diferenciats i correlacionava amb la mida del tumor i la presència de metàstasi en nòduls limfàtics. A més a més, la ràtio de p-4E-BP1:4E-BP1 s'associava amb el grau histològic del tumor i la presència de

metàstasi en els nòduls limfàtics. Això indica que tumors amb pitjor prognosi tenen molt 4E-BP1 fosforilat. En els estudis fets en còlon l'elevada expressió de p-4E-BP1 no correlacionava amb tumors pobrement diferenciats o supervivència, però sí que correlacionava amb la presència de metàstasi en els nòduls limfàtics (Armengol et al. 2007).

Altres grups han trobat resultats similars, un estudi en càncer de mama ha associat la fosforilació d'AKT, mTOR i 4E-BP1 amb desenvolupament i progressió tumoral (Zhou et al. 2004). A més a més, estudis experimentals han demostrat que p-4E-BP1 és essencial per la transformació cel·lular. La sobreexpressió a cèl·lules de carcinoma de mama d'una forma mutant de 4E-BP1 en els seus llocs de fosforilació suprimia la seva tumorigènesi (Avdulov et al. 2004). Kremer et al (2006) van estudiar els patrons d'expressió de diversos biomarcadors de la via d'mTOR en càncer de pròstata. Els autors van observar que 4E-BP1 era un dels millors biomarcadors, ja que la sobreexpressió d'aquest factor es trobava altament associada al càncer de pròstata. De manera similar, en adenocarcinoma de pulmó hi ha una relació directa entre la invasivitat del tumor i el grau d'expressió d'eIF4E, i entre la ràtio eIF4E/4E-BP1 en estadi 1 i mortalitat (Seki et al. 2002).

Per altra banda, en una àmplia sèrie de tumors agressius de càncer de mama, el repressor de la traducció 4E-BP1 es va trobar funcionalment inactivat per una hiperfosforilació constitutiva a través de les vies de transducció de senyals dependents de RAS, suggerint que les cèl·lules tumorals *upregulen* el complex eIF4F per mitjà de moltes vies (Avdulov et al. 2004). Tot això fa pensar que la fosforilació de 4E-BP1 pot ser una conseqüència de diversos fets oncogènics que succeeixen en diferents vies de senyalització, incloent ampliació o mutació de receptors de factors de creixement, pèrdua de funció o mutacions a *PTEN*, *ATM*, *p53*, *PI3K* o *RAS*, o bé altres mecanismes col·laterals de l'activació cel·lular oncogènica, així com l'activació de fosfolipasa D, la qual pot activar la cascada d'mTOR, o bé altres quinases o fosfatases encara no conegudes. El paper de les altres isoformes de 4E-BP, 4E-BP2 i 4E-BP3, en tumors humans no és del tot clar i no se sap com aquestes isoformes poden ser *upregulades* en tumors negatius per 4E-BP1.





---

# HIPÒTESI DE TREBALL

---



La majoria de neoplàsies humanes tenen una enorme heterogeneïtat clínic-patològica i en quasi tots els tumors malignes hi ha activacions oncogèniques que afecten les vies d'immortalització, senyalització cel·lular, cicle cel·lular, apoptosi i invasivitat tumoral. L'estudi en una extensa sèrie de tumors humans de les diferents rutes bioquímiques de senyalització podria permetre'ns identificar factors clau de cada ruta molecular, independentment de l'alteració oncogènica per sobre de dita ruta. D'aquesta forma, es podria donar una firma funcional molecular de cada tumor i específica de cada pacient. A les vies de senyalització de la membrana al nucli hi ha d'haver factors on es canalitzi el senyal oncogènic i proliferatiu en els seus efectors finals. En el nostre laboratori s'ha estudiat l'expressió de la majoria de molècules implicades en aquestes vies en una àmplia sèrie de tumors sòlids de mama, pròstata i d'ovari (Castellvi et al. 2006; Rojo et al. 2007; Castellvi et al. 2009). A més a més, s'ha correlacionat l'expressió de proteïnes entre si per a detectar possibles activacions creuades, com activacions per vies o mecanismes no ben coneguts actualment. Així mateix, s'han estudiat les característiques clíniques dels tumors per correlacionar aquests factors amb l'estadi clínic del tumor, la progressió i la supervivència del pacient. Les evidències obtingudes fins el moment suggereixen que la forma fosforilada de 4E-BP1 (p-4E-BP1) podria ser un factor clau on convergeixen diverses vies oncogèniques. Per tot això, l'estudi molecular del control de la traducció de proteïnes dependent de Cap, a través de la fosforilació de les proteïnes 4E-BP1 i eIF4E, pot ser clau per entendre les avantatges proliferatives de les cèl·lules transformades. A més a més, l'estudi d'aquests dos factors també pot ser important en la recerca d'eventuals, noves i més genèriques dianes terapèutiques contra el càncer.







---

# OBJECTIUS

---



Ens proposem estudiar la importància de 4E-BP1 i la seva forma fosforilada, p-4E-BP1, i altres factors implicats en la iniciació de la traducció dependent de Cap, com a factors clau en el procés tumoral i com a marcadors d'agressivitat en càncer de mama, i analitzar com la regulació de la fosforilació de 4E-BP1 pot afectar a la proliferació cel·lular tant *in vitro* com *in vivo*.

Els objectius concrets són:

1.- Analitzar la importància de p-4E-BP1 i factors relacionats com a biomarcadors de càncer de mama.

1.1.- Analitzar els patrons d'expressió de diverses proteïnes de senyalització a tumors de càncer de mama.

1.2.- Correlacionar els diferents factors de senyalització analitzats entre ells.

1.3.- Correlacionar els perfils d'expressió i les variables clíniques i patològiques.

1.4.- Analitzar la supervivència de les pacients i correlacionar-la amb els diferents factors de senyalització analitzats.

1.5.- Analitzar si els nivells de proteïna 4E-BP1 i eIF4E es correlacionen amb els nivells d'RNA en tumors de càncer de mama.

2.- Estudiar *in vitro* la funció de 4E-BP1.

2.1.- Estudiar la formació del complex eIF4F.

2.2.- Estudiar l'efecte de la sobreexpressió de 4E-BP1 wt i un 4E-BP1 mutant sobre la proliferació cel·lular, en dues línies de càncer de mama i fibroblasts humans normals.

2.3.- Estudiar la fosforilació de l'eIF4E i correlacionar-la amb agressivitat cel·lular.

3.- Estudiar *in vivo* la funció de 4E-BP1.

3.1.- Analitzar com la sobreexpressió de 4E-BP1 pot intervenir en la reducció de tumorigènesi *in vivo* en *xenografts*.

4.- Estudiar la regulació de 4E-BP1 per fosforilació.

4.1.- Analitzar la fosforilació de 4E-BP1 sota l'efecte de quinases ja descrites anteriorment (CDK1 i mTOR).

4.1.1.- Analitzar l'efecte del Taxol sobre la fosforilació de 4E-BP1.

4.1.2.- Analitzar l'efecte de la rapamicina sobre la fosforilació de 4E-BP1.

4.2.- Estudiar la implicació de noves quinases en la fosforilació de 4E-BP1.

4.2.1.- Analitzar l'estat de fosforilació de 4E-BP1 després de la inhibició de diferents quinases.

4.2.2.- Analitzar la localització cel·lular de l'eIF4E després de la inhibició de diferents quinases.

5.- Analitzar l'efecte que provoca sobre 4E-BP1 la inhibició d'LRRK2 i p38beta en diferents tipus cel·lulars.

5.1.- Analitzar l'efecte de la inhibició estable d'LRRK2.

5.2.- Analitzar el mecanisme per mitjà del qual la inhibició d'LRRK2 provoca la degradació de 4E-BP1.



---

# MATERIAL I MÈTODES

---



#### **4.1.- OBTENCIÓ DE MOSTRES DE TUMORS**

Es van seleccionar a l'atzar mostres de teixit tumoral de 96 pacients amb carcinoma de mama procedents del banc de tumors del Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona. Tots els procediments de l'estudi van ser aprovats pel Comitè ètic de l'Hospital Vall d'Hebron.

Les mostres utilitzades per aquest estudi van ser recollides de forma rutinària pel servei d'Anatomia Patològica com s'indica a continuació: un cop avaluat el tumor i realitzat el diagnòstic, es pren una mostra destinada al banc de tumors només en els casos en que hi ha prou material. Aquesta mostra es secciona en tres parts: dues parts es congelen en nitrogen líquid i la tercera es congela en un criomòtle amb OCT. D'aquest criomòtle es realitza un tall amb el criostat que és valorat per un patòleg per confirmar el diagnòstic del material congelat. El mateix procediment es realitza amb el teixit sa adjacent, en cas que n'hi hagi.

#### **4.2.- IMMUNOHISTOQUÍMICA**

Per avaluar l'expressió de diferents factors de senyalització a les diferents mostres tumorals seleccionades es va realitzar una tinció per immunohistoquímica. Es va utilitzar la tècnica de l'avidina-biotina peroxidasa per cada anticòs. De cada teixit es van tallar làmines de 5 µm de gruix i es van col·locar sobre portaobjectes coberts amb poli-lisina. Els talls es van desparafinar amb un tractament de xilè i es van rehidratar amb alcohol. La peroxidasa endògena es va bloquejar per immersió dels talls en metanol al 0.1% durant 20 min. Per la recuperació de l'antigen, els talls de teixits es van escalfar en una olla a pressió amb àcid cítric monohidratat a 10 mM, pH 6, durant 5 min i es van incubar amb l'anticòs primari a temperatura ambient. Els anticòs primaris i les dilucions utilitzades van ser: anti-p-4E-BP1 (Thr70) (#9455, Cell Signaling, Beverly, MA; diluït 1:50), anti-4E-BP1 (#9452, Cell Signaling, diluït 1:25), anti-p-eIF4E (ab76256, Abcam, Cambridge, UK; diluït 1:100), anti-eIF4E (#9742, Cell Signaling, diluït 1:75), anti-p-eIF4G (Ser1108) (#2441, Cell Signaling, diluït 1:50), anti-p-S6 (Ser235/236) (#2211, Cell Signaling, diluït 1:100), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (#9102, Cell Signaling,

diluït 1:200), anti-Ki-67 (DAKO, Glostrup, Denmark, prediluït), anti-HER2 (DAKO, prediluït), anti-receptor d'estrogen (ER) (Novocastra, Bannockburn, IL, diluït 1:50), anti-receptor de progesterona (PR) (Novocastra, prediluït) i anti-p53 (clone DO-7, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ, prediluït). El temps d'incubació per tots els anticossos va ser de 60 min amb l'excepció de p53, el qual es va incubar durant 16 min. Tots els talls es van contrastar amb hematoxilina, es van deshidratar i muntar. Els controls negatius es van incubar sense anticòs primari. Tots els anticossos primaris es van provar prèviament per *Western Blot* per avaluar la seva especificitat de tinció (Rojo et al. 2007; Castellvi et al. 2009). A més a més, es va comprovar l'expressió dels diferents anticossos en teixit normal de mama, còlon, pulmó i teixits conjuntius adjacents. Com que l'anticòs p-eIF4E mostrava uns nivells basals molt elevats en teixit normal de mama i teixits conjuntius adjacents, l'expressió de p-eIF4E es va analitzar per *Western Blot* i la intensitat de banda es va quantificar per mitjà del software Image J (version 1.41o, National Institutes of Health, Bethesda, MD), normalitzat amb la intensitat de  $\beta$ -actina de cada mostra i expressat en unitats arbitràries densitomètriques (ADU).

### **4.2.1- Avaluació immunohistoquímica**

Tots els casos seleccionats van ser avaluats per dos patòlegs per tal de determinar el percentatge de cèl·lules positives i la intensitat de tinció, la qual va ser avaluada semiquantitativament. L'Hscore pels factors de senyalització es va calcular com s'indica a continuació:  $(1 \times \% \text{ cèl·lules amb tinció dèbil}) + (2 \times \% \text{ cèl·lules amb tinció moderada}) + (3 \times \% \text{ cèl·lules amb tinció forta})$ , amb un resultat que anava de 0 a 300. En alguns casos escollits a l'atzar, la tinció immunohistoquímica es va realitzar en talls complets de teixit per tal d'avaluar la consistència dels resultats. El teixit adjacent normal de mama es va analitzar també per tal de definir l'umbral de l'Hscore pels casos positius.

El HER2 es va avaluar d'acord amb les directrius marcades per l'ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) i el CAP (*College of American Pathologists*) (Wolff et al. 2007). Quan es trobava algun cas indeterminat per HER2 (2+), es realitzava una hibridació *in situ* fluorescent amb una sonda marcada amb fluorescència (Pathvysion, Vysis Inc., Downers Grove, IL) d'acord



amb les instruccions del fabricant per tal de confirmar l'amplificació de *HER2/neu*.

#### **4.3.- EXTRACCIÓ D'RNA**

Per tal d'analitzar els nivells d'RNA d'eIF4E i 4E-BP1 es van seleccionar 20 casos a l'atzar i es va realitzar una extracció de l'RNA total del teixit fresc congelat en nitrogen líquid utilitzant l'*RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanya) segons les instruccions del fabricant. El teixit fresc congelat es va triturar amb nitrogen líquid en un morter que es va netejar prèviament amb H<sub>2</sub>O-Dietilpirocarbonada i RNase Zap (Ambion, Austin, TX) per evitar la degradació de l'RNA. Un cop pulveritzat el teixit es va dipositar ràpidament en un eppendorf lliure d'RNases i es va homogeneïtzar amb el tampó de lisi (*RNeasy Mini Kit*) passant el lisat almenys 5 cops per un xeringa sense RNases amb una agulla de 0.7 x 30 mm. La quantificació i la integritat de l'RNA total es van determinar amb l'*RNA nano Lab Chip Kit Bioanalyzer* (Agilent, Palo Alto, CA).

#### **4.4- PCR AMB RETROTRANSCRIPTASA (RT-PCR) A TEMPS REAL**

Un cop extret l'RNA i per tal determinar la quantificació relativa de l'mRNA de 4E-BP1 i eIF4E en els tumors seleccionats a l'atzar, es va realitzar una RT-PCR a temps real amb l'equip ABI PRISM 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA). La quantificació relativa ens permet conèixer si un gen està més o menys expressat en una mostra problema (tumor) respecte a una mostra calibradora (teixit sa) respecte a un gen de referència (gens que no veuen la seva expressió alterada ni pel tipus de mostra ni pel tipus de tractament) que es fan servir per normalitzar els resultats.

Per determinar quin gen de referència era el més adequat per comparar mostres tumorals amb mostres normals, es va realitzar un assaig *Taqman Endogenous Control Assay* (Applied Biosystems) segons les instruccions del fabricant. Amb aquest sistema es va analitzar l'expressió de 16 gens de referència (*18S, ACTB, B2M, GAPDH, GUSB, HMBS, HPRT1, IPO8, PGK1, POLR2A, PPIA, RPLP0, TBP, TFRC, UBC i YWHAZ*) i es va determinar que

per les mostres a estudiar el gen *POLR2A* era el gen que mantenia l'expressió més constant en els tumors i el *pool* comercial d'RNAs de teixits de mama (AM6952, Applied Biosystems).

L'RT-PCR a temps real es va realitzar en dos passos. Primer es va realitzar la síntesi de cDNA de cadena senzilla amb *SuperScriptII reverse transcriptase kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA) a partir d'1.5 µg d'RNA total, 200 ng de *Random Primers*, dNTPs 0.5 mM i H<sub>2</sub>O destil·lada fins a 12 µl. Aquesta reacció es va escalfar 5 min a 65°C, després es va afegir el Tampó de Reacció 1x, DTT 10 mM i 40 U de *RNaseOUT* i es va incubar 2 min a 25°C. Es van afegir 200 U de *SuperScriptII reverse transcriptase* i es va incubar 10 min a 25°C i 50 min a 42°C. Finalment la reacció es va inactivar escalfant a 70°C 15 min. Les alíquotes de cDNA es van guardar a -20°C. En un segon pas es va realitzar la RT-PCR a temps real. Cada mostra es va analitzar per triplicat a partir de 15 ng de cDNA, 1µl de les sondes Taqman Hs00607050\_m1 per 4E-BP1, Hs00854166\_g1 per eIF4E i Hs00172187\_m1 per *POLR2A* (Applied Biosystems) i 10 µl de *TaqMan Universal PCR Master Mix (20xTaqMan Gene Expression Assays*, Applied Biosystems). La reacció de PCR va ser de 2 min a 50°C, 10 min a 95°C i 40 cicles de 15 s a 95°C i 1 minut a 60°C.

Per avaluar l'expressió relativa de 4E-BP1 i eIF4E es va fer servir el mètode comparatiu *RQ Study*. Aquest mètode requereix que tant els gens diana (*4E-BP1* i *eIF4E*) com el gen de referència (*POLR2A*) tinguin la mateixa eficiència d'amplificació a qualsevol rang de concentració (*Abi Prism 7000 RQ Plate and RQ Study, User Guide*). Aquest mètode fa servir fórmules aritmètiques per calcular el valor d'expressió relativa del gen diana (RQ) a la mostra problema (en aquest cas teixit tumoral), normalitzat amb el gen de referència i relatiu a un calibrador (en aquest cas teixit normal). El valor RQ es calcula segons la fórmula  $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$  i  $\Delta\Delta C_T = [C_T(\text{tumor, gen diana}) - C_T(\text{teixit normal, gen diana})] - [C_T(\text{Tumor, gen referència}) - C_T(\text{teixit normal, gen referència})]$ , on  $C_T$  és el cicle de PCR on l'amplificació del gen (diana o de referència) assoleix un llindar fixat. Aquesta anàlisi es va realitzar amb el *software RQ Manager* (Applied Biosystems).

#### **4.5.- MANTENIMENT DE CULTIUS CEL·LULARS**

Per realitzar aquest treball es van seleccionar models cel·lulars amb característiques genètiques diferents que es van tenir en compte a l'hora de valorar els resultats obtinguts (Taula 1). Les línies cel·lulars utilitzades van ser:

- **IMR90**: Línia cel·lular de fibroblasts primaris humans de pulmó (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK).
- **TIG3**: Línia de fibroblasts fetals diploides de pulmó immortalitzada amb la subunitat catalítica de la telomerasa hTERT. Aquesta línia va ser generada i amablement cedida pel Dr. D. Peeper (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Holanda).
- **MDA-MB 468**: Línia cel·lular de carcinoma de mama (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA).
- **MDA-MB 231**: Línia cel·lular de carcinoma de mama (ATCC).
- **HT-29**: Línia cel·lular de carcinoma de còlon (ATCC).
- **DLD-1**: Línia cel·lular de carcinoma de còlon (ATCC).
- **769-P**: Línia cel·lular de carcinoma de ronyó (ATCC).
- **HEK 293T**: Línia cel·lular de ronyó embrionari amb expressió de l'antigen T de l'adenovirus SV40 (ATCC).
- **HeLa**: Línia cel·lular de carcinoma de cèrvix uterí (ATCC).
- **GP2**: Línia cel·lular productora de retrovirus amb expressió estable dels gens *gag* i *pol* del virus de la leucèmia murina Moloney (Clontech, Heidelberg, Alemanya).

Totes les línies cel·lulars es van cultivar en medi DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* 4.5 g/l de Glucosa; 30 mg/l L-Glutamina; Cambrex, Barcelona, Espanya) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (Labclínics, Barcelona, Espanya), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml d'estreptomicina, 0.25 µg/ml d'amfotericina B i HEPES 10 mM (Cambrex, Verviers, Belgium).

El cultiu de les línies cel·lulars es va realitzar en condicions d'esterilitat en una cabina de flux laminar vertical. Periòdicament, es van obtenir sobrenedants dels cultius per detectar la presència de micoplasma utilitzant el test *EZ-PCR Mycoplasma Test Kit* (Biological Industries, Haemek, Israel) segons les instruccions del fabricant.

**Taula 1. Característiques dels models cel·lulars (segons <http://www.sanger.ac.uk>).**

<b>Línia cel·lular</b>	<b>Mutacions</b>	<b>Altres característiques</b>
IMR90	No	
TIG3	No	Expressa hTERT i receptor ecotròpic
MDA-MB 468	<i>RB; PTEN; p53;</i> <i>SMAD4</i>	
MDA-MB 231	<i>KRAS; BRAF; p53;</i> <i>CDKN2A (p16)</i>	
DLD-1	<i>APC; p53;</i>	
HT-29	<i>APC; BRAF; PIK3CA;</i> <i>SMAD4; p53</i>	
HeLa		
769-P	<i>CDKN2A</i>	
HEK 293T		Línia cel·lular productora de lentivirus
GP2*		Línia cel·lular productora de retrovirus

\*Les mutacions a la línia GP2 no es van tenir en consideració ja que aquest model cel·lular només es va fer servir com a productor de virus.

### **4.6.- CONSTRUCCIÓ DE pBABE, pBABE 4E-BP1 wt I pBABE-4E-BP1 mut**

#### **(4 Ala)**

Per induir la sobreexpressió de 4E-BP1 en els diferents models cel·lulars s'ha fet servir el vector retroviral pBABE-4E-BP1 wt i pBABE-4E-BP1 mutant (mut); el vector pBABE s'ha fet servir com a control. Tots aquests vectors van ser amablement cedits pel Dr. N. Sonenberg (McGill University, Montreal, Canada). pBABE-4E-BP1 mut conté els quatre llocs principals de fosforilació (Thr 37, Thr46, Thr 70, i Ser 65) mutats per quatre Alanines, de manera que aquesta forma mutant de 4E-BP1 no es pot fosforilar. Els dos vectors, wt i el mut contenen dues cues d'hemaglutinina (HA).

### **4.7.- GENERACIÓ DE RETROVIRUS I INFECCIÓ**

La producció de retrovirus es va realitzar amb la línia de cèl·lules empaquetadores pantròpica GP2 (Clontech). Aquestes cèl·lules deriven de la línia HEK-293 i expressen de forma estable els gens virals que codifiquen per les proteïnes virals Gag i Pol. Per generar retrovirus aquestes cèl·lules s'han de cotransfectar amb el vector d'expressió viral pVSV-G (Clontech) (que conté

el gen que codifica per la proteïna viral Env) i el vector d'interès. Es van plantar  $1 \times 10^6$  cèl·lules GP2 per placa de 60 mm i a les 24 h es van cotransfectar amb 2.5 µg del vector retroviral d'interès i 2.5 µg del vector pVSV-G amb JetPei (Genycell Biotech, Granada, Espanya) seguint les instruccions del fabricant. A les 24 h es va recollir el sobrenedant que contenia els retrovirus i es va filtrar (filtre de 0.45 µm, Sarstedt, Nümbrecht, Alemanya). Aquest sobrenedant es va suplementar amb 4 µg/ml de polibrè (Sigma-Aldrich) per facilitar la infecció.

Per realitzar les infeccions es va reemplaçar el medi de cultiu de les cèl·lules diana pel sobrenedant amb els retrovirus. Les cèl·lules diana es van plantar el dia abans de realitzar la infecció ( $3.5 \times 10^5$  cèl·lules IMR90;  $5.5 \times 10^5$  cèl·lules MDA-MB 468 i  $4 \times 10^5$  cèl·lules MDA-MB 231). Les cèl·lules productores es van deixar en cultiu i a les 24 h es va tornar a agafar sobrenedant i es va repetir el procediment per realitzar una reinfecció de 24 h més. A les 24 h de la reinfecció les cèl·lules infectades es van seleccionar durant tres dies amb la dosi apropiada de l'antibiòtic puromicina (Sigma-Aldrich) (Taula 2). La dosi de selecció dels diferents models cel·lulars es va triar a partir de la realització de corbes de resistència a puromicina.

**Taula 2. Dosis d'antibiòtics utilitzats per seleccionar cèl·lules infectades.**

Línia cel·lular	Puromicina (µg/ml)
MDA-MB 468	0.7
MDA-MB 231	0.7
IMR90	1.25
TIG 3	0.5

#### **4.8.- TRANSFECCIÓ DE siRNAS**

Per tal d'estudiar noves quinases que podrien estar implicades en la fosforilació de 4E-BP1 es van seleccionar 48 quinases i es van inhibir per mitjà de la transfecció d'siRNAs sintètics (Taula 3). Tots aquests siRNAs estaven

Taula 3. siRNAs contra les possibles quinases candidates a fosforilar 4E-BP1.

Grup	Quinasa	siRNA ref	Gen ref
<b>CAMK</b> [Kinases modulated by Ca <sup>2+</sup> / CaM]]	PIM1	SI02758553	NM_002648
	PIM2	SI02224201	NM_006875
	LKB1 (STK11)	SI02665383	NM_000455
	CaMKKB (CaMKK2)	SI02659713	NM_006549
	AMPKalpha (PRKAA1)	SI02622228	NM_006251
	AMPKalpha2 (PRKAA2)	SI02758595	NM_006252
	MNK1 (MKNK1)	SI02621955	NM_003684
	MNK2 (MKNK2)	SI02758483	NM_017572
	PKD1 (PRKD1)	SI00301650	NM_002742
<b>AGC</b> [cAMP-dependent protein kinase (PKA)/protein kinase G/protein kinase C (PKC)]	AKT1	SI02757244	NM_00101443
	AKT2	SI00299166	NM_001626
	AKT3	SI02622487	NM_181690
	ROCK1	SI02622095	NM_005406
	ROCK2	SI02223753	NM_004850
	PKC alpha (PRKCA)	SI00301308	NM_002737
	PKC beta1 (PRKCB1)	SI00605941	NM_002738
	p70S6K (RPS6KB1)	SI00301721	NM_003161
	RSK2 (RPS6KA3)	SI00288190	NM_004586
	RSK1 (RPS6KA1)	SI02223067	NM_002953
	PKAgamma (PRKACG)	SI00605871	NM_002732
	PKAalpha (PRKACA)	SI00605857	NM_002730
	PKAbeta (PRKACB)	SI02225468	NM_002731
	PDK1	SI00305752	NM_002610
<b>CMGC</b> [Cyclin-dependent kinases (CDKs) / Mitogen-activated protein kinases (MAPK) / Glycogen synthase kinase (GSK) and CDK- like kinases]	CDK1 (cdc2)	SI00299719	NM_001786
	CDK2	SI02654631	NM_001798
	CDK5	SI00604681	NM_004935
	CDK7	SI00287392	NM_001799
	ERK1 (MAPK3)	SI00605997	NM_001040056
	ERK2 (MAPK1)	SI00300755	NM_002745
	ERK5 (MAPK7)	SI00606046	NM_002749
	JNK1 (MAPK8)	SI0257209	NM_002750
	JNK2 (MAPK9)	SI00300797	NM_002752
	JNK3 (MAPK10)	SI02222927	NM_002753
	p38alpha (MAPK14)	SI00300769	NM_001315
	p38 beta (MAPK11)	SI00606053	NM_002751
	p38delta (MAPK13)	SI02222941	NM_002754
p38 gamma (MAPK12)	SI02223081	NM_002969	
GSK3 beta	SI00300335	NM_002093	
GSK3 alpha	SI0288554	NM_019884	
<b>TKL</b> [Tyrosine kinase- like kinases]	IRAK-1	SI00605262	NM_001025242
	RAF-1	SI00301623	NM_002880
	LRRK2	SI00624591	NM_198578
	LRRK2	SI00624526	
<b>TyrK</b> [Tyrosine]	SRC	SI02664151	NM_005417
<b>STE</b> [Sterile]	PAK2	SI00301077	NM_02577
<b>Altres</b>	IKK (CHUK)	SI00605115	NM_001287
	TBK1	SI00301889	NM_013254
<b>Grup atípic</b>	mTOR (FRAP)	SI00300244	NM_004958
	ATM	SI02663360	NM_000051
	DNAPK (PRKDC)	SI02224229	NM_001081640

validats, excepte els de l'LRRK2, del qual es van escollir 2 siRNAs per assegurar-nos que els efectes observats eren deguts a la inhibició de l'LRRK2. Els siRNA utilitzats com a control van ser *Negative Control siRNA* (1022076, Qiagen, Valencia, CA, USA) i el *GADPH siRNA* (SI02653266, Qiagen). Es van plantar  $18 \times 10^4$  cèl·lules diana (MDA-MB 231) en plaques de 6 pouets. A les 24 h es van transfectar 30 nM de cada siRNA amb lipofectamina 2000 (Invitrogen) segons les instruccions del fabricant. Totes les transfeccions amb siRNAs es van repetir tres vegades, obtenint-se resultats similars.

Un cop obtinguts els resultats, es va provar l'efecte d' LRRK2 i p38 $\beta$  en diferents tipus cel·lulars. Per fer això es van utilitzar 2 siRNAs, un dels quals era l'utilitzat a la placa i l'altre era un de diferent, SI00624540 Qiagen, per LRRK2 i SI00606060 Qiagen, per p38 $\beta$ . Es van plantar  $18 \times 10^4$  cèl·lules d'MDA-MB 231,  $3 \times 10^5$  cèl·lules d'MDA-MB 468,  $18 \times 10^4$  cèl·lules de 769-P,  $23 \times 10^4$  cèl·lules de HEK 293T,  $25 \times 10^4$  cèl·lules d'HT-29,  $25 \times 10^4$  cèl·lules de DLD-1,  $18 \times 10^4$  cèl·lules de HeLa i  $25 \times 10^4$  cèl·lules de TIG3 en plaques de 6 pouets i es van seguir les mateixes pautes de transfecció descrites anteriorment.

#### **4.9.- CONSTRUCCIÓ DE pLKO-shLRRK2 i PLKO-shNT**

Per realitzar la inhibició d'LRRK2 en les diferents línies cel·lulars i veure l'efecte que tenien sobre la fosforilació de 4E-BP1, es va fer servir la tecnologia dels *short hairpin RNAs* (shRNAs). Es basa en introduir a les cèl·lules un vector que expressa una seqüència de nucleòtids complementaris a l'mRNA que es vol silenciar. Aquesta seqüència quan es transcriu forma una cadena doble de RNA que es processada per Drosha i Dicer, de manera que es generen *small interference RNAs* (siRNAs) que formen un complex amb RISC permetent la hibridació amb l'mRNA diana del gen endogen, el qual es degrada produint-se el silenciament del gen en qüestió.

Per seleccionar la seqüència del shRNA d'LRRK2 (shLRRK2) es van utilitzar els 2 siRNAs testats anteriorment (Hs\_LRRK2\_2, SI00624526s i Hs\_LRRK2\_4, SI00624540, de Qiagen).

Les seqüències dels diferents siRNA eren:

- LRRK2\_1: 5' CTCGTCGACTTATACGTGTAA 3'

- LRRK2\_2: 5' CAGAATTTTCATCATAAGCTAA 3'

Utilitzant aquestes seqüències, es van dissenyar les seqüències del shRNA per cada un:

- LRRK2\_1:

5'gatccGCTCGTCTCGACTTATACGTGTAATTCAAGAGATTACACGTATAAGTC  
GACGAGTTTTTTTACGCGTg3'

- LRRK2\_2:

5'gatccGCAGAATTTTCATCATAAGCTAATTCAAGAGATTAGCTTATGATGAAA  
TTCTGTTTTTTTACGCGTg3'

Posteriorment, es van clonar en el vector lentiviral pLKO.1 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemanya) generant els vectors pLKO.1-shLRRK2\_1, pLKO.1-shLRRK2\_2 . El vector pLKO.1-shRNA Non-Target (Sigma-Aldrich) (pLKO.1-shNT d'aquí en endavant) es va fer servir com a control.

### **4.10.- GENERACIÓ DE LENTIVIRUS**

La generació de lentivirus es va realitzar a partir de la línia HEK 293T (ATCC). Es van plantar  $5 \times 10^6$  cèl·lules TIG3 per placa de 10 cm i es van cotransfectar 2 µg del vector d'interès; 2 µg del vector d'expressió d'Env pMD.G; 2 µg del vector d'expressió de Rev RSV-Rev; i 2 µg del vector d'empaquetament pCMVDR8.2 (tots tres plàsmids cedits del prof. D. Peeper i necessaris per la formació de lentivirus) amb 0.5 ml de HBS (NaCl 280 mM; HEPES 50 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 mM pH 7.05-7.1) i 0.5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.25 M durant 6 h en presència de cloroquina 25 µM (Sigma-Aldrich). Al dia següent es va realitzar una dilució 1:5 del sobrenedant que contenia els lentivirus amb medi de cultiu i es va realitzar la infecció de les cèl·lules diana seguint el mateix protocol que per la infecció retroviral.

### **4.11.- CORBES DE CREIXEMENT**

Dos dies després de la selecció, les cèl·lules infectades amb les diferents construccions retrovirals o lentivirals es van comptar i plantar cada 4 dies en plaques de sis pouets. El número de divisions o PD (de l'anglès



*population doublings*) es va determinar segons la següent fórmula:  $PD = \text{Log}(N_f/N_i)/\text{Log}2$ , on  $N_f$  és el número de cèl·lules comptat i  $N_i$  és el número de cèl·lules inicial que es van plantar. El PDL (*population doubling level*) representa la suma de PDs calculats en passes anteriors. Per la línia cel·lular MDA-MB 468 es van plantar  $1 \times 10^5$  cèl·lules, per les MDA-MB 231  $8 \times 10^4$  cèl·lules, per les IMR90  $1.25 \times 10^5$  cèl·lules i per les TIG3  $1 \times 10^5$  cèl·lules. Cada corba es va realitzar almenys dues vegades amb resultats similars i cada punt es va determinar per duplicat.

#### **4.12.- FORMACIÓ DE TUMORS EN RATOLINS**

Per tal de realitzar els experiments *in vivo*, es van utilitzar femelles de ratolins atímics BALB/C, de quatre setmanes d'edat (Harlan Laboratories; S. Pietro al Natisone, Itàlia). Abans de l'experiment es van mantenir en quarantena durant una setmana. Es van ressuspendre  $5 \times 10^6$  cèl·lules d'MDA-MB 468 o MDA-MB 231 en 100  $\mu\text{L}$  de PBS i es van injectar subcutàniament en els flancs posteriors de tres animals (dret i esquerre). Es va fer un seguiment del creixement del tumor mesurant els tumors cada dos dies. El període de latència del tumor es va definir com l'interval de temps des de la injecció de les cèl·lules fins el dia que els tumors es van fer aparents en el 50% dels animals. Els ratolins es van sacrificar 54 dies després de la injecció. El tumor va ser ràpidament congelat i emmagatzemat a  $-80^\circ\text{C}$  per obtenir extracte proteic.

#### **4.13.- TRACTAMENT DE LES CÈL·LULES AMB PRODUCTES QUÍMICS**

Per tal de veure l'efecte que provocava la inhibició del p-eIF4E a les MDA-MB 468 que contenen el vector buit, el 4E-BP1 wt o bé el 4E-BP1 mut, es van tractar aquestes cèl·lules amb un inhibidor de les MNKs, el CGP 57380 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO), a una concentració de 40  $\mu\text{M}$  durant tota la nit.

A les MDA-MB 231 i les HEK 293T, es van realitzar diferents tractaments amb Taxol (Paclitaxel Mayne), rapamicina (Cell Signaling) i purvalanol A (Calbiochem, Schwalbach, Alemanya). El tractament amb Taxol es va fer durant 24 h, a una concentració de 25 nM. El Taxol és un agent quimioteràpic que para les cèl·lules en fase G2/M i s'ha descrit que es troba implicat en la

fosforilació de 4E-BP1 a través del complex ciclina B-CDK1 (Greenberg and Zimmer 2005). El tractament amb rapamicina es va fer durant 6 h a una concentració de 30 nM. La rapamicina és un inhibidor directe de la serina treonina quinasa mTOR. Per últim, el tractament amb Purvalanol A es va fer durant 6 h a una concentració de 10  $\mu$ M. El Purvalanol A és un inhibidor de diferents quinases (CDK1, CDK2, CDK5 i CDK7).

Per altra banda, per tal d'estudiar per mitjà de quin mecanisme LRRK2 podria intervenir en l'estabilització de 4E-BP1, es va inhibir l'LRRK2 en *transient* per mitjà dels dos siRNA testats a les MDA-MB 231 i les TIG3. A les 48 hores després de la inhibició es van plantar  $18 \times 10^4$  cèl·lules d'MDA-MB 231 i  $15 \times 10^4$  cèl·lules de TIG3 en plaques de 6 pouets i al dia següent es van tractar 6 h amb MG132 (#1748, Tocris Bioscience, Ellisville, MO), un inhibidor del proteasoma, a una concentració de 30  $\mu$ M o bé 6 h amb rapamicina a una concentració de 30 nM. D'aquesta manera, volíem veure si la degradació de 4E-BP1 a l'inhibir l'LRRK2 era via proteasoma. Per contra, el fet de tractar les cèl·lules amb rapamicina era per veure si LRRK2 es trobava estabilitzant alguna fosfatasa, ja que altres autors han descrit anteriorment, la hiperfosforilació de 4E-BP1 el porta a degradació i fa la proteïna menys estable.

Per tal d'ajustar les concentracions de les diferents drogues es van realitzar corbes de viabilitat per cada línia cel·lular.

#### **4.14.- EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES I WESTERN BLOT**

Les cèl·lules es van rentar en PBS fred i es van lisar amb Tampó de Lisi (HEPES 50 mM pH 7.5; NaCl 150 mM; 1% Triton X; EDTA 1 mM; Glicerol 10%) en presència d'inhibidors de proteases (aprotinina 1  $\mu$ g/ml; leupeptina 1  $\mu$ g/ml; DTT 1 mM) i d'inhibidors de fosfatases (NaF 20 mM; NaPPi 0.1 M;  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM; PMSF en etanol 1 mM;  $\beta$ -Glicerofosfat 20 mM) durant 30 min a 4°C. Després les cèl·lules es van recollir en un eppendorf i es van centrifugar a 15000 g durant 10 min a 4°C. Per altra banda, l'extracció de proteïnes dels teixits es va realitzar a partir dels teixits pulveritzats (amb nitrogen líquid i un morter) amb el mateix tampó de lisi i seguint el mateix procediment, excepte que aquestes mostres es van sonicar durant 10 s abans de la centrifugació. Tant per les cèl·lules com pels teixits, es va recollir el sobrenedant i es va

quantificar amb el reactiu *Bio-Rad Protein Assay* (BioRad, Munich, Alemanya) segons les instruccions del fabricant. A 25-100 µg de proteïnes se'ls hi va posar Tampó de Càrrega (Tampó Laemmli 1x: 0.0626 M Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.01% blau de bromofenol, 10% glicerol) i es van desnaturalitzar durant 5 min a 95°C.

Les proteïnes es van carregar en gels de poliacrilamida de diferents percentatges (6-12%) en funció del pes molecular de la proteïna que es volia analitzar, i es va realitzar l'electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat de sodi (SDS-PAGE). Un cop separades les proteïnes per pes molecular es van transferir a una membrana de PVDF, aplicant un amperatge constant de 400 mA durant 1h i 15 min o bé un amperatge de 300 mA durant 3h per aquelles proteïnes d'alt pes molecular.

Un cop finalitzada la transferència, les membranes es van bloquejar amb 5% de llet desnatada en T-TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM i 0.1% de Tween-20) durant 1 h. Després del bloqueig es va incubar l'anticòs primari diluït en 5% de llet desnatada en T-TBS (o en 5% de BSA en T-TBS en el cas dels fosfoanticòsos) durant tota la nit en moviment a 4°C (Taula 4). Posteriorment es van realitzar tres rentats de 10 min amb 5% de llet desnatada en T-TBS i es va incubar durant 1 h l'anticòs secundari diluït en 5% de llet en T-TBS a temperatura ambient. Finalment es van realitzar tres rentats de 10 min en 5% de llet en T-TBS i es va revelar utilitzant el sistema d'emissió de quimioluminiscència ECL (Amersham Pharma-Biotech, Dreieich, Alemanya).

La intensitat de les bandes obtingudes per *Western Blot* es van quantificar per densitometria amb el software ImageJ (versió 1.41o, National Institutes of Health Bethesda, MD). En tots els casos es va normalitzar l'expressió de la proteïna d'interès amb la intensitat de la banda de  $\beta$ -Actina i es va expressar en unitats densitomètriques arbitràries (UDA).

#### **4.15.- IMMUNOPRECIPITACIÓ**

Els lisats cel·lulars es van incubar amb l'anticòs 4E-BP1 (#9452, Cell Signaling, diluït 1:50), eIF4G (#2498, Cell Signaling, diluït 1:50) o p-eIF4G Ser1108 (#2441, Cell Signaling, diluït 1:50) *overnight* a 4°C. El dia següent, es va afegir la proteïna G sefarosa (*G Sepharose 4 Fast Flow*; 17-0618-01,

Amersham Pharma-Biotech) i la solució es va deixar en agitació durant 1 h a 4°C. Les mostres es van centrifugar a 12,000 g durant 20 s. El pellet es va rentar 3 vegades amb 1 mL de tampó de lisi i es va ressuspèndre en 30 µL de tampó reductor (1% SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris, pH 7.5). La mostra es va escalfar a 95°C durant 3 minuts i es va centrifugar a 12,000 g durant 20 s per fer baixar les boles de sefarosa. Finalment, es va recollir el sobrenedant i es va afegir 1 µL de blau de bromofenol al 0.1%. El sobrenedant es va analitzar per *Western Blot* de la mateixa manera descrita anteriorment.

### **4.16.- IMMUNOCITOFUORESCÈNCIA**

Per tal de fer l'anàlisi de cadherina-E per immunocitofluorescència es va utilitzar la línia cel·lular MDA-MB 468; la línia MDA-MB 231 no es va utilitzar ja que no presenta nivells basals de cadherina-E. Es va fer créixer la línia cel·lular MDA-MB 468 ( $1 \times 10^5$  cèl·lules) en cobreobjectes rodons prèviament esterilitzats de 12 mm (Afora, Barcelona, Espanya) col·locats en plaques de 24 pouets. Quan van assolir la confluència desitjada es va fer la immunocitofluorescència. Aquest procés ja no requeria treballar en condicions d'esterilitat. Es va aspirar el medi, es van rentar les cèl·lules dos cops amb PBS i es va afegir 0,5 ml per pouet de solució de fixació: Formaldehid al 37-40% (Panreac) diluït en PBS. Es va deixar actuar la solució de fixació 10 min, i després de fer 2 rentats amb PBS es va procedir a fer la permeabilització amb Metanol al 100% (Sigma Aldrich). Es va deixar actuar la solució permeabilitzadora durant 30 min a -20°C. Un cop acabada la permeabilització es va fer una incubació d'una hora amb PBS/2% BSA i es va procedir a fer la incubació amb l'anticòs primari, anti-cadherina E (# 36B5, Novocastra, diluït 1:25) tota la nit a 4°C. Les dilucions de l'anticòs es van fer en PBS/2% BSA. Després, es van fer tres rentats de PBS 1x i es va fer una incubació durant 1 h amb l'anticòs secundari conjugat amb fluorocroms, anti-mouse Ig G Rodamina (Jackson ImmunoResearch, diluït 1:200) i diluït en PBS/2% BSA (1:200). Es van fer tres rentats, aquest cop amb aigua destil·lada, per evitar la formació de cristalls de PBS, i es va fer el muntatge amb Citifluor (Citifluor Ltd AF1).

En el cas de les MDA-MB 231 es va realitzar una immunohistoquímica contra eIF4E (610269, BD Transduction Labs, San Jose, California, USA, diluït

1:250), per veure com afectava la inhibició de diferents quinases a la seva localització intracel·lular. Es van plantar 1000 cèl·lules en plaques de 96 pouets. El protocol que es va seguir per fer la immunohistoquímica va ser el mateix que l'utilitzat en el cas de cadherina-E amb l'excepció que en aquest cas l'anticòs secundari utilitzat va ser un AlexaFluor 647 (Invitrogen, diluït 1:200). Per determinar la concentració relativa de l'eIF4E dins del nucli *versus* la concentració dins del citoplasma, la intensitat de senyal es va quantificar utilitzant microscopia confocal. Es van escollir vint cèl·lules a l'atzar de la immunocitofluorescència per escanejar i no es van observar diferències entre elles. Cada cèl·lula va ser escanejada utilitzant una secció Z amb un disc de 0,65 µm de gruix. Aquesta manipulació produïa de 12 a 16 imatges contigües des del dors a la part basal de cada cèl·lula. Utilitzant el *software* Image J, es va mesurar i sumar la intensitat de pixels de cada secció per representar la immunofluorescència d'una cèl·lula. Aquesta part experimental es va realitzar a la Universitat McGill de Montreal, Canadà, amb la col·laboració del grup del Dr. Nahum Sonenberg.

#### **4.17.- ANÀLISI ESTADÍSTICA.**

L'anàlisi estadística es va realitzar amb el *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, version 13.0; SPSS Inc., Chicago, IL). El test de Kruskal-Wallis es va utilitzar per buscar associacions entre els diferents paràmetres analitzats. Es van buscar associacions entre p-4E-BP1, 4E-BP1, la ràtio de p-4E-BP1:4E-BP1 i eIF4E i els diferents factors de senyalització analitzats (HER2, p4E-BP1, 4E-BP1, p-S6, Ki-67, p53, p-ERK1/2, eIF4E, PR i ER), així com amb les variables clíniques i patològiques del tumor (grau histològic, metàstasi limfàtica nodular i mida del tumor). La significància estadística es va fixar en dos extrems amb p valor de  $\leq 0.05$ . L'efecte dels diferents paràmetres sobre la supervivència es va avaluar per mitjà del mètode de Kaplan-Meier, i les diferències es van comparar amb el test de log-rank. Per analitzar la tumorigènesi en ratolins, les mesures dels tumors (MDA-MB 468/vector *versus* MDA-MB 468/4E-BP1 wt i MDA-MB 468/mut 4E-BP1) es van comparar utilitzant el test de Kruskal-Wallis.

**Taula 4. Anticossos utilitzats per *Westernblot***

Anticòs	Referència i casa comercial	Dilució
Primaris		
anti-Actina	CP01; Calbiochem, Darmstadt, Alemanya	1:7000
anti-4E-BP1	#9452, Cell Signaling	1:1000
anti-p-4E-BP1 Ser 65	#9451, Cell Signaling	1:1000
anti-p-4E-BP1 Thr37/46	#9459, Cell Signaling	1:1000
Anti-4E-BP2	# 2845, Cell Signaling	1:1000
anti-eIF4E	#9742, Cell Signaling	1:1000
anti-p-eIF4E	#9741, Cell Signaling	1:500
anti-eIF4G	#2498, Cell Signaling	1:1000
anti-p-eIF4G	#2441, Cell Signaling	1:1000
anti-pS6 Ser235/236	#2211, Cell Signaling	1:1000
anti-HA11	MMS-101P, Covance, Berkeley, CA	1:1000
anti-p38 $\beta$	#2339, Cell Signaling	1:1000
anti-LRRK2	AB9682, Millipore	1:5000
Secundaris		
<i>Sheep Anti-Mouse IgG-HRP</i>	NA9310; Amersham Pharma-Biotech	1:3000
<i>Donkey Anti-Rabbit IgG-HRP</i>	NA9340; Amersham Pharma-Biotech	1:2000



---

# RESULTATS

---





### **5.1- p4E-BP1 COM A BIOMARCADOR EN CÀNCER DE MAMA**

Per tal d'estudiar l'expressió de 4E-BP1 en càncer de mama i veure si es podia correlacionar amb altres factors de senyalització i diferents característiques clíniques (com grau del tumor, supervivència, metàstasi, etc), es van seleccionar 96 carcinomes infiltrants de mama i es va fer una anàlisi per immunohistoquímica; alguns dels casos es van confirmar per *Western Blot*. Totes les característiques d'aquests tumors es troben resumides a la Taula 5.

**Taula 5. Característiques dels tumors de cancer de mama analitzats**

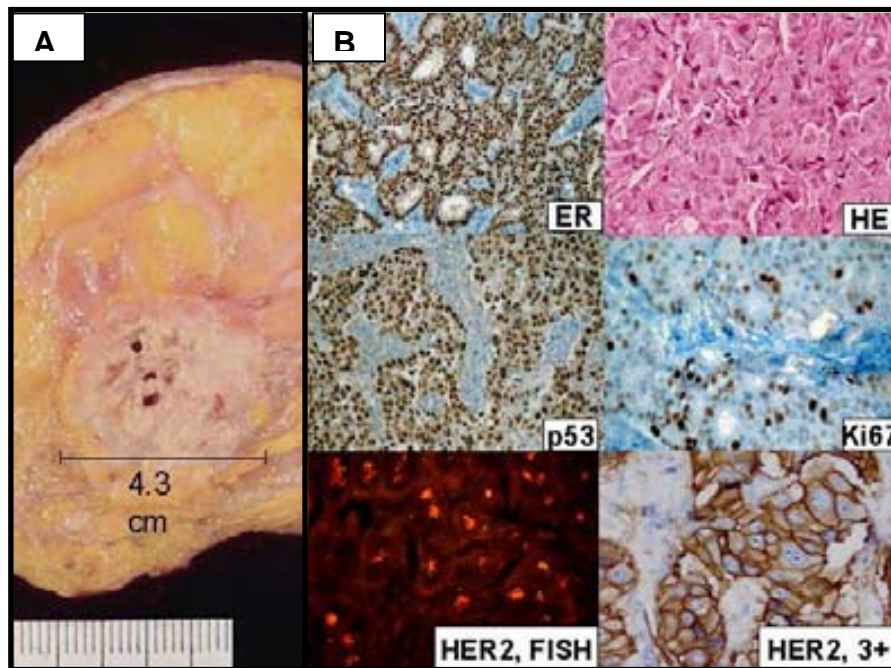
<b>Característiques</b>	<b>N (%)</b>
Tipus histològic	
Ductal	89 (92.7%)
Lobular	4 (4.2%)
Apocrí	1 (1%)
Micropapil·lar	1(%)
Adenoescamós	1 (%)
Grau histològic <sup>a</sup>	
I	7 (7.3%)
II	37 (38.5%)
III	52 (54.2%)
Edat del pacient	
<50 anys	21 (21.9%)
>50 anys	75 (78.1%)
Mida del tumor	
1 (<20 mm)	27 (28.1%)
2 (20-50 mm)	63 (65.6%)
3 (>50 mm)	6 (6.3%)
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	
Si	69 (86.2%)
No	11 (13.8%)
pN	
0	42 (43.7%)
1	28 (29.2%)
2	11 (11.5%)
3	15 (15.6%)
Ki67	
>20%	24 (32%)
≤20%	51 (68%)
Receptors d'hormones	
ER+ (Receptors d'estrogen)	60 (62.5%)
PR+ (Receptors de progesterona)	48 (50%)
Sobreexpressió de HER2/neu	44 (45.8%)
p53	15 (23.8%)

<sup>a</sup>Segons la classificació d'Scarff Bloom Richardson (SBR)

La sèrie de carcinomes escollits presentava la peculiaritat que la sobreexpressió de HER2/neu era positiva per, aproximadament, la meitat dels casos (45.8%). Això es va fer per veure si hi havia correlació del receptor de HER2 amb la sobreexpressió d'altres factors implicats en el creixement cel·lular de diferents vies de senyalització.

### **5.1.1 -Patrons d'expressió de diverses proteïnes a tumors de mama**

Primer de tot, es va caracteritzar cada tumor per mitjà de l'anàlisi dels marcadors utilitzats habitualment en càncer de mama. Aquests marcadors eren els receptors d'hormones (ER/PR+), Ki67, p53 i HER2/neu (Taula 5) (Figura 14).



**Figura 14. Anàlisi dels principals factors marcadors examinats habitualment en tumors de càncer de mama.**

- A. Fotografia d'un tumor de càncer de mama.
- B. Immunohistoquímica dels receptors d'hormones (ER), p53, Ki-67, i HER2 i anàlisi per FISH de HER2. També es mostra la tinció per Hematoxil·lina-eosina (HE).

També es va fer una anàlisi dels principals factors implicats en les vies de senyalització que s'activen en resposta al creixement. Entre els factors analitzats hi trobem, pERK1/2, p-S6, 4E-BP1, p-4E-BP1 (Thr70), eIF4E, p-

eIF4E i p-eIF4G. Tots aquests factors es van analitzar per immunohistoquímica i la seva sobreexpressió es va definir amb un Hscore on el punt de tall era de 50 (amb excepció de p-S6, que es va definir amb un punt de tall de 30). Aquest punt de tall era el resultat de la mitjana de l'expressió trobada en el teixit epitelial normal adjacent al tumor. Els diferents factors estudiats i el percentatge d'expressió es troben resumits a la Taula 6.

**Taula 6.** Nivells d'expressió dels marcadors analitzats en 96 tumors de càncer de mama.

	Número de casos positius, %
p-ERK1/2	21.74%
p-S6	71.8%*
4E-BP1	91.86%
p-4E-BP1 (Thr 70)	50.79%
eIF4E	88%
p-eIF4E	70.5%**
p-eIF4G	28.84%

Un Hscore de 50 va ser considerat sobreexpressió, basat en la mitjana d'expressió en epiteli de mama no tumoral.

\*p-S6 Hscore cutoff = 30.

\*\*p-eIF4E es va analitzar per *Western Blot*.

La Figura 15A mostra l'expressió de 4E-BP1, p-4E-BP1 i eIF4E en dos tumors de càncer de mama. El tumor 61 és un carcinoma d'alt grau amb una elevada expressió de 4E-BP1, p-4E-BP1 i eIF4E, mentre que el tumor 80 mostra una baixa expressió per p-4E-BP1 i eIF4E. En alguns casos, els nivells d'expressió dels diferents factors de senyalització analitzats es van avaluar també per *Western Blot* (Figura 15B).

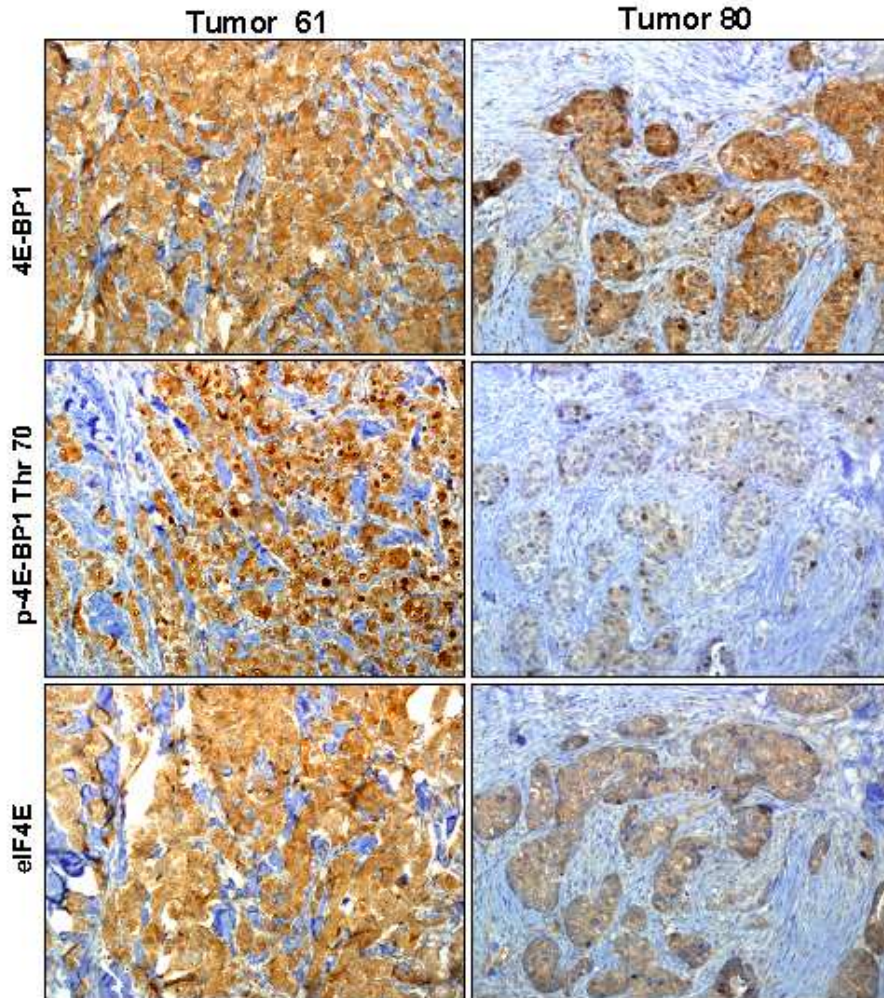
### **5.1.2 -Correlacions entre els diferents factors de senyalització analitzats**

Els resultats de les associacions entre els diferents factors de senyalització analitzats es troben resumits a la Taula 7. Es va observar una associació significativa entre els nivells de p-4E-BP1 i HER2, 4E-BP1, p-S6, PR, i nivells d'ER (test de Kruskal-Wallis,  $p=0.003$ ,  $p=0.031$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.002$ , i  $p=0.034$ , respectivament). Els nivells d'expressió de 4E-BP1 es van correlacionar significativament amb HER2, i receptors de progesterona i estrogen (test de Kruskal-Wallis,  $p=0.004$ ,  $p=0.009$ , i  $p=0.007$ , respectivament). També es va trobar una correlació entre la ràtio de p-4E-BP1:4E-BP1 i HER2, p-S6 i ER (test de Kruskal-Wallis,  $p=0.027$ ,  $p=0.002$  i  $p=0.043$ , respectivament).

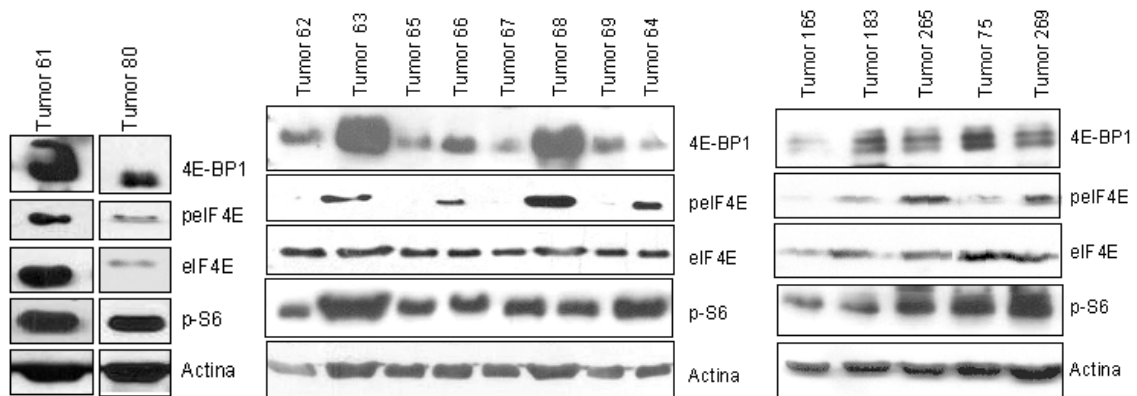
## RESULTATS

Finalment es va analitzar l'expressió d'eIF4E i va correlacionar significativament amb 4E-BP1, p-S6 i pERK1/2 (test de Kruskal-Wallis,  $p=0.018$ ,  $p=0.022$ , i  $p=0.018$ , respectivament).

A



B



**Figura 15. Expressió dels nivells de 4E-BP1 i eIF4E en tumors de càncer de mama.**

- Immunohistoquímica de l'expressió de 4E-BP1, p-4E-BP1 i eIF4E en dos tumors sòlids de mama.
- Western Blot* de 4E-BP1, p-eIF4E, eIF4E i p-S6 de diferents tumors de càncer de mama analitzats.

Taula 7. Significància estadística dels biomarcadors analitzats (test de Kruskal-Wallis).

FACTORS DE SENYALITZACIÓ				
	p-4E-BP1	4E-BP1	p-4E-BP1:4E-BP1 ratio	eIF4E
HER2	0.009*	0.004*	0.027*	0.642
p-4E-BP1	----	0.062	----	0.274
4E-BP1	0.031*	----	----	0.018*
p-S6	0.001*	0.398	0.002*	0.022*
Ki-67	0.322	0.588	0.603	0.863
p53	0.817	0.075	0.464	0.525
p-ERK1/2	0.209	0.128	0.243	0.018*
eIF4E	0.349	0.054	0.417	----
Progesterona	0.002*	0.009*	0.068	0.384
Estrogen	0.034*	0.007*	0.043*	0.305

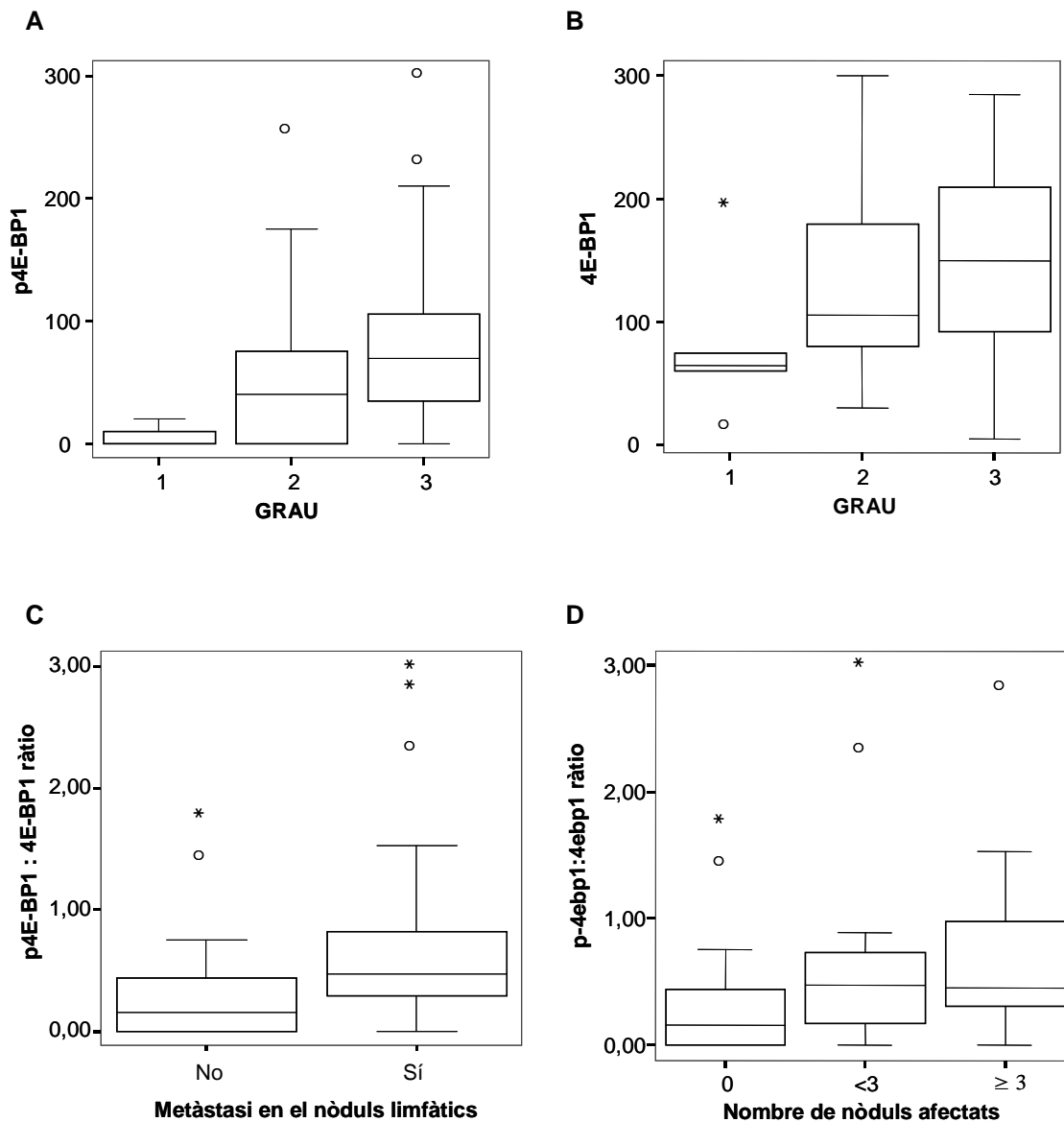
VARIABLES CLÍNiques I PATOLÒGiques				
	p-4E-BP1	4E-BP1	p-4E-BP1:4E-BP1 ratio	eIF4E
Grau histològic	0.032*	0.048*	0.085	0.811
Metàstasi limfàtica nodular	0.137	0.858	0.016*	0.279
Mida del tumor	0.925	0.478	0.432	0.574

\*Estadísticament significatiu ( $p < 0.05$ )

### **5.1.3 -Correlacions entre els perfils d'expressió i les variables clíniques i patològiques**

Els nivells d'expressió de p-4E-BP1, 4E-BP1, eIF4E i p-eIF4G i la ràtio de p-4E-BP1:4E-BP1 es van correlacionar amb els diferents paràmetres de pronòstic, com la mida del tumor, el grau histològic i la presència de metàstasi a nòduls limfàtics. Es va observar que p-4E-BP1 associava amb el grau histològic del tumor (test de Kruskal-Wallis,  $p=0.032$ ) (Figura 16A), com el 4E-BP1 (test de Kruskal-Wallis,  $p=0.048$ ) (Figura 16B). Per altra banda, la ràtio de p-4E-BP1:4E-BP1 correlacionava significativament amb la presència de metàstasi en els nòduls limfàtics (test de Kruskal-Wallis,  $p=0.016$ ) (Figura 16C)

i amb el nombre de nòduls afectats (test de Kruskal-Wallis,  $p=0.054$ ) (Figura 16D). Totes aquestes correlacions observades fan pensar que p-4E-BP1 podria ser un factor candidat per establir el pronòstic en càncer de mama.

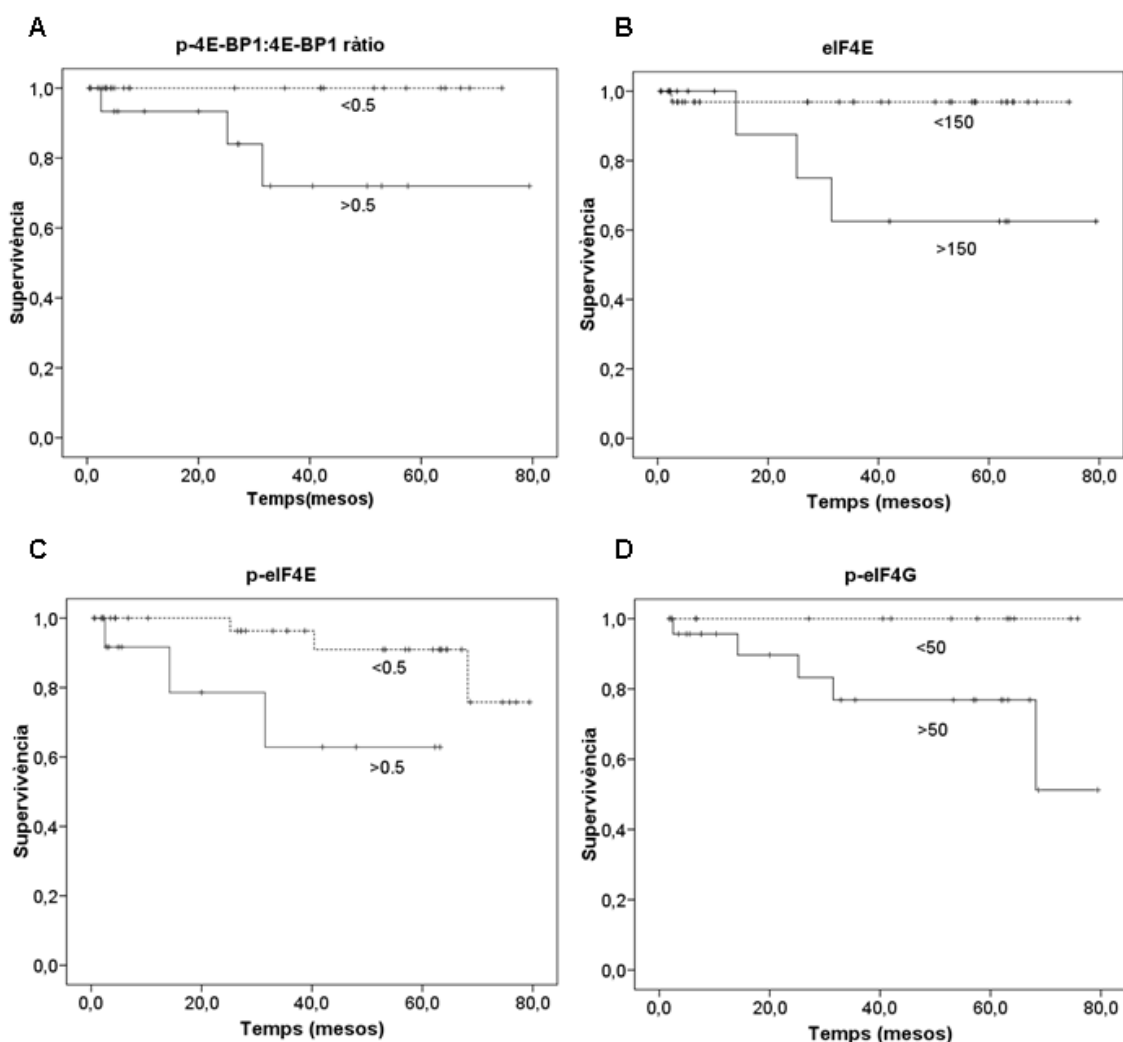


**Figura 16. Anàlisi estadística dels carcinomes de mama amb diagrames de caixes.**

- A. Correlació del p-4E-BP1 amb el grau histològic del tumor en pacients amb carcinoma de mama. La majoria de tumors amb p-4E-BP1 eren tumors d'alt grau ( $p=0.032$ )
- B. Correlació del 4E-BP1 total amb el grau histològic del tumor en pacients amb carcinoma de mama. La majoria de tumors amb 4E-BP1 eren tumors d'alt grau ( $p=0.048$ ).
- C. Ràtio de p-4E-BP1:4E-BP1 correlacionada amb presència de metàstasi en els nòduls limfàtics ( $p=0.016$ ).
- D. Ràtio de p-4E-BP1:4E-BP1 correlacionada amb el nombre de nòduls afectats ( $p=0.054$ ).

### 5.1.4 -Anàlisi de supervivència

Dels 96 casos amb càncer de mama analitzats, només 47 pacients, disposaven de dades de seguiment. De manera que l'anàlisi de supervivència es va fer amb les dades d'aquestes pacients. Es va trobar que la ràtio de p-4E-BP1:4E-BP1 correlacionava amb la supervivència (test de Kaplan-Meier,  $p=0.033$ ) (Figura 17A), així com els nivells de proteïna d'eIF4E i p-eIF4E (Kaplan Meier,  $p=0.020$  i  $p=0.025$ , respectivament) (Figura 17B i 17C). En el cas de p-eIF4G, la correlació amb la supervivència era significativa només al 10% ( $p=0.073$ ) (Figura 17D). La resta de paràmetres analitzats no mostraven cap tipus de correlació amb la supervivència.

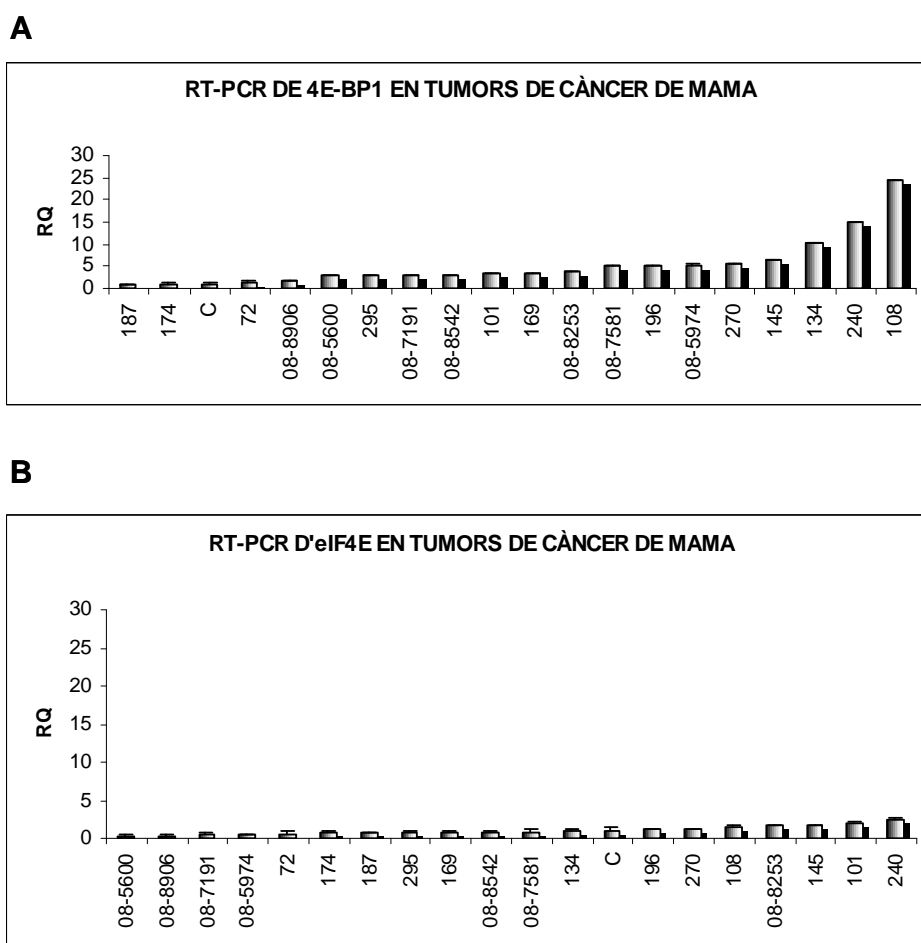


**Figura 17. Anàlisi estadística de la supervivència dels carcinomes de mama.**

- Corbes de supervivència relacionades amb la ratio de p-4E-BP1:4E-BP1 ( $p=0.033$ ).
- Corbes de supervivència relacionades amb el eIF4E ( $p=0.020$ ).
- Corbes de supervivència relacionades amb el p-eIF4E ( $p=0.025$ ).
- Corbes de supervivència relacionades amb el p-eIF4G ( $p=0.073$ ).

**5.1.5 - Anàlisi dels nivells d'RNA de 4E-BP1 en tumors de mama**

Un cop analitzats els diferents factors i obtinguts els resultats basats en els nivells de proteïna, vam considerar important esbrinar si aquest augment de proteïna es donava ja a nivell transcripcional. Per fer això es va realitzar una RT-PCR tant de 4E-BP1 com d'eIF4E de 19 casos seleccionats aleatòriament. Pel que fa als nivells d'RNA de 4E-BP1, es va observar que dels 19 casos analitzats tots presentaven aproximadament uns valors de 4E-BP1 similars entre ells (tant tumors d'alt grau com tumors de baix grau), excepte tres casos, que presentaven de 10 a 20 vegades més RNA que la mostra control; aquests tres casos no eren tumors d'alt grau (Figura 18A). Pel que fa a l'eIF4E, no es va observar cap diferència significativa en cap dels casos analitzats comparat amb la mostra control (Figura 18B). Com a mostra control es va utilitzar un *pool* d'RNA comercial de mames normals.



**Figura 18. Anàlisi dels nivells d'RNA de 4E-BP1 i eIF4E en tumors de càncer de mama.**

- A. Nivells d'RNA de 4E-BP1 en tumors de càncer de mama.
- B. Nivells d'RNA d'eIF4E en tumors de càncer de mama.



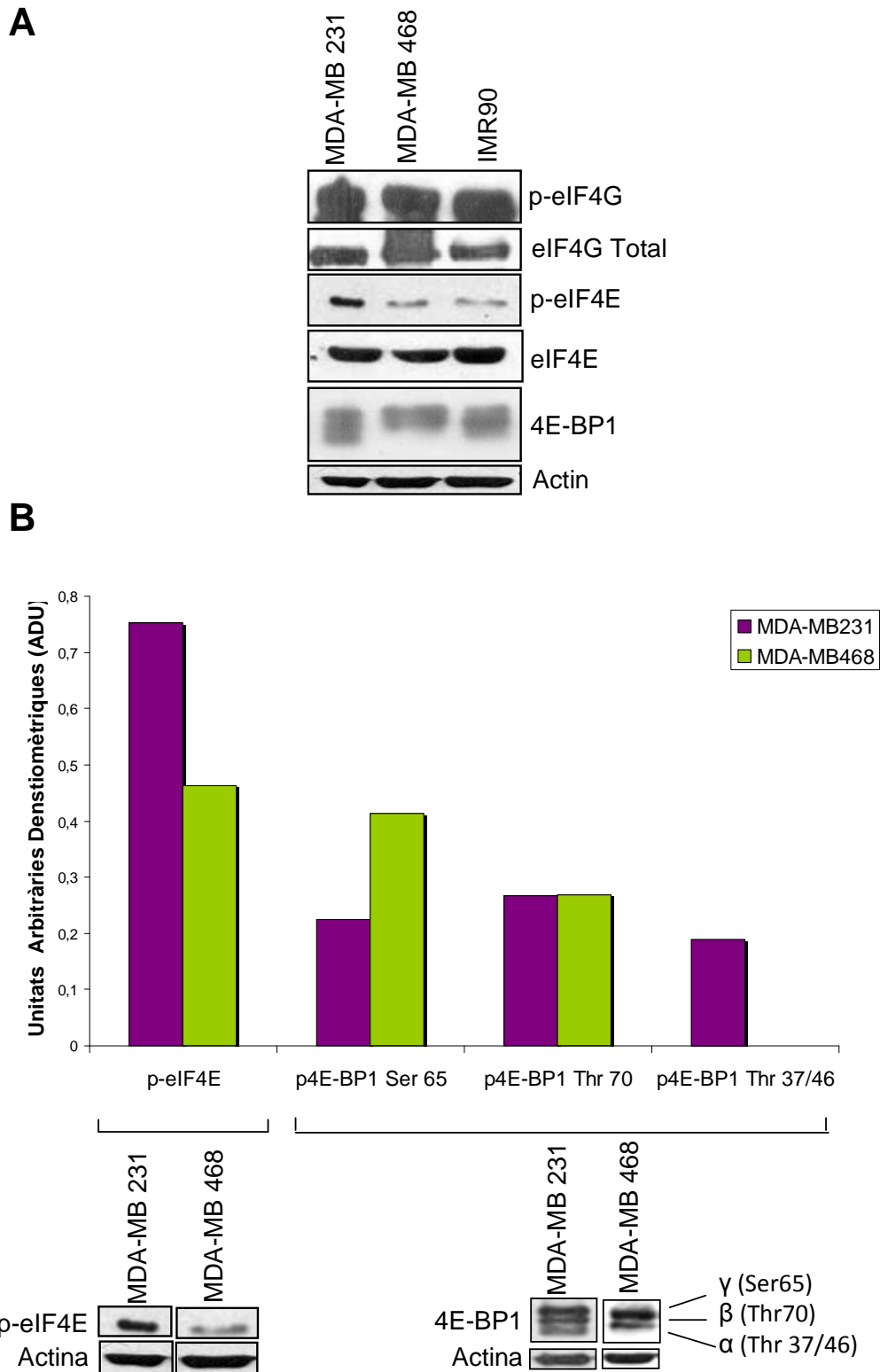
## **5.2.- ESTUDI *IN VITRO* DE LA FUNCIO DE 4E-BP1**

### **5.2.1- Formació del complex eIF4F**

Després de l'anàlisi clínica realitzada i de les dades obtingudes, on es va veure que tant 4E-BP1 com l'eIF4E tenien importància clínica en càncer de mama, vam decidir estudiar *in vitro*, per mitjà de línies cel·lulars, la formació del complex eIF4F. La iniciació de la traducció dependent de Cap és regulada per diversos factors i ve determinada per l'abundància i l'estat de fosforilació de l'eIF4E, el balanç entre els nivells cel·lulars de l'eIF4G i de les 4E-BPs, i l'estat de fosforilació de les 4E-BPs. Vam intentar establir quins d'aquests factors determinants es trobaven associats amb l'activació de la traducció dependent de Cap en dues línies cel·lulars de carcinoma de mama, les MDA-MB 231 i les MDA-MB 468 i en un model cel·lular de fibroblasts humans normals, les IMR90.

Primer de tot vam estudiar els nivells basals d'eIF4G, eIF4E i 4E-BP1 així com les seves formes fosforilades (Figura 19). L'electroforesi de 4E-BP1 en gels de poliacrilamida separa tres isoformes diferents de 4E-BP1: l' $\alpha$ , la  $\beta$  i la  $\gamma$ . La banda  $\gamma$  correspon a la forma hiperfosforilada de 4E-BP1 (Ser 65, Thr 70 i Thr 37/46), la banda  $\beta$  correspon a les fosforilacions en els residus Thr 70 i Thr 37/46 i la banda  $\alpha$  correspon a la seva forma menys fosforilada (Thr 37/46) (Yang and Kastan 2000; Avdulov et al. 2004; Constantinou and Clemens 2005). En aquest estudi vam veure que els nivells d'expressió de p-eIF4E eren inferiors a MDA-MB 468 que a MDA-MB 231 (Figura 19B) i que els nivells de p-4E-BP1 Ser 65 eren superiors. Així doncs, les MDA-MB 468 al tenir el 4E-BP1 hiperfosforilat podrien presentar alteracions que activen l'eIF4E, incrementant la seva associació amb l'eIF4G i, afavorint així la formació del complex eIF4F.

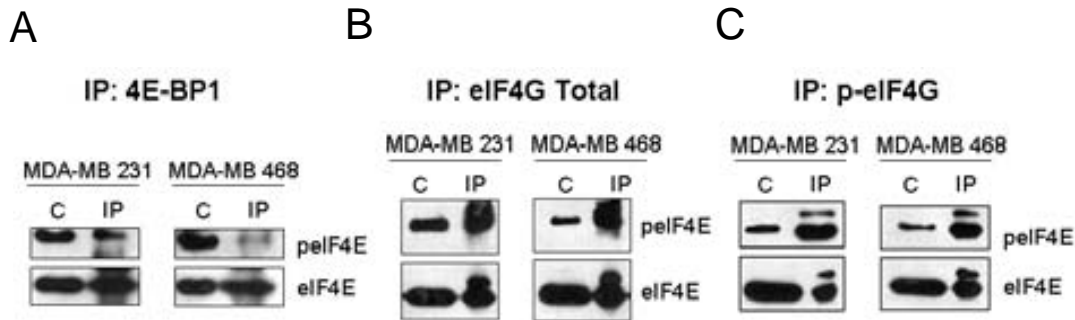
A partir de lisats cel·lulars, es va realitzar una immunoprecipitació, per tal de veure la rellevància de la fosforilació de l'eIF4E en la unió a 4E-BP1 o eIF4G. Els resultats obtinguts indicaven que l'eIF4E té la capacitat d'unir-se al 4E-BP1 independentment del seu estat de fosforilació (Figura 20A). Malgrat tot, hi havia algunes diferències pel que fa a les dues línies cel·lulars. Semblava que a les MDA-MB 231, la forma fosforilada de l'eIF4E tenia més afinitat pel 4E-BP1 que les MDA-MB 468. Aquesta diferència es podria explicar per les variacions que hi ha a les vies de senyalització d'aquestes cèl·lules degut al seu estat



**Figura 19. Expressió dels nivells basals de 4E-BP1, eIF4E i eIF4G i les seves formes fosforilades en línies tumorals de càncer de mama i en fibroblasts humans normals.**

- A. *Western Blot* dels nivells basals de 4E-BP1, eIF4E i eIF4G i les seves formes fosforilades.
- B. Quantificació densitomètrica dels nivells de p-eIF4E i p-4E-BP1 en les dues línies de carcinoma de mama, MDA-MB 231 i MDA-MB 468.

d'activació o la seva estequiometria molecular, ja que les MDA-MB 468 tenen molt poc p-eIF4E basal. Per altra banda, ni la fosforilació d'eIF4E ni la d'eIF4G afectaven la unió entre aquestes dues proteïnes, que a més, no presentaven diferències entre les línies cel·lulars analitzades (Figura 20B-C).



**Figura 20. Anàlisi de la formació del complex eIF4F en dues línies de carcinoma de mama.**

- A. Detecció d'eIF4E i p-eIF4E per *Western Blot* en una immunoprecipitació amb 4E-BP1. El control és la mostra no precipitada.
- B. Immunoprecipitació amb eIF4G i detecció d'eIF4E i p-eIF4E per *Western Blot*.
- C. Immunoprecipitació amb p-eIF4G i detecció d'eIF4E i p-eIF4E per *Western Blot*.

**5.2.2.- Efecte de la sobreexpressió de 4E-BP1 wt i un 4E-BP1 mutant sobre la proliferació cel·lular**

L'afinitat de 4E-BP1 per l'eIF4E ve determinada per l'estat de fosforilació de 4E-BP1. La presència de fòsfats en els residus Thr 37/46 és requerida perquè es produeixi la fosforilació dels residus C-terminals Ser 65 i Thr 70. Per determinar la importància d'aquests residus en la capacitat proliferativa de la cèl·lula es van infectar diferents tipus cel·lulars amb un vector retroviral que codificava per la forma 4E-BP1 wt i amb un vector retroviral que codificava per una forma de 4E-BP1 mutant on els 4 llocs principals de fosforilació de la proteïna (Thr 37/46, Thr 70 i Ser 65) van ser canviats per alanines. De manera que aquest 4E-BP1 mutant s'uniria constitutivament a l'eIF4E i inhibiria la traducció de proteïnes dependent de Cap, ja que no es podria inactivar per fosforilació. Es van infectar les línies cel·lulars MDA-MB 231, MDA-MB 468 i IMR90 (fibroblasts humans normals) amb aquests vectors i es va observar el seu efecte sobre la proliferació cel·lular (Figura 21). En el cas de les IMR90, l'expressió ectòpica de 4E-BP1 provocava una disminució de la proliferació

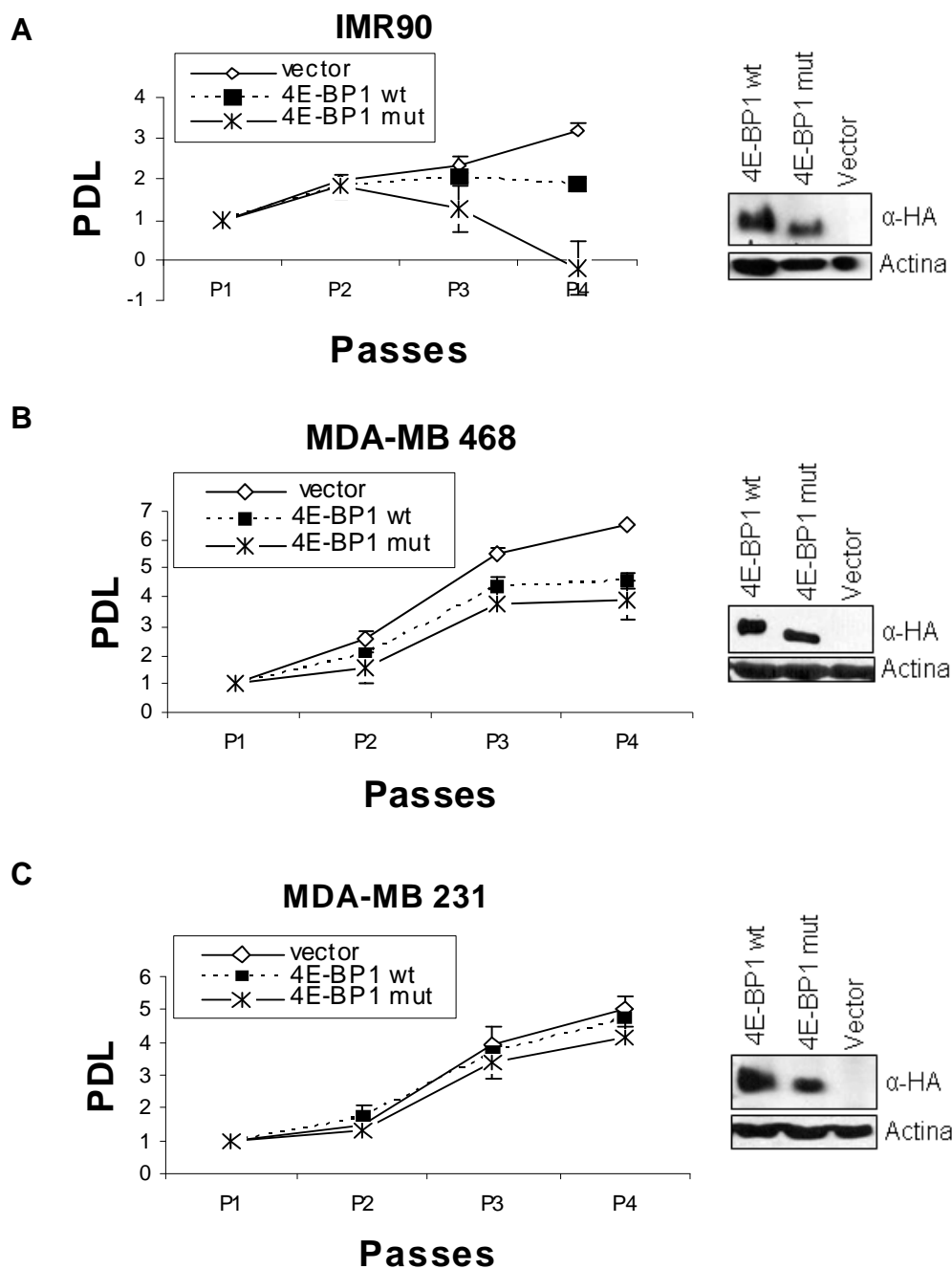


Figura 21. Efecte de 4E-BP1 wt i 4E-BP1 mutant sobre la proliferació cel·lular en cèl·lules infectades estables.

A. La sobreexpressió de 4E-BP1 en IMR90 suprimia significativament la proliferació cel·lular mentre que la forma mutant de 4E-BP1 provocava la mort cel·lular.

B. La proliferació de les MDA-MB 468 es va suprimir quan 4E-BP1 wt i la forma mutant de 4E-BP1 eren sobreexpressades a la cèl·lula.

C. No es va observar cap efecte significatiu sobre la proliferació de les MDA-MB231 quan el 4E-BP1 wt i el 4E-BP1 mutant eren sobreexpressats.

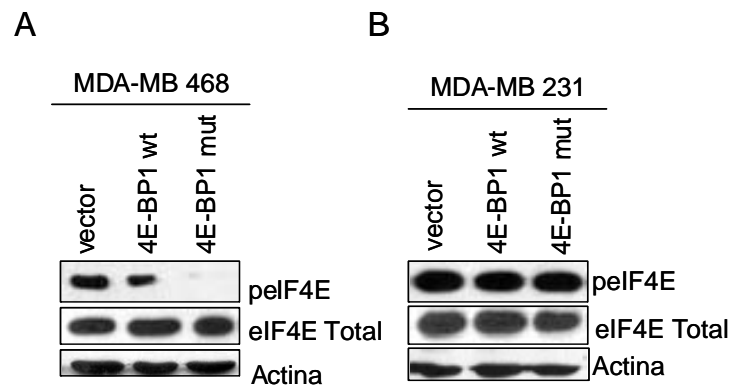
En tots els casos es va confirmar l'expressió ectòpica del 4E-BP1 mitjançant un *Western Blot* contra l'HA.

cel·lular comparat amb les cèl·lules que contenen el vector buit. A més a més, l'efecte sobre la proliferació era més gran quan s'expressava el 4E-BP1 mutant, on s'indueïa la mort cel·lular. Pel que fa a les línies cel·lulars de carcinoma de mama infectades, la disminució de la proliferació cel·lular era molt més evident en les MDA-MB 468 que en les MDA-MB 231, tant amb la forma wt de 4E-BP1 com amb la forma mutant. Les diferències observades en el context molecular d'aquestes dues línies cel·lulars com la hiperfosforilació de 4E-BP1 a les MDA-MB 468 i la poca quantitat de p-eIF4E, podrien explicar les diferències obtingudes després de sobreexpressar el 4E-BP1. A més a més cal destacar que aquestes dues línies cel·lulars presenten mutacions a diferents gens; les MDA-MB 468 tenen mutacions a *RB*, *PTEN*, *p53* i *SMAD4*, mentre que les MDA-MB 231 tenen mutacions a *KRAS*, *BRAF*, *p53* i *CDKN2A (p16)*. En tots els casos, l'expressió ectòpica del 4E-BP1 (HA-4E-BP1) es va confirmar per mitjà d'un *Western Blot* contra l'HA. Les cèl·lules que contenen el 4E-BP1 wt o bé la forma mutant de 4E-BP1 van mostrar expressió d'HA, mentre que les cèl·lules infectades amb el vector buit no mostraven cap tipus d'expressió HA.

### **5.2.3.- Fosforilació d'eIF4E i agressivitat cel·lular**

Com ja hem comentat anteriorment, el significat biològic de la fosforilació de l'eIF4E i el seu efecte en la traducció crea encara controvèrsia. Vam voler analitzar l'estat de fosforilació de l'eIF4E en les cèl·lules de carcinoma de mama que contenen el 4E-BP1 wt i el 4E-BP1 mutant. Novament, vam observar diferències pel que feia a les dues línies cel·lulars analitzades (Figura 22). En el cas de les MDA-MB 468 les cèl·lules que contenen el 4E-BP1 mutant no mostraven fosforilació de l'eIF4E, mentre que sí s'observava fosforilació de l'eIF4E en les cèl·lules amb vector buit o sobreexpressió de 4E-BP1 wt. Per contra, a les MDA-MB 231 no es van observar diferències pel que feia a la fosforilació de l'eIF4E, entre les cèl·lules que sobreexpressaven el vector buit, el 4E-BP1 wt o bé el 4E-BP1 mutant.

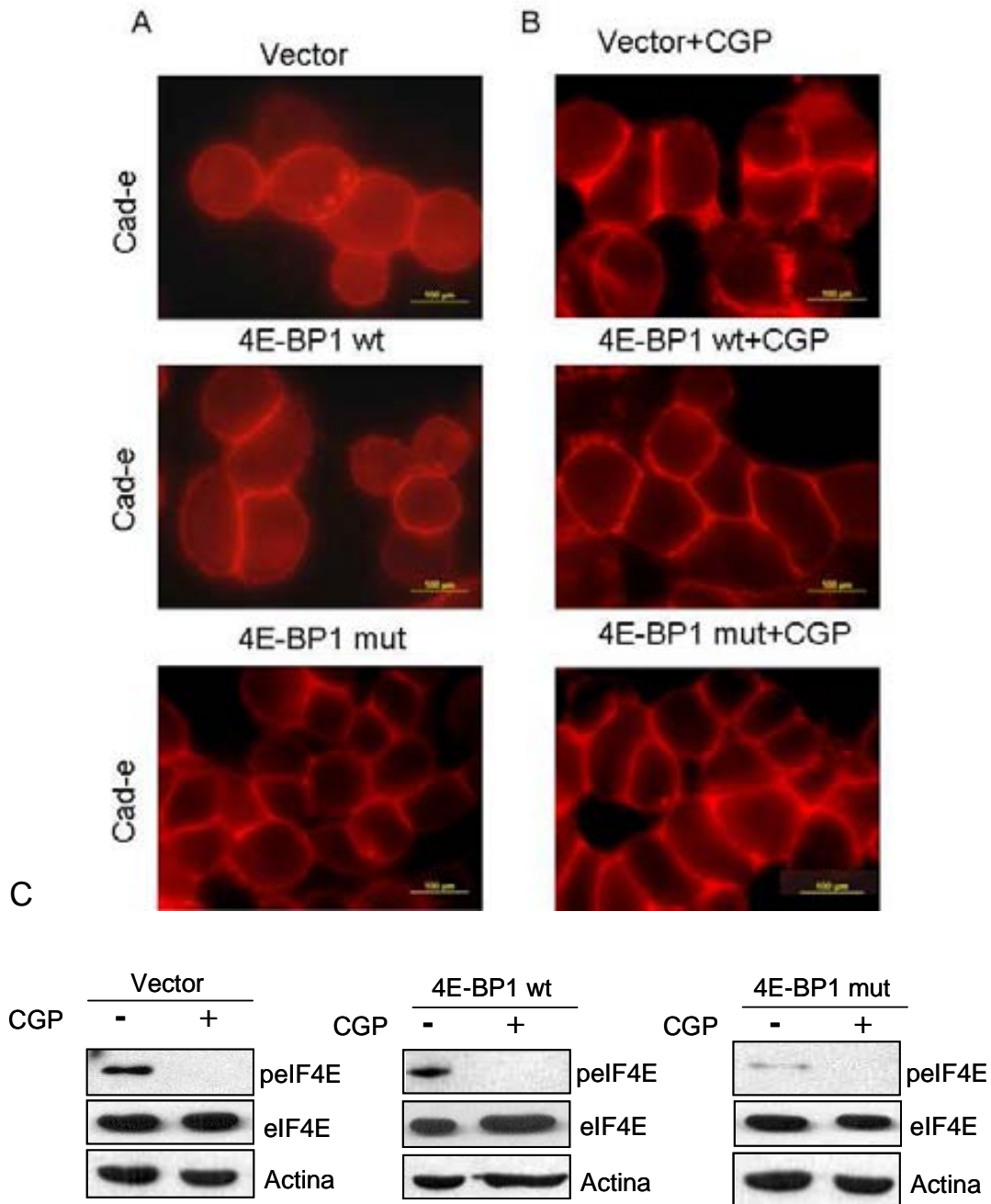
Per veure si podíem relacionar la forma fosforilada de l'eIF4E amb agressivitat cel·lular es va inhibir la fosforilació de l'eIF4E per mitjà del tractament de les cèl·lules control MDA-MB 468 <sup>vector buit</sup>, les MDA-MB 468 <sup>4E-BP1 wt</sup> i les MDA-MB 468 <sup>4E-BP1 mut</sup> amb un inhibidor de les MNKs, el CGP5780. Vam



**Figura 22. Anàlisi de l'estat de fosforilació de l'eIF4E en cèl·lules de càncer de mama que sobreexpressen 4E-BP1 wt i 4E-BP1 mutant.**

- A. *Western blot* de l'eIF4E total i p-eIF4E a MDA-MB 468.
- B. *Western blot* de l'eIF4E total i p-eIF4E a MDA-MB 231.

observar que el tractament amb l'inhibidor d'MNKs induïa una parada en el creixement cel·lular i les cèl·lules adquirien una morfologia més compacta. Segons aquests resultats vam hipotetitzar que aquestes cèl·lules tractades podrien expressar algunes proteïnes d'adhesió cel·lular, com cadherina-E. La cadherina-E és una molècula d'adhesió i un descens de la seva expressió és indicador de major agressivitat tumoral. D'aquesta manera volíem veure si aquelles cèl·lules que tenien pocs nivells de p-eIF4E relacionaven de manera inversa amb l'expressió de cadherina-E. Per comprovar aquesta hipòtesi, vam analitzar per immunocitofluorescència la localització i l'expressió de la cadherina-E en cèl·lules MDA-MB 468 que contenien el vector buit, el 4E-BP1 wt o el 4E-BP1 mutant abans i després del tractament amb l'inhibidor de les MNKs (Figura 23). Les cèl·lules MDA-MB 468 <sup>4E-BP1 mut</sup>, que havien mostrat uns nivells molt més baixos de p-eIF4E que les cèl·lules amb vector buit o 4E-BP1 wt, mostraven una localització de la cadherina-E a la membrana, mentre que les cèl·lules control, MDA-MB 468 <sup>vector buit</sup>, o bé les MDA-MB 468 <sup>4E-BP1 wt</sup> presentaven una localització més citoplasmàtica. Per contra, després del tractament amb l'inhibidor d'MNKs es va observar una relocalització de la cadherina-E a la membrana tant a les cèl·lules amb vector buit com a les cèl·lules amb el 4E-BP1 wt.



**Figura 23. Anàlisi de l'expressió de cadherina-E en cèl·lules de càncer de mama, MDA-MB 468, que sobreexpressen 4E-BP1 wt i 4E-BP1 mutant.**

- A. Expressió de cadherina-E en MDA-MB 468 amb vector buit i sobreexpressió de 4E-BP1 wt i 4E-BP1 mutant. Les cèl·lules amb la sobreexpressió del 4E-BP1 mutant mostraven una relocalització de la cadherina-E a la membrana cel·lular.
- B. Expressió de cadherina-E sota els efectes d'un inhibidor de les MNKs, el CGP. La cadherina-E era relocalitzada a membrana en tots els casos, després de la inhibició de la fosforilació de l'eIF4E.
- C. Control de *Western Blot* per veure que la inhibició del p-eIF4E s'havia produït.

### **5.3.- ESTUDI IN VIVO DE LA FUNCIO DE 4E-BP1**

#### **5.3.1- Efecte de la sobreexpressió de 4E-BP1 en xenografts**

Per tal d'investigar com la sobreexpressió de 4E-BP1 podia intervenir en la reducció de tumorigènesi *in vivo*, les cèl·lules MDA-MB 468 i MDA-MB 231, que sobreexpressaven el 4E-BP1 wt o bé el 4E-BP1 mutant, així com les que contenien el vector buit, es van injectar en els flancs posteriors de ratolins atímics i es va fer un seguiment del creixement del tumor al llarg de 54 dies. Pel que fa a les cèl·lules MDA-MB 231, tant les que expressaven el vector buit com la forma wt de 4E-BP1, van formar tumors amb un període de latència de 5 dies, mentre que les cèl·lules que sobreexpressaven el 4E-BP1 mutant formaven tumors amb un període de latència més llarg (els tumors no es van fer aparents fins a 12 dies després de la injecció). Malgrat tot, les diferències observades pel que feia a la mida del tumor no van ser estadísticament significatives al llarg dels 54 dies que va durar l'experiment (Figura 24). A dia 54, dia del sacrifici del ratolí, es van extirpar els tumors i les mostres obtingudes es van lissar per tal d'obtenir extracte proteic. Amb la finalitat de veure si al final de l'experiment encara es mantenia l'expressió ectòpica de 4E-BP1, es va realitzar un *Western Blot* contra HA de totes les mostres tumorals obtingudes. Es va observar que tots els tumors encara mantenien l'expressió ectòpica del 4E-BP1 (Figura 24C).

En el cas de les cèl·lules MDA-MB 468, les que sobreexpressaven el vector buit van formar tumors amb un període de latència de 7 dies, mentre que les cèl·lules que sobreexpressaven el 4E-BP1 wt o bé el 4E-BP1 mutant van formar tumors amb un període de latència molt més llarg. Els tumors formats per les cèl·lules MDA-MB 468 que sobreexpressaven el 4E-BP1 wt no es van fer aparents fins a dia 12 després de la injecció, mentre que els tumors formats pel 4E-BP1 mutant no es van fer aparents fins a dia 26 després de la injecció. En aquest model cel·lular, les cèl·lules que expressaven el 4E-BP1 wt o el 4E-BP1 mutant van mostrar diferències estadísticament significatives pel que feia a la mida del tumor a l'inici de l'experiment (dia 7) i a la meitat de l'experiment (dia 26), mostrant un valor de p inferior a 0.05 ( $p=0.0042$  pel que feia a dia 7 i  $p=0.0035$  pel que feia a dia 26, test de Kruskal-Wallis). Al final de l'experiment, dia 54, malgrat que es mantenia la minoració del creixement del tumor, les

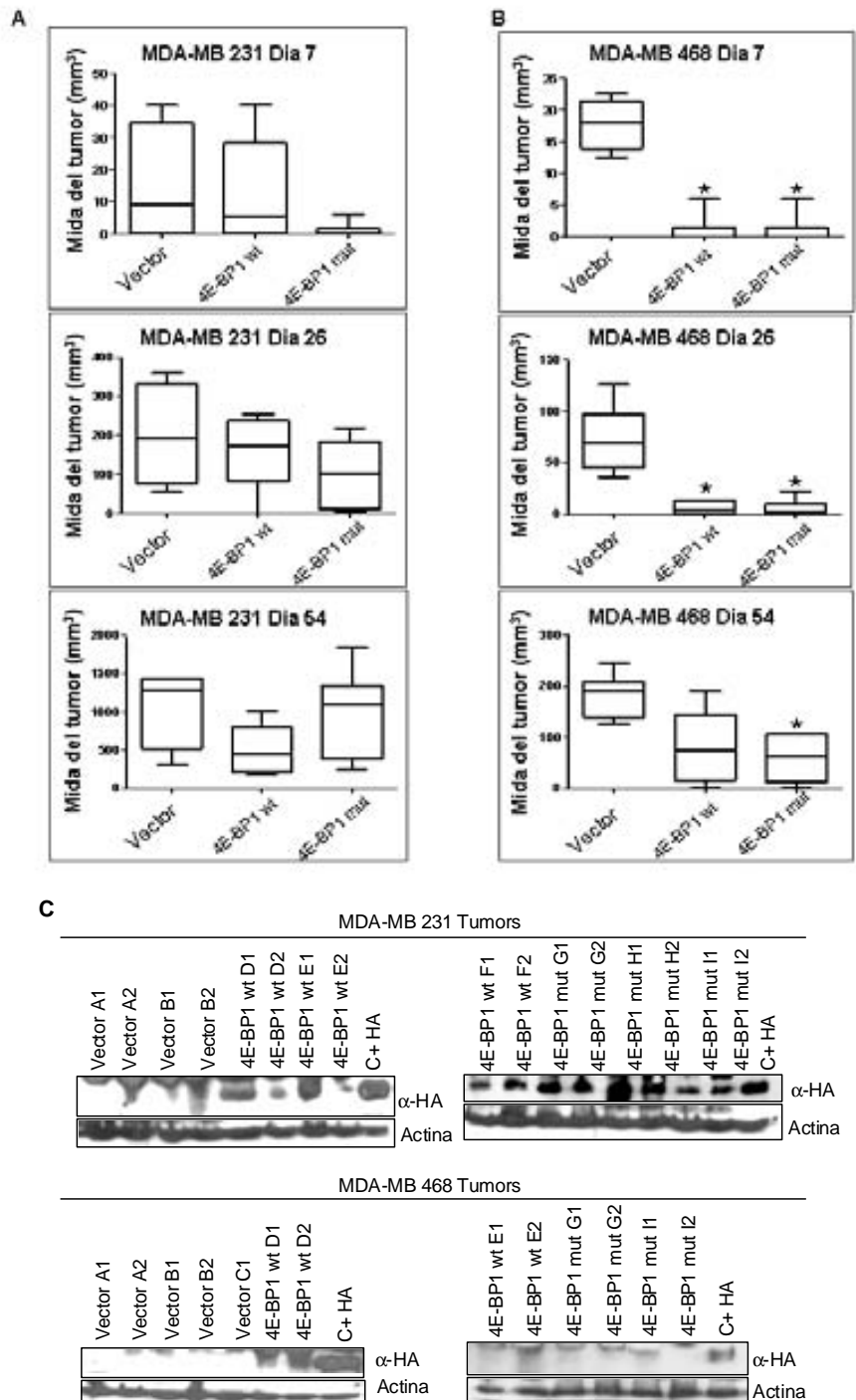


diferències observades només eren estadísticament significatives en les cèl·lules que contenien la forma mutant de 4E-BP1 respecte el vector buit ( $p=0.0128$ , test de Kruskal-Wallis) (Figura 24B). En aquest cas, quan es va comprovar l'expressió ectòpica de 4E-BP1, per mitjà de la realització d'un *Western Blot* contra l'HA, es va veure que la majoria dels tumors havien perdut l'expressió ectòpica de 4E-BP1 (Figura 24C). Això podria explicar perquè els tumors que sobreexpressaven el 4E-BP1 wt o bé el 4E-BP1 mutant van començar a créixer d'una manera més accelerada els dies finals de l'experiment.

#### **5.4.- ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE 4E-BP1 PER FOSFORILACIÓ**

Després d'obtenir els resultats clínics amb tumors humans, on 4E-BP1 i sobretot la seva forma fosforilada, semblava jugar un paper important en la formació de tumors en càncer de mama, i un cop confirmats aquests resultats clínics amb estudis tant *in vitro* com *in vivo*, on la sobreexpressió d'aquesta proteïna i de la seva forma mutada, determinava la viabilitat de la cèl·lula i la seva capacitat proliferativa, ens vam plantejar estudiar com es podia regular la fosforilació de 4E-BP1 i quines vies podien estar-hi implicades.

Des del descobriment de 4E-BP1 i la seva implicació en el càncer han sigut molts els estudis que han intentat esbrinar quines quinases cel·lulars podien estar implicades en la fosforilació d'aquesta proteïna. Com ja hem comentat anteriorment, mTOR és l'única quinasa descrita fins el moment que s'encarrega de fosforilar els residus de l'extrem N-Terminal (Thr 37/46) i intervé en la fosforilació del residu Thr 70 a l'extrem C-Terminal, per mitjà de l'activació d'alguna altra quinasa. Però quina és la quinasa encarregada de fosforilar directament el residu Thr 70 i quina s'encarrega de fosforilar el residu Ser 65, també a l'extrem C-Terminal, és encara una incògnita a dia d'avui. És cert, que en els darrers anys, diversos estudis han intentat donar nom a aquestes quinases i s'hi han implicat diverses proteïnes, com SRC, ATM, PIM2, CDK1 i p38.



**Figura 24. Efecte de la sobreexpressió de 4E-BP1 wt o 4E-BP1 mut en cèl·lules MDA-MB 231 i MDA-MB 468. El creixement del tumor es va avaluar als intervals indicats.**

**A.** Volum del tumor de les MDA-MB 231 a dia 7, 26, i 54 després de la injecció. No es van observar diferències estadísticament significatives al llarg de l'experiment.

**B.** Volum del tumor de les MDA-MB 468 a dia 7 ( $p=0.0042$ ), 26 ( $p=0.0035$ ), i 54 ( $p=0.0128$ ) després de la injecció de les cèl·lules cancerígenes.

**C.** Expressió ectòpica de 4E-BP1 a dia 54 analitzada per *Western Blot*. Les mostres tumorals d'MDA-MB 231 i MDA-MB 468 es van extreure al moment de l'eutanàsia.

#### **5.4.1.- Anàlisi de la fosforilació de 4E-BP1 sota l'efecte de quinases ja descrites anteriorment (CDK1 i mTOR)**

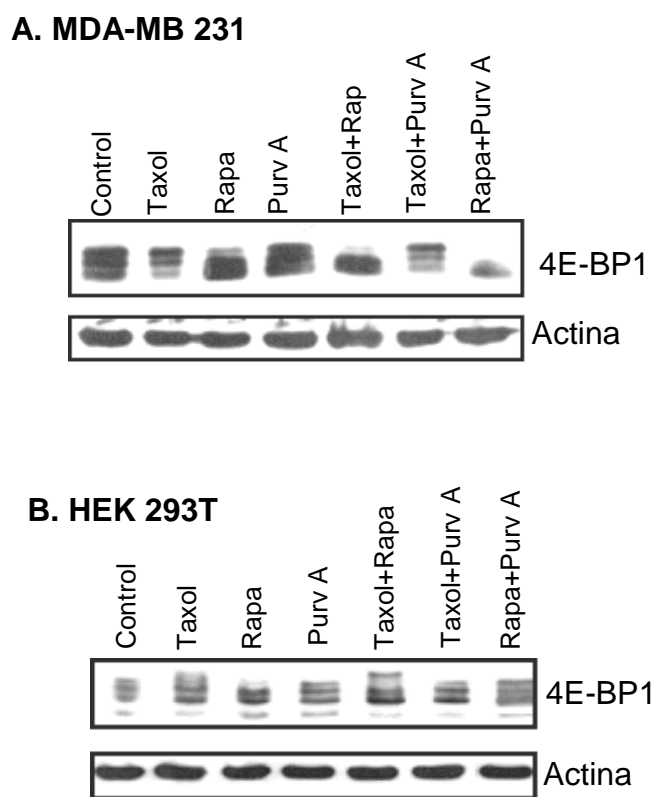
##### **- El Taxol indueix la hiperfosforilació de 4E-BP1**

Els tractaments terapèutics contra el càncer activen diferents vies que paradoxalment, poden dur a la supervivència cel·lular (Johnstone et al. 2002). El tractament amb Taxol activa la via de la PI3K/AKT, que pot acabar amb l'activació d'mTOR i conseqüentment amb la inactivació de 4E-BP1, provocant així un increment de la traducció de proteïnes dependent de Cap. Això podria reduir la citotoxicitat causada pel Taxol i, possiblement, conduir a les cèl·lules a l'adquisició d'una quimioresistència (Greenberg and Zimmer 2005). Per determinar si el Taxol altera la fosforilació de 4E-BP1 de la mateixa manera en diferents tipus de teixit, es va tractar la línia cel·lular de carcinoma de mama MDA-MB 231 (que ja teníem caracteritzada amb estudis *in vitro* i *in vivo*) i una línia embrionària de ronyó (HEK 293T) com a control no tumoral, a una concentració de Taxol de 25 nM durant 24 hores. Abans del tractament, les cèl·lules es van pre-incubar 12 hores en medi sense sèrum per tal de minimitzar els efectes extracel·lulars de fosforilació i supervivència cel·lular. Com es mostra a la Figura 25, el tractament amb Taxol provocava un increment en la fosforilació de 4E-BP1 observat per la diferència de mobilitat de les bandes de fosforilació en el gel. Tot i així es van detectar diferents graus de fosforilació en les diferents línies cel·lulars. Pel que fa a la línia cel·lular MDA-MB 231 es va observar un increment en la intensitat de la tercera banda (que correspon a la fosforilació al residu Ser 65). I a la línia cel·lular HEK 293T es va detectar l'aparició d'una quarta banda de fosforilació en resposta al Taxol.

##### **- La rapamicina actua defosforilant 4E-BP1 a les línies MDA-MB 231 i HEK 293T**

Múltiples cascades de senyalització indueixen la fosforilació de 4E-BP1, incloent RAS/PI3K/AKT/mTOR (Rhoads 1999; Schmelzle and Hall 2000; Raught et al. 2001). Aquesta via pot ser activada per factors de creixement extracel·lulars a través dels seus coneguts receptors, provocant una fosforilació de 4E-BP1 a través de la proteïna quinasa mTOR (Gingras et al. 2001). En

aquest estudi vam examinar l'efecte de la rapamicina, un inhibidor directe de la proteïna quinasa mTOR, sobre l'estat de fosforilació de 4E-BP1 a les cèl·lules MDA-MB 231 i HEK 293T. Per tal de minimitzar els efectes extracel·lulars sobre la fosforilació i senyals de supervivència cel·lular, les cèl·lules es van preincubar 12 hores en medi sense sèrum. L'anàlisi per *Western blot* va revelar que aquestes cèl·lules responien de manera similar al tractament amb rapamicina. La rapamicina causava la defosforilació de 4E-BP1. En el gel s'observava un augment de la banda que migra més avall, corresponent a la forma hipofosforilada de 4E-BP1 (Figura 25).



**Figura 25.** Anàlisi de l'estat de fosforilació de 4E-BP1 en diferents línies cel·lulars tractades amb Taxol (25 nM, 24 h), rapamicina (30 nM, 6 h) i purvalanol (10 µM, 6 h) per *Western Blot*.

- A. Anàlisi de la fosforilació de 4E-BP1 en les MDA-MB 231 sota l'efecte del Taxol, la rapamicina i el Purvalanol.
- B. Anàlisi de la fosforilació de 4E-BP1 en les HEK 293T sota l'efecte del Taxol, la rapamicina i el Purvalanol.

### **- El Purvalanol, un inhibidor de la CDK1, inhibeix la fosforilació de 4E-BP1 causada pel Taxol**

Com altres autors han descrit anteriorment un dels mecanismes a través del qual el Taxol pot fosforilar 4E-BP1 és a través del complex ciclina B-CDK1 (Greenberg and Zimmer 2005). Per tal d'esbrinar si el complex ciclina B-CDK1 actua de la mateixa manera en els diferents tipus cel·lulars, es va mirar l'estat de fosforilació de 4E-BP1 a MDA-MB 231 i HEK 293T, en resposta al Purvalanol A; aquest inhibidor impedeix l'activació de diferents quinases (CDK1, CDK2, CDK5 i CDK7). El tractament amb Purvalanol va causar una defosforilació de 4E-BP1 amb un increment de la banda no fosforilada, la Thr 37/46 (banda  $\alpha$ ) a les línies MDA-MB 231 i HEK 293T (Figura 25). Amb el tractament combinat amb Taxol i Purvalanol es va observar que a les HEK 293T, que mostraven l'aparició d'una quarta banda de fosforilació en resposta al Taxol aquesta banda desapareixia al tractar-les amb Purvalanol. Pel que fa a les MDA-MB 231, on no vam observar l'aparició d'aquesta quarta banda en resposta al Taxol, el co-tractament amb Purvalanol produïa un lleuger efecte en la defosforilació de 4E-BP1, sobretot a la banda corresponent a la Thr 70.

La serina treonina quinasa mTOR és la responsable de la fosforilació de 4E-BP1 en els residus Thr 37/46. La fosforilació de 4E-BP1 en aquests residus és requerida per la fosforilació de 4E-BP1 a altres llocs que, al seu torn, és necessària per trencar la unió de 4E-BP1 al factor d'iniciació eIF4E. El tractament amb Taxol ha estat associat a l'activació d'mTOR a la fase mitòtica del cycle cel·lular. Per tant, la inhibició d'mTOR podria inhibir la hiperfosforilació de 4E-BP1 en resposta al Taxol.

Per tal d'esbrinar si mTOR es trobava implicat en la hiperfosforilació de 4E-BP1 induïda pel Taxol, les cèl·lules es van co-tractar amb Taxol i rapamicina. Sorprenentment les dues línies cel·lulars diferien en la seva resposta. La línia MDA-MB 231 mostrava una reducció de la fosforilació de 4E-BP1. Per altra banda, la línia HEK 293T mostrava un efecte totalment diferent. En aquesta línia no baixava la quarta banda de fosforilació causada pel Taxol, però sí que baixava la tercera banda de fosforilació, que com s'ha descrit, depèn de l'efecte d'mTOR (Figura 25). Això podria suggerir que en aquest tipus cel·lular, la fosforilació causada pel Taxol és independent de la via d'mTOR.

Per tal de veure si la via de fosforilació mTOR i la via de fosforilació de CDK1 tenien un efecte sinèrgic sobre l'estat de fosforilació de 4E-BP1 es va mirar l'efecte d'un co-tractament amb rapamicina i Purvalanol A. Es van tractar les diferents línies cel·lulars amb rapamicina i Purvalanol A. Només es va observar un efecte sinèrgic a la línia MDA-MB 231, on s'observava només una banda de fosforilació de 4E-BP1, corresponent a la forma hipofosforilada de la proteïna (Figura 25).

### **5.4.2.- Estudi de noves quinases que podrien estar implicades en la fosforilació de 4E-BP1.**

#### **- Selecció de 48 quinases cel·lulars que poden estar implicades en la fosforilació de 4E-BP1**

Obtinguts aquests resultats, vam realitzar un estudi més exhaustiu analitzant 48 quinases cel·lulars que podien ser candidates a fosforilar 4E-BP1. Per tal de fer la selecció es van escollir diverses quinases que formen part de diferents rutes de senyalització cel·lular. Les quinases són proteïnes clau en la regulació de les funcions cel·lulars i constitueixen un dels grups de proteïnes més grans i funcionalment diversos. Per mitjà de l'adició de grups fosfat a les seves proteïnes diana dirigeixen l'activitat, localització i funcionalitat de diverses proteïnes, i serveixen per dirigir l'activitat de la majoria de processos cel·lulars. De les 518 proteïnes quinasa humanes, 478 pertanyen a una superfamília on els seus dominis catalítics es troben relacionats pel que fa a la seqüència. Aquests es poden classificar en grups, famílies i subfamílies.

L'arbre de quinases (kinoma) mostra la similitud de seqüència entre els dominis catalítics: la distància de les branques entre dues quinases és proporcional a la divergència entre les seves seqüències (Figura 26). Hi ha 7 grups majoritaris. **CaMK** [*Calmodulin dependent kinases*], **AGC** [*cAMP-dependent protein kinase (PKA) / protein kinase G / protein kinase C (PKC)*], **CMGC** [*Cyclin-dependent kinases (CDKs), mitogen-activated protein kinases (MAPK), Glycogen synthase kinases (GSK), CDK-like kinases*], **TKL** [*Tyrosine kinase-like*], **TK** [*tyrosine kinase*], **STE** [*Sterile*; les quinases identificades en aquest grup es van descobrir en anàlisis genètics de mutants de llevat estèrils], **CK1** [*Casein kinases*]. El grup de les tirosina quinasa forma un grup diferent ja

que els seus membres fosforilen les proteïnes a residus tirosina, mentre que tots els altres grups fosforilen primàriament residus serina i threonina. També trobem un **grup atípic** de quinases, aquestes no mostren similitud de seqüència amb les quinases típiques, però se sap, o es prediu, que tenen activitat enzimàtica, i algunes d'elles tenen una estructura similar a les quinases típiques. I per acabar, hi ha altres quinases, com IKK i TBK1, que no pertanyen a cap grup en concret.

Les 48 quinases que van ser seleccionades com a possibles candidates a fosforilar 4E-BP1 es mostren resumides a la Taula 3 (material i mètodes). Es va intentar fer una selecció on s'incloguessin quinases dels diferents grups i que afectessin a les diferents rutes cel·lulars implicades en la regulació del metabolisme i creixement cel·lular.

#### **- Anàlisi de l'estat de fosforilació de 4E-BP1 un cop inhibida la quinasa corresponent**

Un cop feta la selecció, es va inhibir cada una d'aquestes quinases per mitjà de la transfecció d'un siRNA i, posteriorment, es va realitzar un *Western Blot* contra 4E-BP1 per veure com la inhibició d'aquesta quinasa afectava a la seva fosforilació. El que esperàvem veure era que aquelles quinases que estiguessin implicades en la fosforilació de 4E-BP1, a l'inhibir-les, es veiés una baixada de la fosforilació de dita proteïna (Figures 27, 28, 29 i 30). Com a controls positius de que la tècnica de transfecció havia funcionat es van utilitzar un siRNA contra 4E-BP1, on vam veure una total inhibició de 4E-BP1 i un siRNA contra mTOR, quinasa descrita i confirmada que fosforila 4E-BP1, i on vam veure una baixada de la fosforilació de 4E-BP1. A més a més també vam utilitzar la rapamicina com a control positiu on vam observar una baixada de la fosforilació de 4E-BP1 després del tractament. Com a controls negatius, on no vam veure cap canvi pel que feia a l'estat de fosforilació de 4E-BP1, vam utilitzar un siRNA *non target* (que no tenia cap diana a la cèl·lula) i un siRNA contra GAPDH.

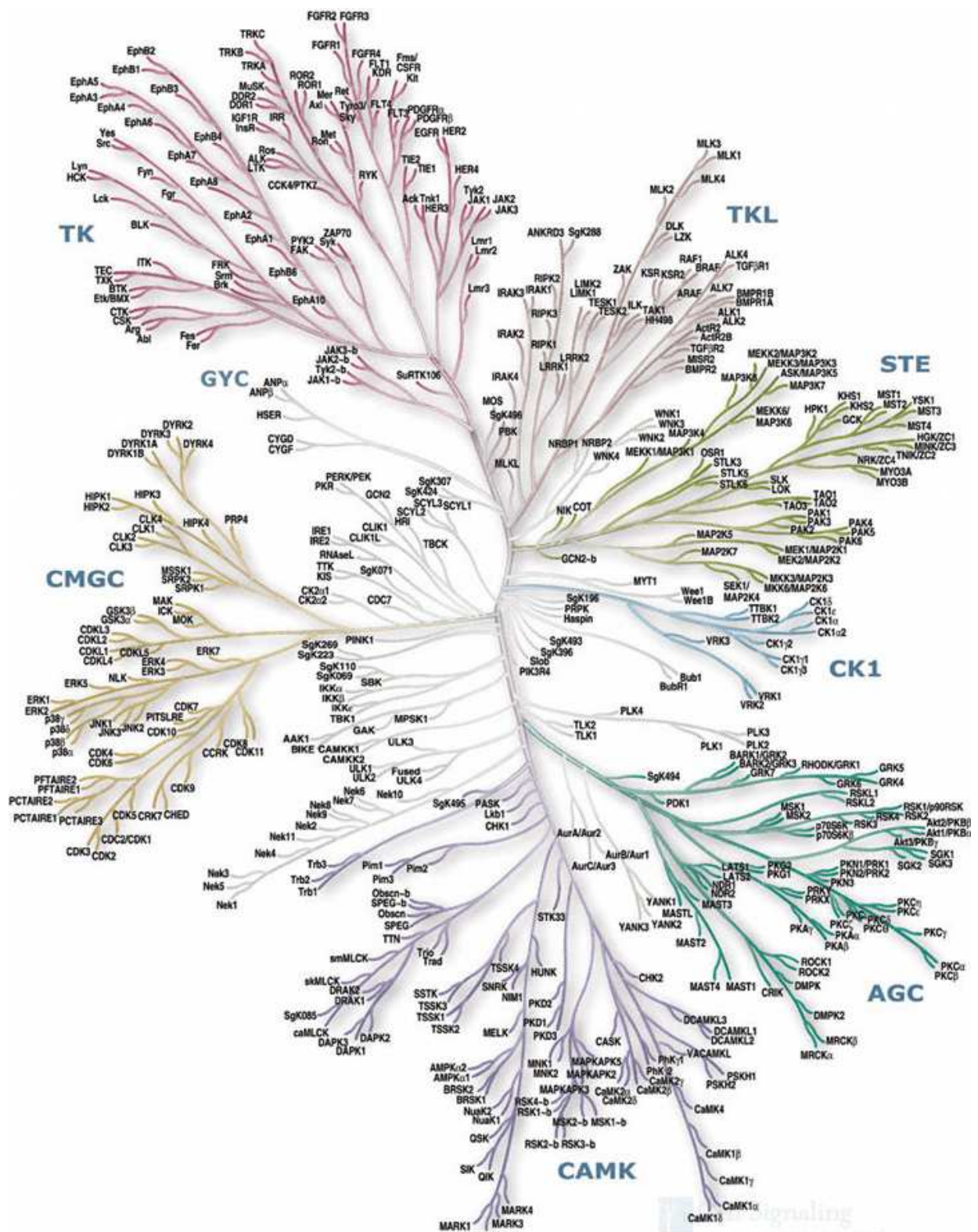
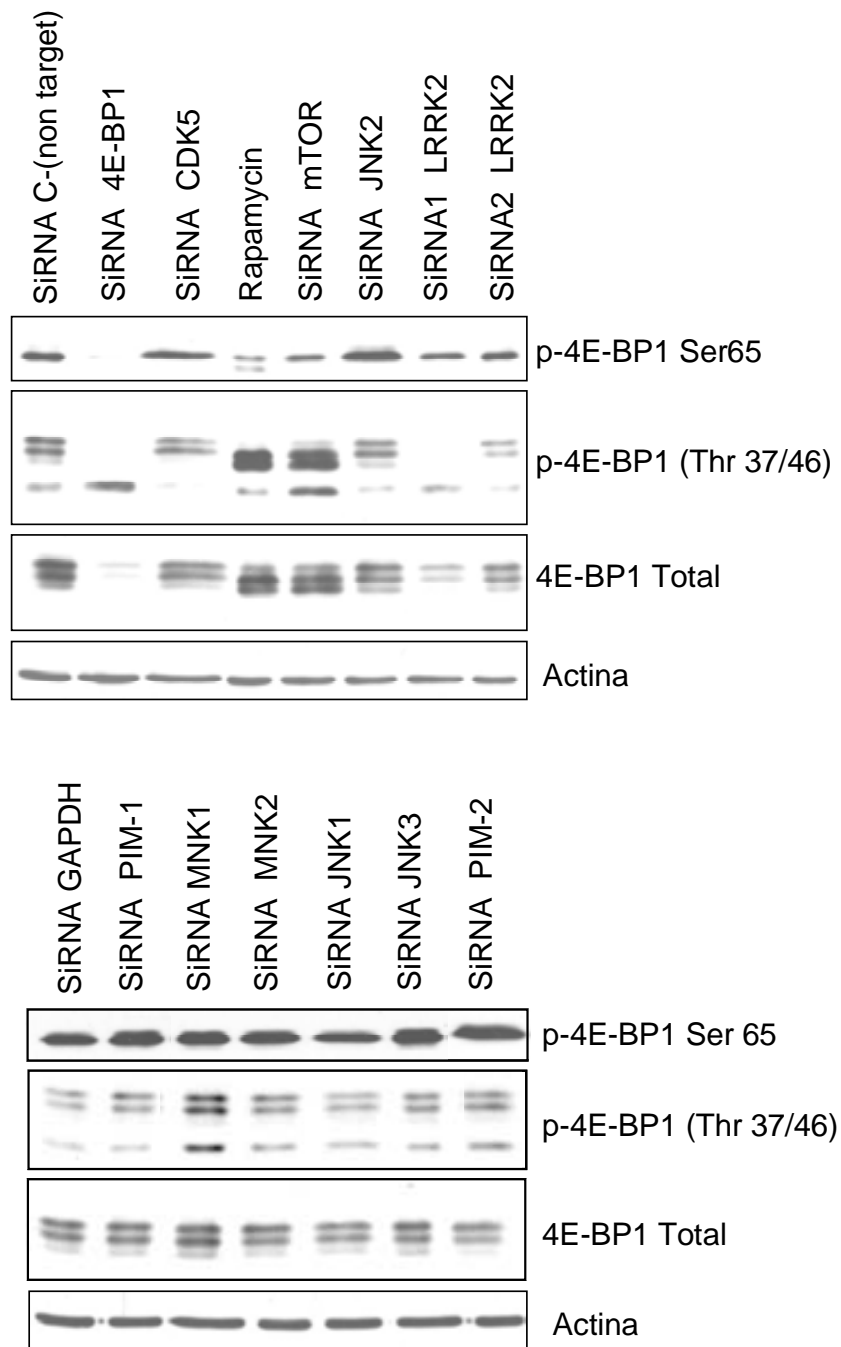


Figura 26. Kinoma humà (arbre de quinases humà). Classificació de les diferents quinases cel·lulars segons la seva similitud de seqüència: AGC, CAMK, CK1, CMG, STE, TK i TKL.

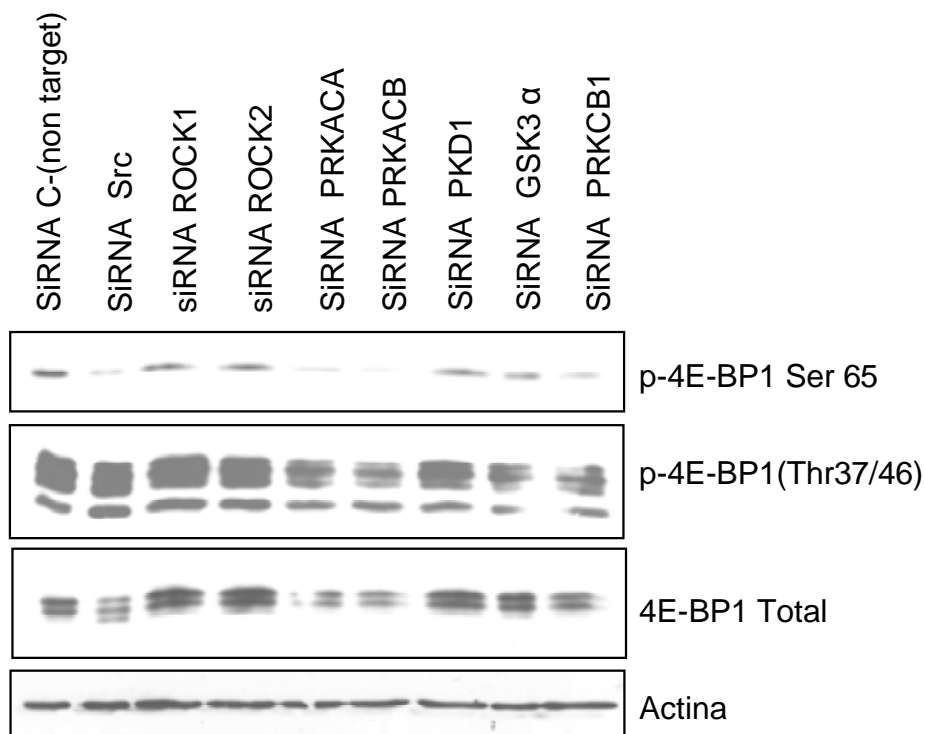
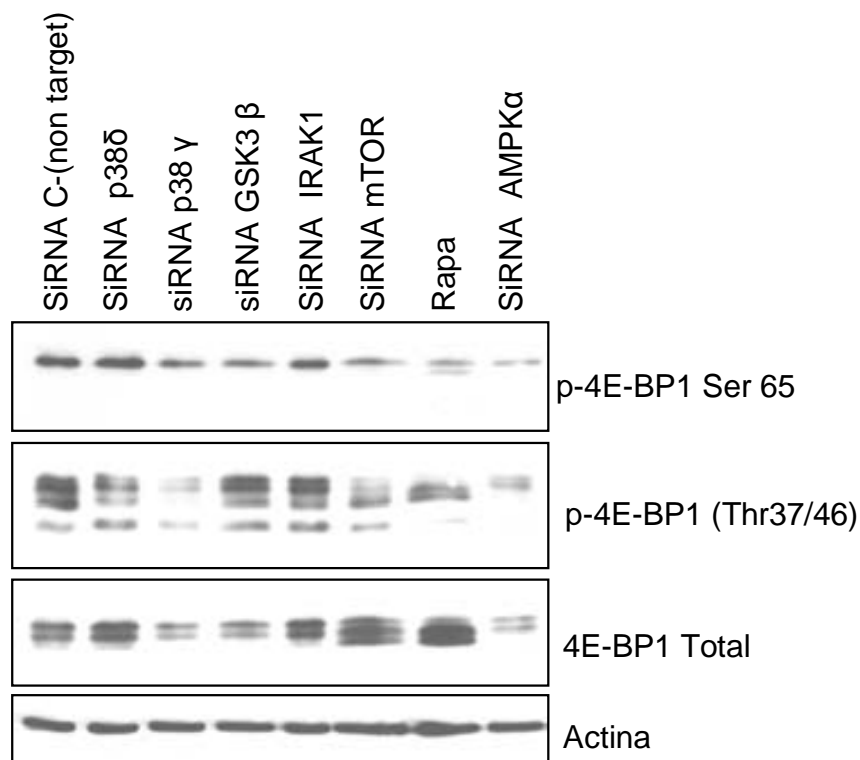




**Figura 27. Anàlisi per *Western Blot* de l'estat de fosforilació de 4E-BP1 després de la inhibició de diferents quinases cel·lulars.**

La inhibició d'LRRK2 va provocar una disminució de la quantitat total de 4E-BP1.

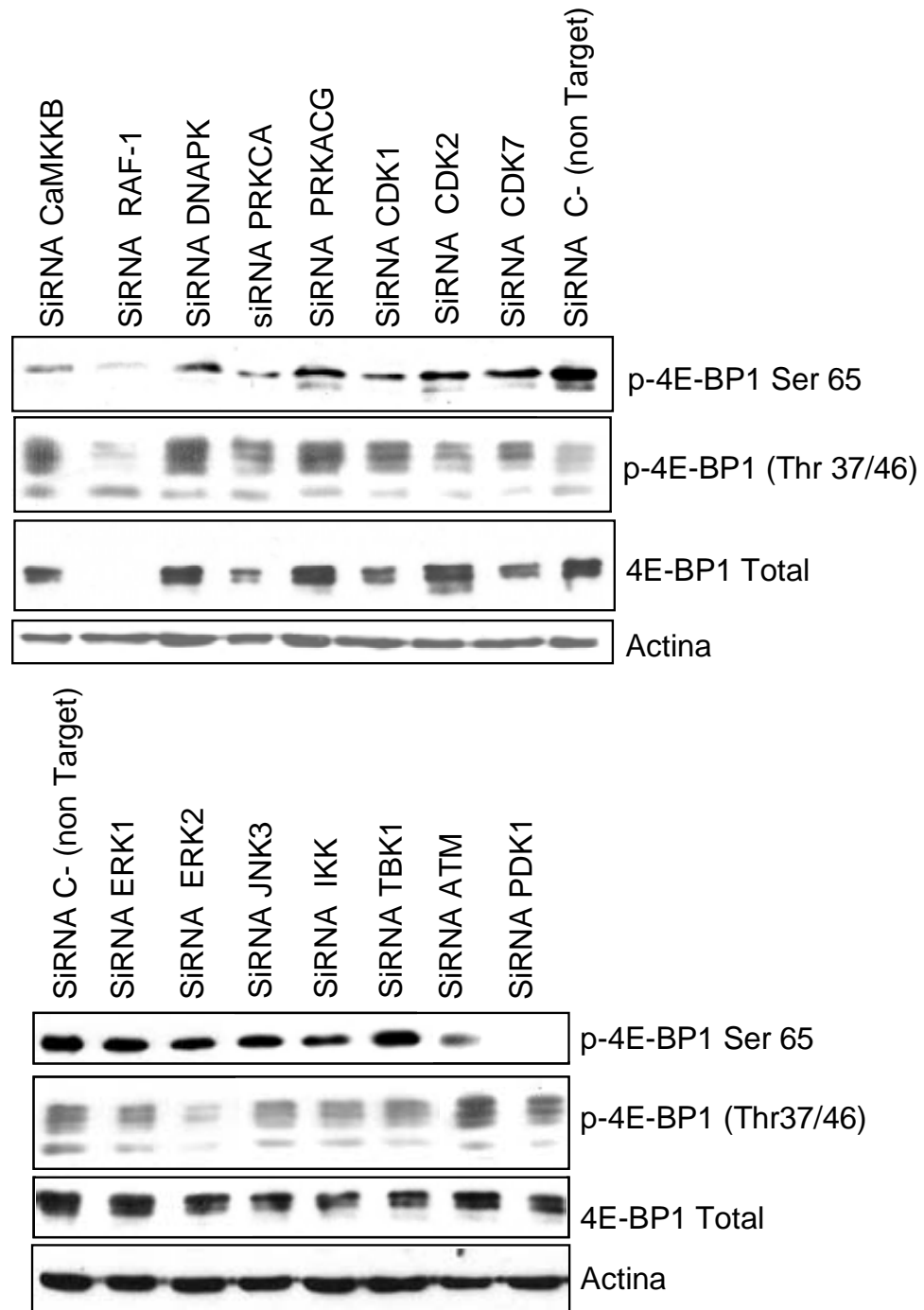
\*Es van utilitzar dos siRNA diferents contra LRRK2 perquè cap dels dos havia estat validat prèviament. L'siRNA 1 semblava tenir un major efecte sobre 4E-BP1.



**Figura 28. Anàlisi per *Western Blot* de l'estat de fosforilació de 4E-BP1 després de la inhibició de diferents quinases cel·lulars.**

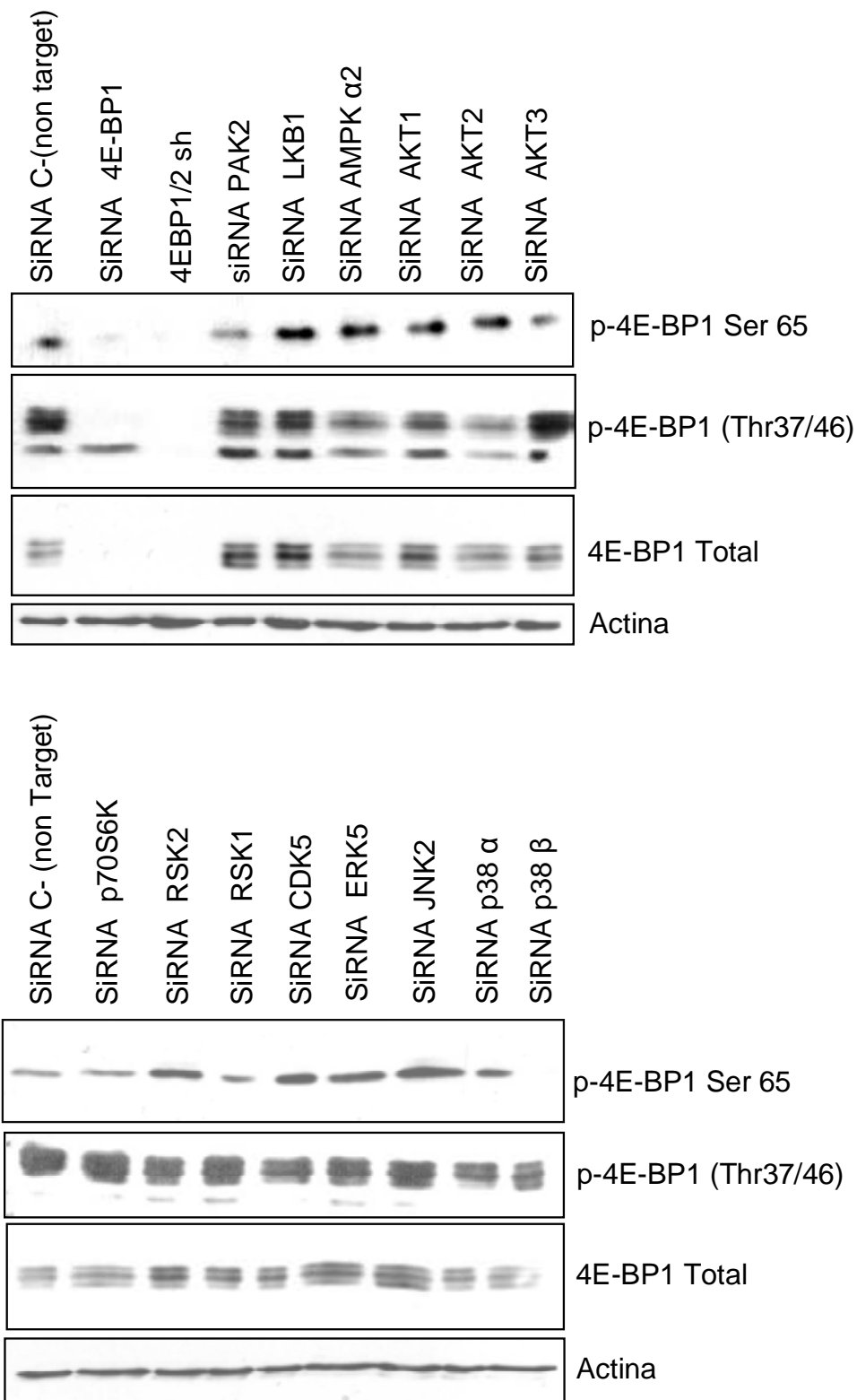
La inhibició de SRC i PRKCB1 va provocar la defosforilació de 4E-BP1.

La inhibició de p38 $\gamma$ , GSK3 $\beta$ , AMPK $\alpha$ , PRKACA i PRKACB provocava una baixada de la quantitat total de 4E-BP1.



**Figura 29.** Anàlisi per *Western Blot* de l'estat de fosforilació de 4E-BP1 després de la inhibició de diferents quinases cel·lulars.

La inhibició de CaMKKB, CDK1, PRKCA i PDK1 va provocar una defosforilació de 4E-BP1. La inhibició de RAF-1 va provocar una baixada de la quantitat total de 4E-BP1.



**Figura 30. Anàlisi per *Western Blot* de l'estat de fosforilació de 4E-BP1 després de la inhibició de diferents quinases cel·lulars.**

La inhibició de PAK2 i p38 $\beta$  va provocar una baixada de la fosforilació de 4E-BP1.

Tots els experiments es van repetir fins a 3 vegades. Només es van considerar positius els casos on la inhibició de la quinasa va produir la defosforilació o baixada de quantitat de 4E-BP1 total en dues o tres de les repeticions. Els casos que només es van reproduir una vegada no es van considerar. Es van obtenir dos tipus de resultats:

1.- La inhibició d'algunes de les quinases provocava una baixada de la fosforilació de 4E-BP1. Aquestes quinases eren: CDK1, PDK1, SRC, PRKCB1, PAK2, p38 $\beta$ , PRKCA i CaMKKB. Això era indicatiu de que aquestes quinases es trobaven d'alguna manera implicades en la fosforilació de 4E-BP1. Amb aquests resultats no podem afirmar si la fosforilació és directa o bé és conseqüència de l'activació per cascada d'altres quinases.

2.- La inhibició d'altres quinases provocava un descens en la quantitat de proteïna total de 4E-BP1. Aquestes quinases eren: LRRK2, RAF-1, p38 $\gamma$ , GSK3 $\beta$ , AMPK $\alpha$ , PRKACA i PRKACB.

### **- Anàlisi de la localització cel·lular de l'eIF4E un cop inhibida la quinasa corresponent**

L'eIF4E és una proteïna principalment citoplasmàtica, però com ja s'ha descrit anteriorment, una fracció de l'eIF4E (del 12%-33%, a mamífers) es pot trobar dins del nucli (Strudwick and Borden 2002; Rong et al. 2008). La importació nuclear de l'eIF4E és mediada pel 4E-T (transportador d'eIF4E), el qual s'uneix a l'eIF4E a través d'un domini conservat compartit amb les 4E-BPs i l'eIF4G i, simultàniament, interactua amb els receptors nuclears d'importació, importina  $\alpha/\beta$  (Dostie et al. 2000). Se sap que l'eIF4E dins del nucli promou l'exportació nuclear de diversos mRNAs (Rousseau et al. 1996; Culjkovic et al. 2005). Encara no està del tot estudiat com es manté aquesta fracció nuclear de l'eIF4E i com és regulada. Rong i Livingstone (2008) van descriure que el tractament amb rapamicina afavoria l'acumulació de l'eIF4E dins del nucli i que aquesta acumulació era dependent de 4E-BP1 i del seu estat de fosforilació

D'acord amb aquestes dades, vam voler esbrinar com la inhibició de les diferents quinases seleccionades podia afectar a la localització cel·lular de l'eIF4E. A la Figura 31 es mostra l'efecte que la inhibició de cada quinasa provocava sobre la localització intracel·lular de l'eIF4E. Com a controls positius

es van utilitzar la rapamicina i l'siRNA d'mTOR. Es va observar que la inhibició de PDK1 provocava un lleuger augment de l'eIF4E al nucli. Així i tot, després de tres repeticions, només la inhibició de p38 $\beta$  provocava una acumulació de l'eIF4E al nucli similar a l'observada amb el tractament amb rapamicina i la inhibició d'mTOR (Figura 32).

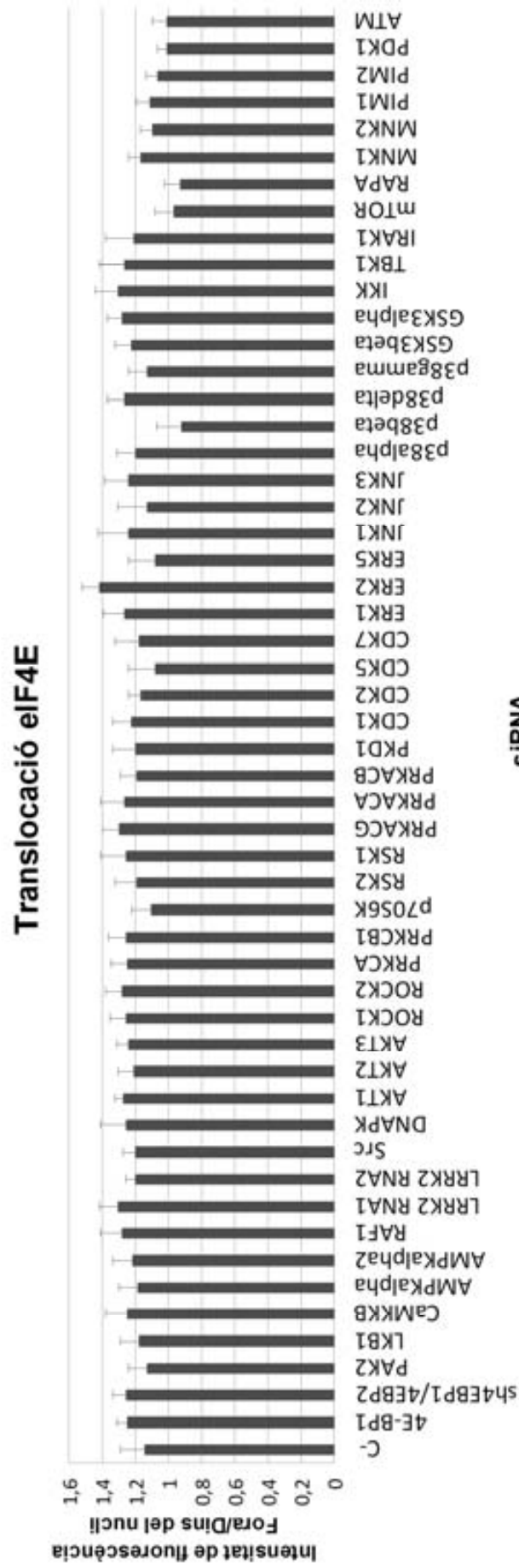
### **5.5- ANÀLISI DE LA INHIBICIÓ D'LRRK2 I p38BETA EN DIFERENTS TIPUS CEL·LULARS**

Després d'aquest *screening* inicial on vam observar l'efecte de diferents quinases sobre la fosforilació de 4E-BP1, vam decidir estudiar amb més detall dues d'aquestes quinases. Una d'elles era l'LRRK2, que afectava a la quantitat de proteïna total de 4E-BP1, i l'altra era p38beta, que afectava a la fosforilació del 4E-BP1 a la Ser 65 i, a més a més, afectava també a la localització intracel·lular de l'eIF4E.

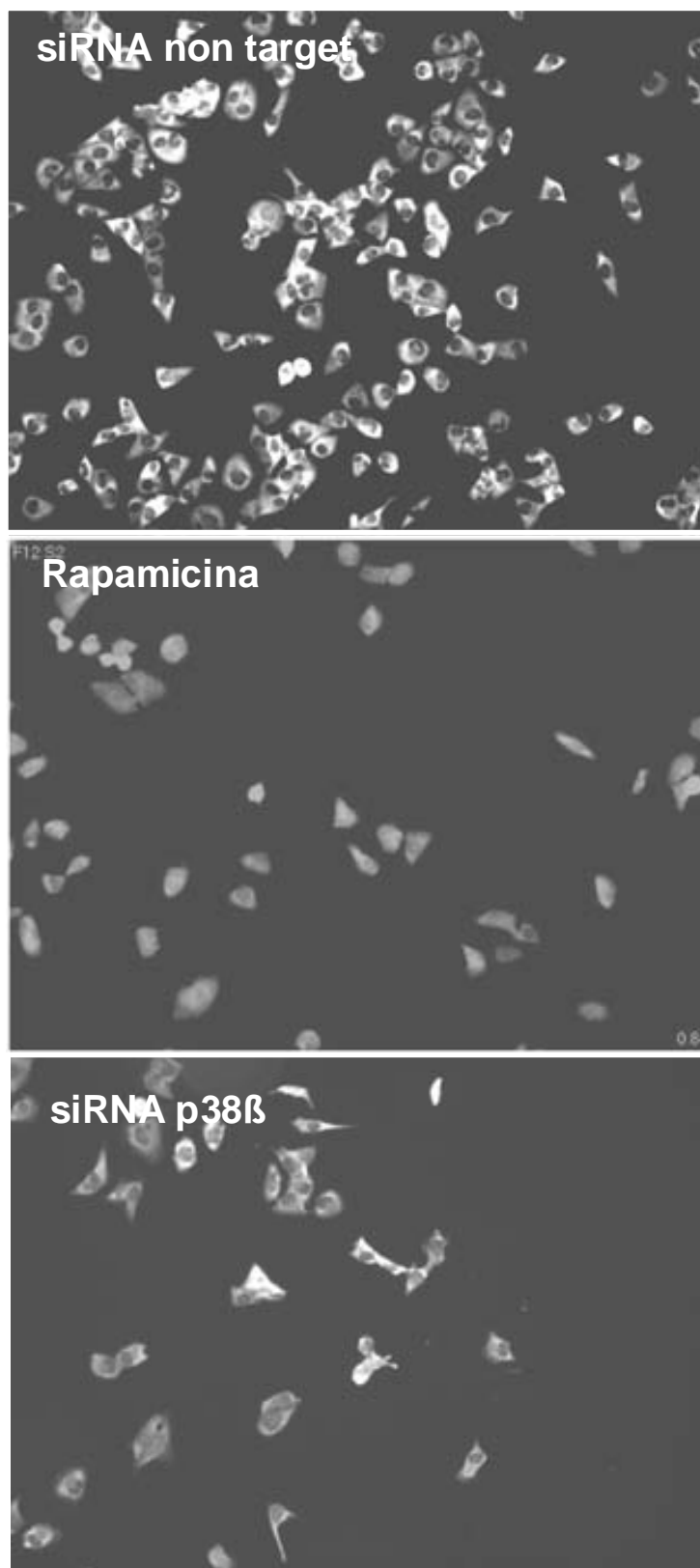
Es va realitzar el mateix experiment en diferents tipus de teixit i amb un segon siRNA (siRNA2) per tal de confirmar els resultats obtinguts. A més a més, es va comprovar també la inhibició d'aquestes dues quinases per mitjà de *Western Blot* en contra d'LRRK2 i p38 beta.

Pel que fa a la inhibició de l'LRRK2 amb l'siRNA 2, a la línia MDA-MB 231 es van obtenir els mateixos resultats que s'havien obtingut anteriorment amb l'siRNA 1 utilitzat a l'*screening* (Figura 33). Aquests resultats confirmaven l'efecte de l'LRRK2 sobre la quantitat total de 4E-BP1. Pel que fa a la resta de línies cel·lulars, en algunes d'elles (MDA-MB 468, 769-P, TIG3 i DLD-1) es va observar també un descens de la quantitat total de 4E-BP1 quan s'inhibia l'LRRK2. Per altra banda, hi havia altres línies (HEK 293T, HT-29 i HeLa) que no mostraven cap efecte sobre 4E-BP1 després de la inhibició de l'LRRK2 (Figura 33).

Pel que fa a l'efecte sobre la fosforilació de 4E-BP1 després de la inhibició de p38 $\beta$  amb l'siRNA 2, aquest no va ser tan bo com amb l'siRNA 1 utilitzat a l'*screening*, i no s'observava una baixada de la fosforilació de 4E-BP1



**Figura 31. Anàlisi de la translocació de l'eIF4E sota l'efecte de la inhibició de diferents quinases siRNA**



**Figura 32. Efecte sobre la translocació de l'eIF4E després del tractament amb rapamicina i la inhibició de p38β.**



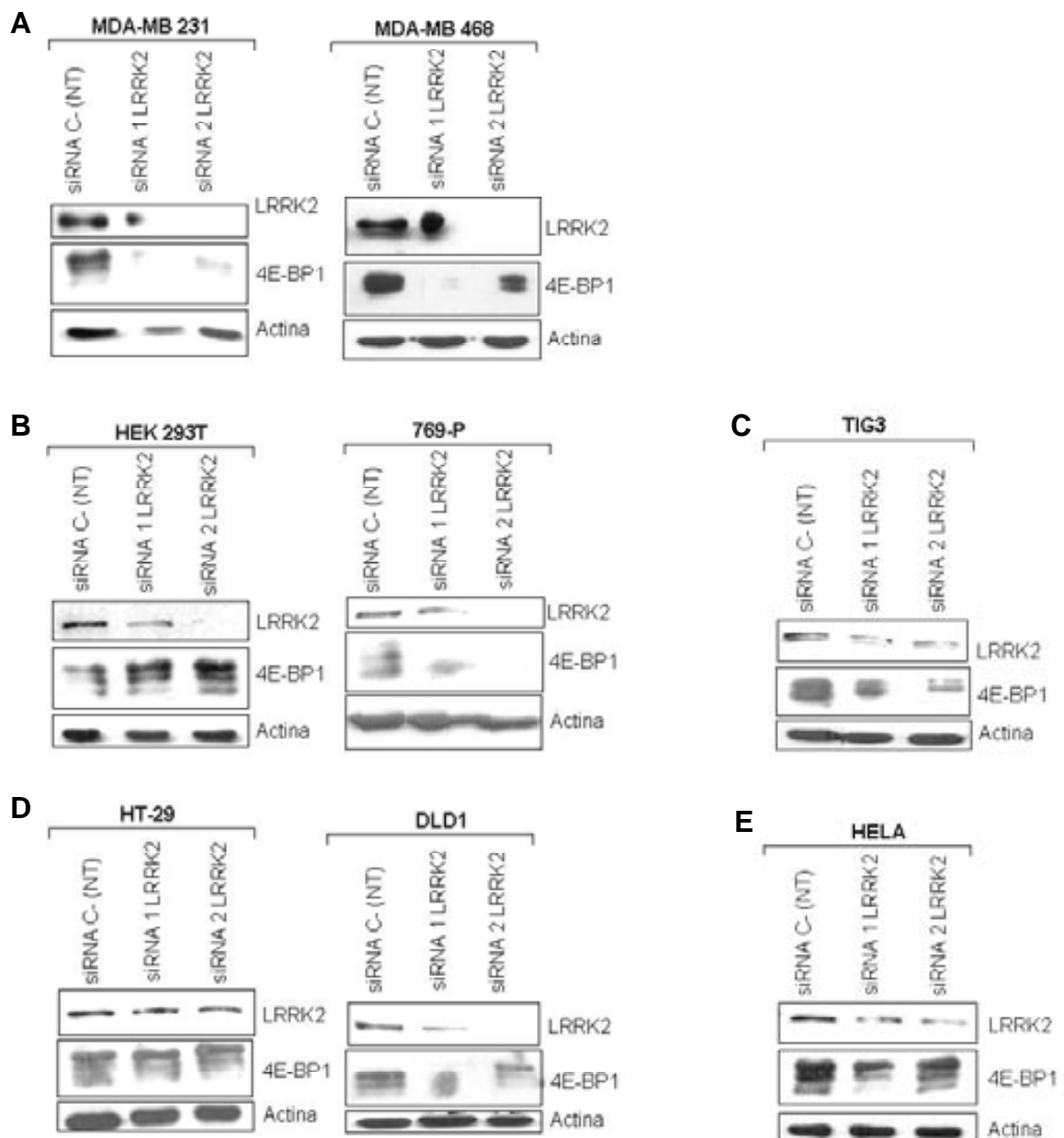
en les MDA-MB 231; aquests resultats no ens permetien confirmar els resultats obtinguts a l'*screening* ja que esperàvem veure un efecte similar amb l'siRNA 2 (Figura 34). De la resta de línies cel·lulars, les que van mostrar una disminució de la fosforilació de 4E-BP1 van ser les HEK 293T, les TIG3, les HT-29 i les DLD-1, encara que, de la mateixa manera que a les MDA-MB 231, aquesta baixada de la fosforilació només es va observar quan s'inhibia el p38 $\beta$  amb l'siRNA 1. Les 769-P mostraven una baixada de la fosforilació de 4E-BP1 després de la inhibició de p38 $\beta$  amb l'siRNA 1 i l'siRNA 2. Pel que fa a les MDA-MB 468 i les HeLa, es va observar una disminució de la quantitat total de 4E-BP1 després de la inhibició amb l'siRNA 1 i amb l'siRNA 2 (Figura 34).

## **5.6.- LRRK2**

### **5.6.1.- Inhibició estable d'LRRK2**

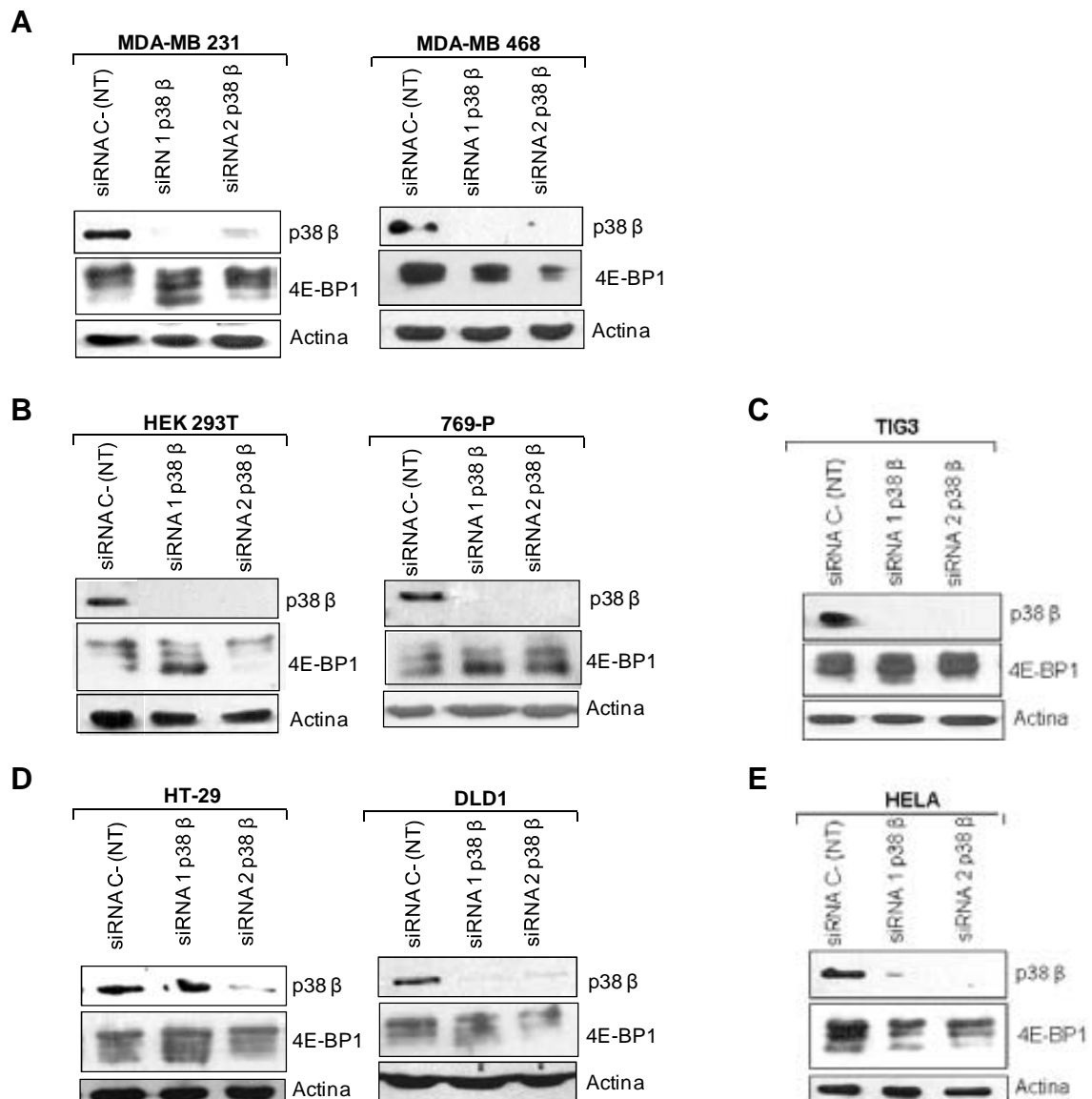
Obtinguts aquests resultats vam decidir analitzar l'efecte que provocava sobre la proliferació cel·lular la inhibició estable d'LRRK2. Per fer això, es van generar vectors lentivirals a partir de les seqüències dels siRNA testades (pLKO.1-shLRRK2\_1, pLKO.1-shLRRK2\_2) i es va infectar la línia cel·lular TIG3, fibroblasts humans. Es va fer un seguiment de la seva proliferació al llarg de 4 passes i aquesta proliferació es va comparar amb un vector *non target* (pLKO.1-shNT) (Figura 35).

Es va observar que les cèl·lules que tenien inhibit l'LRRK2, proliferaven més ràpidament que les cèl·lules control (pLKO.1-shNT). Aquests resultats es van confirmar amb els dos vectors lentivirals testats. Per mitjà de *Western Blot* es va comprovar que l'LRRK2 estigués realment inhibit i es va analitzar també l'estat de 4E-BP1 i de 4E-BP2. Es va observar el mateix efecte que havíem obtingut amb la inhibició transitòria: la quantitat total de 4E-BP1 es reduïa quan l'LRRK2 estava inhibit. Sorprenentment, a l'analitzar l'estat de 4E-BP2 no vam observar cap diferència entre les cèl·lules control i les que tenien inhibit l'LRRK2. Això ens fa pensar que LRRK2 podria intervenir en l'estabilització de 4E-BP1 d'una manera directa o indirecta i molt específica, ja que 4E-BP2 es regula d'una manera molt similar a 4E-BP1.



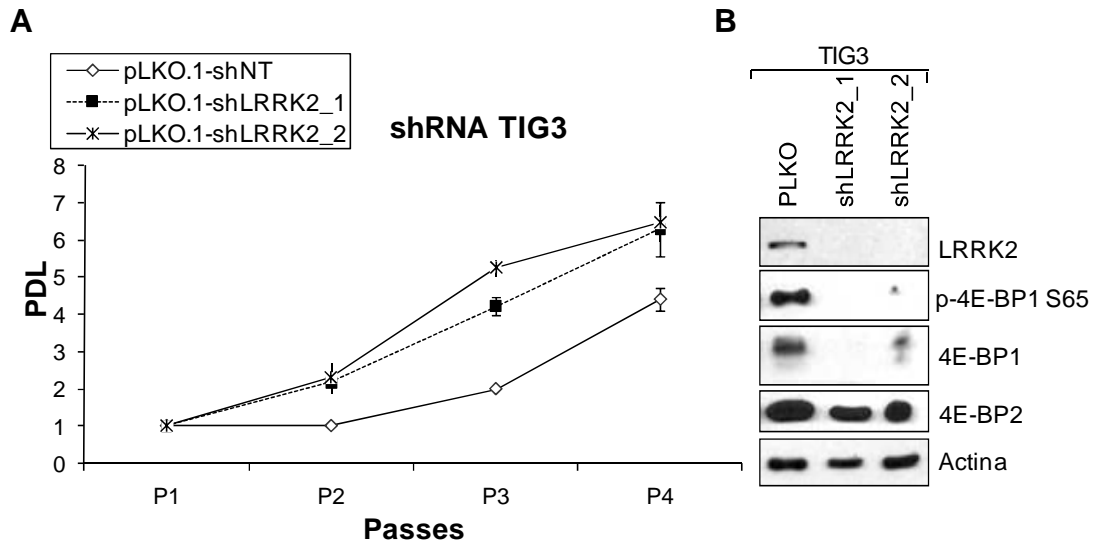
**Figura 33.** Anàlisi per *Western Blot* de l'estat de fosforilació de 4E-BP1 després de la inhibició d'LRRK2.

- A. Estat de fosforilació de 4E-BP1 a MDA-MB 231 i MDA-MB 468 (carcinoma de mama).
- B. Estat de fosforilació de 4E-BP1 a HEK 293T i 769-P (cèl·lules de ronyó i carcinoma de ronyó).
- C. Estat de fosforilació de 4E-BP1 a TIG3 (fibroblasts humans).
- D. Estat de fosforilació de 4E-BP1 a HT-29 i DLD-1 (carcinoma de còlon).
- E. Estat de fosforilació de 4E-BP1 a HeLa (carcinoma de cèrvix uteri).



**Figura 34.** Anàlisi per *Western Blot* de l'estat de fosforilació de 4E-BP1 després de la inhibició p38β.

- A. Estat de fosforilació de 4E-BP1 a MDA-MB 231 i MDA-MB 468 (carcinoma de mama).
- B. Estat de fosforilació de 4E-BP1 a HEK 293T i 769-P (cèl·lules de ronyó i carcinoma de ronyó).
- C. Estat de fosforilació de 4E-BP1 a TIG3 (fibroblasts humans).
- D. Estat de fosforilació de 4E-BP1 a HT-29 i DLD-1 (carcinoma de còlon).
- E. Estat de fosforilació de 4E-BP1 a HeLa (carcinoma de cèrvix uterí).

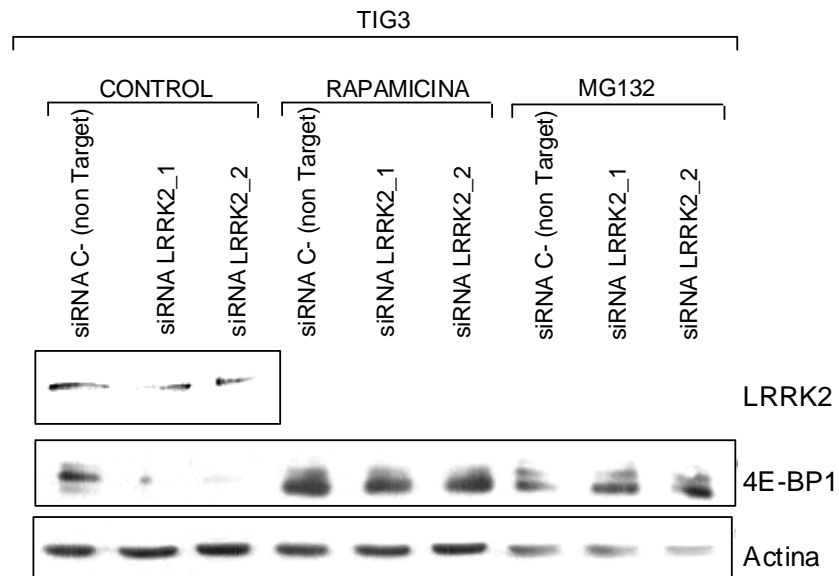


**Figura 35. Efecte de la inhibició d'LRRK2 sobre la proliferació cel·lular en cèl·lules infectades estables.**

**A.** Es va observar un augment de la proliferació cel·lular quan l'LRRK2 era inhibit. **B.** Es va confirmar que s'havia inhibit l'LRRK2 mitjançant un *Western Blot* contra LRRK2 i es va comprovar l'efecte sobre l'expressió de 4E-BP1 i 4E-BP2.

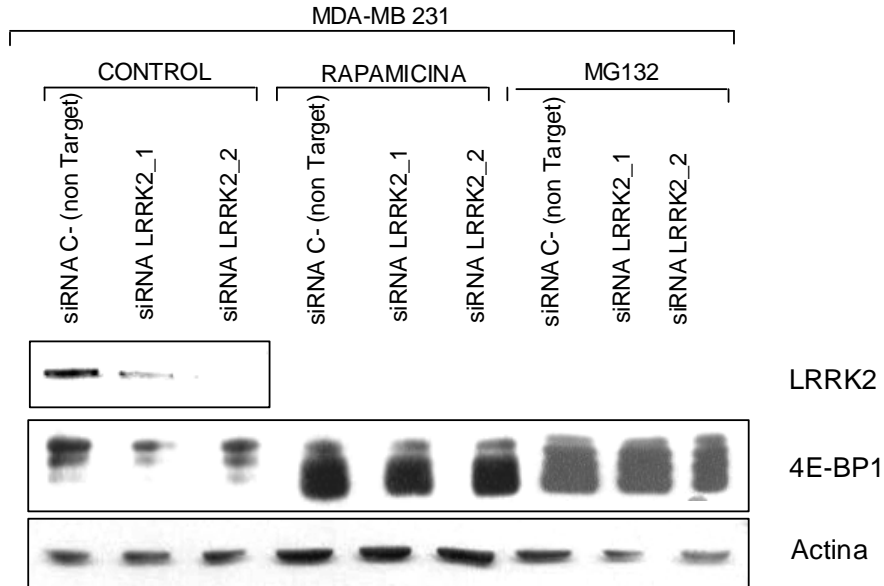
### **5.6.2- Anàlisi de diferents mecanismes a través dels quals LRRK2 podria establir 4E-BP1**

Vam decidir estudiar per mitjà de quin mecanisme l'LRRK2 podria intervenir en l'estabilització de 4E-BP1. Primer de tot, per veure si la degradació de 4E-BP1 es donava via proteasoma es van tractar les cèl·lules que tenien una inhibició transitòria d'LRRK2, amb MG132, un inhibidor del proteasoma. A més a més, per tal de veure si l'LRRK2 es trobava estabilitzant alguna fosfatasa es va realitzar un tractament amb rapamicina. A les Figures 36 i 37 es mostra que tant la inhibició del proteasoma com el tractament amb rapamicina provocaven en les TIG3 i en les MDA-MB 231 una acumulació de 4E-BP1 on l'LRRK2 estava *downregulat*. Això era indicador que quan inhibim l'LRRK2 la *downregulació* de 4E-BP1 es donava via proteasoma. El fet que la rapamicina tingués un efecte inhibitori en la pèrdua de 4E-BP1 en les cèl·lules que tenien *knockejat* l'LRRK2 ens fa pensar que l'LRRK2 podria estar estabilitzant 4E-BP1 a la cèl·lula a través de la regulació directa o bé indirecta d'alguna fosfatasa ja que, com han descrit altres autors amb anterioritat, la fosforilació de 4E-BP1 provoca la ubiquitinització d'aquesta proteïna i incrementa el seu *turnover*.



**Figura 36. Anàlisi dels nivells de 4E-BP1 per *Western Blot* a les cèl·lules TIG3 després del tractament amb un inhibidor del proteasoma (MG132) i un inhibidor d'mTOR (rapamicina).**

El diagrama representa els nivells de proteïna mesurades per densitometria. Es va observar una acumulació de 4E-BP1 en les cèl·lules que tenien inhibit l'LRRK2 després del tractament amb els diferents inhibidors.



**Figura 37. Anàlisi dels nivells de 4E-BP1 per *Western Blot* a les cèl·lules MDA-MB 231 després del tractament amb un inhibidor del proteasoma (MG132) i un inhibidor d'mTOR (rapamicina).**

El diagrama representa els nivells de proteïna mesurades per densitometria. Es va observar una acumulació de 4E-BP1 en les cèl·lules que tenien inhibit l'LRRK2 després del tractament amb els diferents inhibidors.





---

# DISCUSSIÓ

---





### **6.1.- p4E-BP1 COM A BIOMARCADOR EN CÀNCER DE MAMA**

Els càncers de mama són els tumors malignes més freqüents en dones. Malgrat que l'esperança de vida de les dones amb càncer de mama ha augmentat en els darrers anys, al voltant d'un 40% de les pacients moren. Els factors pronòstic més importants del càncer de mama es troben relacionats amb la mida del tumor i la presència de metàstasi en els nòduls limfàtics. Malgrat tot, contínuament s'estan buscant nous factors rellevants pel pronòstic d'aquestes pacients. Els tumors positius per HER2 tenen tractaments específics basats en inhibidors i anticossos monoclonals (com per exemple l'herceptina). De totes maneres, només el 20%-25% dels tumors de mama són positius per HER2 i, d'aquests només el 50% responen als tractaments amb herceptina (Piccart-Gebhart et al. 2005).

Alguns factors *downstream* de HER2, com PTEN i PI3K, i altres receptors, com CMET, poden trobar-se també alterats en tumors de mama i poden provocar una proliferació cel·lular descontrolada independentment de l'estat de HER2. De fet, tots els tumors malignes tenen nombroses alteracions genètiques que poden afectar a diferents vies de senyalització.

En aquest estudi ens proposàvem investigar 4E-BP1 com a biomarcador en càncer de mama, ja que estudis previs del nostre grup mostraven 4E-BP1 com una proteïna on podrien convergir diverses senyals oncogèniques independentment de que hi poguessin haver efectors *upstream* alterats (Castellvi et al. 2006; Armengol et al. 2007; Rojo et al. 2007; Castellvi et al. 2009). Els resultats del present estudi evidencien que nivells de proteïna total de 4E-BP1 i la seva forma fosforilada, p-4E-BP1, es troben associats amb el grau de malignitat del tumor en càncer de mama. A més a més, la ràtio de p-4E-BP1:4E-BP1 total correlacionava significativament amb la presència de metàstasi en els nòduls limfàtics. Pel que fa a la supervivència, es va trobar disminuïda en els casos amb la ràtio de p-4E-BP1:4E-BP1, eIF4E total i p-eIF4E elevats. Aquests resultats donen suport a publicacions prèvies del nostre grup, així com altres publicacions, on alts nivells de p-4E-BP1 i eIF4E s'han associat amb el grau i el pronòstic del càncer de mama i altres tipus de càncer (De Benedetti and Harris 1999; De Benedetti and Graff 2004; Zhou et al. 2004; Castellvi et al. 2006; Armengol et al. 2007; Rojo et al. 2007; Castellvi et al.

2009; Coleman et al. 2009). El 30% dels tumors on 4E-BP1 es trobava fosforilat eren negatius per altres efectors *upstream*, com pMAPK i pAKT; això dona suport a la teoria que 4E-BP1 podria ser fosforilat per altres quinases diferents d'mTOR. En relació amb això, estudis recents han descrit la fosforilació de 4E-BP1 i eIF4E després de llargs temps de tractament amb rapamicina, mentre que S6 es mantenia defosforilat, recolzant que hi ha funcions encara desconegudes d'mTORC1 o bé que altres quinases no identificades podrien estar implicades en la fosforilació de 4E-BP1 (Ma and Blenis 2009). Aquests resultats apunten que l'estudi de p-4E-BP1 podria ser rellevant no només com un marcador de pronòstic sinó també com un indicador d'efectes antitumorogènics de drogues que actuen sobre vies *upstream*, com per exemple, sobre HER, PI3K/AKT o MAPK.

Pel que fa a l'eIF4G, no vam trobar nivells d'associació significatius amb el p-4E-BP1, el tamany del tumor o la supervivència. El grup del Dr. Schneider, ha descrit que l'eIF4G pot ser rellevant promovent la formació d'embòlia en carcinomes de mama inflamatoris per mitjà de l'activació d'IRES que contenen mRNAs p120 (Silvera et al. 2009; Silvera and Schneider 2009). En les nostres sèries no vam incloure carcinomes inflamatoris però l'associació entre el p-eIF4G i la supervivència va ser significativa al 10%.

En resum, els nostres resultats mostren que 4E-BP1 s'associa amb prognosi en càncer de mama i es troben recolzats per dades d'altres autors. En un estudi en càncer de mama, la fosforilació d'AKT, mTOR i 4E-BP1 es va associar amb el desenvolupament i la progressió tumoral (Zhou et al. 2004). A més a més, estudis experimentals han demostrat que 4E-BP1 és essencial per la transformació cel·lular. Extenent el concepte, proposem 4E-BP1 com una proteïna on podrien convergir diferents senyals bioquímiques independentment de l'alteració d'altres efectors *upstream* i, proposem que és possible que hi hagi altres factors que, de la mateixa manera que 4E-BP1, puguin actuar com a punt de convergència de les diferents senyals bioquímiques. Un estudi dels perfils d'expressió de totes les vies de transformació cel·lular ens premetria obtenir una firma molecular de cada tumor. Aquesta firma, combinada amb les dades clíniques i patològiques, ens podria ajudar a establir un potencial de malignitat per cada tumor i a partir d'aquí deduir la seva evolució i la seva resistència potencial a la quimioteràpia i radioteràpia convencional.

## **6.2.- REGULACIÓ DELS NIVELLS DE 4E-BP1 I eIF4E I LA SEVA ESTABILITZACIÓ.**

Segons els nostres resultats, nivells elevats de proteïna de 4E-BP1 i d'eIF4E total eren indicadors d'un pitjor pronòstic. Malgrat tot, no vam observar canvis significatius dels nivells d'mRNA de 4E-BP1 i eIF4E en els diferents tumors analitzats. La regulació de 4E-BP1 a nivell de transcripció ha estat reportat prèviament per Southgate et al (2007) que han associat el factor de transcripció FOXO1 a la regulació de 4E-BP1. Van descriure que en el múscul esquelètic de ratolí la sobreexpressió de FOXO1 provocava un increment dels nivells d'mRNA de 4E-BP1. No van observar cap efecte de FOXO1 sobre eIF4E. En els nostres resultats no es va observar cap increment d'mRNA, per tant, sembla ser que FOXO1 no juga un paper important en tumors de càncer de mama. Això es podria relacionar amb el fet que FOXO1 es troba transcripcionalment inactiu en cèl·lules on predominen els factors de creixement i les seves vies de senyalització.

Per altra banda, els elevats nivells de proteïna observats es podrien donar per una major estabilitat d'aquesta. Elia et al. (2008) van descriure que la fosforilació de 4E-BP1 regula la seva ubiquitinització portant-la a la seva degradació per proteasoma. Estudis previs també havien proposat la degradació de 4E-BP1 a través del proteasoma en cèl·lules infectades per herpes simplex virus-1 (Walsh and Mohr 2004). A més a més, els seus resultats també suggerien que la seva degradació era sensible al seu estat de fosforilació. Segons els nostres resultats la forma fosforilada de 4E-BP1 es troba elevada en tumors d'alt grau i està relacionada amb pitjor supervivència, podria ser que el procés comencés per una primera estabilització de la proteïna i que aquesta fos ràpidament fosforilada per la hiperactivació de les vies de senyalització d'mTOR i MAPK i que la taxa de degradació no fós suficientment ràpida com per mantenir la proteïna defosforilada en aquests tumors. Per altra banda, encara no està del tot clar si 4E-BP1 és degradat exclusivament pel proteasoma. La interpretació dels experiments fets amb MG132 per inhibir l'activitat del proteasoma és complicada pel fet que també provoca la defosforilació d'un o més llocs de 4E-BP1. Aquest podria ser un efecte indirecte sobre la inhibició d'una proteïna quinasa o bé de l'estabilització d'una proteïna

fosfatasa per MG132 (Torres et al. 2003) i podria potenciar la inhibició del procés d'ubiquitinització que és induït per fosforilació.

En el nostre estudi vam veure que l'eIF4E s'associava amb una pitjor supervivència. En estudis previs s'ha descrit que la regulació d'eIF4E s'associa a la ubiquitinització i la seva conseqüent degradació pel proteasoma. Murata i Shimotohno (2006) suggerien que aquesta degradació es trobava associada a la seva interacció amb l'eIF4G i 4E-BP1. Van veure que l'eIF4G no unia formes ubiquitinitzades d'eIF4E i que la sobreexpressió de 4E-BP1 reduïa els nivells d'ubiquitinització d'eIF4E i inhibia la seva degradació. Això podria explicar que en els tumors humans analitzats en el nostre estudi es trobin sobreexpressades a la vegada, 4E-BP1 i eIF4E, ja que 4E-BP1 conserva l'eIF4E impedit la seva degradació. A més a més, també s'ha descrit que la forma fosforilada de l'eIF4E no pot ser ubiquitinitzada (Murata and Shimotohno 2006). Això podria explicar que en la sèrie de tumors humans estudiada observéssim una correlació significativa de p-eIF4E i pitjor supervivència.

### **6.3- IMPORTÀNCIA DE 4E-BP1 COM A MECANISME DE REGULACIÓ A NIVELL TRADUCCIONAL**

S'ha trobat una clara relació entre el càncer humà i l'activació de la maquinària traduccional dependent de Cap (De Benedetti and Harris 1999; Zimmer et al. 2000). Molts factors oncogènics coneguts són moduladors *upstream* de la integritat del complex eIF4F (com per exemple, HER-2/neu, EGF-R/erb-b, c-Myc, etc) o efectors *downstream* de la funció d'eIF4F (com per exemple, ciclina D1, Bcl-X<sub>L</sub>, etc) o bé ambdues coses alhora (Brown and Schreiber 1996; Rhoads 1999). Per tant, en el càncer de mama, la formació del complex eIF4F podria actuar com un integrador i amplificador d'un ampli rang de diversos senyals pre-neoplàsics provinents de diferents gens relacionats amb el càncer. Aquestes observacions deixen oberta la pregunta de si alteracions en el complex eIF4F són les desencadenants de l'aparició d'un fenotip transformant en cèl·lules cancerígenes o bé són una conseqüència de la necessitat de les cèl·lules cancerígenes d'incrementar la síntesi proteïca.

Després dels resultats obtinguts en tumors clínics, on 4E-BP1 semblava ser un factor clau en el càncer de mama, vam sobreexpressar 4E-BP1 en

cèl·lules de carcinoma de mama i en fibroblasts humans normals. A més a més, les cèl·lules de carcinoma de mama amb sobreexpressió de 4E-BP1 es van injectar en ratolins. Esperàvem veure un descens de la proliferació cel·lular. La línia de fibroblasts humans normals, IMR90, i la línia de carcinoma de mama, MDA-MB 468, mostraven una inhibició de la proliferació en resposta a la sobreexpressió de la forma wt de 4E-BP1. A més a més, la sobreexpressió de la forma mutada de 4E-BP1 als quatre llocs principals de fosforilació, provocava mort cel·lular a les IMR90 i parada de proliferació a les MDA-MB 468. Cal destacar que la unió de l'eIF4E amb la forma mutant de 4E-BP1, la qual no pot ser fosforilada als llocs de fosforilació Thr 37, Thr 46, Thr 70 i Ser 65, induïa una clara pèrdua de viabilitat a les IMR90 on la traducció de proteïnes sembla ser crucial (Avdulov et al. 2004). A cèl·lules malignes, no es va observar mort cel·lular després de la sobreexpressió de la forma mutant però es va observar una clara reducció de la proliferació cel·lular i una tumorigènesi tardana, la qual es va donar d'una manera més evident a les cèl·lules MDA-MB 468 que a les MDA-MB 231. A més a més, es van obtenir els mateixos resultats tant en els experiments *in vitro* com *in vivo*. Estudis realitzats prèviament han demostrat que la sobreexpressió d'eIF4E transforma cèl·lules normals, i que les cèl·lules tumorals necessiten una traducció contínua de proteïnes per la seva persistència i propagació tant *in vitro* com *in vivo* (Avdulov et al. 2004). Un estudi previ fet per Avdulov et al. (2004) va descriure també *in vitro* una activitat antiproliferativa de 4E-BP1 a les mateixes cèl·lules de carcinoma de mama utilitzades en el present estudi. Ells també van observar que la sobreexpressió a les MDA-MB 468 d'una forma mutada de 4E-BP1 a diferents llocs de fosforilació suprimia la proliferació cel·lular i la seva tumorigènesi. De totes maneres, el mutant utilitzat en aquest estudi era A37/A46, mentre que en el present estudi es va utilitzar un mutant en els quatre llocs de fosforilació principals de 4E-BP1, ja que les dues últimes fosforilacions, Thr 70 i Ser 65, són considerades responsables de l'alliberament de l'eIF4E. A més a més, els experiments *in vivo* realitzats per l'Avdulov et al (2004) es van parar a dia 21 després de la injecció, i nosaltres vam allargar l'estudi fins a dia 54. Vam observar que la supressió de la tumorigènesi es va mantenir fins a dia 54 a les cèl·lules MDA-MB 468 amb 4E-BP1 mutant, tot i que l'expressió ectòpica de 4E-BP1 ja no era present en el moment de l'eutanàsia. A més a més, en aquest

estudi s'han presentat nous resultats amb les cèl·lules de carcinoma de mama MDA-MB 231, a les quals la supressió de la tumorigènesi no va ser evident i havia desaparegut a dia 54. És interessant destacar que les cèl·lules MDA-MB 468 tenen mutacions a *PTEN*, el qual probablement està activant constitutivament mTOR i, per tant, la fosforilació de 4E-BP1, com es va observar. Suggestim que aquestes cèl·lules són més sensibles a la fosforilació de 4E-BP1 que les cèl·lules MDA-MB 231, les quals tenen nivells basals més baixos de 4E-BP1 Ser 65. Com ja s'ha descrit amb anterioritat, la forma hipofosforilada de 4E-BP1 s'uneix a l'eIF4E, amb el consegüent resultat que la sobreexpressió de 4E-BP1 (normal o mutat) no tenia efecte sobre el creixement cel·lular. A més a més, les cèl·lules MDA-MB 231 podrien estar utilitzant altres vies de senyalització diferents a la fosforilació de 4E-BP1. És important destacar que aquestes cèl·lules tenen mutacions a *KRAS* i, per tant, podrien ser més MAPK-dependents.

### **6.4.- FOSFORILACIÓ D'eIF4E I AGRESSIVITAT CEL·LULAR**

El significat biològic de la fosforilació de l'eIF4E i el seu efecte en la traducció és encara una controvèrsia (Scheper and Proud 2002; Wendel et al. 2007). La fosforilació de l'eIF4E no és indispensable pel desenvolupament de ratolins (Ueda et al. 2004), però sembla ser important perquè es doni un desenvolupament normal a *Drosophila* (Lachance et al. 2002). En un estudi fet per Topisirovic et al. l'any 2004 amb cultius cel·lulars, la fosforilació de l'eIF4E dins del nucli semblava promoure la funció de transport d'mRNAs específics cap al citoplasma així com l'activitat transformant de l'eIF4E (Topisirovic et al. 2004) i, de fet, l'eIF4E promou l'exportació d'ODC i ciclina D1 del nucli al citoplasma (Rousseau et al. 1996). Així doncs, la fosforilació de l'eIF4E sembla ser important en el control del transport de l'mRNA i, consegüentment, en les propietats transformants de l'eIF4E (Li et al. 2002). A més a més, els nostres resultats associen nivells elevats de p-eIF4E amb una pitjor supervivència. D'una manera similar els nivells de proteïna de p-eIF4E s'han associat amb el grau de malignitat en cèl·lules de càncer de mama (Kim et al. 2009). Es podrien proposar diverses teories sobre el paper de p-eIF4E en la transformació i la progressió. Una de les hipòtesis és que p-eIF4E tingui menys afinitat pel 4E-

BP1 que la forma total de l'eIF4E, almenys en certs tipus cel·lulars. En aquest treball, la co-immunoprecipitació amb eIF4G, p-eIF4G i 4E-BP1 i els posteriors estudis per *Western Blot* amb anticossos contra p-eIF4E i eIF4E total no van mostrar diferències d'unió significants pel que feia a l'eIF4E o al p-eIF4E amb l'eIF4G o el p-eIF4G. Per contra, semblava que hi havia una menor afinitat del p-eIF4E amb el 4E-BP1 total comparat amb l'eIF4E total en les cèl·lules de càncer de mama MDA-MB 468. A més a més, les MDA-MB 468 que contenien el 4E-BP1 mut no mostraven fosforilació de l'eIF4E a diferència de les MDA-MB 468 amb vector buit o amb el 4E-BP1 wt. Cal destacar que aquest efecte no es va observar a les MDA-MB 231 on la sobreexpressió del 4E-BP1 mutant no va mostrar cap efecte. Estudis anteriors han demostrat que la forma fosforilada de l'eIF4E es dona quan es troba unit a l'eIF4G, ja que la quinasa responsable de fosforilar-lo són les MNKs i aquesta es troba unida a l'eIF4G. Suposem que la fosforilació de l'eIF4E observada a les MDA-MB 468 wt correspon a la fracció de l'eIF4E que no es troba unit al 4E-BP1 ectòpic i que es podria haver inactivat per fosforilació. D'una manera similar, la defosforilació de l'eIF4E induïda per infecció de cèl·lules amb adenovirus (Feigenblum and Schneider 1996) sembla que és deguda a la separació física del complex eIF4F de la MNK1, per una proteïna de 100 kDa que competeix amb MNK1 per la unió a l'eIF4G (Cuesta et al. 2000).

L'eIF4E és fosforilat per les MNKs, les quals són activades a través de la via clàssica de les MAPK (ERK1, 2) i la via MAPK activada per estrès (p38 MAPK) (Ueda et al. 2004; Graff et al. 2007; Proud 2007). A part de l'eIF4E, altres substrats de les MNKs (per exemple, hnRNPA1) semblen estar implicats en el control de la traducció (Buxade et al. 2005), encara que les MNKs semblen jugar un paper crucial en la regulació d'mRNAs específics i no en la traducció en general (Buxade et al. 2008). En el nostre model, ja que el tractament amb l'inhibidor d'MNKs induïa una parada en el creixement cel·lular i les cèl·lules adquirien una morfologia més compacta, vam hipotetitzar que aquestes cèl·lules tractades podrien expressar algunes proteïnes d'adhesió cel·lular, com cadherina-E (Niessen and Gottardi 2008). En el cas de les cèl·lules MDA-MB 468 es va observar una relocalització de la cadherina-E a la membrana un cop tractades amb l'inhibidor d'MNKs; aquesta relocalització es va observar tant en les cèl·lules que sobreexpressaven el 4E-BP1 wt o mutant

com en les que contenen el vector buit. Cal destacar que les cèl·lules MDA-MB 468<sup>4E-BP1 mut</sup>, que per *Western Blot* havien mostrat uns nivells de p-eIF4E molt més baixos que les cèl·lules amb vector buit o 4E-BP1 wt, ja mostraven una relocalització de cadherina-E a la membrana abans del tractament amb l'inhibidor d'MNKs. Aquests resultats podrien ser indicadors d'una major agressivitat cel·lular en aquelles cèl·lules amb nivells més alts de p-eIF4E. Malgrat tot, encara són necessaris més estudis per poder relacionar aquests factors de senyalització amb l'expressió i relocalització de cadherina-E a membrana.

### **6.5. – LOCALITZACIÓ CEL·LULAR DE L'EIF4E**

L'eIF4E és una proteïna que es localitza principalment al citoplasma, però una fracció d'aquesta es pot trobar dins del nucli (Strudwick and Borden 2002; Rong et al. 2008). El paper de l'eIF4E dins del nucli no ha estat tan intensament estudiat com el seu paper citoplasmàtic, però se sap que promou l'exportació nuclear de diversos mRNAs (Rousseau et al. 1996; Culjkovic et al. 2005). Rong i Livingstone van descriure l'any 2008 que el tractament amb rapamicina afavoria l'acumulació de l'eIF4E dins del nucli i que aquesta era dependent de 4E-BP1 i del seu estat de fosforilació (Rong et al. 2008). Un any més tard, Livingstone et al van descriure nous inhibidors de la via d'mTOR que eren anàlegs a la rapamicina i que provocaven el mateix efecte que la rapamicina sobre la translocació de l'eIF4E al nucli (Livingstone et al. 2009). L'acumulació de l'eIF4E dins del nucli es donava a cèl·lules MEFS *wild type*, però no en MEFs 4E-BP1/2 DKO, tractades amb inhibidors de la via PI3K-mTOR. Així doncs, la inhibició d'mTOR, amb la subseqüent defosforilació de les 4E-BPs nuclears és necessària per l'acumulació nuclear de l'eIF4E. A més a més, inhibidors d'altres vies de senyalització van fallar a l'hora d'induir l'acumulació nuclear de l'eIF4E, indicant que era específic d'mTOR (Livingstone et al. 2009). En el nostre estudi, a l'inhibir diferents quinases que podien afectar a la fosforilació de 4E-BP1, només la inhibició de p38 $\beta$  mostrava una relocalització clara de l'eIF4E al nucli. Això podia ser indicatiu de que p38 $\beta$  podia estar jugant un paper important en la via d'mTOR a través de la fosforilació directa o bé indirecta de 4E-BP1.



## **6.6.- HIPERFOSFORILACIÓ DE 4E-BP1 I LA SEVA CORRELACIÓ AMB mTOR, CDK1 I ALTRES FACTORS CEL·LULARS**

Malgrat que la quinasa responsable de la fosforilació de 4E-BP1 als residus de l'extrem carboxi-terminal (Thr 70 i Ser 65) no ha estat clarament definida, el complex ciclina B-CDK1 ha estat implicat en la fosforilació de 4E-BP1 al residu Thr 70 durant la fase mitòtica del cicle cel·lular (Heesom et al. 2001; Greenberg and Zimmer 2005). El tractament amb Taxol indueix l'activació del complex ciclina B-CDK1 (O'Connor et al. 2002; Mollinedo and Gajate 2003). Segons els resultats obtinguts en aquest estudi, el tractament amb Taxol provocava un increment en la fosforilació de 4E-BP1 en les dues línies cel·lulars testades, encara que mostraven diferents graus de fosforilació. Vam observar que la línia cel·lular MDA-MB 231 mostrava un increment en la intensitat de la segona i tercera banda (forma  $\beta$  i  $\gamma$ , respectivament) en resposta al Taxol mentre que la línia cel·lular HEK 293T mostrava l'aparició d'una quarta isoforma, que desapareixia al tractar les cèl·lules amb Purvalanol. El Purvalanol és un inhibidor de CDK1, CDK2, CDK5 i CDK7. Per tant, podem dir que l'aparició d'aquesta quarta isoforma de 4E-BP1 ve determinada per l'acció d'alguna d'aquestes CDKs. Donat que el Taxol para la cèl·lula en fase G2/M i és en aquesta fase del cicle cel·lular on es troba actiu el complex ciclina B-CDK1 i d'acord amb el que s'ha descrit anteriorment sobre la capacitat del complex ciclina B-CDK1 de fosforilar 4E-BP1 (Greenberg and Zimmer 2005), probablement l'aparició d'aquesta quarta isoforma és deguda a l'activitat de la CDK1. Pel que fa a les MDA-MB 231, on no vam observar l'aparició d'aquesta quarta banda en resposta al Taxol però sí un augment d'intensitat a les bandes corresponents a la Thr 70 i Ser 65, el co-tractament amb Purvalanol semblava baixar la intensitat d'aquestes dues bandes, sobretot la banda corresponent a la Thr 70.

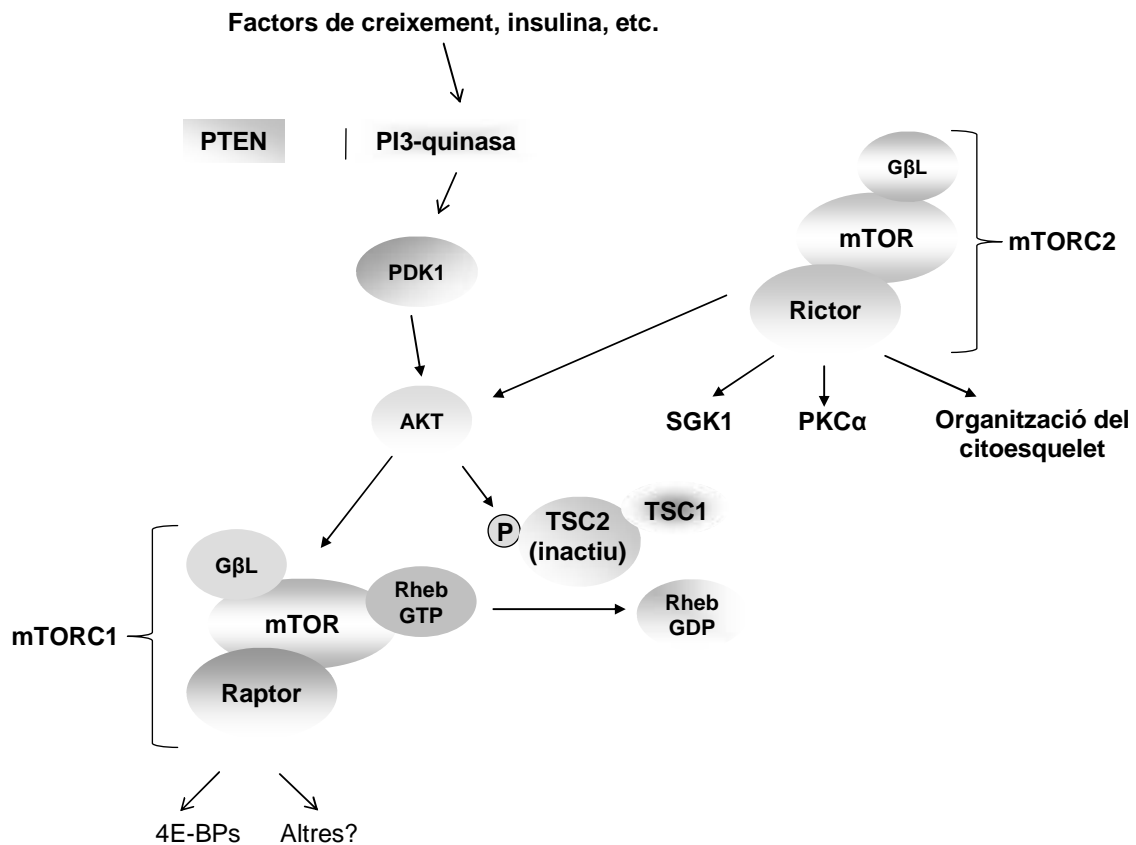
El Taxol també activa la via de la PI3K/AKT (Vivanco and Sawyers 2002). Això ens podria fer pensar que la fosforilació induïda per Taxol podria derivar també de l'activitat d'mTOR. La línia HEK 293T, que mostrava una quarta isoforma de 4E-BP1 induïda per Taxol quan es co-tractava amb rapamicina, mostrava la desaparició de la tercera isoforma però no de la quarta

isoforma. Això suggereix que en aquest tipus cel·lular, la fosforilació causada pel Taxol és independent de la via d'mTOR. A més, el fet que la rapamicina sigui capaç de fer desaparèixer la tercera isoforma (forma  $\gamma$ ) però no la quarta isoforma indica que l'aparició d'aquesta quarta isoforma no presenta un seguiment jeràrquic com ha estat descrit per a les altres tres isoformes de 4E-BP1  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  (Proud 2004; Wang et al. 2005).

Obtinguts aquest resultat, que recolzaven estudis previs realitzats per altres autors, on es descrivia que mTOR i CDK1 jugaven un paper important en la regulació de la fosforilació de 4E-BP1 (Rhoads 1999; Schmelzle and Hall 2000; Raught et al. 2001; O'Connor et al. 2002; Mollinedo and Gajate 2003; Greenberg and Zimmer 2005) i vista la importància clínica que podia tenir la fosforilació de 4E-BP1, vam seleccionar 48 quinases cel·lulars que podien ser candidates a fosforilar 4E-BP1 i les vam inhibir per mitjà de siRNAs prèviament validats. Entre les quinases seleccionades es van incloure mTOR i CDK1. Novament, es va observar efecte de CDK1 sobre la fosforilació de 4E-BP1 en les MDA-MB 231. Aquests resultats indiquen que CDK1 sí que juga un paper important en aquest tipus cel·lular i que segons els estudis que havíem obtingut prèviament, el Purvalanol potser no acaba de ser un bon inhibidor d'aquesta quinasa ja que l'efecte observat després d'inhibir la CDK1 amb un siRNA era molt més dràstic que quan havíem intentat inhibir la CDK1 per mitjà de Purvalanol, on l'efecte sobre la banda de fosforilació Ser 65 era molt més tènue.

La quinasa PDK1 també va mostrar efecte sobre la fosforilació de 4E-BP1. Aquests resultats es podien esperar ja que PDK1 fosforila AKT a la Thr 308 provocant la seva activació (Alessi et al. 1997; Calleja et al. 2007; Calleja et al. 2009). De totes maneres per tal que AKT s'activi del tot és necessària la seva fosforilació a la Ser 473, que ve donada per mTORC2 (Figura 38). mTOR és tant un activador com un efector de la senyalització d'AKT, així que actua com a punt d'unió entre la resposta a factors de creixement a través de la PI3K i la traducció de proteïnes, el creixement cel·lular, la proliferació, el metabolisme i la supervivència. Un cop AKT ha estat activat del tot activa mTORC1 a través de la inhibició de TSC2, la qual, junt amb TSC1, regula negativament mTORC1 per la inhibició de la GTPasa Rheb, un regulador positiu d'mTORC1. Com ja s'ha descrit anteriorment una de les dianes

principals d'mTOR és 4E-BP1 (Guertin and Sabatini 2009), per tant, era lògic que a l'inhibir PDK1, amb la conseqüent inhibició d'mTOR, s'observés una baixada de la fosforilació de 4E-BP1 (Figura 38). Malgrat tot, no vam observar cap efecte sobre la fosforilació de 4E-BP1 després de la inhibició d'AKT1, AKT2 o AKT3, potser, al no inhibir les tres isoformes de cop permetia que les dues isoformes no inhibides féssin la funció de la forma d'AKT inhibida.

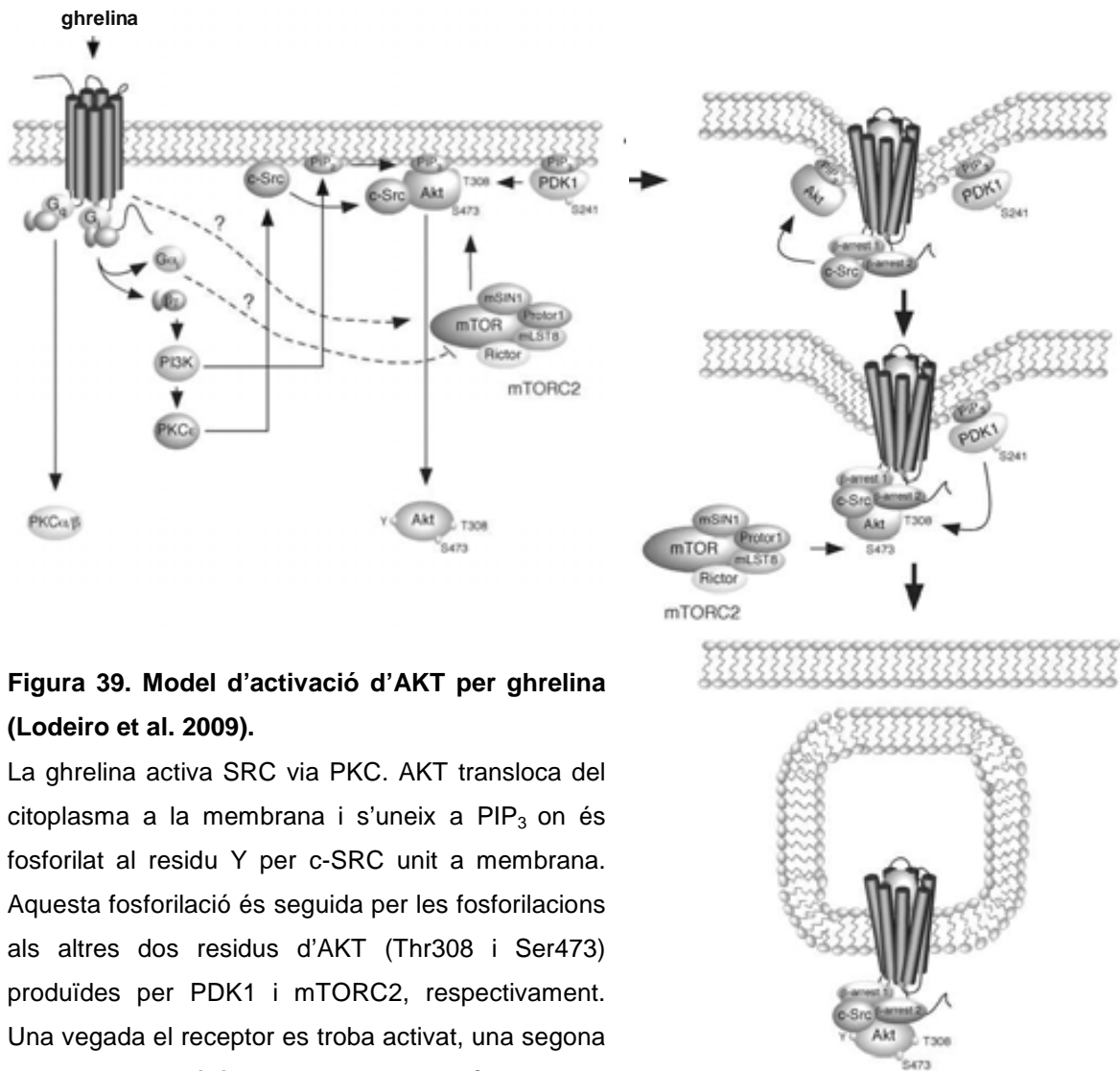


**Figura 38.** Via de senyalització de PI3K-PDK en resposta a factors de creixement i insulina.

Relacionat amb això també es va observar una disminució de la fosforilació de 4E-BP1 quan es va inhibir SRC. c-SRC és una quinasa que es troba implicada en l'activació de les MAPK en resposta a ghrelina. La ghrelina indueix una primera onada de l'activació de la via de SRC via senyalització dependent de proteïna G i PI3K, que és seguida per una segona onada de l'activació de c-SRC via senyalització de  $\beta$ -arrestines (Camina et al. 2007) (Figura 39). En un estudi fet per Lodeiro et al l'any 2009, es va veure que c-SRC actuava com a quinasa *upstream* d'AKT, ja que a l'inhibir-lo amb un siRNA reduïa la fosforilació d'AKT induïda per ghrelina a la Thr 308 i Ser 473

(Lodeiro et al. 2009). Estudis anteriors han demostrat que a part de les fosforilacions a la Thr 308 i Ser 473, la fosforilació al residu Y també és essencial per l'activació d'AKT (Chen et al. 2001; Conus et al. 2002; Lodeiro et al. 2009). Es va veure que la ghrelina activava la fosforilació al residu Y d'AKT. Malgrat tot, el mecanisme pel qual es dona aquesta fosforilació resta encara per explicar. També van demostrar, per mitjà d'assajos de co-immunoprecipitació, que c-SRC interacciona amb AKT en resposta a ghrelina (Figura 39). Aquesta interacció es dona a través del domini SH3 de SRC amb el domini PXXP d'AKT (Jiang and Qiu 2003). AKT es translocaria a la membrana a través de la unió del seu domini PH a PIP<sub>3</sub> generat per PI3K i això permetria la interacció del domini SH3 de SRC unit a membrana amb el domini PXXP d'AKT. A partir d'aquí SRC fosforila AKT en el seu residu Y, i es desencadenen les posteriors fosforilacions d'AKT a Thr 308 i Ser 473 per la PDK1 i mTORC2 (Jiang and Qiu 2003). Així doncs, SRC, en resposta a ghrelina, coopera amb PI3K en l'activació d'AKT. Aquests resultats recolzen els resultats de Karni et al (2005) on s'havia descrit la implicació de SRC en la fosforilació de 4E-BP1. Un cop el receptor ha estat activat, una segona onada de senyalització és donada per les  $\beta$ -arrestines. SRC és reclutat al receptor de membrana després de l'activació per ghrelina i forma un complex amb les  $\beta$ -arrestines 1 i 2 associades al receptor. (Camina et al. 2007). D'aquesta manera AKT pot interactuar amb SRC com a conseqüència de la co-localització a la membrana plasmàtica quan PI3K és activat en resposta a ghrelina. Aquesta associació d'AKT-c-SRC inicia la segona onada de fosforilació d'AKT al seu residu Y (Figura 39). Una altra via per mitjà de la qual podria estar actuant sobre la fosforilació de 4E-BP1 seria a través de la fosforilació i conseqüent inactivació de TSC2.

Altres quinases que a l'inhibir-les també van mostrar efecte sobre la fosforilació de 4E-BP1 van ser PRKCB1, PAK2, p38 $\beta$ , PRKCA i CaMKKB. Curiosament, algunes d'elles es troben relacionades amb l'apoptosi. PRKCA i



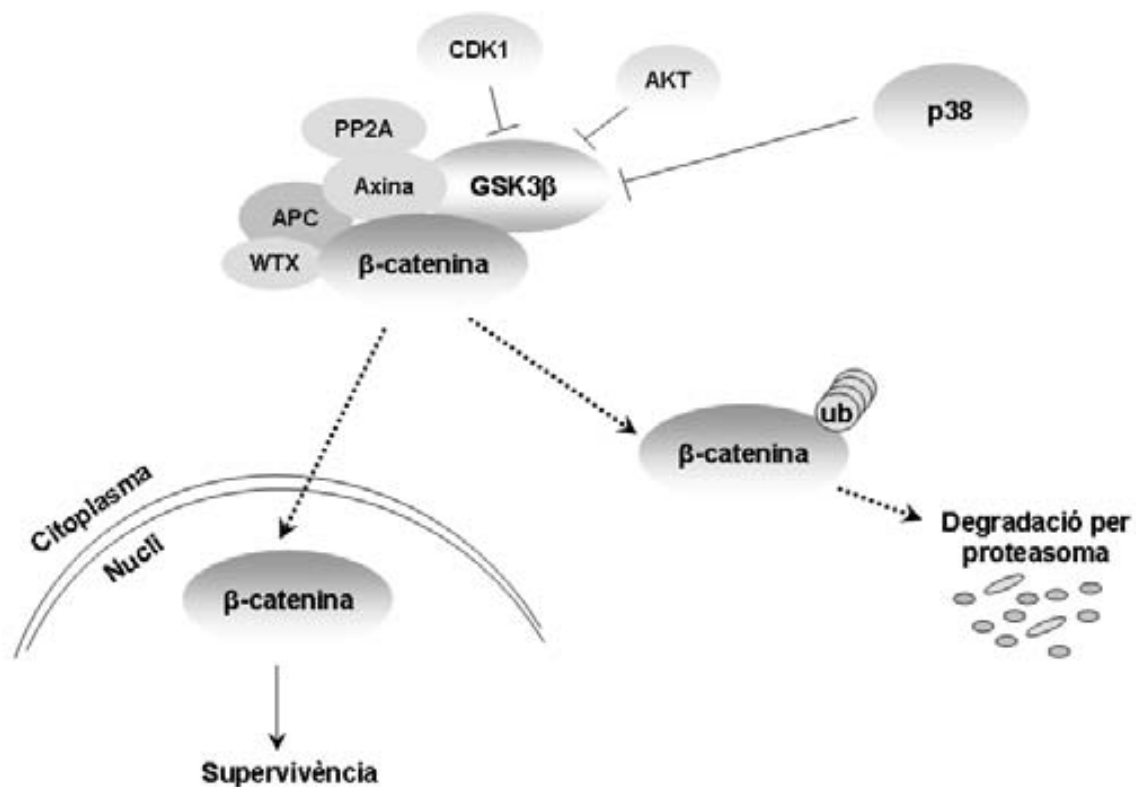
**Figura 39. Model d'activació d'AKT per ghrelina (Lodeiro et al. 2009).**

La ghrelina activa SRC via PKC. AKT transloca del citoplasma a la membrana i s'uneix a PIP<sub>3</sub> on és fosforilat al residu Y per c-SRC unit a membrana. Aquesta fosforilació és seguida per les fosforilacions als altres dos residus d'AKT (Thr308 i Ser473) produïdes per PDK1 i mTORC2, respectivament. Una vegada el receptor es troba activat, una segona onada d'activació és mitjançada per les β-arrestines 1 i 2, implicant el reclutament del receptor d'hormones (GHS-R1a), c-SRC i AKT.

PRKCB1 (conegudes també com PKCα i PKCβ) semblen regular múltiples vies, incloent la via de les MAPK (ERK1/2, JNK i p38). El tractament amb PMA, un éster de forbol que indueix apoptosi a través de PKC, produeix un increment dels nivells de p38. Per contra, inhibidors de p38 bloquegen l'efecte apoptòtic causat per PMA; això sugereix un paper de p38 en l'apoptosi mitjançada per PKC (Tanaka et al. 2003; Yin et al. 2005). Les PAK a mamífers també han estat implicades en la regulació de les vies de senyalització MAPK (incloent JNK, ERK1/2 i p38). PAK2 s'activa per talls proteolítics que es donen durant l'apoptosi mediada per caspases i podria jugar un paper important en la regulació de processos apoptòtics de la mort cel·lular. Així doncs, tant les PKC

com PAK2 podrien activar la via p38 MAPK, que també afecta la fosforilació de 4E-BP1, i jugar un paper en la regulació dels *checkpoints* del cicle cel·lular i la supervivència cel·lular. Malgrat tot, el fet que aquestes quinases estiguin relacionades amb la fosforilació de 4E-BP1 fa pensar que contribueixen a la supervivència cel·lular. Prèviament ja s'han descrit funcions no clàssiques de p38 on se l'ha relacionat amb la supervivència cel·lular. En aquest sentit s'ha demostrat que p38 podria contribuir a la resistència a quimioteràpics que metilen el DNA per mitjà de la contribució a la reparació del DNA a la fase G2/M del cicle cel·lular, permetent a les cèl·lules escapar de la catàstrofe mitòtica (Hirose et al. 2003). Estudis més recents han relacionat nous mecanismes pels quals p38 MAPK podria estar implicada directament amb la supervivència cel·lular. La  $\beta$ -catenina és un factor de transcripció conegut que promou la supervivència cel·lular a través de la regulació de l'expressió d'altres gens de supervivència com c-MYC (He et al. 1998). Els nivells de  $\beta$ -catenina es troben regulats per un complex multiproteic que conté, entre d'altres, GSK3 $\beta$  (Figura 40). La fosforilació de  $\beta$ -catenina per GSK3 $\beta$  du a la  $\beta$ -catenina a ubiquitinització i a la seva subsegüent degradació (Liu et al. 2002). S'ha vist que la senyalització que impedeix que GSK3 $\beta$  fosforili la  $\beta$ -catenina, provoca acumulació de  $\beta$ -catenina al citosol i la seva subsegüent translocació a nucli (Doble and Woodgett 2003). Diferents estudis han descrit que p38 MAPK pot modular l'activitat de GSK3 $\beta$  (Rane et al. 2001; Hildesheim et al. 2004; Wang et al. 2007). La fosforilació de GSK3 $\beta$  es dona principalment per AKT al l'extrem N-terminal (Cross et al. 1995), però un estudi recent ha demostrat que p38 MAPK pot inactivar directament GSK3 $\beta$  en un residu de l'extrem C-terminal (Thornton et al. 2008). La fosforilació de GSK3 $\beta$  per p38 inhibeix la proteïna, de manera que es produeix una acumulació de  $\beta$ -catenina i, d'aquesta manera, p38 podria mediar la supervivència cel·lular (Figura 40). També s'ha descrit que p38MAPK pot mediar la supervivència neuronal per mitjà de la fosforilació del factor de transcripció MEF2 (Mao and Wiedmann 1999). En els nostre estudi hem observat que p38 $\beta$  es troba implicat en la fosforilació de 4E-BP1, aquesta podria ser una altra via alternativa per mitjà de la qual contribueix a la supervivència cel·lular promovent la traducció de proteïnes. Tot i així, no vam observar cap efecte de l'altra isoforma majoritària de la cèl·lula, la p38 $\alpha$ .

A l'inhibir diferents quinases vam observar que algunes d'elles afectaven a la quantitat total de proteïna de 4E-BP1. Aquestes quinases eren: LRRK2, RAF-1, p38 $\gamma$ , GSK3 $\beta$ , AMPK $\alpha$ , PRKACA i PRKACB, observant-se un efecte dràstic en LRRK2 i RAF-1. Per mitjà de quin mecanisme aquestes quinases poden estar afectant l'estabilitat de dita proteïna o bé si per contra, aquesta inhibició es dona a nivell d'RNA, és un fet que s'hauria d'estudiar més detingudament en un futur.



**Figura 40. Mecanisme per mitjà del qual p38 pot mediar la supervivència cel·lular.**

p38 fosforila i inhibeix GSK3 $\beta$ . D'aquesta manera, la  $\beta$ -catenina s'acumula al citosol i transloca posteriorment al nucli.

### **6.7 - p38 $\beta$ i LRRK2**

Obtinguts aquests resultats vam decidir estudiar més detingudament dues d'aquestes quinases. La p38 $\beta$ , que afectava a la fosforilació de 4E-BP1 i la localització intracel·lular de l'eIF4E, i LRRK2 que afectava a la quantitat de proteïna total de 4E-BP1. L'extensió de l'estudi de la inhibició d'aquestes dues quinases a diferents línies cel·lulars de diferents teixits va mostrar que no tots els tipus cel·lulars responien de la mateixa manera a la seva inhibició. En el cas

de p38 $\beta$  es va observar efecte sobre la fosforilació de 4E-BP1 en les cèl·lules HEK 293T i 769-P (amdues de ronyó), en les TIG3 (fibroblasts), HT-29 i DLD-1 (amdues de còlon) i en les MDA-MB 231 (mama). Cal destacar que no vam obtenir els mateixos resultats amb els dos siRNA provats. El primer siRNA, l'utilitzat a l'*screening* inicial, funcionava en totes les línies esmentades, produïnt una baixada de la fosforilació de 4E-BP1. Per contra, l'siRNA 2 no va produir un efecte tant destacat com l'siRNA 1 sobre la fosforilació de 4E-BP1, en les MDA-MB 231, en les HEK 293T, les TIG3, les HT-29 i les DLD-1. Aquests resultats no eren gaire esperançadors, ja que no ens permetien confirmar al 100% els resultats previs obtinguts a l'*screening*. Malgrat tot, si que es produïa el mateix efecte amb l'siRNA1 i l'siRNA2 de p38 $\beta$  en les 769-P. Així doncs, p38 $\beta$  no produïa el mateix efecte sobre els diferents teixits testats. A més a més, pel què fa a les HeLa (cèrvix uteri) i les MDA-MB 468 (mama) es va observar una disminució de la quantitat total de 4E-BP1 total després de la inhibició de p38 $\beta$  amb l'siRNA1 i l'siRNA2. Pel que fa a l'inhibició estable de p38 $\beta$  tampoc es van obtenir bons resultats ja que les cèl·lules morien als pocs dies d'haver *knockejat* el p38 $\beta$ . Aquests resultats es van observar tant en les MDA-MB 231 com en les TIG3 i no ens va permetre fer estudis de viabilitat cel·lular. El fet que la inhibició de p38 $\beta$  provoqués una mort cel·lular tant dràstica ens fa pensar que aquesta proteïna podria estar jugant un paper important en la supervivència d'aquests dos tipus cel·lulars. I que en aquest paper podria trobar-se implicada la fosforilació de 4E-BP1 o bé les altres vies de supervivència cel·lular en les quals pot actuar p38MAPK descrites anteriorment.

Pel què fa a l'LRRK2, es va observar el mateix efecte obtingut a l'*screening* a les MDA-MB 231 i en aquest cas els dos siRNAs testats tenien el mateix efecte sobre 4E-BP1. Altres línies que van mostrar efecte sobre la quantitat de proteïna total de 4E-BP1 van ser les MDA-MB 468, les 769-P, les TIG3 i les DLD-1. Pel que fa a la inhibició estable d'LRRK2 en les TIG3 vam observar que la inhibició de dita quinasa provocava un increment en la proliferació cel·lular. Pocs són els estudis fets sobre LRRK2, una quinasa que ha estat relacionada amb la malaltia de Parkinson. S'ha vist que mutacions dominants en aquest gen són les més freqüents en els parkinsons hereditaris (Paisan-Ruiz et al. 2004; Zimprich et al. 2004; Bonifati 2007). S'han suggerit



diferents substrats de l'LRRK2 incloent la moesina (Jaleel et al. 2007), la  $\beta$ -tubulina (Gillardon 2009) i els substrats de MAPKKK, MKK3/6 o MKK4/7 (Gloeckner et al. 2009). Malgrat tot, encara no se sap si la fosforilació d'algun d'aquests substrats és fisiològicament rellevant. Recentment, Imai et al (2008) van descriure 4E-BP1 com a substrat d'LRRK2. L'estrès oxidatiu i altres estímuls poden impactar sobre la traducció de proteïnes afectant la fosforilació de 4E-BP1. Imai et al (2008) proposaven que LRRK2 modula aquest sistema a través de la fosforilació de 4E-BP1 específica a la Thr 37/46, la qual pot llavors estimular la fosforilació de 4E-BP1 a la Ser 65 i la Thr 70 a través d'altres quinases. De manera similar, Tain et al (2009) van demostrar que els nivells de p-4E-BP1 disminuïen en models *knockout* d'LRRK homozigots de *Drosophila*. Totes aquestes dades donen suport a que 4E-BP1 és substrat d'LRRK2 o del seu homòleg a *Drosophila*, dLRRK. En una altra publicació més recent Kumar et al (2010) confirmaven que 4E-BP1 actua com a substrat d'LRRK2 *in vitro*, però que no es tracta del substrat majoritari. En els nostres estudis veiem *downregulació* de 4E-BP1 total quan inhibim LRRK2. Això ens va fer pensar que LRRK2 podria estar regulant l'estabilitat de proteïna de 4E-BP1 i que d'aquesta manera es trobaria implicada en la supervivència cel·lular. Vam estudiar per quin mecanisme LRRK2 podria estar regulant la quantitat total de 4E-BP1. Segons els nostres resultats, la inhibició del proteasoma provocava una acumulació de 4E-BP1 on l'LRRK2 estava *downregulat*. Això era indicador que la *downregulació* de 4E-BP1 observada a l'inhibir LRRK2 es donava via proteasoma. A més a més, el fet que la rapamicina tingués un efecte inhibitori sobre la pèrdua de 4E-BP1 en les cèl·lules que tenien *knockejat* l'LRRK2 ens fa pensar que l'LRRK2 podria estar estabilitzant 4E-BP1 a la cèl·lula a través de la regulació directa o bé indirecta d'alguna fosfatasa, ja que la fosforilació de 4E-BP1 provoca la ubiquitinització d'aquesta proteïna i incrementa el seu *turnover*. De fet, s'ha demostrat que la rapamicina incrementa l'activitat fosfatasa de la PP2A *in vivo* (Peterson et al. 1999) i que tractaments amb un inhibidor de la PP2A, provoca una hiperfosforilació de 4E-BP1 (Greenberg and Zimmer 2005).

Aquests resultats recolzen els estudis previs fets per Elia et al. (2008) que van descriure que la fosforilació de 4E-BP1 regula la seva ubiquitinització portant-la a la seva degradació per proteasoma. Estudis previs també havien proposat la degradació de 4E-BP1 a través del proteasoma en cèl·lules

infectades per herpes simplex virus-1 (Walsh and Mohr 2004). A més a més, els seus resultats també suggerien que la seva degradació era sensible al seu estat de fosforilació. Per altra banda, encara no està del tot clar si 4E-BP1 és degradat exclusivament pel proteasoma ja que la interpretació dels experiments fets amb MG132 per inhibir l'activitat del proteasoma és complicada pel fet que també provoca la defosforilació d'un o més llocs de 4E-BP1. Aquest podria ser un efecte indirecte sobre la inhibició d'una proteïna quinasa o bé de l'estabilització d'una proteïna fosfatasa per MG132 (Torres et al. 2003) i podria potenciar en inhibició del procés d'ubiquitinització que és induït per fosforilació.



---

# CONCLUSIONS

---



**A)** A nivell clínic-patològic, l'expressió d'elevats nivells de p-4E-BP1, eIF4E i p-eIF4E mostrava correlació amb el pronòstic en pacients amb carcinoma de mama, destacant les següents conclusions:

**1.-** Nivells elevats de 4E-BP1 i p-4E-BP1 correlacionaven amb el grau histològic del tumor. La ràtio de p4E-BP1:4E-BP1 relacionava amb la presència de metàstasi en els nòduls limfàtics i amb el nombre de nòduls afectats. Nivells elevats de la ràtio de p4E-BP1:4E-BP1, l'eIF4E total i el p-eIF4E eren indicadors d'una pitjor supervivència. Tot això indica que p-4E-BP1 podria ser un bon biomarcador en càncer de mama.

**2.-** Els nivells d'mRNA de 4E-BP1 i eIF4E no estaven incrementats en els tumors de mama analitzats, de manera que els nivells de proteïna no es veien correlacionats amb els d'mRNA.

**B)** A nivell cel·lular i molecular, la sobreexpressió de 4E-BP1 wt i una forma mutant de 4E-BP1, que no es pot hiperfosforilar, tenien efecte citotòxic en cèl·lules normals i en alguns tipus tumorals, observant que:

**3.-** La sobreexpressió de 4E-BP1 wt en les cèl·lules IMR90 suprimia significativament la proliferació cel·lular, mentre que la forma mutant de 4E-BP1 provocava la mort cel·lular.

En el cas de les MDA-MB 468 la seva proliferació es va suprimir quan es va sobreexpressar el 4E-BP1 wt i la forma mutant de 4E-BP1. No es va observar cap efecte sobre la proliferació cel·lular de les MDA-MB 231 quan el 4E-BP1 wt i la forma mutant eren sobreexpressats. Els resultats obtinguts *in vitro* a les MDA-MB 468 i les MDA-MB 231 es van confirmar amb experiments *in vivo*. Tot això indica que 4E-BP1 podria evitar la propagació de les cèl·lules tumorals, almenys en alguns tipus cel·lulars.

**4.-** En les cèl·lules MDA-MB 468 que contenien el 4E-BP1 mutant es van observar nivells de p-eIF4E més baixos comparat amb les cèl·lules control. Aquests nivells reduïts de p-eIF4E correlacionaven amb una relocalització de

## CONCLUSIONS

---

cadherina-E a la membrana cel·lular, de manera que la forma fosforilada de l'eIF4E es podria relacionar amb una major agressivitat cel·lular.

**C)** A l'screening de quinases que podien trobar-se implicades en la fosforilació de 4E-BP1, a més a més d'mTOR, es van identificar diverses quinases relacionades directa o indirectament amb la fosforilació i la quantitat de 4E-BP1. En aquest estudi es va poder concloure que:

**5.-** La inhibició de CDK1, PDK1, SRC, PRKCB1, PAK2, p38 $\beta$ , PRKCA i CaMKKB provocava la defosforilació de 4E-BP1. Això era indicatiu que aquestes quinases actuaven de manera directa o indirecta sobre la fosforilació de 4E-BP1.

**6.-** La inhibició de p38 $\beta$  provocava una relocalització de l'eIF4E al nucli, de manera que p38 $\beta$  podria estar jugant un paper important en la via d'mTOR a través de la fosforilació directa o bé indirecta de 4E-BP1.

**7.-** La inhibició d'LRRK2, RAF-1, p38 $\gamma$ , GSK3 $\beta$ , AMPK $\alpha$ , PRKACA i PRKACB provocava una disminució dels nivells totals de 4E-BP1 a la cèl·lula.

**8.-** A les cèl·lules TIG3, la inhibició estable d'LRRK2 provocava una disminució dels nivells totals de 4E-BP1 i un increment de la proliferació cel·lular comparat amb les cèl·lules control; aquest fet indicava que LRRK2 podia jugar un paper important en el control del creixement cel·lular a través de l'estabilització directa o bé indirecta de 4E-BP1.

**9.-** A les MDA-MB 231 i les TIG3, la degradació de 4E-BP1 produïda a l'inhibir LRRK2 es donava via proteasoma. El tractament d'aquestes cèl·lules amb rapamicina provocava acumulació de 4E-BP1 en cèl·lules on l'LRRK2 es trobava inhibit. Això indicava que probablement aquesta quinasa estabilitza, de manera directa o bé indirecta, alguna fosfatasa de 4E-BP1.

Amb aquests resultats proposem que p-4E-BP1 podria ser un factor clau candidat per establir el pronòstic en càncer de mama. A més a més, la regulació de la síntesi proteica a través de la inhibició de la fosforilació de 4E-BP1, podria evitar la propagació de la cèl·lula tumoral, almenys en alguns tipus cel·lulars. Proposem 4E-BP1 com a factor clau on convergeixen les principals vies de senyalització que es troben alterades en càncer i podria ser considerada com a possible proteïna diana en futures teràpies contra el càncer







---

# **BIBLIOGRAFIA**

---



- Abraham, R. T. and G. J. Wiederrecht (1996). "Immunopharmacology of rapamycin." Annu Rev Immunol **14**: 483-510.
- Alessi, D. R., S. R. James, et al. (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." Curr Biol **7**(4): 261-9.
- Alessi, D. R., L. R. Pearce, et al. (2009). "New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond." Sci Signal **2**(67): pe27.
- Andersson, K. and R. Sundler (2006). "Posttranscriptional regulation of TNFalpha expression via eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) phosphorylation in mouse macrophages." Cytokine **33**(1): 52-7.
- 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.
- Averous, J. and C. G. Proud (2006). "When translation meets transformation: the mTOR story." Oncogene **25**(48): 6423-35.
- Banerjee, S., K. Narayanan, et al. (2002). "Murine coronavirus replication-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation promotes interleukin-6 production and virus replication in cultured cells." J Virol **76**(12): 5937-48.
- 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.
- Beugnet, A., X. Wang, et al. (2003). "Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1." J Biol Chem **278**(42): 40717-22.
- Bonifati, V. (2007). "LRRK2 low-penetrance mutations (Gly2019Ser) and risk alleles (Gly2385Arg)-linking familial and sporadic Parkinson's disease." Neurochem Res **32**(10): 1700-8.
- Brown, E. J. and S. L. Schreiber (1996). "A signaling pathway to translational control." Cell **86**(4): 517-20.
- Browning, K. S., S. R. Lax, et al. (1987). "Identification of two messenger RNA cap binding proteins in wheat germ. Evidence that the 28-kDa subunit of eIF-4B and the 26-kDa subunit of eIF-4F are antigenically distinct polypeptides." J Biol Chem **262**(23): 11228-32.
- Bushell, M., W. Wood, et al. (2000). "Changes in integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis." Eur J Biochem **267**(4): 1083-91.
- Buxade, M., J. L. Parra-Palau, et al. (2008). "The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases)." Front Biosci **13**: 5359-73.
- 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.

- Cai, S. L., A. R. Tee, et al. (2006). "Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning." *J Cell Biol* **173**(2): 279-89.
- Calleja, V., D. Alcor, et al. (2007). "Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo." *PLoS Biol* **5**(4): e95.
- Calleja, V., M. Laguerre, et al. (2009). "Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition." *PLoS Biol* **7**(1): e17.
- Camina, J. P., M. Lodeiro, et al. (2007). "Stimulation by ghrelin of p42/p44 mitogen-activated protein kinase through the GHS-R1a receptor: role of G-proteins and beta-arrestins." *J Cell Physiol* **213**(1): 187-200.
- Cantley, L. C. and B. G. Neel (1999). "New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(8): 4240-5.
- 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.
- Chen, R., O. Kim, et al. (2001). "Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* **276**(34): 31858-62.
- Cho, P. F., C. Gamberi, et al. (2006). "Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in Drosophila embryos." *Curr Biol* **16**(20): 2035-41.
- Cho, P. F., F. Poulin, et al. (2005). "A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP." *Cell* **121**(3): 411-23.
- Choi, K. M., L. P. McMahon, et al. (2003). "Two motifs in the translational repressor PHAS-I required for efficient phosphorylation by mammalian target of rapamycin and for recognition by raptor." *J Biol Chem* **278**(22): 19667-73.
- Clemens, M. J. (2004). "Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation." *Oncogene* **23**(18): 3180-8.
- Clemens, M. J. and U. A. Bommer (1999). "Translational control: the cancer connection." *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1): 1-23.
- Clemens, M. J., M. Bushell, et al. (2000). "Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells." *Cell Death Differ* **7**(7): 603-15.
- 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.
- Coleman, L. J., M. B. Peter, et al. (2009). "Combined analysis of eIF4E and 4E-binding protein expression predicts breast cancer survival and estimates eIF4E activity." *Br J Cancer* **100**(9): 1393-9.
- Constantinou, C. and M. J. Clemens (2005). "Regulation of the phosphorylation and integrity of protein synthesis initiation factor eIF4GI and the translational repressor 4E-BP1 by p53." *Oncogene* **24**(30): 4839-50.

- Conus, N. M., K. M. Hannan, et al. (2002). "Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase." J Biol Chem **277**(41): 38021-8.
- Craig, A. W., A. Haghighat, et al. (1998). "Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation." Nature **392**(6675): 520-3.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, et al. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature **378**(6559): 785-9.
- 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.
- Cuesta, R., Q. Xi, et al. (2000). "Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F." Embo J **19**(13): 3465-74.
- Culjkovic, B., I. Topisirovic, et al. (2005). "eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR." J Cell Biol **169**(2): 245-56.
- Davies, S. P., H. Reddy, et al. (2000). "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors." Biochem J **351**(Pt 1): 95-105.
- 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. 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.
- Dean, J. L., G. Sully, et al. (2004). "The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation." Cell Signal **16**(10): 1113-21.
- Doble, B. W. and J. R. Woodgett (2003). "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase." J Cell Sci **116**(Pt 7): 1175-86.
- 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.
- Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(1): 11-22.
- Elia, A., C. Constantinou, et al. (2008). "Effects of protein phosphorylation on ubiquitination and stability of the translational inhibitor protein 4E-BP1." Oncogene **27**(6): 811-22.
- Feigenblum, D. and R. J. Schneider (1996). "Cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) and 4E-inactivating protein BP-1 independently regulate cap-dependent translation." Mol Cell Biol **16**(10): 5450-7.
- Fingar, D. C., C. J. Richardson, et al. (2004). "mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E." Mol Cell Biol **24**(1): 200-16.
- 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.
- 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.
- Gera, J. F., I. K. Mellingshoff, et al. (2004). "AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression." J Biol Chem **279**(4): 2737-46.
- Gillardon, F. (2009). "Leucine-rich repeat kinase 2 phosphorylates brain tubulin-beta isoforms and modulates microtubule stability--a point of convergence in parkinsonian neurodegeneration?" J Neurochem **110**(5): 1514-22.
- Gingras, A. C., S. G. Kennedy, et al. (1998). "4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway." Genes Dev **12**(4): 502-13.
- Gingras, A. C., B. Raught, et al. (2001). "Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1." Genes Dev **15**(21): 2852-64.
- 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.
- Gingras, A. C., B. Raught, et al. (2004). "mTOR signaling to translation." Curr Top Microbiol Immunol **279**: 169-97.
- Gloeckner, C. J., A. Schumacher, et al. (2009). "The Parkinson disease-associated protein kinase LRRK2 exhibits MAPKKK activity and phosphorylates MKK3/6 and MKK4/7, in vitro." J Neurochem **109**(4): 959-68.
- Goyer, C., M. Altmann, et al. (1993). "TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function." Mol Cell Biol **13**(8): 4860-74.
- Gradi, A., H. Imataka, et al. (1998). "A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G." Mol Cell Biol **18**(1): 334-42.
- 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.
- Greenberg, V. L. and S. G. Zimmer (2005). "Paclitaxel induces the phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 through a Cdk1-dependent mechanism." Oncogene **24**(30): 4851-60.
- Gross, J. D., N. J. Moerke, et al. (2003). "Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E." Cell **115**(6): 739-50.
- Guertin, D. A. and D. M. Sabatini (2005). "An expanding role for mTOR in cancer." Trends Mol Med **11**(8): 353-61.
- Guertin, D. A. and D. M. Sabatini (2009). "The pharmacology of mTOR inhibition." Sci Signal **2**(67): pe24.
- 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.
- Hara, K., Y. Maruki, et al. (2002). "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action." Cell **110**(2): 177-89.
- 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.
- He, T. C., A. B. Sparks, et al. (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." Science **281**(5382): 1509-12.
- 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.
- Herbert, T. P., R. Fahraeus, et al. (2000). "Rapid induction of apoptosis mediated by peptides that bind initiation factor eIF4E." Curr Biol **10**(13): 793-6.
- Herbert, T. P., G. R. Kilhams, et al. (2000). "Distinct signalling pathways mediate insulin and phorbol ester-stimulated eukaryotic initiation factor 4F assembly and protein synthesis in HEK 293 cells." J Biol Chem **275**(15): 11249-56.
- 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.
- Hernandez, G., M. del Mar Castellano, et al. (1998). "Isolation and characterization of the cDNA and the gene for eukaryotic translation initiation factor 4G from *Drosophila melanogaster*." Eur J Biochem **253**(1): 27-35.
- Hernandez, G. and P. Vazquez-Pianzola (2005). "Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families." Mech Dev **122**(7-8): 865-76.
- Hildesheim, J., G. I. Belova, et al. (2004). "Gadd45a regulates matrix metalloproteinases by suppressing DeltaNp63alpha and beta-catenin via p38 MAP kinase and APC complex activation." Oncogene **23**(10): 1829-37.
- Hirose, Y., M. Katayama, et al. (2003). "The p38 mitogen-activated protein kinase pathway links the DNA mismatch repair system to the G2 checkpoint and to resistance to chemotherapeutic DNA-methylating agents." Mol Cell Biol **23**(22): 8306-15.
- Holcik, M., N. Sonenberg, et al. (2000). "Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death." Trends Genet **16**(10): 469-73.
- Hu, C., S. Pang, et al. (1994). "Molecular cloning and tissue distribution of PHAS-I, an intracellular target for insulin and growth factors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3730-4.
- Huang, S., L. N. Liu, et al. (2001). "p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin." Cancer Res **61**(8): 3373-81.
- Im, E., F. C. von Lintig, et al. (2002). "Rheb is in a high activation state and inhibits B-Raf kinase in mammalian cells." Oncogene **21**(41): 6356-65.
- Imai, Y., S. Gehrke, et al. (2008). "Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*." Embo J **27**(18): 2432-43.

- 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.
- Imataka, H., H. S. Olsen, et al. (1997). "A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G." Embo J **16**(4): 817-25.
- Imataka, H. and N. Sonenberg (1997). "Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A." Mol Cell Biol **17**(12): 6940-7.
- Jacinto, E. and M. N. Hall (2003). "Tor signalling in bugs, brain and brawn." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(2): 117-26.
- Jaleel, M., R. J. Nichols, et al. (2007). "LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity." Biochem J **405**(2): 307-17.
- Jiang, T. and Y. Qiu (2003). "Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation." J Biol Chem **278**(18): 15789-93.
- Johnstone, R. W., A. A. Ruefli, et al. (2002). "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." Cell **108**(2): 153-64.
- Jones, A. C., M. M. Shyamsundar, et al. (1999). "Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2-and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis." Am J Hum Genet **64**(5): 1305-15.
- 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.
- Jung, M. Y., L. Lorenz, et al. (2006). "Translational control by neuroguidin, a eukaryotic initiation factor 4E and CPEB binding protein." Mol Cell Biol **26**(11): 4277-87.
- Karni, R., Y. Gus, et al. (2005). "Active Src elevates the expression of beta-catenin by enhancement of cap-dependent translation." Mol Cell Biol **25**(12): 5031-9.
- Kim, S. H., F. R. Miller, et al. (2009). "Proteomic and phosphoproteomic alterations in benign, premalignant and tumor human breast epithelial cells and xenograft lesions: biomarkers of progression." Int J Cancer **124**(12): 2813-28.
- 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.
- Kozak, M. (1978). "How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA?" Cell **15**(4): 1109-23.
- Kozak, M. (1989). "The scanning model for translation: an update." J Cell Biol **108**(2): 229-41.
- Kremer, C. L., R. R. Klein, et al. (2006). "Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression." Prostate **66**(11): 1203-12.



- Kumar, A., E. Greggio, et al. (2010). "The Parkinson's disease associated LRRK2 exhibits weaker in vitro phosphorylation of 4E-BP compared to autophosphorylation." *PLoS One* **5**(1): e8730.
- Lachance, P. E., M. Miron, et al. (2002). "Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth." *Mol Cell Biol* **22**(6): 1656-63.
- 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.
- Land, S. C. and A. R. Tee (2007). "Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif." *J Biol Chem* **282**(28): 20534-43.
- 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.
- Li, B. D., J. S. Gruner, et al. (2002). "Prospective study of eukaryotic initiation factor 4E protein elevation and breast cancer outcome." *Ann Surg* **235**(5): 732-9.
- Li, B. D., L. Liu, et al. (1997). "Overexpression of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) in breast carcinoma." *Cancer* **79**(12): 2385-90.
- Lin, T. A. and J. C. Lawrence, Jr. (1996). "Control of the translational regulators PHAS-I and PHAS-II by insulin and cAMP in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* **271**(47): 30199-204.
- Liu, C., Y. Li, et al. (2002). "Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism." *Cell* **108**(6): 837-47.
- Livingstone, M., O. Larsson, et al. (2009). "A chemical genetic screen for mTOR pathway inhibitors based on 4E-BP-dependent nuclear accumulation of eIF4E." *Chem Biol* **16**(12): 1240-9.
- Lodeiro, M., M. Theodoropoulou, et al. (2009). "c-Src regulates Akt signaling in response to ghrelin via beta-arrestin signaling-independent and -dependent mechanisms." *PLoS One* **4**(3): e4686.
- Lopez-Lastra, M., A. Rivas, et al. (2005). "Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation." *Biol Res* **38**(2-3): 121-46.
- Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(5): 307-18.
- 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.
- Mamane, Y., E. Petroulakis, et al. (2004). "eIF4E--from translation to transformation." *Oncogene* **23**(18): 3172-9.
- Manning, B. D. and L. C. Cantley (2003). "Rheb fills a GAP between TSC and TOR." *Trends Biochem Sci* **28**(11): 573-6.
- Mao, Z. and M. Wiedmann (1999). "Calcineurin enhances MEF2 DNA binding activity in calcium-dependent survival of cerebellar granule neurons." *J Biol Chem* **274**(43): 31102-7.
- Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, et al. (1997). "Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP." *Cell* **89**(6): 951-61.

- Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, et al. (1999). "Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G." Mol Cell **3**(6): 707-16.
- Matsuo, H., H. Li, et al. (1997). "Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein." Nat Struct Biol **4**(9): 717-24.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mollinedo, F. and C. Gajate (2003). "Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis." Apoptosis **8**(5): 413-50.
- Morino, S., H. Imataka, et al. (2000). "Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region." Mol Cell Biol **20**(2): 468-77.
- 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.
- Mothe-Satney, I., G. J. Brunn, et al. (2000). "Mammalian target of rapamycin-dependent phosphorylation of PHAS-I in four (S/T)P sites detected by phospho-specific antibodies." J Biol Chem **275**(43): 33836-43.
- Murata, T. and K. Shimotohno (2006). "Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E." J Biol Chem **281**(30): 20788-800.
- Nakamura, A., K. Sato, et al. (2004). "Drosophila cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis." Dev Cell **6**(1): 69-78.
- Napoli, I., V. Mercaldo, et al. (2008). "The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP." Cell **134**(6): 1042-54.
- 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.
- Nelson, M. R., A. M. Leidal, et al. (2004). "Drosophila Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression." EMBO J **23**(1): 150-9.
- Neshat, M. S., I. K. Mellingshoff, et al. (2001). "Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10314-9.

- Niessen, C. M. and C. J. Gottardi (2008). "Molecular components of the adherens junction." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 562-71.
- O'Connor, D. S., N. R. Wall, et al. (2002). "A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer." Cancer Cell **2**(1): 43-54.
- Paisan-Ruiz, C., S. Jain, et al. (2004). "Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease." Neuron **44**(4): 595-600.
- 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.
- 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.
- Pestova, T. V., C. U. Hellen, et al. (1996). "Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry." Mol Cell Biol **16**(12): 6859-69.
- Peterson, R. T., B. N. Desai, et al. (1999). "Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4438-42.
- Piccart-Gebhart, M. J., M. Procter, et al. (2005). "Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer." N Engl J Med **353**(16): 1659-72.
- Podsypanina, K., R. T. Lee, et al. (2001). "An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten<sup>+/-</sup> mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10320-5.
- Polunovsky, V. A., A. C. Gingras, et al. (2000). "Translational control of the antiapoptotic function of Ras." J Biol Chem **275**(32): 24776-80.
- 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. (2004). "mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids." Biochem Biophys Res Commun **313**(2): 429-36.
- Proud, C. G. (2005). "The eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins and apoptosis." Cell Death Differ **12**(6): 541-6.
- Proud, C. G. (2007). "Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery." Biochem J **403**(2): 217-34.
- 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.
- Ptushkina, M., T. von der Haar, et al. (1998). "Cooperative modulation by eIF4G of eIF4E-binding to the mRNA 5' cap in yeast involves a site partially shared by p20." Embo J **17**(16): 4798-808.
- 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.
- Qin, H., B. Raught, et al. (2003). "Phosphorylation screening identifies translational initiation factor 4GII as an intracellular target of

- Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase I." J Biol Chem **278**(49): 48570-9.
- Rajasekhar, V. K., A. Viale, et al. (2003). "Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes." Mol Cell **12**(4): 889-901.
- Rane, M. J., P. Y. Coxon, et al. (2001). "p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils." J Biol Chem **276**(5): 3517-23.
- Raught, B., A. C. Gingras, et al. (2000). "Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI." Embo J **19**(3): 434-44.
- Raught, B., A. C. Gingras, et al. (2001). "The target of rapamycin (TOR) proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7037-44.
- Rhoads, R. E. (1999). "Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis." J Biol Chem **274**(43): 30337-40.
- Rhoads, R. E. (2009). "eIF4E: new family members, new binding partners, new roles." J Biol Chem **284**(25): 16711-5.
- Richter, J. D. and N. Sonenberg (2005). "Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins." Nature **433**(7025): 477-80.
- 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.
- Rong, L., M. Livingstone, et al. (2008). "Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs." Rna **14**(7): 1318-27.
- Ronkina, N., A. Kotlyarov, et al. (2007). "The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK." Mol Cell Biol **27**(1): 170-81.
- Rosenwald, I. B. (2004). "The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view." Oncogene **23**(18): 3230-47.
- 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., M. J. Hutzler, et al. (2001). "Expression of eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha is increased frequently in bronchioloalveolar but not in squamous cell carcinomas of the lung." Cancer **92**(8): 2164-71.
- Rousseau, D., A. C. Gingras, et al. (1996). "The eIF4E-binding proteins 1 and 2 are negative regulators of cell growth." Oncogene **13**(11): 2415-20.
- 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 eukaryotic 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.
- Ruggero, D. and P. P. Pandolfi (2003). "Does the ribosome translate cancer?" Nat Rev Cancer **3**(3): 179-92.
- Ruud, K. A., C. Kuhlman, et al. (1998). "Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*." J Biol Chem **273**(17): 10325-30.
- Sachs, A. B., P. Sarnow, et al. (1997). "Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes." Cell **89**(6): 831-8.
- Saghir, A. N., W. J. Tuxworth, Jr., et al. (2001). "Modifications of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) in adult cardiocytes by adenoviral gene transfer: differential effects on eIF4F activity and total protein synthesis rates." Biochem J **356**(Pt 2): 557-66.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, et al. (2005). "Growing roles for the mTOR pathway." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 596-603.
- Schalm, S. S. and J. Blenis (2002). "Identification of a conserved motif required for mTOR signaling." Curr Biol **12**(8): 632-9.
- 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.
- Scheper, G. C., B. van Kollenburg, et al. (2002). "Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA." J Biol Chem **277**(5): 3303-9.
- Schmelzle, T. and M. N. Hall (2000). "TOR, a central controller of cell growth." Cell **103**(2): 253-62.
- Seal, R., R. Temperley, et al. (2005). "Serum-deprivation stimulates cap-binding by PARN at the expense of eIF4E, consistent with the observed decrease in mRNA stability." Nucleic Acids Res **33**(1): 376-87.
- Seki, N., T. Takasu, et al. (2002). "Expression of eukaryotic initiation factor 4E in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the human peripheral lung." Clin Cancer Res **8**(10): 3046-53.
- Shi, Y., A. Frankel, et al. (1995). "Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro." Cancer Res **55**(9): 1982-8.
- Silvera, D., R. Arju, et al. (2009). "Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer." Nat Cell Biol **11**(7): 903-8.
- Silvera, D. and R. J. Schneider (2009). "Inflammatory breast cancer cells are constitutively adapted to hypoxia." Cell Cycle **8**(19): 3091-6.
- Simpson, L. and R. Parsons (2001). "PTEN: life as a tumor suppressor." Exp Cell Res **264**(1): 29-41.
- Smith, M. R., M. Jaramillo, et al. (1990). "Translation initiation factors induce DNA synthesis and transform NIH 3T3 cells." New Biol **2**(7): 648-54.
- Southgate, R. J., B. Neill, et al. (2007). "FOXO1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle." J Biol Chem **282**(29): 21176-86.
- Strudwick, S. and K. L. Borden (2002). "The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus." Differentiation **70**(1): 10-22.
- Tain, L. S., H. Mortiboys, et al. (2009). "Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss." Nat Neurosci **12**(9): 1129-35.

- Tanaka, Y., M. V. Gavrielides, et al. (2003). "Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway." J Biol Chem **278**(36): 33753-62.
- Tee, A. R. and C. G. Proud (2000). "DNA-damaging agents cause inactivation of translational regulators linked to mTOR signalling." Oncogene **19**(26): 3021-31.
- Tee, A. R. and C. G. Proud (2002). "Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif." Mol Cell Biol **22**(6): 1674-83.
- Thornton, T. M., G. Pedraza-Alva, et al. (2008). "Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation." Science **320**(5876): 667-70.
- 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.
- Torres, C., M. K. Francis, et al. (2003). "Metabolic stabilization of MAP kinase phosphatase-2 in senescence of human fibroblasts." Exp Cell Res **290**(2): 195-206.
- 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.
- Tsukiyama-Kohara, K., S. M. Vidal, et al. (1996). "Tissue distribution, genomic structure, and chromosome mapping of mouse and human eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins 1 and 2." Genomics **38**(3): 353-63.
- Tuazon, P. T., W. C. Merrick, et al. (1989). "Comparative analysis of phosphorylation of translational initiation and elongation factors by seven protein kinases." J Biol Chem **264**(5): 2773-7.
- 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.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." Nat Rev Cancer **2**(7): 489-501.
- Walsh, D. and I. Mohr (2004). "Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells." Genes Dev **18**(6): 660-72.
- Wang, L., T. E. Harris, et al. (2007). "PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding." J Biol Chem **282**(27): 20036-44.
- 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. and C. G. Proud (2006). "The mTOR pathway in the control of protein synthesis." *Physiology (Bethesda)* **21**: 362-9.
- Wang, Y., M. M. Zeigler, et al. (2007). "The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival." *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**(1): 68-77.
- 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.
- Wells, S. E., P. E. Hillner, et al. (1998). "Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors." *Mol Cell* **2**(1): 135-40.
- Wendel, H. G., E. De Stanchina, et al. (2004). "Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy." *Nature* **428**(6980): 332-7.
- Wendel, H. G., R. L. Silva, et al. (2007). "Dissecting eIF4E action in tumorigenesis." *Genes Dev* **21**(24): 3232-7.
- Willis, A. E. (1999). "Translational control of growth factor and proto-oncogene expression." *Int J Biochem Cell Biol* **31**(1): 73-86.
- Wolff, A. C., M. E. Hammond, et al. (2007). "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer." *Arch Pathol Lab Med* **131**(1): 18-43.
- 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.
- Yin, L., N. Bennani-Baiti, et al. (2005). "Phorbol ester-induced apoptosis of C4-2 cells requires both a unique and a redundant protein kinase C signaling pathway." *J Biol Chem* **280**(7): 5533-41.
- Zhou, X., M. Tan, et al. (2004). "Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers." *Clin Cancer Res* **10**(20): 6779-88.
- 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.
- Zimprich, A., S. Biskup, et al. (2004). "Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology." *Neuron* **44**(4): 601-7.





---

# ANNEX

---



Els resultats d'aquest treball formen part del següent article:

Berta Pons<sup>1,2\*</sup>, Vicente Peg<sup>1\*</sup>, María Ángeles Vázquez-Sánchez<sup>1</sup>, Laura López-Vicente<sup>1</sup>, Elisabet Argelaguet<sup>1</sup>, Laura Coch<sup>1</sup>, Alba Martínez<sup>1</sup>, Javier Hernández-Losa<sup>1</sup>, Cristina Saura<sup>3</sup>, Octavi Córdoba<sup>4</sup>, Jose Baselga<sup>3</sup>, Gemma Armengol<sup>1,5¶</sup> and Santiago Ramon y Cajal<sup>1¶</sup> *Survival in human breast carcinomas is associated with the factors p-4E-BP1 and p-eIF4E, a new group of molecular funnel targets.* En revisió a PLoS ONE, Manuscript ID 10-PONE-RA-17799



## **Survival in human breast carcinomas is associated with the factors p-4E-BP1 and p-eIF4E, a new group of molecular funnel targets**

Berta Pons<sup>1,2\*</sup>, Vicente Peg<sup>1\*</sup>, María Ángeles Vázquez-Sánchez<sup>1</sup>, Laura López-Vicente<sup>1</sup>, Elisabet Argelaguet<sup>1</sup>, Laura Coch<sup>1</sup>, Alba Martínez<sup>1</sup>, Javier Hernández-Losa<sup>1</sup>, Cristina Saura<sup>3</sup>, Octavi Córdoba<sup>4</sup>, Jose Baselga<sup>3</sup>, Gemma Armengol<sup>1,5¶</sup> and Santiago Ramon y Cajal<sup>1¶</sup>

**Author Affiliations:** <sup>1</sup>Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, <sup>3</sup>Department of Oncology, <sup>4</sup>Department of Gynecology, Vall d'Hebron University Hospital, <sup>5</sup> Department of Animal Biology, Plant Biology and Ecology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

\*These authors contributed equally to this work

¶These authors contributed equally to this work

**Corresponding author:** S. Ramon y Cajal, Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035-Barcelona, Spain

Tel: +34 932746824; Fax: +34 934894015; E-mail: sramon@vhebron.net

**Grant support:** Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ref.05/0818 and 08/0143), Fundació Marató TV3 (Ref.052710), Mutua Madrileña (FMMA/2009/02), Redes temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (Ref.RD06/0020/0104 and RD06/0020/1020) and Generalitat de Catalunya (Ref.2005SGR00144).

## **ABSTRACT**

**Background:** An understanding of cell signaling pathways and protein translation control are crucial for understanding malignant transformation. Several proteins, such as 4E-BP1 and the eIF4F complex, regulate cap-dependent translation. In this study, we investigate the importance of p-4E-BP1 as a key factor in the tumor process and analyze how 4E-BP1 phosphorylation and eIF4E phosphorylation status affect *in vitro* and *in vivo* cell proliferation in breast carcinomas.

**Methodology/Principal Findings:** HER2, estrogen and progesterone receptors, p53, p-ERK1/2, pS6, 4E-BP1, p-4E-BP1, eIF4E, p-eIF4E, and p-eIF4G were analyzed by immunohistochemistry and by Western blot in 96 tumors. Nine cell lines, including 2 breast carcinomas (MDA-MB-231 and 468), human fibroblasts (IMR90 and TIG3), colon cell lines (HT-29, HCT-116) and MDA-MB-435 and HEK 293T were studied. Cells were infected with a retrovirus carrying a mutant 4E-BP1 unable to hyperphosphorylate (4E-BP1mut) or a wild-type 4E-BP1. Xenograft studies involved injecting breast carcinoma cells into athymic BALB/C mice. The binding affinity of 4E-BP1 and eIFs was analyzed by co-immunoprecipitation. An association was found between p-4E-BP1 levels and high-grade tumors, and a correlation of the p-4E-BP1/4E-BP1 ratio and eIF4E and p-eIF4E levels with survival. *In vitro*, 4E-BP1mut induced a significant decrease in cell proliferation, particularly in IMR90, TIG3, HEK 293T, MD-MB-435 and MDA-MB-468 cells, whereas the other carcinoma cell lines were resistant. A correlation was observed between baseline p-eIF4E level and sensitivity to 4E-BP1mut transduction. By co-immunoprecipitation, p-eIF4E seemed to present lower affinity for 4E-BP1 than total eIF4E in MDA-MB-468 cells. After treatment with MNK inhibitor, CGP57380, downregulation of p-eIF4E levels associated with an increase of E-cadherin and  $\beta$ -catenin protein expression.

**Conclusions/Significance:** These results provide evidence that high eIF4E and p-eIF4E levels and a high p-4E-BP1/4E-BP1 ratio indicate poor prognosis in breast cancer. We propose that high levels of p-4E-BP1, which does not bind to eIF4E, and high levels of p-eIF4E, which can likely bypass the suppressor effect of 4E-BP1, are central factors in cell signaling and reflect the oncogenic potential of these pathways in breast cancer.

## INTRODUCTION

Breast carcinomas are the most common malignant tumors in women. Although the life expectancy of patients with breast carcinoma has increased in recent years, about 40% of women die from the disease [1]. Tumors positive to HER2 (human epidermal growth factor receptor) have specific treatments based on inhibitors and monoclonal antibodies (eg, herceptin); nonetheless, only 20%-25% of breast tumors are HER2-positive, and only 50% of these respond to herceptin treatment [2]. Thus, considerable effort is directed toward developing new drugs able to inhibit HER family members [3,4] and toward encountering new targets for drug therapy [5].

It is well recognized that downstream factors of HER2, such as PTEN and PI3K, and other receptors, such as CMET, can also be altered in breast tumors and drive the proliferation signal regardless of HER2 status. All malignant tumors carry numerous genetic alterations that can affect the signaling pathways. Cell signaling is a complex network where two or more pathways sometimes converge in a few proteins that integrate and drive signals from upstream effectors. Identification of these proteins would be extremely useful as a means to determine the status and relevance of the signaling pathways in tumor cells and to identify crucial therapeutic targets.

Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1 (4E-BP1) plays a critical role in the control of biological processes, such as protein synthesis, cell survival, and growth. Thus, it is not surprising that alterations in 4E-BP1 regulation are associated with tumor development and progression [5]. In a recent study, we proposed that the phosphorylated form of this protein (p-4E-BP1) is the Achilles heel of this pathway, acting as a funnel factor or bottleneck through which the transforming signals converge, channeling the oncogenic proliferative signal [5]. Previous work in our laboratory with a large series of breast, ovarian, prostate, and endometrial tumors showed a correlation between p-4E-BP1 and the clinical and pathologic characteristics of tumors, regardless of the upstream oncogenic alterations [6-8].

Other authors have reported similar results in breast carcinomas, melanomas and prostate [9-12]. In a study on breast cancer, phosphorylation of AKT, mTOR, and 4E-BP1 was associated with tumor development and progression [11]. Transfer of 4E-BP1 phosphorylation site mutants into breast carcinoma cells suppresses their tumorigenicity [13]. Kremer et al. [12] recently investigated the expression patterns of several biomarkers of the mTOR pathway in prostate cancer. The authors observed that 4E-BP1 levels, in combination with activation of mTOR and PTEN, were one of the best biomarkers of prostate intraepithelial neoplasia (PIN). Other reports have associated p-4E-BP1 with patient survival in prostate cancer [9] and melanoma [10].

The importance of 4E-BP1 lies in its control of cap-dependent translation initiation complex assembly. Binding of 4E-BP1 to eIF4E prevents formation of the cap-dependent mRNA translation initiation complex, eIF4F (composed of three subunits, eIF4E, eIF4A, and eIF4G), and consequent ribosome binding. 4E-BP1 phosphorylation results in eIF4E release, thereby enabling cap translation initiation. 4E-BP1 is phosphorylated at six serine/threonine sites, and the two ultimate phosphorylations, at Thr70 and Ser65, are considered to be responsible for eIF4E dissociation. In a specific group of mRNAs, all of them with a lengthy and highly structured 5' UTR, translation is dependent on eIF4E availability. The proteins encoded by these mRNAs, such as c-myc, cyclin D1, VEGF, and ODC, are related with cell growth and the cell cycle.

The inhibitory binding protein 4E-BP1 regulates eIF4E availability. Accordingly, eIF4E levels are substantially elevated in several types of cancers reviewed in [14]. eIF4E drives malignancy when it is overexpressed in experimental models reviewed in [15], whereas reducing eIF4E expression effectively inhibits the growth of breast and prostate cancer xenografts and head and neck squamous carcinoma cells [16,17]. Moreover, eIF4E activation is significantly related to reduced patient survival in human prostate cancers, lung cancer and others [9]. eIF4E can be regulated postranscriptionally by two different mechanisms: binding to the translational repressor 4E-BPs and phosphorylation by Mnk [18-20]. Although eIF4E phosphorylation on Ser209 was discovered some time ago,



it remains unclear whether phosphorylation increases or decreases the affinity of eIF4E for the cap structure. Early data indicated that eIF4E phosphorylation increased its affinity for capped mRNAs, whereas more recent studies have shown that eIF4E phosphorylation actually decreases its affinity for the cap structure and capped oligoribonucleotides [19,21,22].

The aim of the present study was to study the importance of p-4E-BP1 and p-eIF4E as key factors in the tumor process and hallmarks of aggressiveness in breast cancer, and to analyze how 4E-BP1 phosphorylation combined with eIF4E phosphorylation status affects cell proliferation *in vitro* and *in vivo* in a breast cancer model. We show that cells expressing high levels of p-eIF4E can be resistant to blocking of cap-dependent translation with a mutant 4E-BP1 and that the downregulation of p-eIF4E associates with an increase of E-cadherin and  $\beta$ -catenin protein levels.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Patients**

Breast tissue specimens with carcinoma from 96 patients diagnosed between 2001 and 2008 were chosen from the tumor bank at the Pathology Department of Vall d'Hebron Hospital (Barcelona, Spain). All tumors were histologically examined to confirm the diagnosis of carcinoma, using light microscopy and eosin stain. A portion of the biopsied samples was quickly frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  immediately after surgery. The remainder of the tumor was fixed in neutral formalin and embedded in paraffin. All the procedures used in the study were approved by the Ethics Committee of Vall d'Hebron Hospital.

### **Immunohistochemistry**

Immunohistochemical staining using the avidin-biotin peroxidase technique was performed for each antibody. In brief, sections 5  $\mu\text{m}$  thick were cut from tissue specimens and placed on poly-L-lysine-coated glass slides. Sections were deparaffinized by xylene treatment and rehydrated in graded alcohol. Endogenous peroxidase was blocked by immersing the sections in 0.1%

absolute methanol for 20 min. For antigen retrieval, tissue sections were heated in a pressure cooker in citric acid monohydrate 10 mM, pH 6.0, for 5 min and incubated with the primary antibody at room temperature. The primary antibodies and dilutions used were: anti-p-4E-BP1 (Thr70) antibody (#9455, Cell Signaling, Beverly, MA; diluted 1:50), anti-4E-BP1 (#9452, Cell Signaling, diluted 1:25), anti-eIF4E (#9742, Cell Signaling, diluted 1:75), anti-p-eIF4E (ab76256, Abcam, Cambridge, UK; diluted 1:100), anti-p-eIF4G (Ser1108) (#2441, Cell signaling, diluted 1:50), anti-p-S6 Ser235/236 (#2211, Cell Signaling, diluted 1:100), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (#9102, Cell Signaling, diluted 1:200), anti-Ki-67 (DAKO, Glostrup, Denmark, prediluted), anti-HER2 (DAKO, prediluted), anti-estrogen receptor (ER) (Novocastra, Bannockburn, IL, 1:50), anti-progesterone receptor (PR) (Novocastra, prediluted) and anti-p53 (clone DO-7, Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ, prediluted). The incubation time for all antibodies was 60 min with the exception of p53, which was incubated for 16 min. All slides were hematoxylin counterstained, dehydrated, and mounted. Negative controls were performed by omitting the primary antibody. All primary antibodies were first tested by Western blot in frozen tissue to evaluate the specificity of the immunoreactivity and antibodies [6,8].

### **Immunohistochemistry evaluation**

All cases were evaluated by two pathologists to determine the percentage of positive cells and intensity of the staining, which was assessed semiquantitatively. The histoscore (Hscore) for cell signaling factors was calculated as follows: (1 x % weak staining cells)+(2 x % moderate staining cells)+(3 x % strong staining cells), with the results ranging from 0 to 300. Because expression of some of these cell signaling factors is heterogeneous, immunostaining was performed in complete tissue sections to evaluate the consistency of the results. Adjacent normal breast tissue was also analyzed to define Hscore thresholds for positive cases.

HER2 was evaluated according the ASCO (American Society of Clinical Oncology) and CAP (College of American Pathologists) guidelines [23]. When an inconclusive HER2 result was found (2+), fluorescent *in situ* hybridization

was carried out (Pathvysion, Vysis Inc., Downers Grove, IL) according to the manufacturer's instructions to confirm HER2/neu amplification.

### **Plasmid constructs**

pBABE-4E-BP1 and pBABE-4E-BP1 (4 Ala) constructs were kindly provided by Dr. N. Sonenberg (McGill University, Montreal, Canada). pBABE-4E-BP1 (4 Ala) contains a mutated form of 4E-BP1. The mutations are on the four most relevant 4E-BP1 phosphorylation sites: Thr 37/46, Thr 70, and Ser 65. Both wild-type (wt) and mutant (mut) 4E-BP1 contain two amino terminal hemagglutinin (HA) tags.

### **Cell lines and cell culture**

The following cell lines were used in the study: IMR90 human primary fibroblasts (ATCC, American Type Culture Collection, Middlesex, UK), TIG3 human fibroblasts (kindly donated by D. Peeper), HEK 293T human embryonal kidney cells (ATCC), MDA-MB 231, and MDA-MB 468 breast carcinoma cells (ATCC), HT-29, HCT116 p53 null and HCT116 p53 wild type, colon carcinoma cell lines (ATCC) and melanoma MDA-MB 435 cells. Cell lines were maintained in standard growth medium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics.

HT-29 cells and MDA-MB 468 cells were treated with 40  $\mu$ M of MNK inhibitor overnight (CGP 57380, Tocris Bioscience, Ellisville, MO).

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

To generate cell lines that stably express 4E-BP1 and mutant 4E-BP1, pBABE constructs were transiently transfected into a packaging cell line (GP-293, Clontech, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. For retroviral infection, cell monolayers were incubated in the presence of the retrovirus-containing supernatant and 4  $\mu$ g/mL polybrene (Sigma-Aldrich Taufkirchen, Germany) for 24 h. Infection was repeated the next day. Twenty-four hours after the second infection, medium supplemented with puromycin (0.7  $\mu$ g/mL, Sigma Aldrich) was added, and cells underwent selection for 3 days to eliminate uninfected cells.

### **Growth curves**

Two days after selection, cells were counted and seeded in duplicate every 3 days. Population doubling (PD) was determined by the following formula:  $PD = \text{Log}(N_f/N_i)/\text{Log}2$ , where  $N_f$  is the number of cells counted and  $N_i$  is the number of cells seeded. Cumulative population doubling level numbers (PDL) represent the sum of PDs from previous passages. The number of cells seeded from the IMR90, MDA-MB 468, and MDA-MB 231 lines were  $1.4 \times 10^5$  cells,  $1.25 \times 10^5$  cells, and  $9 \times 10^4$  cells, respectively. Each curve was performed at least twice with similar results, and each time point was determined in duplicate.

### **Immunofluorescence study**

MDA-MB 468 that stably express 4E-BP1 wt and 4E-BP1 mut (7 days after transduction and 50 days after transduction) were seeded in microscope cover glasses at 60% confluence 24 h before treatment. After treatment with MNK inhibitor (CGP 57380, Tocris Bioscience, Ellisville, MO), cells were fixed in 4% formaldehyde/PBS, permeabilized in 100% methanol, and blocked with 2% BSA. Fixed cells were incubated with anti-E-cadherin mouse monoclonal antibody clone 36B5 (Novocastra) (1:50) overnight at 4°C. After washing with PBS, cells were incubated with rhodamine conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Suffolk, UK; 1:200) for 1 h. Cells were washed twice with PBS and one with distilled water for 10 min each time. Lastly, cells were mounted in Citifluor before observation and analyzed by fluorescence microscopy.

### **Western blot analysis**

Lysates were obtained from cell lines and tissues. Tissues were ground and sonicated in lysis buffer (HEPES 50 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; 1% Triton X; EDTA 1 mM; 10% glycerol) in the presence of protease and phosphatase inhibitors. Subconfluent cells were lysed in the same buffer. After clearing the lysates by centrifugation, protein concentrations were determined using the Bradford assay (Bio-Rad Protein Assay, Munich, Germany). About 50-100 µg of protein was denatured and resolved on sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (PVDF) (Bio-Rad). The primary antibodies used were: anti-

4E-BP1 antibody (#9452, Cell Signaling, diluted 1:1000), anti-eIF4E (#9742, Cell Signaling, diluted 1:1000), anti-p-eIF4E Ser209 (#9741, Cell Signaling, diluted 1:500), anti-eIF4G (#2498, Cell Signaling, diluted 1:1000), anti-p-eIF4G Ser1108 (#2441, Cell Signaling, diluted 1:1000), anti-p-S6 Ser235/236 (#2211, Cell Signaling, diluted 1:1000), anti- $\beta$ -catenin (#9562, Cell Signaling, diluted 1:2000) and anti-HA11 monoclonal antibody (MMS-101P, Covance, Berkeley, CA, diluted 1:1000). Anti-actin (CP01, Calbiochem, Darmstadt, Germany; diluted 1:7000) was used as the loading control. The secondary antibodies used were: donkey anti-rabbit IgG-HRP (NA9340, Amersham Pharma-Biotech, Uppsala, Sweden; diluted 1:2000) and donkey anti-mouse IgG-HRP (NA9340, Amersham Pharma-Biotech; diluted 1:2000). Bound antibodies were visualized with an enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Pharma-Biotech). For the p-eIF4E band intensities, proteins were quantified by densitometry with the Image J software (version 1.41o, National Institutes of Health, Bethesda, MD), normalized to the intensity of  $\beta$ -actin in each sample, and expressed in arbitrary densitometric units (ADU).

### **Immunoprecipitation**

Lysed cells were incubated with 4E-BP1 antibody (#9452, Cell Signaling, diluted 1:50), eIF4G (#2498, Cell Signaling, diluted 1:50) or p-eIF4G Ser1108 (#2441, Cell Signaling, diluted 1:50) overnight at 4°C. The next day, protein G Sepharose 4 Fast Flow (17-0618-01, Amersham Pharma-Biotech) was added, and the solution was gently mixed for 1 h at 4°C. Samples were centrifuged at 12,000 x g for 20 s. The pellet was washed 3 times with 1 mL lysis buffer, and suspended in 30  $\mu$ L sample reducing buffer (1% SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris, pH 7.5). The suspension was heated to 95°C for 3 min and centrifuged at 12,000 x g for 20 s to remove the beads. Lastly, 1  $\mu$ L of 0.1% bromophenol blue was added, and the supernatant was analyzed by Western blot as described above.

### **Tumor formation assay**

Four-week-old athymic female BALB/C nude mice were purchased from Harlan Laboratories (San Pietro al Natisone, Italy) and housed for 1 week before the experiment. A  $5 \times 10^6$  amount of MDA-MB 468 cells or MDA-MB 231 cells was

suspended in 100  $\mu$ L of PBS and injected subcutaneously in the flanks of 3 animals (right and left). Tumor growth was monitored by daily measurement. The latency period to tumor formation was defined as the interval from cell inoculation to the time when tumors became visible in at least 50% of animals. Mice were sacrificed 54 days after injection. The tumor was quickly frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  to obtain protein extract.

### **Statistical Analysis**

Statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 13.0; SPSS Inc., Chicago, IL). The Kruskal-Wallis test was used to seek associations between the parameters analyzed. Statistical significance was set at a two-tailed  $P$  value of  $\leq 0.05$ . The effect of the various parameters on survival was tested with the Kaplan-Meier method, and differences were compared with the log-rank test. To analyze tumorigenicity, tumor weights (MDA-MB 468/vector versus MDA-MB 468/4E-BP1 wt and MDA-MB 468/4E-BP1mut) were compared using the Kruskal-Wallis test.

## **RESULTS**

### **Clinico-pathological features of the tumors studied**

The characteristics of the 96 infiltrating carcinomas of the breast studied are shown in Table 1. To determine whether there was a correlation between HER2 receptor overexpression and the other factors implicated in the growth and proliferation signaling pathways, we studied a series in which HER2/neu overexpression was present in about half the cases (45.8%). Most cases were ductal carcinomas (92.7%), grade III (54%), and with a tumor size between 20 and 50 mm (65.6%) (Table 1).

#### *Protein expression profiles in breast tumors*

First, to assess the heterogeneous expression of some factors, we analyzed all tumors in whole paraffin sections instead of tissue microarray (TMA) sections. Hormone receptors (ER/PR+), Ki-67, p53, and HER2/neu were evaluated to characterize the tumor (Supplementary Figure 1). Some of the most relevant

factors implicated in the growth signaling pathways (pERK1/2, p-S6, 4E-BP1, p-4E-BP1 [Thr70], eIF4E, p-eIF4E, and p-eIF4G) were analyzed by immunohistochemistry (IHQ). In paraffin sections, overexpression of these signaling factors was defined by a cutoff of 50 on the Hscore (with the exception of p-S6, cutoff 30 and p-eIF4E, cutoff 140), because this value was the median of expression found in adjacent normal breast epithelium. As p-eIF4E antibody showed high basal expression in normal tissue surrounding the tumor, the cutoff was much higher than in the other factors. Therefore, p-eIF4E protein expression was also analyzed by Western blotting (WB). Among the signaling factors studied, p-ERK1/2 was detected in 21.7% of cases, p-S6 in 71.8%, 4E-BP1 in 91.9%, p-4E-BP1 in 50.8%, eIF4E in 88%, p-eIF4E in 70.5%, and p-eIF4G in 28.84%. As shown in Figure 1, some tumors displayed higher levels of p-4E-BP1 and eIF4E or p-eIF4E than others by either IHQ or WB.

#### *Correlations between signaling factors*

Results of the assessment of associations between cell signaling factors are shown in Supplementary Table 1. A significant association was found between p-4E-BP1 expression levels and HER2, 4E-BP1, p-S6, progesterone and estrogen levels (Kruskal-Wallis test,  $p=0.003$ ,  $p=0.031$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.002$ , and  $p=0.034$ , respectively). 4E-BP1 expression levels significantly correlated with HER2, progesterone, and estrogen (Kruskal-Wallis test,  $p=0.004$ ,  $p=0.009$ , and  $p=0.007$ , respectively). A correlation was also found between the p-4E-BP1:4E-BP1 ratio and HER2, p-S6, and estrogen (Kruskal-Wallis test,  $p=0.027$ ,  $p=0.002$  and  $p=0.043$ , respectively). Moreover, eIF4E expression was also analyzed and significantly correlated with 4E-BP1, p-S6, and pERK1/2 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.018$ ,  $p=0.022$ , and  $p=0.018$ , respectively).

#### *Correlations between expression profiles and clinical and pathological variables*

Expression levels of p-4E-BP1, 4E-BP1, eIF4E, and p-eIF4G and the p-4E-BP1:4E-BP1 ratio were correlated with several prognostic parameters, such as tumor size, histologic grade, and presence of lymph node metastasis (Supplementary Table 1). Associations with histologic grade were found for p-4E-BP1 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.032$ ) (Figure 2A) and 4E-BP1 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.048$ ). The p-4E-BP1:4E-BP1 ratio significantly correlated with

presence of lymph node metastasis (Kruskal-Wallis,  $p=0.016$ ) (Figure 2B). No correlation of these factors with tumor size was observed in this group of breast carcinomas.

### *Survival analysis*

Forty-seven patients with breast carcinoma with available survival data for up to 6 years were analyzed. Correlations with overall survival were found for the p-4E-BP1:4E-BP1 ratio (Kaplan-Meier,  $p=0.033$ ) (Figure 2C) and p-eIF4E (Western Blot analysis) and eIF4E protein levels (Kaplan-Meier,  $p=0.025$  and  $p=0.020$ , respectively) (Figure 2D and Supplementary Figure 2). None of the other factors showed a significant correlation between the expression level and survival.

### **Overexpression of wild-type and mutant 4E-BP1 in cell lines and its association with cell proliferation and p-eIF4E**

It is known that the phosphorylation status of 4E-BP1 determines binding to eIF4E. To assess whether phosphorylated 4E-BP1 and eIF4E might be involved in cell proliferation, 9 cell lines, including 2 breast carcinoma lines (MDA-MB 231 and MDA-MB 468), human fibroblasts (IMR90 and TIG3), 2 colon carcinoma lines (HT-29, HCT-116), and MDA-MB 435 and HEK 293T were studied. First, baseline eIF4E, p-eIF4E, p-eIF4G, and 4E-BP1 levels were determined in these tumor cells (Figure 3). The MDA-MB 468 cells harbor mutations in PTEN and high levels of p-4E-BP1 and the MDA-MB-231 cells have KRAs mutations and high p-eIF4E.

Then, retroviral infection was used to introduce HA-4E-BP1wt and HA-4E-BP1mut, a mutated variant in which Thr37/46, Thr70, and Ser65 are replaced by Ala. The resulting mutated 4E-BP1, 4E-BP1mut, binds constitutively to eIF4E and inhibits translation initiation. In some cell lines, 4E-BP1 expression led to a decrease in proliferation compared to cells expressing the empty vector, and the effect on cell proliferation was higher when the constitutive translational repressor 4E-BP1mut was expressed. Figure 4 shows the effect on IMR90 fibroblasts, and on MDA-MB 231 and 468 breast carcinoma cells. Interestingly, the effect of 4E-BP1mut on cell proliferation was higher in cell lines with low



levels of p-eIF4E, while the others were resistant to the translational repressor, regardless of 4E-BP1 baseline status (Table 2). Unexpectedly, MDA-MB 468 4E-BP1 mutant cells became resistant after several weeks in growth (similar to the xenografts, see below).

HA-immunoblotting confirmed expression of ectopic HA-4E-BP1, whereas cells infected with null vector showed no HA expression.

### **Affinity of p-eIF4E to 4E-BP1 and eIF4G**

To assess the relevance of eIF4E phosphorylation when eIF4E binds to 4E-BP1 or eIF4G, we performed immunoprecipitation of cell lysates from breast carcinoma cells (MDA-MB 231 and MDA-MB 468). The results indicated that eIF4E binds to 4E-BP1 regardless of its phosphorylation status (Figure 5A). Nonetheless, there were some differences between the cell lines. More p-eIF4E was bound to 4E-BP1 in MDA-MB 231 than in MDA-MB 468. This difference may be explained by variations in the signaling pathways of these cells due to their activation status or molecular stoichiometry. Moreover, both eIF4E and p-eIF4E bound to eIF4G at Ser1108 (Figure 5B-C), at similar levels in both breast cell lines

### **Effect of MNK inhibitor CGP57380 on cell proliferation and cell phenotype**

In order to study whether the level of p-eIF4E associated with *in vitro* cell growth, we treated the MDA-MB 468 and HT-29 cells with an MNK inhibitor, CGP57380, which blocks eIF4E phosphorylation. As is seen in Figure 6, the level of p-eIF4E was downregulated after 24 h. Interestingly, both cell lines showed a decrease in cell growth and formed much more compact, three-dimensional plaques after treatment with the inhibitor. The differences with untreated cells were evident: cells with p-eIF4E showed more irregular cell clusters and spreading out of cells from the clusters. These cytological features are similar to those observed in well differentiated adenocarcinomas, and this suggested that some cell adhesion proteins, such as E-cadherin and/or  $\beta$ -catenin might be upregulated. To check this hypothesis, we analyzed the level

of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in these cell lines by immunofluorescence and Western Blot. In HT-29 cells, there was a clear increase of E-cadherin in the cell membrane after treatment with CGP57380 (data not shown). Also by WB, there was a marked increase of both E-cadherin and  $\beta$ -catenin after 24 h of treatment with the MNK inhibitor (Figure 6A). In MDA-MB 468 cells, there was a correlation between p-eIF4E levels and E-cadherin and  $\beta$ -catenin expression. Interestingly, at 7 days post-transduction of 4E-BP1mut, when MDA-MB 468 mutant cells are more sensitive, these cells displayed very low levels of p-eIF4E and predominant cell membrane expression of E-cadherin (Figure 6B). After 50 days, when cells become resistant, they displayed higher levels of p-eIF4E and a more cytoplasmic expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin (data not shown).

### **Xenograft tumor growth**

To investigate the effects of 4E-BP1 *in vivo*, MDA-MB 231 and MDA-MB 468 cells transduced with HA-4E-BP1wt or HA-4E-BP1mut were injected into the flanks of nude mice and tumor growth was evaluated. MDA-MB 231 cells expressing the null vector and 4E-BP1wt formed tumors with a latency period of 5 days, whereas cells expressing 4E-BP1mut formed tumors with a longer latency period (12 days). However, the differences observed in tumor size along the time course study were not statistically significant (Figure 7A). MDA-MB 468 cells formed tumors with a latency period of 7 days, whereas cells expressing 4E-BP1wt or 4E-BP1mut formed tumors with much longer latency. MDA-MB 468 tumors formed by 4E-BP1wt cells were first apparent on day 12, whereas tumors formed by 4E-BP1mut did not appear until day 26 after injection. In the MDA-MB 468 cell model, tumors expressing 4E-BP1wt or 4E-BP1mut were significantly smaller than tumors with empty vector at days 7 and 26 after injection (Kruskal-Wallis test,  $p=0.0042$ ,  $p=0.0035$ , respectively) (Figure 7B). Moreover, tumor size of mice with 4E-BP1mut was statistically different than that of mice with the empty vector at day 54 (Kruskal-Wallis test,  $p=0.0128$ ), even though small tumors could be observed already.

MDA-MB 231 and MDA-MB 468 tumor samples were excised at the time animals were sacrificed. Samples were lysed to obtain protein extracts, which were analyzed by WB (Figure 7C).

## DISCUSSION

The results of this study provide evidence that the p-4E-BP1:4E-BP1 ratio and eIF4E and p-eIF4E protein levels correlate with survival and lymph node metastasis in breast cancer. These findings further support the concept that high levels of p-4E-BP1 and eIF4E are associated with the grade and prognosis of breast tumors and other types of cancer [5-8,11,20,24,25]. Moreover, we provide new insight into the role of p-eIF4E in human carcinomas and the association of this factor with aggressiveness and resistance to the tumor suppressor effect of 4E-BP1.

An association was found between survival and tumors with high levels of p-eIF4E expression in this series of breast carcinomas. These findings were mainly obtained by WB analysis of p-eIF4E, because the IHQ results also showed high p-eIF4E levels in normal breast tissue surrounding the tumors. The association between eIF4E and human malignancies has been described by several authors [26-29] and the role of p-eIF4E in human tumors has recently been investigated in lung tumors [27] and in large series of tumors studied by tissue microarrays [28]. Moreover, p-eIF4E levels were associated with the grade of malignancy in immortalized and low- and high-grade malignant breast cells [30].

The biochemical pathways underlying the role of p-eIF4E in malignant tumors remains unclear and the biological significance of eIF4E phosphorylation and its effect on translation is controversial [19,22,31]. eIF4E phosphorylation is dispensable for mouse development [32], but seems to be important for normal development in *Drosophila* [33]. In a cell culture study by Borden et al, eIF4E phosphorylation in the nucleus was seen to enhance the mRNA transport function and transformation activity of eIF4E [34], and eIF4E is reported to promote export of ODC and cyclin D1 from the nucleus to the cytoplasm [35]. Thus, phosphorylation of nuclear eIF4E seems to be an important step in mRNA transport control, and consequently, in the transforming properties of eIF4E. Tumorigenesis in transgenic eIF4E-expressing mice is markedly

increased, leading to the development of lymphomas [36]. This transforming activity of eIF4E has been associated with its phosphorylation [22,37] and with c-myc co-activation [36]. In fact, eIF4E phosphorylation has been associated with suppression of apoptosis by an increase in the antiapoptotic protein MCL1 [22].

Another biochemical mechanism that may explain the role of p-eIF4E in transformation is the fact that p-eIF4E does not bind as strongly to 4E-BP1 as total eIF4E does, at least in some cell types. In an *in vitro* study, phosphorylation of eIF4E was found to attenuate its interaction with mRNA 5-cap analogs [38]. In coimmunoprecipitation and WB studies, p-eIF4E seemed to show a weaker affinity with 4E-BP1 than total eIF4E in the MDA-MB 468 breast cancer cells and not in the MDA-MB 231 cells. In fact, binding of eIF4E with a mutant 4E-BP1, which cannot be phosphorylated at sites Thr37, Thr46, Thr70, or Ser65, induced a clear loss of viability in normal cells, such as IMR90 and TIG3 fibroblasts, in which cap-dependent translation seems to be crucial [13]. In malignant cells, a slight decrease of cell viability was observed in the HT-29 and HCT116 colon carcinoma cells and in MDA-MB 231 breast carcinoma cells, whereas HEK293T, MDA-MB 435, and MDA-MB 468 were much more sensitive to the suppressor effect of 4E-BP1mut. Importantly, this sensitivity correlated with baseline p-eIF4E levels in all these cell lines. The lower affinity of p-eIF4E to 4E-BP1 could explain the resistance of some carcinoma cell lines to mutated 4E-BP1, and would support the idea that tumors expressing high levels of p-eIF4E could have a more aggressive behavior.

eIF4E is phosphorylated by the MNKs, which are activated through the classic MAP kinase pathway (ERK1, 2) and the stress-activated MAP kinase pathway (p38 MAP kinase) [19,32,39]. In addition to eIF4E, other MNK substrates (eg, hnRNPA1) are involved in translational control [40], and MNKs seem to play a crucial role in the regulation of specific mRNAs, rather than in general translation [41]. Because treatment with MNK inhibitor induced a decrease in cell growth in our model and cells acquired more compact clusters, we hypothesized that treated cells might overexpress cell adhesion proteins, such as E-cadherin and  $\beta$ -catenin [42]. Effectively, we found that HT-29 colon

carcinoma cells, which partially display E-cadherin in the cell membrane and cytoplasm, strongly expressed E-cadherin in the entire cell membrane and less intensely in the cytoplasm after treatment with the inhibitor. A similar pattern was observed in MDA-MB 468 cells transduced with mutant 4E-BP1 after several days of culture when they become resistant to this mutant. In addition, MDA-MB 468 cells sensitive to 4E-BP1mut at 7 days after transduction, which exhibited lower levels of p-eIF4E, showed E-cadherin membrane expression similar to that seen in resistant MDA-MB 468 cells treated with MNK inhibitor. These findings could explain the more aggressive behavior of tumors harboring high levels of p-eIF4E. The interesting findings [43,44] suggesting out that eIF4G can promote formation of emboli in inflammatory breast carcinomas by enhancing translation of IRES-containing p120 mRNAs are promising. In our series, we studied ductal carcinomas and we did not find correlation between p-eIF4G levels with p-4E-BP1, tumor size, or survival but the association between eIF4G, p-eIF4E and  $\beta$ -catenin warrants in-depth evaluation.

In a previous study, Avdulov et al. [13] also reported an antiproliferative activity of a mutant form of 4E-BP1 *in vitro*. In addition, these authors observed that transfer of a 4E-BP1 phosphorylation site mutant into MDA-MB 468 cells suppressed their tumorigenicity. However, the mutant used in that study was A37/A46, which harbors changes only at Thr37 and Thr46, whereas in the present study a mutant with changes in four 4E-BP1 phosphorylation sites was used to include the two ultimate phosphorylations, at Thr70 and Ser65, which are considered to be responsible for eIF4E dissociation. Furthermore, we maintained the transduced MDA-MB 468 cells with mutant 4E-BP1 for a lengthy period both *in vitro* and *in vivo*, such that MDA-MB 468 became resistant after several weeks *in vitro* and formed tumors after 50 days *in vivo*.

In summary, our results show that high levels of p-eIF4E and a high p-4E-BP1/4E-BP1 ratio indicate a poorer prognosis and lower survival in breast cancer. In addition, several cancer cell lines showed sensitivity to a mutant 4E-BP1 depending on the baseline level of p-eIF4E. We propose that high levels of p-4E-BP1, which does not bind to eIF4E, and high levels of p-eIF4E, which can likely bypass the suppressor effect of 4E-BP1, are central factors in cell

signaling and reflect the oncogenic potential of these pathways in breast cancer. These results provide evidence that 4E-BP1 and eIF4E phosphorylation inhibitors could be a new group of molecular funnel targets for breast cancer treatment.

### **Acknowledgments**

We are grateful to the tumor banks of Hospital Vall d'Hebron and Xarxa del Banc de Tumors de Catalunya for providing the tumor samples. Our thanks to Teresa Moliné for technical assistance, J.L. Parra and N. Sonenberg for their careful reading and suggestions, and C. Cavallo for English editing.

## References

1. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, et al. (2000) Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124: 966-978.
2. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, et al. (2005) Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353: 1659-1672.
3. Baselga J, Swain SM (2009) Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 9: 463-475.
4. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, et al. (2006) Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 355: 2733-2743.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Castellvi J, Garcia A, Ruiz-Marcellan C, Hernandez-Losa J, Peg V, 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*.
9. Graff JR, Konicek BW, Lynch RL, Dumstorf CA, Dowless MS, et al. (2009) eIF4E activation is commonly elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival. *Cancer Res* 69: 3866-3873.
10. O'Reilly KE, Warycha M, Davies MA, Rodrik V, Zhou XK, et al. (2009) Phosphorylated 4E-BP1 is associated with poor survival in melanoma. *Clin Cancer Res* 15: 2872-2878.

11. Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Klos KS, Lan KH, et al. (2004) Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res* 10: 6779-6788.
12. Kremer CL, Klein RR, Mendelson J, Browne W, Samadzedeh LK, et al. (2006) Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression. *Prostate* 66: 1203-1212.
13. Avdulov S, Li S, Michalek V, Burcher 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.
14. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N (2006) mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25: 6416-6422.
15. Schneider RJ, Sonenberg N (2007) Translational control in cancer development and progression. In: Mathews M, Sonenberg N, Hershey JWB, editors. *Translational Control in Biology and Medicine*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 401–432.
16. Oridate N, Kim HJ, Xu X, Lotan R (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: 318-323.
17. Graff JR, Konicek BW, Vincent TM, Lynch RL, Monteith D, et al. (2007) Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity. *J Clin Invest* 117: 2638-2648.
18. Richter JD, Sonenberg N (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433: 477-480.
19. Scheper GC, Proud CG (2002) Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur J Biochem* 269: 5350-5359.
20. Coleman LJ, Peter MB, Teall TJ, Brannan RA, Hanby AM, et al. (2009) Combined analysis of eIF4E and 4E-binding protein expression predicts breast cancer survival and estimates eIF4E activity. *Br J Cancer* 100: 1393-1399.
21. Minich WB, Balasta ML, Goss DJ, Rhoads RE (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: 7668-7672.
22. Wendel HG, Silva RL, Malina A, Mills JR, Zhu H, et al. (2007) Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev* 21: 3232-3237.
  23. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, et al. (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 131: 18-43.
  24. De Benedetti A, Harris AL (1999) eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 59-72.
  25. De Benedetti A, Graff JR (2004) eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23: 3189-3199.
  26. Soni A, Akcakanat A, Singh G, Luyimbazi D, Zheng Y, et al. (2008) eIF4E knockdown decreases breast cancer cell growth without activating Akt signaling. *Mol Cancer Ther* 7: 1782-1788.
  27. Yoshizawa A, Fukuoka J, Shimizu S, Shilo K, Franks TJ, et al. Overexpression of phospho-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 16: 240-248.
  28. Fan S, Ramalingam SS, Kauh J, Xu Z, Khuri FR, et al. (2009) Phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4 (eIF4E) is elevated in human cancer tissues. *Cancer Biol Ther* 8: 1463-1469.
  29. Graff JR, Konicek BW, Carter JH, Marcusson EG (2008) Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Res* 68: 631-634.
  30. Kim SH, Miller FR, Tait L, Zheng J, Novak RF (2009) Proteomic and phosphoproteomic alterations in benign, premalignant and tumor human breast epithelial cells and xenograft lesions: biomarkers of progression. *Int J Cancer* 124: 2813-2828.
  31. Ma XM, Blenis J (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 307-318.
  32. Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, 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.
33. Lachance PE, Miron M, Raught B, Sonenberg N, Lasko P (2002) Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth. *Mol Cell Biol* 22: 1656-1663.
  34. Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL (2004) Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res* 64: 8639-8642.
  35. Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L, 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.
  36. Ruggero D, Montanaro L, Ma L, Xu W, Londei P, et al. (2004) The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* 10: 484-486.
  37. Li BD, Gruner JS, Abreo F, Johnson LW, Yu H, et al. (2002) Prospective study of eukaryotic initiation factor 4E protein elevation and breast cancer outcome. *Ann Surg* 235: 732-738; discussion 738-739.
  38. Zuberek J, Wyslouch-Cieszynska A, Niedzwiecka A, Dadlez M, Stepinski J, et al. (2003) Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion: intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein. *Rna* 9: 52-61.
  39. Proud CG (2007) Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J* 403: 217-234.
  40. Buxade M, Parra JL, Rousseau S, Shpiro N, Marquez R, et al. (2005) The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1. *Immunity* 23: 177-189.
  41. Buxade M, Parra-Palau JL, Proud CG (2008) The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases). *Front Biosci* 13: 5359-5373.
  42. Niessen CM, Gottardi CJ (2008) Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta* 1778: 562-571.

43. Silvera D, Arju R, Darvishian F, Levine PH, Zolfaghari L, et al. (2009) Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. *Nat Cell Biol* 11: 903-908.
44. Silvera D, Schneider RJ (2009) Inflammatory breast cancer cells are constitutively adapted to hypoxia. *Cell Cycle* 8: 3091-3096.

## **Figure Legends**

### **Figure 1. Expression levels of 4E-BP1 and eIF4E in breast carcinomas**

- A. Immunostaining for 4E-BP1, p-4E-BP1, and eIF4E expression in two solid tumors of the breast.
- B. Western blot against 4E-BP1 and eIF4E in some solid tumors of the breast.

### **Figure 2. Statistical analysis of breast carcinomas**

- A. Phosphorylated 4E-BP1 according to histologic grade in patients with breast carcinomas. Most tumors with p-4E-BP1 ( $p=0.032$ ) were high-grade carcinomas.
- B. P-4E-BP1:4E-BP1 ratio correlated with presence of lymph node metastasis ( $p=0.016$ ).
- C. Overall survival curve related to p-4E-BP1:4E-BP1 ratio ( $p=0.033$ ).
- D. Overall survival curve related to phosphorylated eIF4E ( $p=0.025$ ).

### **Figure 3. Analysis of eIF4F translation complex in various cell lines.**

Immunoblot showing p-eIF4G, p-eIF4E, eIF4E, and 4E-BP1 protein levels in actively proliferating cells.

### **Figure 4. Effect of wild type and mutant 4E-BP1 (4E-BP1wt and 4E-BP1mut, respectively) on cell proliferation of stably transduced cells**

- A) Proliferation of IMR90 cells was significantly suppressed when 4E-BP1wt and 4E-BP1mut were overexpressed.
- B) Proliferation of MDA-MB 468 cells was suppressed when 4E-BP1wt and 4E-BP1mut were overexpressed.
- C) There was no effect on MDA-MB 231 proliferation when cells were transduced with 4E-BP1wt or 4E-BP1mut.

In all cases, ectopic expression of 4E-BP1 was confirmed by HA immunoblotting.

**Figure 5. Co-immunoprecipitation of 4E-BP1, eIF4G, and p-eIF4G with eIF4E and p-eIF4E in malignant breast epithelial cells**

A) eIF4E and p-eIF4E were detected by western blot in immunoprecipitation (IP) with 4E-BP1. Unprecipitated sample is the control (C).

B) Immunoprecipitation with eIF4G. eIF4E and p-eIF4E binding was detected by western blot.

C) Immunoprecipitation with p-eIF4G. eIF4E and p-eIF4E binding was detected by western blot.

**Figure 6. Effect of the MNK inhibitor, CGP 57380.**

a) HT-29 and MDA-MB 468 cells after treatment with MNK inhibitor. eIF4E phosphorylation was blocked after treatment. An increase of E-cadherin and  $\beta$ -catenin was observed after treatment with CGP 57380.

b) Analysis of E-cadherin by immunohistochemistry before and after treatment with MNK inhibitor. All the cells analyzed (MDA-MB 468 and MDA-MB 468 4E-BP1 mutant cells 7 days after transduction) showed an increase of E-cadherin levels in the membrane of the cell after treatment with MNK inhibitor. Interestingly, MDA-MB 468 cells transduced with 4E-BP1 mutant 7 days after transduction showed an increase of E-cadherin in the cell membrane without MNK inhibitor treatment.

The status of p-eIF4E was analyzed by western blot.

**Figure 7. Xenograft tumor growth**

MDA-MB 231 cells ( $5 \times 10^6$ ) transduced with wild-type 4E-BP1 (4E-BP wt) or 4E-BP1 with mutations at the Thr37, Thr46, Thr70, and Ser65 phosphorylation sites (4E-BP1mut) were injected into the back of nude mice, and tumor growth was evaluated at the time intervals indicated.

**A.** MDA-MB 231 tumor volume on day 7, 26, and 54 after cancer cell injection. Wild-type 4E-BP1 and mutated 4E-BP1 show no significant effect.

**B.** MDA-MB 468 tumor volume on day 7 ( $p=0.0042$ ), 26 ( $p=0.0035$ ), and 54 ( $p=0.0128$ ) after cancer cell injection.

**C.** 4E-BP1, p-eIF4E, and eIF4E expression on day 54 analyzed by western blot. MDA-MB 231 and MDA-MB 468 tumor samples were excised at the time of euthanasia.

**Table 1.** Characteristics of the breast tumors

<b>FEATURE</b>	<b>N (%)</b>
Histologic type	
Ductal	89 (92.7%)
Lobular	4 (4.2%)
Apocrine	1 (1%)
Micropapillary	1(%)
Adenosquamous	1 (%)
Histologic grade <sup>a</sup>	
I	7 (7.3%)
II	37 (38.5%)
III	52 (54.2%)
Age of patient	
<50 years	21 (21.9%)
>50 years	75 (78.1%)
Tumor size	
1 (<20 mm)	27 (28.1%)
2 (20-50 mm)	63 (65.6%)
3 (>50 mm)	6 (6.3%)
Ductal carcinoma in situ	
Yes	69 (86.2%)
No	11 (13.8%)
pN	
0	42 (43.7%)
1	28 (29.2%)
2	11 (11.5%)
3	15 (15.6%)
Hormone receptors	
ER+ (Estrogen receptors)	60 (62.5%)
PR+ (Progesterone receptors)	48 (50%)
Ki67	
>20%	24 (32%)
≤20%	51 (68%)
HER2/neu overexpression	44 (45.8%)
p53	15 (23.8%)

<sup>a</sup>According to the Scarff Bloom Richardson (SBR) classification

**Table 2.** Characteristics of the cell lines and sensitivity to the 4E-BP1 mutant.

<b>Cell line</b>	<b>p-eIF4E</b>	<b>4E-BP1 mut sensitivity</b>
TIG3	Low intensity	Yes
IMR90	Low intensity	Yes
MDA-MB 468	Low intensity	Yes
MDA-MB 435	Low intensity	Yes
MDA-MB 231	High intensity	No
HCT116 p53 wt	High intensity	No
HCT116 p53 null	High intensity	No
HT-29	High intensity	No
HEK293T	Low intensity	Yes

Figure 1.

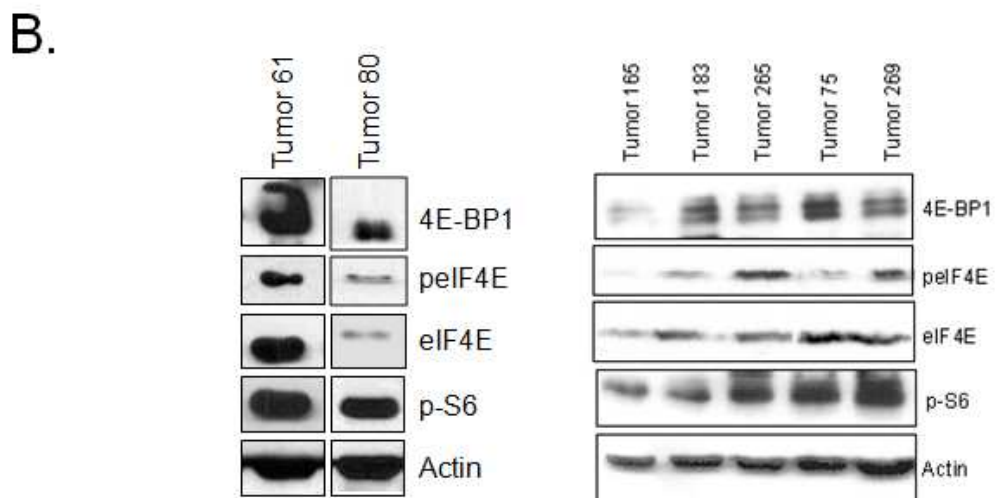
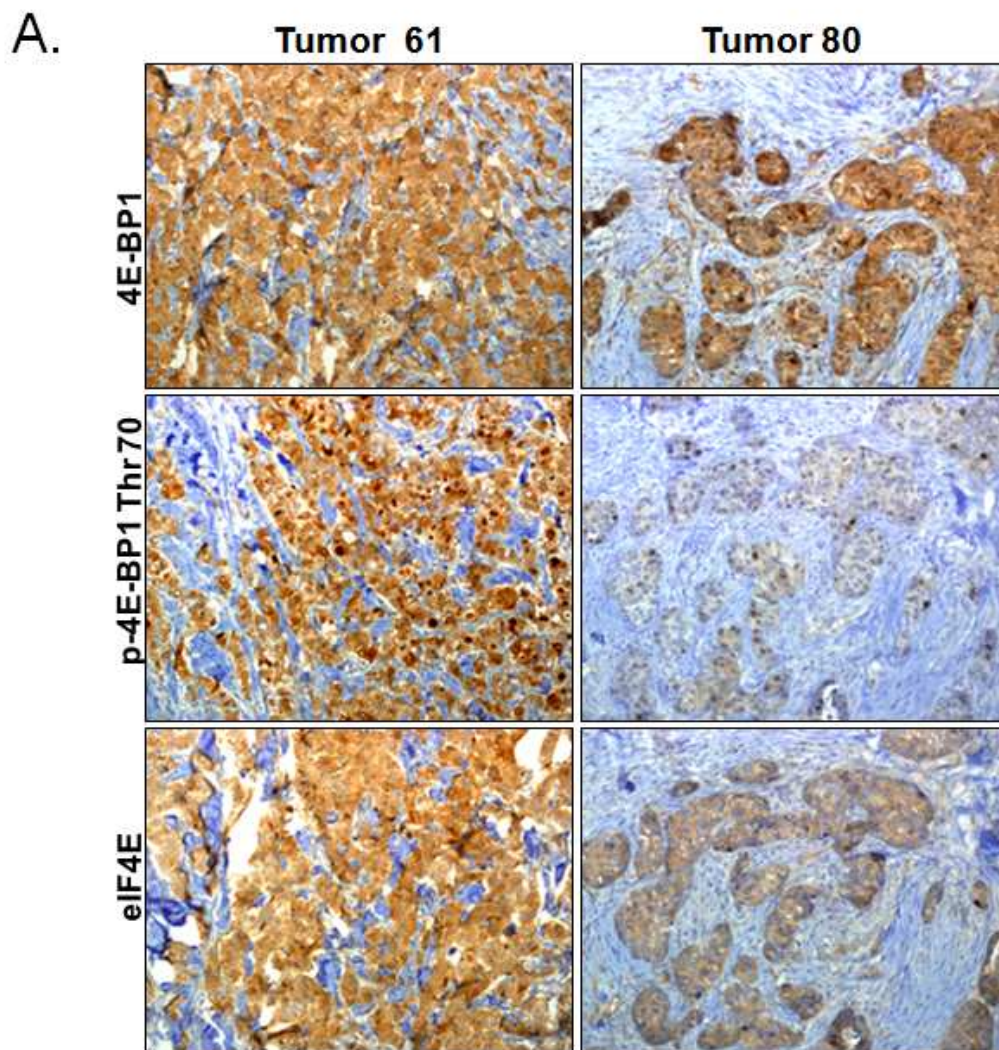
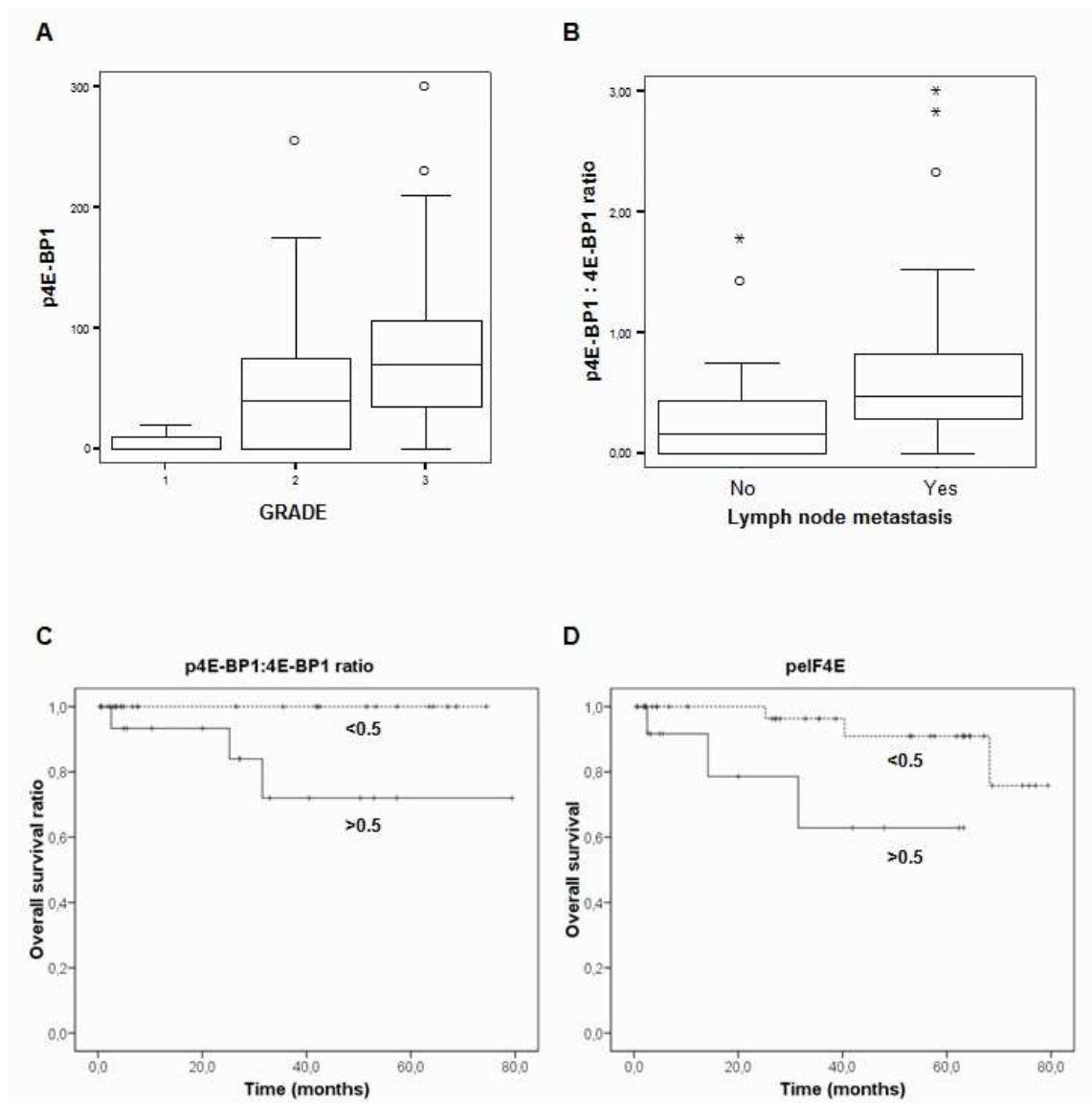
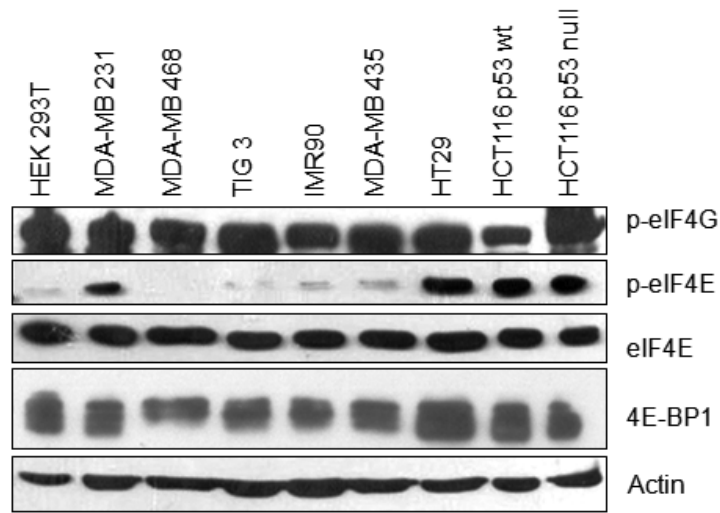




Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**

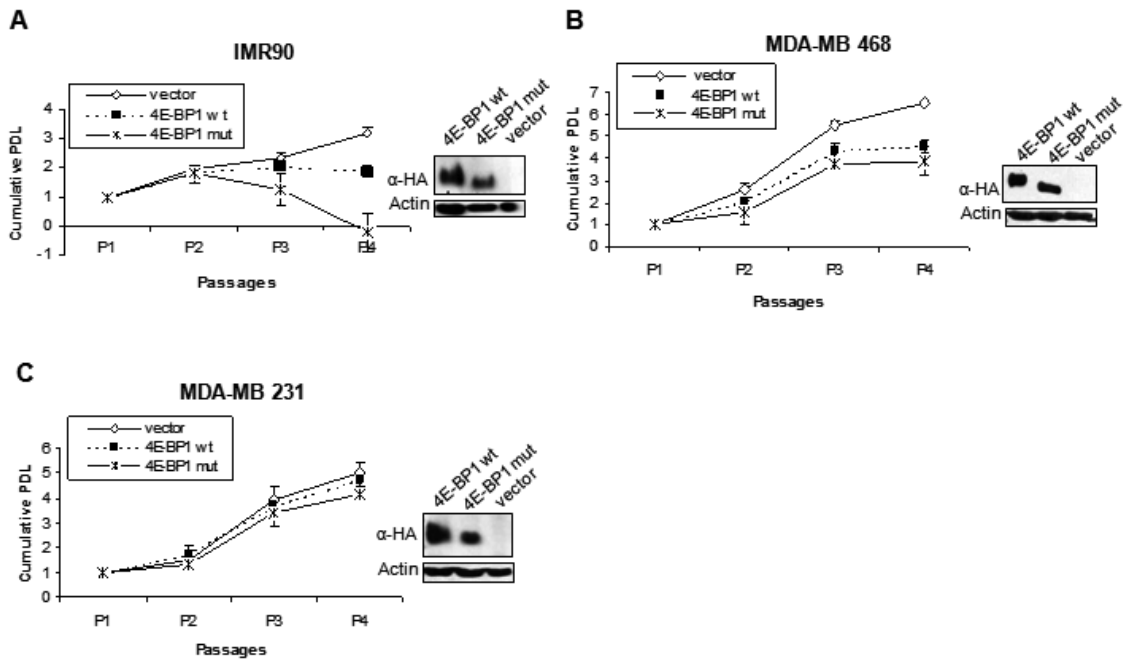
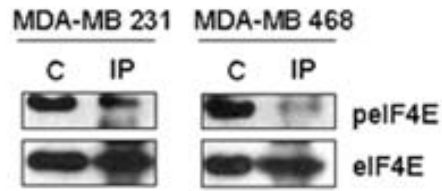
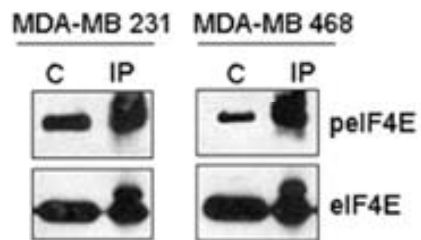


Figure 5

**A. IP: 4E-BP1**



**B. IP: Total eIF4G**



**C. IP: p-eIF4G**

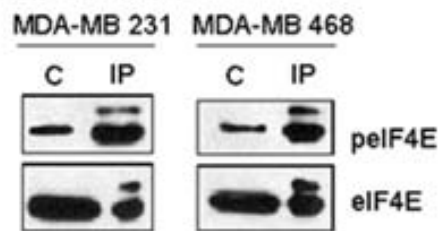


Figure 6

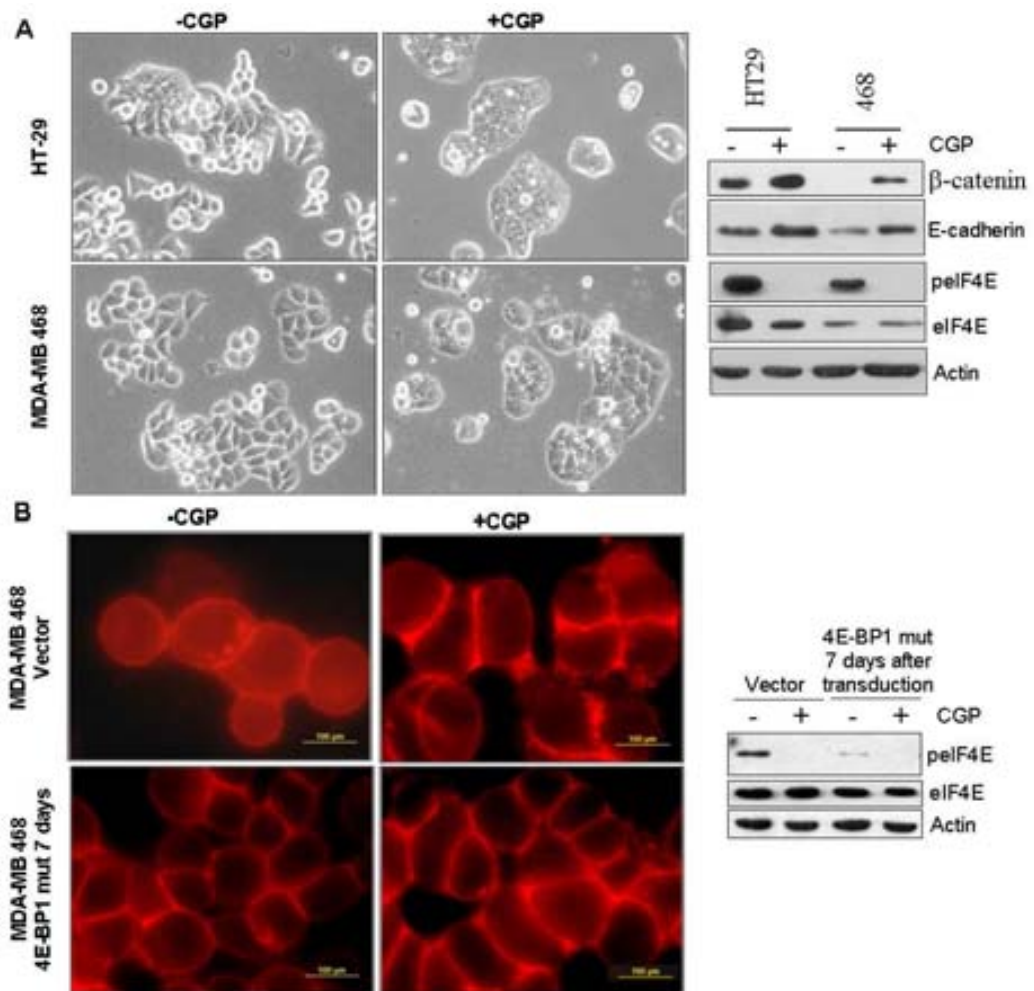
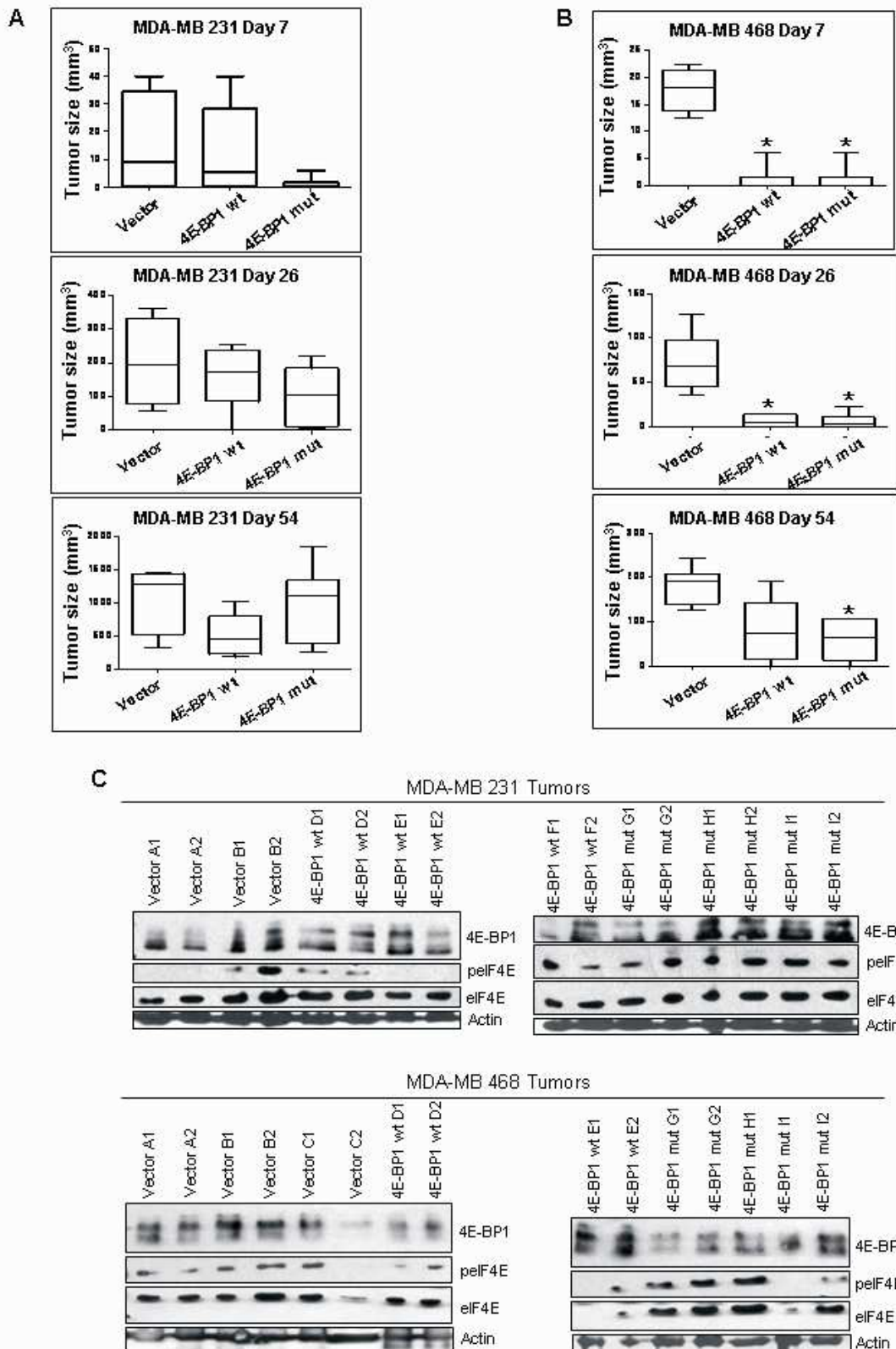


Figure 7



## Supplementary data

**Supplementary Table 1.** Statistical significance of biomarkers (Kruskal-Wallis test)

	p-4E-BP1	4E-BP1	p-4E-BP1:4E-BP1 ratio	eIF4E
HER2	0.009*	0.004*	0.027*	0.642
p-4E-BP1	----	0.062	----	0.274
4E-BP1	0.031*	----	----	0.018*
p-S6	0.001*	0.398	0.002*	0.022*
Ki-67	0.322	0.588	0.603	0.863
p53	0.817	0.075	0.464	0.525
p-ERK1/2	0.209	0.128	0.243	0.018*
eIF4E	0.349	0.054	0.417	----
Progesterone	0.002*	0.009*	0.068	0.384
Estrogen	0.034*	0.007*	0.043*	0.305
Histologic grade	0.032*	0.048*	0.085	0.811
Lymph node metastasis	0.137	0.858	0.016*	0.279
Tumor Size	0.925	0.478	0.432	0.574

\*Statistically significant ( $p < 0.05$ )

## **Supplementary Figure Legends**

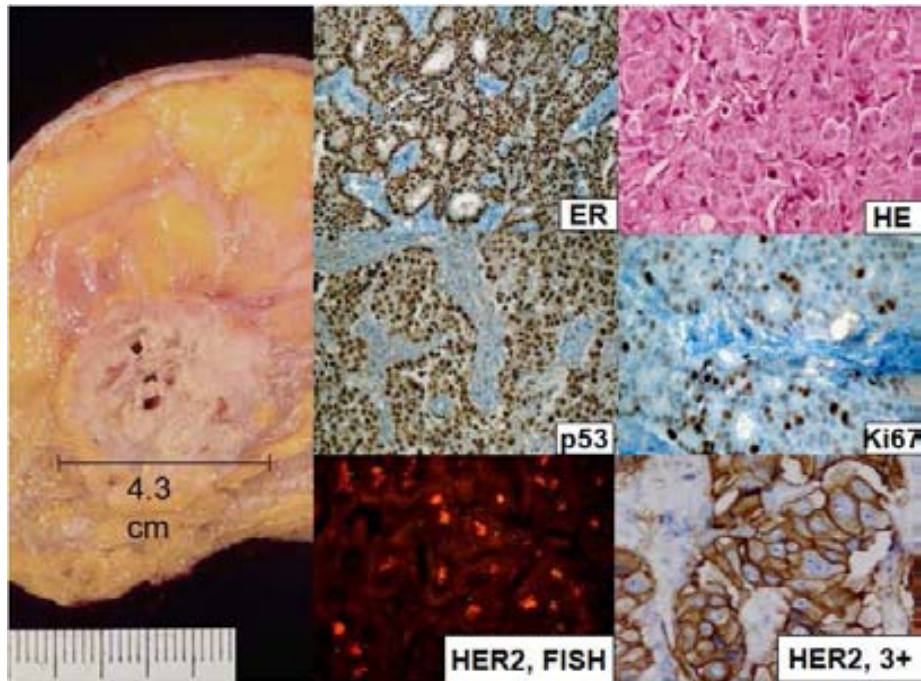
### **Supplementary Figure 1. Main factors and parameters examined in breast tumors**

- A. Gross specimen photograph
- B. Immunohistochemistry of hormone receptors (ER), Ki-67, p53 and HER2 by FISH

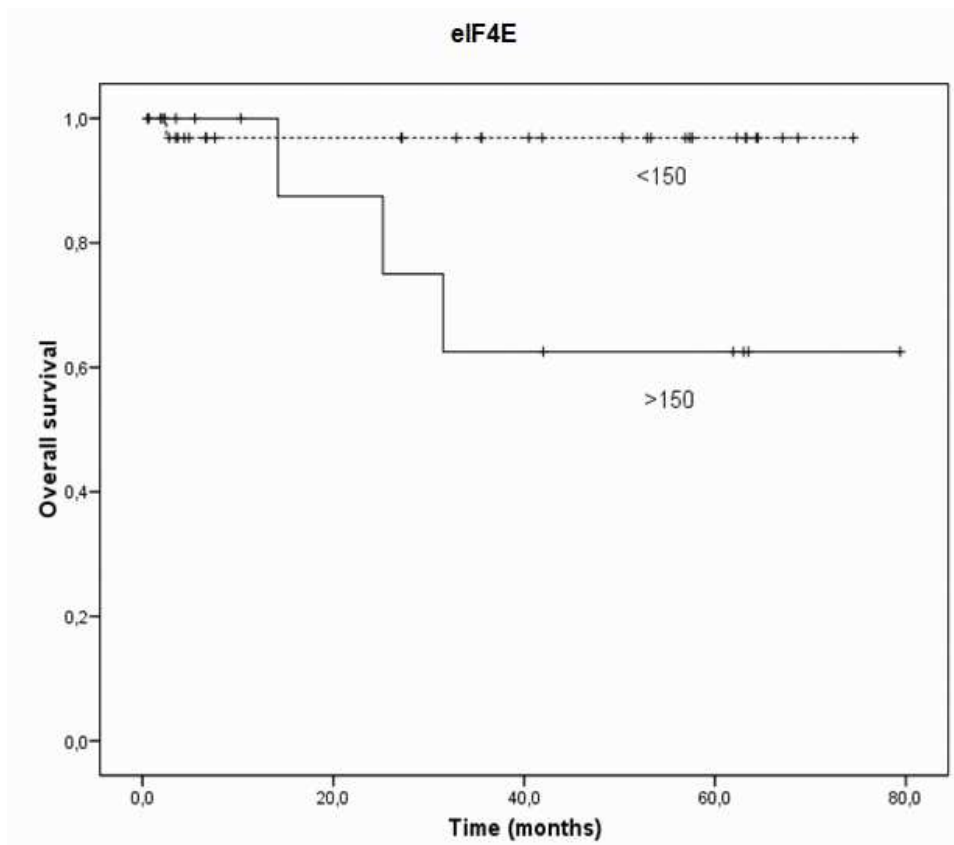
### **Supplementary Figure 2. Statistical analysis of breast carcinomas**

Overall survival curve related to eIF4E ( $p=0.020$ ).

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2





---

# AGRAÏMENTS

---

*La memoria del corazón elimina los malos recuerdos  
y magnifica los buenos, y gracias a este artificio,  
logramos sobrellevar el pasado*

**Gabriel García Márquez**



Buff, ja està, s'ha acabat. Avui poso punt i final a aquesta tesi o millor dit, a aquesta etapa de la meua vida. No sé quantes vegades hauré pensat en aquest moment i ara que hi sóc gairebé no em surten les paraules. Ja fa gairebé 5 anys que vaig començar i n'heu estat tants els que m'heu acompanyat! He viscut moments de tot, he rigut i he plorat, i si avui sóc aquí és perquè al llarg de tots aquests anys no he caminat sola. Gràcies a tots, perquè si avui us recordo és perquè d'alguna manera o altra heu posat el vostre granet de sorra per ajudar-me a arribar fins aquí.

Primer de tot vull donar les gràcies als meus directors de tesi, el Santiago i la Gemma;

*Gracias Santiago, por creer y confiar en mi y sobretodo por darme la oportunidad de dedicarme a esto. Gracias por dirigir este proyecto por el que llevo tantos años luchando. Gracias también por darme la oportunidad de viajar a Canadá y ver otro laboratorio en el que aprendí mucho tanto a nivel profesional como a nivel personal.*

Gemma, sobren les paraules. Gràcies per ensenyar-me a fer ciència i sobretot per dedicar-me part del teu temps. Gràcies per donar-me les pautes a seguir per tirar endavant, per escoltar-me sempre en els moments difícils i per recolzar-me. Gràcies per mostrar-me el teu optimisme, amb el qual sempre m'has fet creure que ho aconseguiria. Per mi ets un exemple a seguir i sé del cert que sense tu avui no seria aquí.

Al llarg de tot aquest temps el laboratori s'ha arribat a convertir gairebé en una segona casa, hi he passat tantes i tantes hores!! Recordo el primer dia, hi havia el Javi, *ay Javi! te debo tantas cosas. Todavía recuerdo el día en que te conocí, tu estabas escribiendo la tesis!! me pareciste una persona muy cercana por aquel entonces y todavía lo sigues siendo a día de hoy. Gracias por todo el tiempo que me dedicaste al principio, enseñándome a hacer cultivos, westerns y razonándome siempre el por qué de las cosas. Gracias porque siempre has tenido 5 minutos para mi cuando te he necesitado.*

En aquells temps també hi era la Laura, havíem coincidit en algunes classes de la universitat, però cap de les dues ens podíem arribar a imaginar que de simples companyes passaríem a ser grans amigues. *Gracias Lau, por ser como eres, porque a lo largo de todos estos años siempre has estado a mi*

*lado convirtiéndote en mi inseparable compañera de batallas, porque contigo he reído y he llorado, porque hemos aprendido juntas a hacer ciencia y porque siempre has considerado mi proyecto tan importante como el tuyo. Gracias por tu tiempo, por tus ánimos, por tu alegría y por tu apoyo incondicional, no puedo llegar a imaginarme esta tesis sin ti a mi lado. Evins, tu también estabas allí, compartiendo laboratorio, sin ti no sé si Laura y yo hubiésemos sobrevivido. Nos has aportado siempre madurez, nos has escuchado y aconsejado en los experimentos y me ayudaste tanto con los ratones, que no tengo palabras suficientes para agradértelo. Gracias por tus sonrisas, por tu buen humor y por convertirte también en una gran amiga. Y luego vino Eli, recuerdo cuando viniste, estabas aburrida y me dijiste “¿te puedo ayudar en algo?” y recuerdo que te di unos 20 multiwells del KF para hacer cristal violeta, jejeje. Y poco a poco entraste a formar parte de mi vida. Siempre has aportado alegría y optimismo al laboratorio, me has escuchado y has conseguido arrancarme una sonrisa en los días más oscuros, con tus bailes, tus muñecotes y tu buen humor. Nada volvió a ser lo mismo desde que te fuiste, Laura y yo te llegamos a echar tanto y tanto de menos! Gracias por convertirte en una gran amiga durante los años que estuviste en el laboratorio y por seguir siéndolo ahí fuera. A las tres, GRACIAS, porque sois el ejemplo más claro de que en el trabajo también se pueden hacer amigos. Hoy de todas nosotras sólo quedo yo en el laboratorio y ya me habeis demostrado con creces que la amistad era verdadera y sigue fuera, porque os sigo viendo y porque sigo teniendo vuestro apoyo fuera del laboratorio. Sin duda, sois lo mejor de estos 5 años, gracias por ser las mejores compañeras de trabajo y amigas que se pueda llegar a desear*

Gràcies, a la Núria a qui també conec des dels inicis. Gràcies per escoltar-me sempre, pels dinars, pels cafès i per les hores i hores de debat sobre LOST. Gràcies per estar sempre al meu costat.

A la Teresa i a la Rosa. Per mi sou dos pilars bàsics del laboratori. No hem compartit espai físic, però heu estat i sou tant importants per mi!! Gràcies Rosa, per escoltar-me sempre, per recolzar-me, per animar-me i per treure temps per fer un cafè sempre que t'he necessitat. A tu Teresa, gràcies per totes les immunos que m'has fet, per mi has estat un gran suport experimental però

sobretot et vull agrair tot el suport moral que m'has donat al llarg d'aquests anys. Gràcies per dir les coses sempre tan clares, per escoltar-me sempre i per recolzar-me i per fer-me veure també quan m'havia equivocat. Gràcies per les llargues converses que hem tingut en les que hem intentat canviar el món. Somniar amb tu ha estat meravellós. Gràcies a les dues perquè heu estat el meu refugi en els moments difícils i perquè heu somrigut amb mi en els bons moments.

A la Laura F., gràcies pel teu bon humor, perquè sempre que vaig a Anatomia i estàs pel laboratori et veig somrient, encara que ens pengem el telèfon sense dir-nos adéu, jajajaj. Ara ja ho sabem, abans de penjar hem de dir "ei, que penjo!!". A la Cristina, no hem compartit espai físic al laboratori, però gràcies per deixar-me sempre un lloquet a la campana de cultius i a l'incubador i gràcies també per tots els ànims que m'has donat.

*A ti Vicente, por ser mi primer "becario" jejeje. Gracias por interesarte siempre por mi trabajo y sobretodo por acercarme un poco más al mundo de la medicina. Te debo toda la parte clínica, está claro que esta parte no hubiese salido adelante sin ti. Gracias por tu tiempo y por tu esfuerzo y por explicarme siempre todas las cosas médicas. Gracias también a Elena, porque también has estado ahí, por tu optimismo y por tu apoyo.*

Gràcies a totes les nenes del laboratori, amb les que comparteixo el dia a dia. Perquè m'heu aguantat en aquesta fase final, perquè m'aguanteu a les 8h del matí quan no articulo paraula i perquè feu que el laboratori sigui un lloc agradable i distès. *Gracias M<sup>a</sup>Ángeles y Ana, somos las tres veteranas del laboratorio, todas en la fase final y en vías de extinción, jajaja. Gracias por todos los momentos de despacho en los que nos hemos escuchado y nos hemos desahogado, hemos compartido momentos muy duros pero oye, "y lo que nos hemos reído juntas??" este último año con vosotras ha sido sencillamente genial.* A les menudes del grup, la Laura C. i l'Alba, que tot just comencen. Gràcies per escoltar-me sempre, per recolzar-me i tenir sempre un moment per mi. Sou el futur del laboratori, així que endavant!. A totes quatre gràcies per totes les galetes que hem menjat juntes, pels "cafè-café" del matí,

## AGRAÏMENTS

---

on fem anàlisis íntegres de com anirà la nostra jornada laboral segons l'horòscop del "20 minutos". Per les barbacoes, els sopars i per adorar les meves mandonguilles, jejejej.

Hi ha molta més gent a qui donar les gràcies, al Carlos, *espero verte pronto reincorporado de nuevo al trabajo, muchos ánimos*, la Matilde, els nouvinguts al laboratori, el Trond i l'Andrea, la Cleo, el Josep Castellví, l'Eli, la Sònia, la Maribel, la Lluïsa, la Montse, el Borja, l'Eva Naches, l'Esther i la Terete, a tots, mil gràcies.

Gràcies també a la gent de Canadà, el Mark, la Diane, el Mike, la Gündula, l'Oksana, la Joanne, l'Ola i el Ryan, perquè em vau acollir al vostre laboratori amb els braços oberts i em vau fer sentir part del grup des del primer dia. Gràcies també al Dr.Sonenberg per permetre'm realitzar part d'aquesta tesis al seu laboratori.

Als meus amics, els que formeu part de la meva vida diària, gràcies a la, Mónica, la Sandra i l'Anna G. perquè tinc la certesa que sempre podré comptar amb vosaltres, per preocupar-vos sempre per mi i per escoltar-me sempre. Sobren les paraules, sou el millor que em vaig emportar de la carrera de biologia. M'encanten els sopars de "bruixes" on ens escoltem i on mai ens jutgem. Gràcies per tots aquests anys que fa que caminem juntes. A la Noe, per tots els sopars, les cerveses i les bones estones de xerrera que hem compartit, gràcies per fer-me sempre costat i per escoltar-me en els moments difícils. Al Frede, per les cerveses de dijous al drapaire on les converses per millorar el món i els debats filosòfics ens porten fins a les tantes de la matinada. Al Vicen, *porque siempre has tenido un momento para escucharme*. Al grup de monitors, Àlex, Anna T., Núria i Xell, que doneu sempre aquell toc d'alegria a la meva vida, que tant m'heu escoltat, que tant m'heu recolzat i amb qui sempre passo tantes i tantes bones estones. A l'Anneta, la Cris i la Marta, porque sou part de mi. Perquè els sopars amb vosaltres són revitalitzadors, perquè sempre em feu somriure, perquè conèixer món amb vosaltres és genial, perquè sempre m'heu recolzat, m'heu escoltat i mai m'heu jutjat, perquè el vostre suport és incondicional i perquè sense vosaltres la meva vida no seria el mateix.

I sobretot gràcies a la meva família, les persones que formen el pilar base de la meva vida, als qui tant estimo i dels que tant he après,

Gràcies als meus pares, per fer de mi la persona que sóc. Gràcies pel vostre recolzament incondicional, per creure sempre en mi, per animar-me amb les vostres dosis de bon humor, per entendre'm i ajudar-me a tirar endavant. Perquè sou els millors pares que es poden arribar a desitjar. Gràcies per estimar-me tant i tant.

Gràcies al meu germà i cunyada. A tu Leti per escoltar-me i recolzar-me sempre. A tu Nacho, per creure sempre en mi i donar-me la confiança i el recolzament d'un germà gran. Perquè ets el millor germà que es pot tenir, perquè sempre hi ets i perquè sempre m'has mimat molt.

I a la resta de família, àvies, tiets, tietes, cosins i cosines, perquè en els dinars familiars sempre m'heu preguntat com van "els bitxos", perquè m'estimeu tal com sóc i perquè formar part d'aquesta gran família és un luxe. Gràcies també a tu Sam, t'incloc a la família, perquè des de petita sempre m'has escoltat i junt amb la Pilar m'heu fet de "tiets adoptius", la Pilar em va estimar molt, m'ho va demostrar en vida, i tu Sam sé que m'estimes com un autèntic tiet.

A tots, gràcies

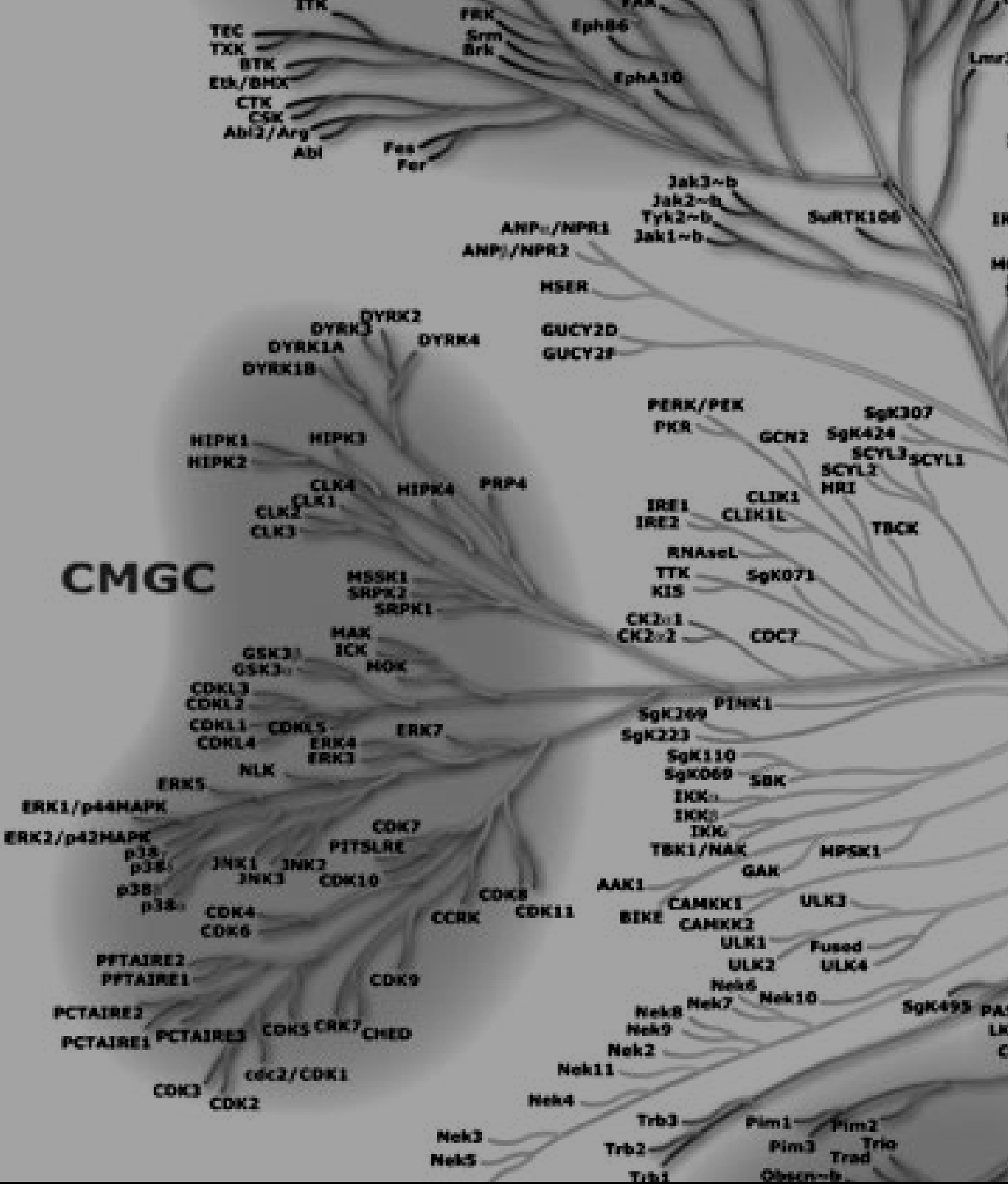












**Estudi de 4E-BP1 i la seva regulació en càncer de mama**

**Berta Pons López**

**Tesi doctoral 2010**