



Universitat de Lleida

Mecanismes de regulació de l'adhesió i la invasió cel·lulars pel complex ciclina D1-Cdk4 citoplasmàtic

Noel Pérez Fusté

<http://hdl.handle.net/10803/399572>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

**MECANISMES DE REGULACIÓ DE
L'ADHESIÓ I LA INVASIÓ
CEL·LULARS PEL COMPLEX
CICLINA D1-CDK4 CITOPLASMÀTIC**

Noel Pérez Fusté

Programa de Doctorat en Salut

Setembre 2016



Universitat de Lleida

**MECANISMES DE REGULACIÓ DE L'ADHESIÓ I
LA INVASIÓ CEL·LULARS PEL COMPLEX
CICLINA D1-CDK4 CITOPLASMÀTIC**

Noel Pérez Fusté

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida

Programa de Doctorat en Salut

Director

Dr. Eloi Garí Marsol

Director

Dr. Francisco Ferrezuelo Muñoz

Setembre 2016

*“Quan tractem de ser millors del que som, tot al nostre
voltant també es torna millor”*

*“El secret està en no tenir por d'equivocar-nos i de saber
que cal ser humil per aprendre”*

Paulo Coelho

A la meva mare,

Al meu germà,

A la Maria

AGRAÏMENTS

I finalment, ja he escrit la meva Tesi Doctoral!!! Vull donar les gràcies a totes les persones que m'han envoltat durant aquests 4 anys i mig, des de que vaig aterrar al grup de Cicle Cel·lular per fer el màster i posteriorment el doctorat, i espero no deixar-me a ningú.

Primerament, vull agrair a l'Eloi que m'hagi acollit en el seu grup i que hagi fet possible tot aquest treball. Ell és el principal responsable d'aquesta tesi i de tota la meva formació com a científic. Eloi, m'has ensenyat a pensar, a treballar i m'has sabut ajudar i escoltar sempre que ho he necessitat. I el més important, sempre has valorat la meva feina i m'has fet sentir important en tot moment. Ets una persona molt treballadora, humil i estic encantat d'haver compartit tots aquests anys amb tu. Recordaré sempre aquelles tardes i vespres parlant i discutint sobre nous experiments, on trobàvem noves coses per fer, plantejàvem noves hipòtesis i on només tu podies veure un resultat positiu de tots els experiments que feia. Ets un gran investigador i una persona fantàstica, i tant de bo algun dia pugui tenir tants coneixements com tens tu i els sàpiga transmetre tan bé.

També moltes gràcies al Paco. M'has ensenyat a pensar, a tenir un punt de vista crític, a saber analitzar els resultats i a fer la feina ben feta. També recordaré les estones de despatx on criticàvem totes les coses que pensem que estan mal fetes...que no són poques!!! I, sincerament, vas tenir una gran idea quan ens vas "obligar" a portar esmorzar als seminaris de grup! Gràcies a la Neus Colomina, a la Neus Pedraza i al Jordi, per haver-me ajudat quan us ho he demanat i per comentar els meus resultats i treure bones conclusions que em servien per plantejar nous experiments. Sou molt bons investigadors i unes persones excel·lents, gràcies per tots els vostres consells.

Gràcies als "mindundis" per haver fet més amens els dies de laboratori, i per totes les converses i "cotilleos" viscuts. Moltes gràcies Sònia, Marta, Irene i Tània per haver-me escoltat i per tots els consells i opinions que m'heu donat al llarg d'aquests anys. Hem rigut molt! A més de grans companys de feina, m'heu demostrat que sou molt bones amistats. En especial, gràcies a la Tània ja que m'has ajudat en molts experiments. Ets molt treballadora i t'espera un gran futur. També gràcies a la Siba i al Marcelí, que sou qui em vau ensenyar tot el funcionament del laboratori i de les tècniques quan vaig començar a fer el màster. I amb la Turi, fa poc que ens coneixem però hem fet una bona amistat, on els dos sentim passió pel futbol, per la bici i pel gimnàs! Espero que tot et vagi molt bé.

També vull donar infinites gràcies als membres del grup de Patologia Oncològica. En especial, a l'Isidre per haver-me ajudat en el treball amb els ratolins, on vas fer una gran feina. Ets un crac, molt treballador i pots arribar allà on et proposis. Moltes gràcies a la Cristina, la Núria i la M^a Alba per ajudar-me sempre que ho he necessitat i per formar part de tot aquest treball. També he d'agrair al Xavi Dolcet tot el que m'has ensenyat i per ser sempre tan positiu.

Moltíssimes gràcies al Xavier Matías-Guiu, a la Maria Santacana i a l'Esmeralda Castelblanco, membres del grup d'Anatomia Patològica. Gràcies a la vostra col·laboració, he pogut completar el meu treball i veure una correlació entre els meus resultats i mostres de tumor de pacients. Gràcies al Xavier Matías-Guiu per ajudar-me i per haver volgut tirar tota aquesta feina endavant.

També vull agrair als companys de la taula de la tercera planta, per les converses que hem mantingut a l'hora de dinar i per donar-me ànims durant els mesos que he estat escrivint la tesi. Gràcies David, Alba, José, Rosanna, Mariona, Lara, Omar, Èlia...

Moltes gràcies als "savis" Adrià, Solé, Javi, Raúl, David, Toni i Nekane. Encara que ens haguem distanciat i ja no ens puguem veure tant com jo voldria, sempre recordaré tots els moments viscut durant la carrera. Us aprecio moltíssim i sou unes amistats per tota la vida. En especial gràcies a tu, Adrià. Ens vam conèixer a 1r d'ESO i hem viscut molts i molts moments, tots especials i únics. Hem compartit classe durant tota la ESO, el batxillerat i la carrera i hem fet una amistat molt especial. Sempre m'has acollit, sempre m'has escoltat i sempre m'has ajudat. Desitjo que tot et vagi molt bé en aquesta vida perquè t'ho mereixes tot, i espero que sempre formis part de la meva vida.

Moltes gràcies a la meva família. Rosa, Maria, Cari, Gaspar, Roco, Erea, Aleix, Roger i Neus, per escoltar-me als aniversaris i als dinars i sopars familiars, i fer-me veure que la meva feina és molt important i interessant i que puc tenir un gran futur com a científic. Si he aconseguit tot això i he arribat fins aquí també ha sigut gràcies al vostre suport continu.

També vull agrair a la meva família adoptiva: Roser, Lluís i Ricard, heu aguantat molts assaigs dels seminaris, heu escoltat moltes historietes meves de laboratori i sempre heu mostrat molt interès per la meva feina. Tots aquests anys m'heu cuidat molt, m'heu fet sentir un més de la família i sempre us estaré agraït per tots aquests magnífics anys. Hem fet moltes coses junts, molts viatges, on ens ho hem passat molt bé i heu aconseguit que us tingui molt carinyo i us apreciï molt. Formeu part de mi, de la meva família, i us estimo molt.

Roser, ets una mare fantàstica i una persona excel·lent que m'has cuidat com si fossa un fill més, no canviïs mai. Lluís, et vull donar les gràcies per acollir-me a la teva família. No he conegut mai a una persona tan treballadora i tan "manetes" com tu i, encara que no ho expressis, sempre t'has preocupat per mi. Ricard, he vist com passaves de ser un nenet a un noi ben guapo, he vist fer-te gran, com et sortien els "musculitos", la "tableta" i el bigoti. Ets com un germanet petit amb qui he passat molts i molts moments i m'has fet riure molt. Ets autèntic i no perdis mai aquesta "xispa" que tens.

També moltes gràcies a les "padrines" Aurita i Rosario per tot el que heu fet per mi. Jo ja no tinc padrines, però vosaltres m'heu tractat i cuidat com si fossa un nét més i sempre us heu preocupat per mi. També vull agrair a la resta de la família Bigordà i de la família Sánchez per acollir-me a les vostres famílies i fer-me sentir tan bé amb vosaltres, i gaudir de tantes festes junts.

Ja per acabar, vull agrair tot el que han fet per mi a les dues persones més importants de la meua vida. Gràcies mare i Víctor, sense vosaltres no seria aquí. A tu mare, per educar-me i per fer-me veure que en aquesta vida sempre s'ha de lluitar i tirar endavant quan les coses estan complicades. Quan a casa estàvem malament, tu vas treure forces d'on no n'hi havia perquè al Víctor i a mi no ens faltés de res. Sempre ens has posat a nosaltres per davant de tot. Gràcies al teu esforç i al teu sacrifici he aconseguit tenir una carrera, un màster i poder fer un doctorat. Sempre m'has escoltat, m'has ajudat i has confiat en mi. Tot el que sóc és gràcies a tu i estic molt orgullós de ser fill teu. Moltes gràcies Víctor per ser tan bon germà. Junts hem superat moltes dificultats, ens hem ajudat, ens hem cuidat i sé que sempre ens tindrem l'un a l'altre pel que faci falta. Sóc molt feliç de tenir un germà com tu.

Per últim, donar-li les gràcies a la meua companya de viatge. Maria, no sé el que faria sense tu. Ja són molts anys junts, on hem passat per bons moments i d'altres que no tant, però sempre has estat al meu costat i has aconseguit tirar endavant la nostra relació. De vegades, tu ets l'única persona que sap escoltar-me, sap entendre'm i ets qui em dona molts bons consells en les meves indecisions, que no són poques. Aquesta tesi també és gràcies a tu, pel teu suport i per confiar sempre en mi. Aquest últim any i mig a Lleida he set molt feliç al teu costat, on hem conviscut molt bé junts en el dia a dia (també, gràcies als dinars i sopars de les mares...). Cada dia em demostres lo molt que m'estimes i he tingut molta sort coneixent-te i de que formis part de la meua vida. Per això, vull continuar agafant-te la mà allà on sigui.

ÍNDEX

ABREVIATURES	1
RESUMS	9
Resum	11
Resumen	13
Abstract	15
INTRODUCCIÓ	17
1. Ciclina D1	19
1.1. Les ciclins D i la regulació del cicle cel·lular	19
1.2. Les ciclins D són gens essencials	21
1.3. Regulació dels nivells de ciclina D1	23
1.4. Ciclina D1 i la regulació de la migració	26
1.5. Funcions citoplasmàtiques de ciclina D1	28
2. Paxilina	30
2.1. Adhesions focals	30
2.2. Estructura de la paxilina	31
2.3. Les GTPases Rho	34
2.4. Mecanismes que regula paxilina en la migració	36
2.5. Paxilina en les membranes <i>ruffles</i>	40
3. Càncer	42
3.1. Ciclina D1 i tumorigènesi	47
3.2. Desregulació de paxilina en el càncer	51
4. Hipòtesi	54
5. Objectius	55

MATERIALS I MÈTODES	57
1. Tècniques de biologia molecular	59
1.1. Construccions plasmídiques	59
2. Tècniques de biologia cel·lular	63
2.1. Cultius cel·lulars	63
2.2. Transfecció cel·lular	64
2.3. Producció de lentivirus i infecció	65
2.4. Assaig de capacitat d'adhesió (<i>spreading</i>)	67
2.5. Assaig d'invasió	67
2.6. Assaig de viabilitat i proliferació	68
2.7. Assaig clonogènic	69
3. Tècniques de microscòpia	70
3.1. Immunofluorescència	70
3.2. Immunohistoquímica	71
4. Tècniques bioquímiques	72
4.1. Anticossos	72
4.2. Extracció proteica i <i>Western blot</i>	73
4.3. Immunoprecipitació	74
4.4. Purificació per afinitat de HA-Ciclina D1 (<i>HA-pull down</i>)	76
4.5. Purificació per afinitat de la GST-Paxilina (<i>GST-pull down</i>)	77
4.6. Fraccionament cel·lular	78
4.7. Assaig d'activitat Rac1 (<i>Rac1 pull down</i>)	79
4.8. Assaig d'activitat Ral (<i>Ral pull down</i>)	79
4.9. Assaig quinasa	80
4.10. Assaig d'interacció directa	81
5. Animals d'experimentació	82
5.1. Consideracions prèvies	82
5.2. Assaig de metàstasi	82

RESULTATS	85
CAPÍTOL 1: La ciclina D1 citoplasmàtica regula l'adhesió cel·lular, la invasió i la metàstasi a través de la fosforilació de paxilina	87
1. La paxilina s'uneix i és un substrat <i>in vitro</i> del complex ciclina D1-Cdk4	89
2. Anàlisi de les dianes de fosforilació de la paxilina i obtenció dels diferents mutants	91
3. La fosforilació de paxilina en les serines 83 i 178 pel complex ciclina D1-Cdk4 és necessària per l'adhesió i la invasió cel·lulars	95
4. Les cèl·lules deficientes en ciclina D1 tenen nivells reduïts de paxilina fosforilada en la serina 83	101
5. La ciclina D1 co-localitza amb la paxilina en la membrana cel·lular de fibroblasts i cèl·lules tumorals	105
6. El complex ciclina D1-Cdk4 purificat de la membrana cel·lular és actiu	111
7. Cèl·lules deficientes en ciclina D1 tenen una activitat Rac1 reduïda en la membrana cel·lular	113
8. La fosforilació de paxilina en les serines 83 i 178 restaura el potencial metastàtic de les cèl·lules deficientes en ciclina D1	119
CAPÍTOL 2: Caracterització de la ciclina D1 citoplasmàtica com a marcador d'invasivitat en el càncer	123
1. L'addició de la cua de farnesilació a la ciclina D1 augmenta la seva localització a la membrana plasmàtica	125
2. El reclutament de ciclina D1 a la membrana plasmàtica augmenta la invasivitat de les cèl·lules tumorals	129
3. El reclutament de ciclina D1 a la membrana plasmàtica disminueix la capacitat d'adhesió de les cèl·lules tumorals i dels fibroblasts	131
4. La ciclina D1 associada a la membrana no altera la proliferació ni la capacitat de formació de colònies	133
5. La unió de la ciclina D1 a la membrana promou l'activació de les GTPases Ra1B i Rac1	135

6. La presència de la ciclina D1 a la membrana de les cèl·lules tumorals estimula la invasió i la metàstasi	138
7. Obtenció de nous interactors de ciclina D1 per la tècnica iTRAQ	142
7.1. Preparació de les mostres	142
7.2. Anàlisi dels resultats obtinguts en l'iTRAQ	144
DISCUSSIÓ	147
1. Una funció citoplasmàtica de ciclina D1	149
2. Mecanisme d'actuació de paxilina a través de ciclina D1	153
3. La funció de la GTPasa Rac1	156
4. Ciclina D1 i paxilina en el càncer	158
CONCLUSIONS	163
BIBLIOGRAFIA	167
ANNEX	189

ABREVIATURES

aa	<i>amino acid</i>
Ab HC	<i>antibody heavy chain</i>
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Brk	<i>breast tumor kinase</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Ccnd1	<i>cyclin D1</i>
Ccnd1 +/+	<i>cells with cyclin D1</i>
Ccnd1 -/-	<i>cells without cyclin D1</i>
Cdc42	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
ChIP-chip	<i>chromatin immunoprecipitation on a DNA chip</i>
CIP/KIP	<i>CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein</i>
CKI	<i>CDK inhibitor</i>
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	<i>dithiothreitol</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	<i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FN	<i>fibronectin</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>

ABREVIATURES

GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GDI	<i>guanine dissociation inhibitor</i>
GDP	<i>guanosine diphosphate</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSK3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
GST	<i>glutathione s-transferase</i>
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
HA	<i>hemagglutinin</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HEK293T	<i>human embryonic kidney cell line with the SV40 large T antigen</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HPLC-MSMS	<i>liquid chromatography–tandem mass spectrometry</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	<i>immunofluorescence</i>
IgG	<i>immunoglobulin G</i>
IP	<i>immunoprecipitation</i>
IPTG	<i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
iTRAQ	<i>isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
JNK	<i>c-jun n-terminal kinase</i>
KDa	<i>kilodalton</i>
LIM	<i>Lin11, Isl-1, Mec-3</i>
MDCK	<i>canine kidney cell line</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MFE	<i>human endometrium adenocarcinoma cell line</i>
Mm	<i>mus musculus</i>

MLK3	<i>mixed-lineage protein kinase 3</i>
NFκβ	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NIH3T3	<i>mouse embryonic fibroblast cell line</i>
OD ₆₀₀	<i>optical density measured at a wavelength of 600 nm</i>
PACSIN2	<i>protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2</i>
PAK	<i>p21-activated kinase</i>
PBD	<i>p21-binding domain</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate-buffered saline with 0.1% Tween20</i>
PC12	<i>pheochromocytoma of rat adrenal medulla cell line</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCR-SDM	<i>polymerase chain reaction – site directed mutagenesis</i>
PEI	<i>polyethylenimine</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PIX	<i>PAK-interacting exchange factor</i>
PKC	<i>protein kinase c</i>
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PP2A	<i>protein phosphatase-2A</i>
pRB	<i>retinoblastoma protein</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTPN11	<i>tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11</i>
PTPN12	<i>tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12</i>
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
Pxn	<i>paxillin</i>
R3327-5'A	<i>rat prostate tumor cell line</i>
Rac1	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RalA	<i>ras-related protein ral-A</i>

ABREVIATURES

RalB	<i>ras-related protein ral-B</i>
Rgl2	<i>ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 2</i>
RhoA	<i>ras homolog gene family, member A</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROCK	<i>rho-associated protein kinase</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
shD1	<i>shRNA against cyclin D1</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
TEMED	<i>tetramethylethylenediamine</i>
TFR	<i>transferrin receptor</i>
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
Tris-HCl	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethan - hydrogen chloride</i>
TSP-1	<i>thrombospondin 1</i>
Ubi	<i>ubiquitin</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WB	<i>western blot</i>
wt	<i>wild type</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

RESUMS

RESUM

Ciclina D1 és un regulador de les quinases Cdk4/6 que té múltiples funcions en la cèl·lula. El rol més conegut és com a regulador del cicle cel·lular i la proliferació, però també té funcions essencials en els processos d'adhesió i migració cel·lulars. Els gens que codifiquen per ciclina D1 i Cdk4 són proto-oncogens donat que l'expressió anormal del complex ciclina D1-Cdk4 promou el creixement tumoral i la metastasi. El complex ciclina D1-Cdk4 fa les funcions de regulador transcripcional i s'han identificat diferents interactors nuclears del complex que participen en la proliferació cel·lular i el desenvolupament de teixits. Per contra, hi ha poc coneixement sobre com ciclina D1-Cdk4 controla l'adhesió i la migració cel·lulars. Diversos estudis suggereixen que ciclina D1 també interacciona amb proteïnes citoplasmàtiques involucrades en la regulació de la migració i la invasió de les cèl·lules. En aquest treball es mostra que la paxilina, una proteïna component dels focus d'adhesió implicada en la regulació de l'adhesió i la migració, és un substrat citoplasmàtic del complex ciclina D1-Cdk4. Aquest complex fosforila una fracció de paxilina que es troba associada a la membrana cel·lular i promou l'activació de la GTPasa Rac1, induint la migració i la invasió cel·lulars. L'absència de ciclina D1 és suficient per frenar la metastasi pulmonar induïda per la injecció de cèl·lules tumorals en ratolins immunodeficients, sent l'expressió d'un al·lel fosfomimètic de paxilina capaç de rescatar el potencial metastàtic d'aquestes cèl·lules deficientes en ciclina D1. Els nostres resultats demostren que la localització del complex ciclina D1-Cdk4 en el citoplasma no només serveix per frenar la proliferació cel·lular, sinó que constitueix un mecanisme funcionalment rellevant que opera en condicions normals i patològiques per controlar l'adhesió cel·lular, la migració i la metastasi a través de l'activació de la via Ciclina D1-Cdk4-Paxilina-Rac1.

Per avaluar la funció citoplasmàtica de ciclina D1 de manera independent de la funció nuclear, hem construït un mutant de ciclina D1 que s'uneix a la membrana cel·lular i segresta ciclina D1 en el citoplasma. Les cèl·lules tumorals que expressen aquesta ciclina D1 associada a la membrana mostren major potencial invasiu i metastàtic en comparació amb les que contenen l'al·lel normal de ciclina D1, sense alterar la taxa de proliferació ni de creixement d'aquestes cèl·lules tumorals. Els nostres resultats ens fan pensar que el paper de ciclina D1 en el citoplasma s'associa principalment amb la capacitat invasiva de les cèl·lules tumorals i que l'anàlisi de la localització subcel·lular de ciclina D1 pot ser interessant per mesurar la malignitat i el desenvolupament del càncer, sent un bon marcador d'invasivitat.

RESUMEN

Ciclina D1 es un regulador de las quinasas Cdk4/6 que tiene múltiples funciones en la célula. El rol más conocido es como regulador del ciclo celular y la proliferación, pero también tiene funciones esenciales en los procesos de adhesión y migración celular. Los genes que codifican para ciclina D1 y Cdk4 son proto-oncogenes dado que la expresión anormal del complejo ciclina D1-Cdk4 promueve el crecimiento tumoral y la metástasis. El complejo ciclina D1-Cdk4 hace las funciones de regulador transcripcional y se han identificado diferentes interactores nucleares del complejo que participan en la proliferación celular y el desarrollo de tejidos. Por el contrario, hay poco conocimiento sobre cómo ciclina D1-Cdk4 controla la adhesión y la migración celulares. Varios estudios sugieren que ciclina D1 también interacciona con proteínas citoplasmáticas involucradas en la regulación de la migración y la invasión de las células. En este trabajo se muestra que la paxilina, una proteína componente de los focos de adhesión implicada en la regulación de la adhesión y la migración, es un sustrato citoplasmático del complejo ciclina D1-Cdk4. Este complejo fosforila una fracción de paxilina que se encuentra asociada a la membrana celular y promueve la activación de la GTPasa Rac1, induciendo la migración y la invasión celulares. La ausencia de ciclina D1 es suficiente para frenar la metástasis pulmonar inducida por la inyección de células tumorales en ratones inmunodeficientes, siendo la expresión de un alelo fosfomimético de paxilina capaz de rescatar el potencial metastático de estas células deficientes en ciclina D1. Nuestros resultados demuestran que la localización del complejo ciclina D1-Cdk4 en el citoplasma no sólo sirve para frenar la proliferación celular, sino que constituye un mecanismo funcionalmente relevante que opera en condiciones normales y patológicas para controlar la adhesión celular, la migración y la metástasis a través de la activación de la vía Ciclina D1-Cdk4-Paxilina-Rac1.

Para evaluar la función citoplasmática de ciclina D1 de manera independiente de la función nuclear, hemos construido un mutante de ciclina D1 que se une a la membrana celular y secuestra ciclina D1 en el citoplasma. Las células tumorales que expresan esta ciclina D1 asociada a la membrana muestran mayor potencial invasivo y metastático en comparación con las que contienen el alelo normal de ciclina D1, sin alterar la tasa de proliferación ni de crecimiento de estas células tumorales. Nuestros resultados nos hacen pensar que el papel de ciclina D1 en el citoplasma se asocia principalmente con la capacidad invasiva de las células tumorales y que el análisis de la localización subcelular de ciclina D1 puede ser interesante para medir la malignidad y el desarrollo del cáncer, siendo un buen marcador de invasividad.

ABSTRACT

Cyclin D1 is a regulator of Cdk4/6 kinases that has multiple functions in the cell. The best known role is as a regulator of cell cycle and proliferation, but also has essential functions in cell adhesion and migration processes. The genes encoding cyclin D1 and Cdk4 are proto-oncogenes because abnormal expression of the cyclin D1-Cdk4 complex promotes tumor growth and metastasis. The cyclin D1-Cdk4 complex acts as a transcriptional regulator, and various nuclear interactors of the complex involved in cell proliferation and tissue development have been identified. By contrast, there is little knowledge about how cyclin D1-Cdk4 controls cell adhesion and migration. Several studies also suggest that cyclin D1 interacts with cytoplasmic proteins involved in the regulation of cell migration and invasion. This study shows that paxillin, a component of focal adhesions involved in the regulation of adhesion and migration, is a cytoplasmic substrate of the cyclin D1-Cdk4 complex. This complex phosphorylates a fraction of paxillin which is associated with the cell membrane and promotes the activation of Rac1 GTPase, inducing cell migration and invasion. The absence of cyclin D1 is enough to stop lung metastasis induced by injection of tumor cells in immunodeficient mice, and the expression of a phosphomimetic allele of paxillin is able to rescue the metastatic potential of these cyclin D1 deficient cells. Our results demonstrate that the localization of cyclin D1-Cdk4 complex in the cytoplasm not only serves to arrest cell proliferation, but also constitutes functionally important mechanism that operates in normal and pathological conditions to control cell adhesion, migration and metastasis through activation of a Cyclin D1-Cdk4-Paxillin-Rac1 axis.

To evaluate the role of the cytoplasmic cyclin D1 independently of the nuclear function, we made a mutant of cyclin D1 that binds to the cell membrane and sequesters cyclin D1 in the cytoplasm. Tumor cells expressing the cyclin D1-membrane associated allele show increased invasive and metastatic potential compared to the cells that contain the normal allele of cyclin D1, without altering the rate of proliferation or growth of these tumor cells. Our results suggest that the role of cyclin D1 in the cytoplasm is mainly associated with the invasive capacity of tumor cells and the analysis of the subcellular localization of cyclin D1 may be interesting to measure the malignancy and the development of cancer, being a good marker of invasiveness.

INTRODUCCIÓ

1. CICLINA D1

1.1. Les ciclines D i la regulació del cycle cel·lular

Les ciclines regulen la progressió de les diferents etapes del cycle cel·lular associant-se i formant complexos amb subunitats catalítiques, les quinases dependents de ciclina (CDKs). Fins a l'actualitat, en els humans s'han identificat 29 ciclines i 20 CDKs, però no totes estan relacionades amb el cycle cel·lular (Malumbres, 2014), on la funció principal de les CDKs és assegurar un control òptim d'aquests dos processos fonamentals: la replicació del DNA i la segregació cromosòmica (Bendris et al., 2015). L'única CDK que sembla ser essencial pel control del cycle cel·lular en mamífers és Cdk1 (Hochegger et al., 2008). L'activitat de les CDKs oscil·la en les diferents fases, a causa de la fosforilació reversible que sofreixen i de l'associació transitòria amb cofactors específics, com ara les ciclines i els CKIs (inhibidors de CDKs). Les ciclines exerceixen una doble funció com a activadors de les CDKs i reconeixent substrats específics, mentre que els CKIs actuen com a components inhibidors (Bendris et al., 2015).

Les cèl·lules de mamífer contenen gens que codifiquen per a tres ciclines de tipus D homòlogues (D1, D2 i D3) (Sherr, 1995), que s'expressen de manera específica de teixit (Xiong et al., 1991; Sherr, 1995) i s'associen a les quinases Cdk4 i Cdk6 per formar un complex actiu (Matsushime et al., 1994; Bockstaele et al., 2006). De les tres ciclines D, la ciclina D1 és la més estudiada pel fet que l'amplificació del seu gen és la segona més comuna en tumors humans en diferents orígens histològics (Beroukhim et al., 2010). El complex ciclina D-Cdk4/6 és el responsable de la regulació de la fase G1 del cycle cel·lular. En aquesta fase té lloc el primer punt de control del cycle denominat punt de restricció, en el què la cèl·lula comprova que ha adquirit la massa i la maquinària necessària per a la duplicació del DNA. En aquest punt s'aconsegueix un nivell d'activació dels complexos ciclines de G1-Cdk suficient per executar l'entrada en un nou cycle si les condicions són les ideals (Reed, 1992; Sherr, 1993). El complex ciclina D-Cdk4/6 realitza dues funcions importants en la iniciació del cycle cel·lular. La primera funció és catalítica i involucra la

inactivació de pRB, que és un inhibidor del factor de transcripció E2F (Kato et al., 1993). La fosforilació de pRB provoca l'alliberament d'E2F i d'aquesta manera s'aconsegueix l'activació de gens necessaris per a la transició G1/S i per a la fase S, com ara ciclina E, que juntament amb Cdk2 fosforila més pRB creant un circuit de retroalimentació positiva (**Figura 1**). Una segona funció del complex ciclina D-Cdk4/6 és el segrest de membres de la família de les proteïnes CIP/KIP inhibidores de CDKs, el que facilita l'activació del complex ciclina E-Cdk2, permetent l'entrada a la fase S on es produeix la replicació del DNA (Sherr and Roberts, 1999). A part de la seva funció com a regulador de Cdk4, la ciclina D1 modula l'activitat de diversos factors transcripcionals de manera independent de Cdk4, com per exemple el receptor d'estrògens (Neuman et al., 1997; Zwijsen et al., 1997; Musgrove et al., 2011).

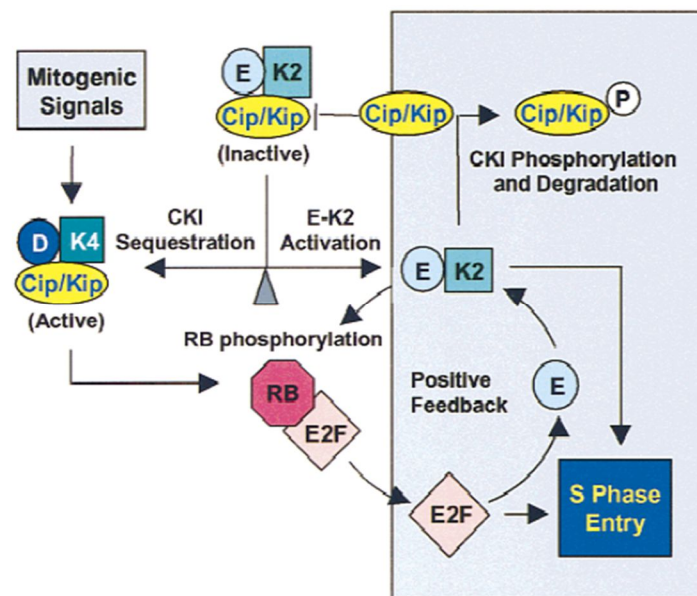


Figura 1. Regulació de la transició G1/S del cycle cel·lular per ciclina D1. Ciclina D1 s'associa amb Cdk4 formant un complex catalític actiu que fosforila pRB, alliberant el repressor E2F i facilitant la progressió del cycle cel·lular. A més, segresta proteïnes CIP/KIP inhibidores de CDKs per induir l'activació del complex ciclina E-Cdk2 (Sherr and Roberts, 1999).

1.2. Les ciclines D són gens essencials

Com s'ha dit, ciclina D1 és una subunitat reguladora de les quinases Cdk4/6 i controla la proliferació cel·lular actuant com un regulador transcripcional. A més, avui sabem que la regulació transcripcional mediada per ciclina D1 és important pel desenvolupament embrionari. Anàlisis ChIP-chip van mostrar que durant el desenvolupament embrionari de ratolins, ciclina D1 ocupa els promotors de gens expressats en abundància, indicant que ciclina D1 també té una funció *in vivo* a nivell transcripcional durant el desenvolupament (Bienvenu et al., 2010).

Al 1995, es va publicar el fenotip observat com a conseqüència de l'eliminació de ciclina D1 (Fantl et al., 1995; Sicinski et al., 1995). Els ratolins deficients en ciclina D1 mostren anormalitats en la retina i en el desenvolupament de les mames durant el període de gestació, tenen un tamany més petit i també presenten anormalitats neurològiques que encara no estan ben caracteritzades. Posteriorment, es van generar ratolins en els que es va eliminar ciclina D2 o ciclina D3 (Sicinski et al., 1996; Sicinska et al., 2003) els quals, igual que els ratolins deficients en ciclina D1, són viables i tenen defectes específics de teixit. La pèrdua de ciclina D2 provoca esterilitat en les femelles, anormalitats en el desenvolupament del cerebel i errors en la proliferació dels limfòcits B (Huard et al., 1999; Lam et al., 2000; Sicinski et al., 1996; Solvason et al., 2000), i els ratolins deficients en ciclina D3 mostren defectes en la maduració dels limfòcits T (Sicinska et al., 2003). Els fenotips observats són coincidents amb les dades descrites en la literatura que mostren com l'expressió de les ciclines D és específica de teixit (Matsushime et al., 1991).

En un altre treball, es va generar un ratolí en el que se li van eliminar les tres ciclines D per tal de mostrar si tenien funcions redundants (Kozar et al., 2004). Aquests embrions es van desenvolupar de forma normal fins a la meitat de la gestació, moment en el què molts òrgans estaven ben desenvolupats, demostrant que la pèrdua de funció de les tres ciclines D no afecta la divisió cel·lular. La gestació dels embrions deficients en les tres ciclines D no es completava degut a una greu anèmia i a defectes coronaris. L'eliminació de les tres ciclines D provoca errors en la proliferació de totes les cèl·lules hematopoètiques, i fa que el

fetge d'aquests fetus tingui un menor nombre de *stem cells*, on l'habilitat d'aquestes cèl·lules per proliferar també es veu reduïda. En paral·lel, en un altre treball es va generar un ratolí que havia perdut Cdk4 i Cdk6 (Malumbres et al., 2004). En aquests ratolins es va observar un fenotip molt similar al dels ratolins deficients en les tres ciclines D, on els embrions deficients en Cdk4 i Cdk6 també moren abans de finalitzar la gestació degut a una anèmia severa i també mostren anormalitats en les cèl·lules hematopoètiques. En conjunt, aquests treballs demostren que les ciclines de tipus D tenen funcions redundants.

Cal destacar que altres tipus cel·lulars proliferen relativament bé en aquests embrions deficients en les tres ciclines D. Per exemple, els fibroblasts derivats d'aquests embrions proliferen de forma similar als *wild type*, però requereixen altes concentracions de mitògens per reentrar en el cicle cel·lular i són resistents a la inhibició del cicle cel·lular per p16 (inhibidor de Cdk4/6) i molt dependents de Cdk2. Com s'ha dit anteriorment, l'activitat dels complexos Ciclina D-Cdk4/6 és crítica pel desenvolupament de teixits específics (Kozar et al., 2004; Malumbres et al., 2004). L'augment dels nivells del complex ciclina D1-Cdk4 per senyals mitogènics segregaria p27, alliberant els complexos ciclina E-Cdk2 i ciclina A-Cdk2 permetent, d'aquesta manera, la seva activació (Sherr and Roberts, 1999). En ratolins deficients en els tres tipus de ciclines D s'observa una disminució dels nivells de p27, que provoca una lleugera activació del complex ciclina E-Cdk2 durant les primeres fases del cicle cel·lular (Kozar et al., 2004). Aquest petit augment basal en l'activació dels complexos ciclina E-Cdk2 són suficients per fosforilar i inactivar pRB i permetre la progressió a través del cicle cel·lular, causant un solapament parcial de les funcions de les ciclines D i E. Per contra, és important recordar que l'eliminació únicament de ciclina D1 provoca defectes específics en processos que requereixen l'establiment de la polaritat, com per exemple l'adhesió al substrat i la migració cel·lular (Neumeister et al., 2003; Li et al., 2006a), indicant que no hi ha redundància en el control d'aquestes funcions.

1.3. Regulació dels nivells de ciclina D1

Els factors mitogènics i la unió de la cèl·lula a la matriu extracel·lular col·laboren en la inducció de l'expressió de ciclina D1 a través de diverses vies de senyalització. A més, els senyals anti-proliferatius també determinen els nivells de ciclina D1 en la cèl·lula (Knudsen, 2006). Per aquest motiu, la regulació de l'expressió de ciclina D1 i la unió a Cdk4 representen un dels esdeveniments més importants per a la progressió del cicle cel·lular.

La capacitat de ciclina D1 per actuar com a sensor de proliferació no només depèn de la seva ràpida inducció per mitògens sinó també de la seva inestabilitat inherent, el què garanteix la seva degradació en les cèl·lules privades de factors de creixement o sota estímuls anti-proliferatius, com el tractament amb TGF β (Diehl et al., 1997). Tant la poliubiquitinació com l'exportació nuclear de ciclina D1 depenen de la fosforilació per GSK3 β d'un residu de treonina (T286) localitzat prop de l'extrem C-terminal de ciclina D1 (Diehl et al., 1998). Els factors de creixement modulen l'activitat i la localització de GSK3 β a través de la via de senyalització Ras/PI3K/Akt, on la senyalització per Ras inhibeix l'activitat de GSK3 β . Ras i PI3K actuen juntes per activar Akt, i aquesta fosforila GSK3 β en la serina 9 inhibint la seva activitat catalítica (Cross et al., 1995; Dudek et al., 1997; Vanhaesebroeck et al., 1997). Durant la fase G1 del cicle cel·lular, GSK3 β és principalment citoplasmàtica però en la transició G1/S una part important d'aquesta proteïna s'acumula al nucli per poder accedir al complex ciclina D1-Cdk4 i fosforilar ciclina D1 (Diehl et al., 1998). La fosforilació en la treonina 286 de la ciclina D1 facilita la interacció amb l'exportina nuclear CRM1 activant la seva sortida del nucli (Alt et al., 2000). El mutant no fosforilable de ciclina D1 T286A o la forma de *splicing* alternatiu ciclina D1b, que no conté els 33 darrers aminoàcids de l'extrem C-terminal, són més estables i nuclears al no poder ser fosforilats per GSK3 β i no poder interaccionar amb CRM1 (Diehl et al., 1998; Alt et al., 2000) (**Figura 2**). Un cop al citoplasma, mitjançant un mecanisme d'ubiquitinació, la ciclina D1 és degradada en el proteosoma. A més, s'ha vist que la sobreexpressió constitutiva del mutant nuclear de ciclina D1 T286A en fibroblasts de ratolí produeix una transformació cel·lular i promou el creixement de tumors en ratolins immunodeficients (Alt et al., 2000). Per tant, sembla essencial per a la

regulació del cicle cel·lular que ciclina D1 sigui eliminada del nucli durant la fase S (Alao, 2007) (**Figura 3**). La importància de la ciclina D1 en el càncer fa que sigui una bona diana per a la seva teràpia i hi ha diferents agents anti-cancerígens convencionals i experimentals que s'han observat que indueixen la degradació de ciclina D1 en moltes línies cel·lulars tumorals i en tumors *in vivo* (Alao, 2007).

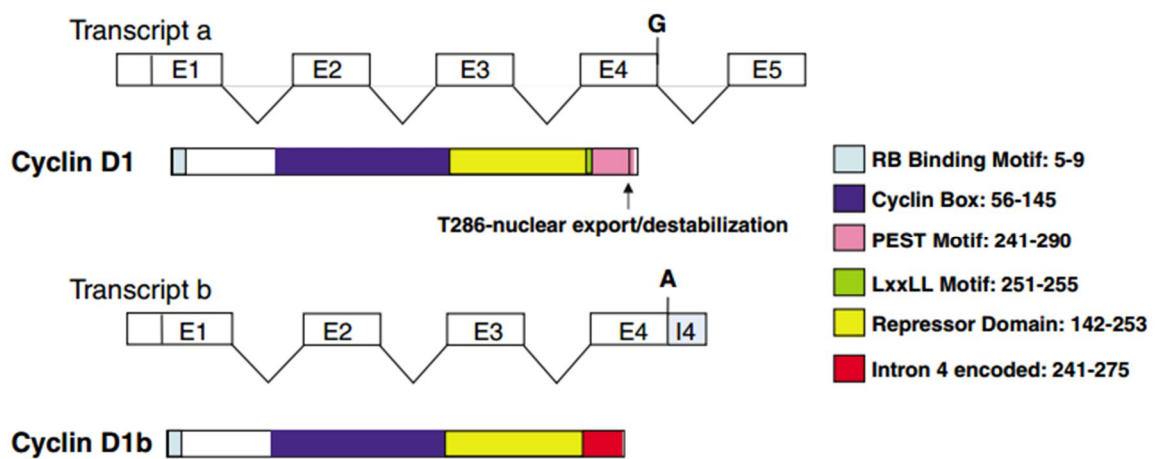


Figura 2. Representació esquemàtica de ciclina D1. La quinasa $GSK3\beta$ fosforila l'extrem C-terminal de ciclina D1 en el residu treonina 286, regulant l'exportació nuclear i la seva estabilitat. ERK i p38 també s'ha vist que regulen l'estabilitat de ciclina D1 fosforilant aquest residu treonina 286. En la forma alternativa de splicing (ciclina D1b) els motius reguladors i els residus de l'extrem C-terminal que es troben a partir del residu 240 han estat substituïts per la seqüència de l'intró 4 del gen de la ciclina D1 (Knudsen, 2006).

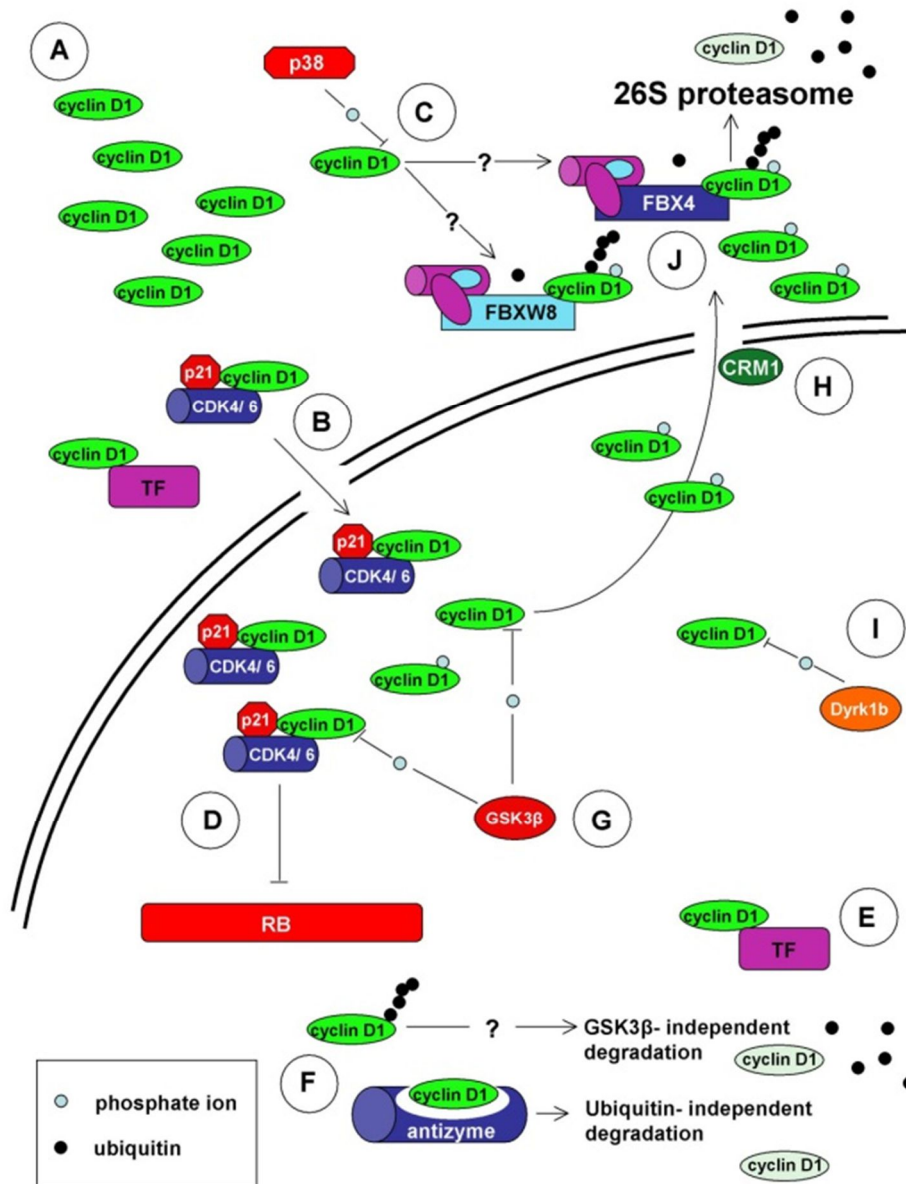


Figura 3. Regulació de la degradació de ciclina D1. (A) Ciclina D1 no conté el senyal de localització nuclear i aquest segrest pot resultar en una acumulació al citoplasma. (B) La ciclina D1 citoplasmàtica és transportada al nucli quan interacciona amb Cdk4 o amb diferents factors transcripcionals (TF). (C) La quinasa p38 fosforila la ciclina D1 en la treonina 286 i indueix la seva degradació en el proteosoma. (D i E) En el nucli, els complexos ciclina D1-Cdk4/6 actius fosforilen pRB. A més, ciclina D1 està relacionada amb l'activitat de diferents factors de transcripció independentment de Cdk4/6. (F) La ciclina D1 lliure és degradada pel proteosoma 26S a través de la ubiquitinació de manera independent a la quinasa GSK3 β . (G i H) GSK3 β fosforila la ciclina D1 en la treonina 286 facilitant la seva exportació nuclear mitjançant l'exportina CRM1, on és degradada en el citoplasma. (I) La fosforilació de la treonina 288 per la quinasa Dyrk1b pot induir la degradació de la ciclina D1. (J) Les proteïnes FBX4 i FBXW8 ubiquitinen la ciclina D1 fosforilada en el citoplasma, dirigint-la a la degradació pel proteosoma 26S (Alao, 2007).

1.4. Ciclina D1 i la regulació de la migració

A més de les funcions clàssiques de ciclina D1 en la progressió del cycle cel·lular i la tumorigènesi, s'han identificat noves funcions associades a ciclina D1 com la migració i la invasió cel·lulars, l'augment de l'angiogènesi, la inhibició del metabolisme mitocondrial, la regulació de factors de transcripció a través d'una forma unida a DNA, la producció d'instabilitat genòmica, la millora de la detecció i reparació dels danys al DNA i la regulació de l'expressió del genoma no codificant (Pestell, 2013) (**Figura 4**).

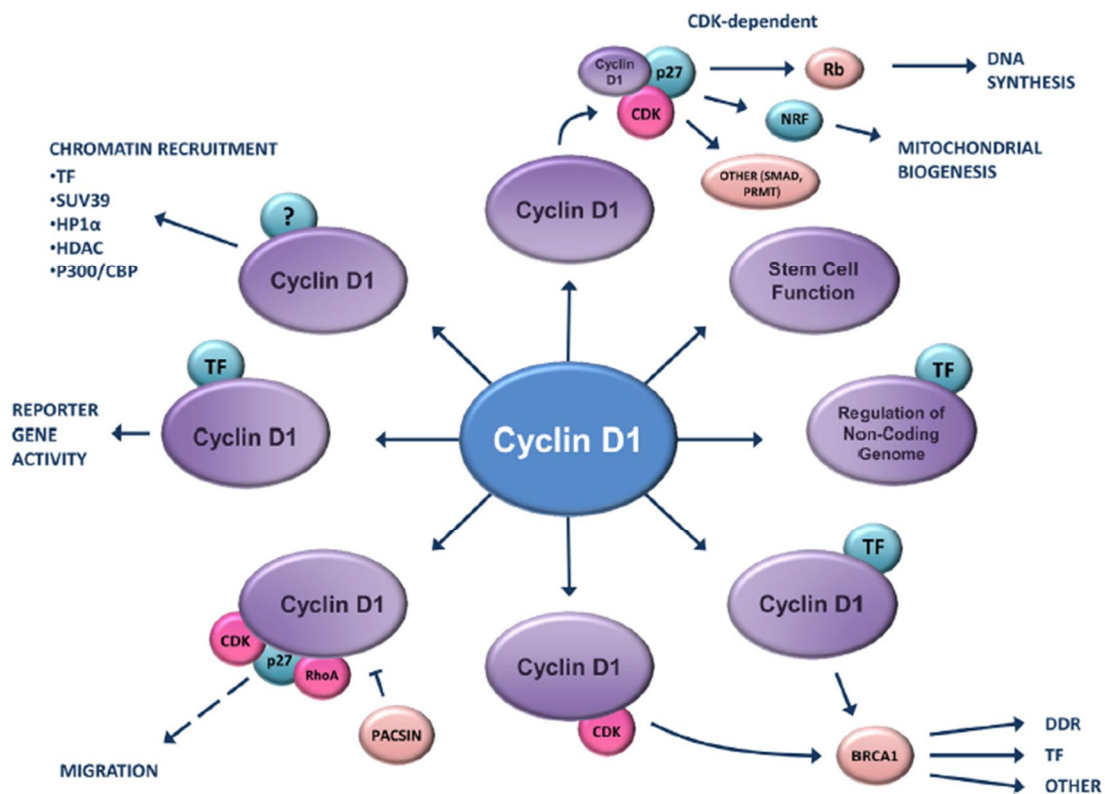


Figura 4. Representació de les interaccions amb ciclina D1. Hi ha funcions que requereixen unió a CDK i d'altres que són independents d'activitat CDK o no es coneixen (Pestell, 2013).

La ciclina D1 s'ha associat amb la invasió tumoral i la metàstasi en diferents estudis clínics i en experiments *in vivo* on, per exemple, s'ha vist que l'expressió del microRNA-9 inhibeix la proliferació, la invasió i la metàstasi del càncer gàstric a través de la repressió de ciclina D1 (Zheng et al., 2013), i on també s'ha descrit que la sobreexpressió de ciclina D1

es relaciona amb la metàstasi del càncer de pròstata a l'os (Drobnjak et al., 2000). A més, la repressió de l'expressió de ciclina D1 en cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó xenotransplantat anul·la el seu potencial invasiu (Huang et al., 2009). Aquesta associació sembla estar relacionada amb la capacitat de ciclina D1 per regular l'adhesió i la migració, i no als mecanismes dependents de ciclina D1 que controlen la proliferació cel·lular (Velasco-Velázquez et al., 2011). També es va observar en dos estudis que l'eliminació de ciclina D1 en macròfags i fibroblasts de ratolí provocava defectes específics en processos que requerien l'establiment de la polaritat, com per exemple un increment de la seva capacitat d'adhesió a la matriu extracel·lular, i una reducció de la motilitat i de la seva capacitat invasiva (Neumeister et al., 2003; Li et al., 2006a), establint que ciclina D1 millora la migració i la invasió cel·lulars. A més, l'eliminació de ciclina D1 provocava l'adquisició d'una morfologia més estesa a la placa que l'observada en cèl·lules *wild type* (**Figura 5**). Aquests fenotips s'han atribuït a la funció nuclear de ciclina D1 com a regulador transcripcional de gens que controlen l'adhesió i la migració cel·lulars (Li et al., 2006a; Li et al., 2006b).

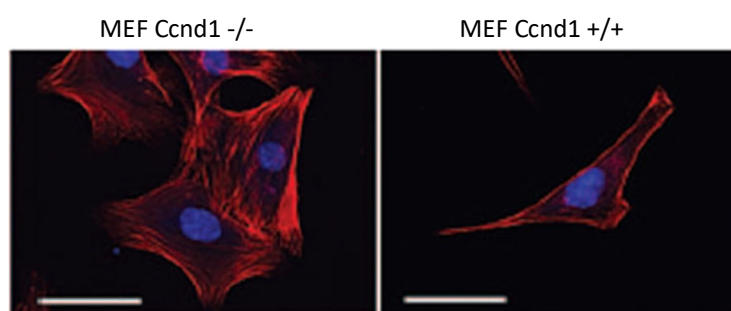


Figura 5. Els fibroblasts embrionaris de ratolí deficients en ciclina D1 tenen un fenotip més estès i major adhesió cel·lular (barra d'escala = 50 μ m) (Li et al., 2006a).

Ciclina D1 regula negativament la transcripció d'un grup de gens que codifiquen proteïnes implicades en la migració i en l'adhesió cel·lulars com la quinasa ROCK, efector de la GTPasa RhoA, i la TSP-1 (Li et al., 2006a). Cèl·lules deficients en ciclina D1 mostren un augment de l'activitat RhoA, que comporta un augment del nombre de focus d'adhesió i fibres d'estrès. En aquestes condicions la cèl·lula està més estesa (*spread*) i té poca motilitat, i també mostren un increment en la producció de TSP-1, una glicoproteïna de la

matriu extracel·lular que inhibeix la metàstasi i el creixement de tumors (Streit et al., 2000). L'expressió de ciclina D1 en aquestes cèl·lules deficientes en ciclina D1 o la repressió de l'excés de producció de TSP-1 promou novament la migració.

A més dels mecanismes transcripcionals, també s'han descrit mecanismes post-transcripcionals de regulació de l'adhesió i la migració cel·lulars per part de ciclina D1. L'activitat del complex ciclina D1-Cdk4 inhibeix la GTPasa RhoA a través de la proteïna CIP/KIP p27. Aquest CKI interacciona i inhibeix en el citoplasma a RhoA promovent així la migració cel·lular (Besson et al., 2004). En absència de ciclina D1 els fibroblasts mostren un increment de l'activitat RhoA que correlacionen amb una disminució molt significativa dels nivells de p27. Els estudis mostren que l'activitat del complex ciclina D1-Cdk4 és necessària per mantenir l'estabilitat de la proteïna p27 (Li et al., 2006b).

1.5. Funcions citoplasmàtiques de ciclina D1

Curiosament, diferents treballs suggereixen que ciclina D1 no es limita al nucli, sinó que s'associa al citoplasma on interacciona funcional i físicament amb proteïnes citoplasmàtiques i associades a la membrana, que estan involucrades en la regulació de la migració cel·lular com ara filamina A, PACSIN2, RhoA i les GTPases Ral, indicant que aquesta ciclina podria tenir un paper actiu en la regulació citoplasmàtica de l'adherència i de la migració cel·lulars (Alhaja et al., 2004; Fernández et al., 2011; Zhong et al., 2010; Meng et al., 2011; Li et al., 2014). En una línia cel·lular de càncer de mama altament invasiva i metastàtica s'ha observat que ciclina D1 interacciona i co-localiza amb filamina A en les ondulacions de la membrana citoplasmàtica anomenades *ruffles*, en cèl·lules que estan migrant (Zhong et al., 2010). Filamina A és una proteïna d'unió a actina que està implicada en processos com la transició epiteli-mesènquima (Stossel et al., 2001). Els nivells d'activació del complex ciclina D1-Cdk4 regulen l'estat de fosforilació de filamina A, indicant probablement que aquesta proteïna sigui un substrat del complex. A més, en aquesta línia cel·lular derivada de càncer de mama es va observar que la inhibició de l'expressió de

ciclina D1 induïa una disminució de la migració i la invasió cel·lulars (Zhong et al., 2010). També s'ha vist que macròfags deficients en ciclina D1 tenen menys membranes *ruffles* i per tant, menys capacitat migratòria (Neumeister et al., 2003). En un altre treball es demostra que ciclina D1 s'uneix a les GTPases Ral (RalA i RalB, que regulen l'exocist), i que el complex ciclina D1-Cdk4 fosforila *in vitro* Rgl2, un GEF de Ral, estimulando la presència de formes actives de Ral unides a GTP, fent que ciclina D1 augmenti el desacoblament de la cèl·lula amb la matriu extracel·lular i la motilitat en col·laboració amb les GTPases Ral (Fernández et al., 2011). També s'ha vist que la proteïna adaptadora dels focus d'adhesió PACSIN2 s'uneix directament a la ciclina D1 a l'extrem C-terminal i regula el *spreading* i la migració cel·lulars de manera dependent de l'expressió de ciclina D1 (Meng et al., 2011).

La presència de ciclina D1 al citoplasma també ha estat relacionada amb processos de diferenciació (Sumrejkanchanakij et al., 2003; Fernández-Hernández et al., 2013). Per exemple, estudis fets per immunohistoquímica en teixits neuronals revelen que l'expressió de ciclina D1 augmenta durant el desenvolupament cortical i més tard, durant la diferenciació terminal, decreix. Durant els primers passos de la diferenciació del cervell, els progenitors cel·lulars duen a terme diversos processos de polaritat com pèrdua de l'adherència, migració i la formació de les neurites (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). En aquest període de temps, l'expressió de ciclina D1 encara no ha disminuït i es localitza majoritàriament al citoplasma. En un altre estudi es va veure que l'eliminació de ciclina D1 en la línia cel·lular PC12 també provocava anomalies en processos que impliquen l'establiment de la polaritat, en concret en la formació de neurites (Marampon et al., 2008). Aquestes dades permeten pensar que variacions en els nivells citoplasmàtics de ciclina D1 poden ser crítiques per coordinar la proliferació amb processos com la migració, l'adhesió cel·lular o la formació de neurites que tenen lloc en els primers estadis de la diferenciació. En relació amb aquest fet, s'ha observat que els ratolins deficients en ciclina D1 són viables però presenten anomalies neurològiques (Sicinski et al., 1995).

2. PAXILINA

2.1. Adhesions focals

La interacció d'una cèl·lula amb la matriu extracel·lular proporciona importants senyals químics que contribueixen a la regulació de processos com ara el desenvolupament embrionari, la vigilància immunològica, el procés de cicatrització i l'homeòstasi del teixit mitjançant diverses funcions cel·lulars, com ara la migració, la diferenciació i la proliferació. Les proteïnes responsables de la unió de la cèl·lula a la matriu extracel·lular són les integrines. Aquestes, són proteïnes transmembrana formades per subunitats α i β que juntes poden formar fins a 24 heterodímers diferents (Hynes, 2002), i són el pont d'unió de la matriu extracel·lular amb les vies de senyalització i el citoesquelet d'actina de l'interior cel·lular. Tot i que els dominis citoplasmàtics de les integrines no tenen activitat enzimàtica intrínseca, la interacció amb la matriu extracel·lular produeix la dimerització de les integrines i el reclutament d'una gran varietat de proteïnes estructurals i reguladores a les adhesions focals. Les proteïnes estructurals intervenen en la interacció física amb el citoesquelet d'actina, mentre que les proteïnes reguladores modulen la dinàmica del citoesquelet d'actina, la formació de focus d'adhesió i la contracció cel·lular mitjançant els filaments d'actina-miosina (Etienne-Manneville and Hall, 2002), que té un paper important i necessari per a la migració cel·lular eficient. Per tant, les adhesions focals són un complex macromolecular a través de les quals el citoesquelet es connecta a la matriu extracel·lular (Turner et al., 1990) (**Figura 6**). A més, les adhesions focals, per mitjà de les integrines, transmeten informació a través de la membrana cel·lular per tal de regular l'acoblament a la matriu extracel·lular, la proliferació cel·lular, la diferenciació i la mort (Geiger et al., 2001).

Originalment, la llista de les proteïnes localitzades als focus d'adhesió és limitava a les proteïnes estructurals, com la talina i la vinculina, que es creia que intervenien en l'ancoratge del domini citoplasmàtic de la integrina al citoesquelet d'actina (Burrige et al., 1988). Ara, uns 45 anys després de la visualització del contacte focal en les cèl·lules, la complexitat molecular de les adhesions focals segueix augmentant i s'ha descrit que

actualment comprenen més de 125 proteïnes, moltes de les quals exhibeixen múltiples interaccions proteïna-proteïna (Turner, 2000; Zaidel-Bar et al., 2007). Molècules com la paxilina serveixen com a proteïnes d'acoblament (*scaffold*) per facilitar la integració funcional d'aquesta multitud de proteïnes dels focus d'adhesió (Deakin and Turner, 2008).

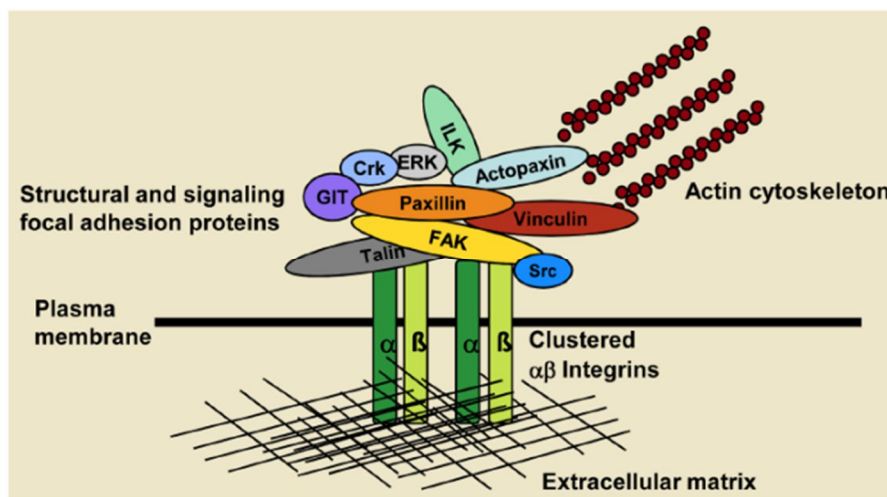


Figura 6. Les adhesions focals proporcionen un enllaç estructural entre la matriu extracel·lular i el citoesquelet d'actina. L'adhesió cel·lular a la matriu extracel·lular, a través dels heterodimers transmembrana de les $\alpha\beta$ integrines, condueix a la seva activació i al reclutament de nombroses proteïnes intracel·lulars a la membrana plasmàtica (Deakin and Turner, 2008).

2.2. Estructura de la paxilina

La paxilina és una proteïna de 68 KDa amb múltiples dominis i es localitza en els extrems de les fibres d'actina a les adhesions focals. Es va identificar com un substrat tirosina-quinasa i es va descriure com un component estructural i regulador de les adhesions focals, on també es va veure que interacciona amb una altra proteïna del focus d'adhesió, la vinculina (Turner et al., 1990). La regulació del reciclatge dels focus d'adhesió per part de la paxilina és un pas clau en el control de l'adhesió i la motilitat cel·lulars, i té un paper central en la morfogènesis. A més, és important destacar que moltes de les proteïnes que interactuen amb la paxilina estan involucrades en la regulació de l'organització del citoesquelet d'actina, que és necessària pels esdeveniments de motilitat cel·lular associada

a diverses respostes biològiques, com ara el desenvolupament embrionari, la cicatrització i la metàstasi (Schaller, 2001).

L'extrem C-terminal de la paxilina conté quatre dominis LIM, que són motius que intervenen en les interaccions proteïna-proteïna (Schmeichel and Beckerle, 1994) i es troben en tots els organismes eucariotes, però estan absents en els procariotes (Kadmas and Beckerle, 2004). Els dominis LIM2 i LIM3 de la paxilina són essencials per dirigir la proteïna a les adhesions focals (Brown et al., 1996) i s'ha establert que la fosforilació d'aquests dominis contribueix a la regulació de la localització de la paxilina a les adhesions focals (Brown et al., 1998a). Els dominis LIM de la paxilina també serveixen com a llocs d'unió de diverses proteïnes estructurals i reguladores, com la tubulina i la tirosina-fosfatasa PTPN12 (també coneguda com PTP-PEST) (Côte et al., 1999; Herreros et al., 2000), i aquestes interaccions tenen un paper important en el control de la dinàmica de l'adhesió focal (Webb et al., 2004; Efimov et al., 2008).

L'extrem N-terminal de la paxilina controla la major part de la seva activitat de senyalització. Conté cinc motius LD rics en leucina i aspartat (LD1-LD5) que són dominis d'unió a proteïnes que tinguin la seqüència consens LDXLLXXL (Tumbarello et al., 2002). Originalment, els motius LD van ser identificats quan es van mapejar els llocs d'unió de la paxilina amb la vinculina i amb la quinasa FAK (Turner and Miller, 1994; Brown et al., 1996), i des de llavors s'han identificat en diverses proteïnes amb funcions diferents (Brown et al., 1998b). A més, entre els dominis LD1 i LD2 hi ha una regió rica en prolins que serveix de lloc d'unió de dominis SH2 i SH3 (**Figura 7**).

En la molècula de paxilina existeixen múltiples llocs de fosforilació en tirosines, serines i treonines, i és un substrat d'una gran varietat de quinases que s'activen en resposta a diversos estímuls d'adhesió i per factors de creixement, per tal de modular el grau de motilitat cel·lular. Hi ha dues variants de *splicing* de la paxilina (β i γ), i també s'ha vist una quarta isoforma (δ) enriquida en cèl·lules epitelials que es creu que es genera a partir d'un lloc d'inici de la traducció alternatiu a partir de l'aminoàcid 132 (Brown and Turner, 2004). La paxilina està molt conservada entre les espècies i les proteïnes de la seva família

com Hic5, leupaxina i PaxB, comparteixen una àmplia similitud amb la paxilina en els dominis LIM i en els motius LD, tot i que aquestes proteïnes no tenen la regió rica en prolina i els hi falta algunes dianes de fosforilació clau, el que suggereix que aquestes proteïnes poden complementar algunes funcions de la paxilina i ser antagonistes d'altres funcions (Turner, 2000).



Figura 7. Estructura de la paxilina. La paxilina té 591 aminoàcids, uns 68 KDa, i es compon de diversos dominis estructurals. Té 5 motius LD rics en leucina en l'extrem N-terminal i 4 dominis LIM "double zinc finger" a l'extrem C-terminal. També es mostra els principals llocs de fosforilació en serines i tirosines (adaptat de Alam et al., 2014).

En un estudi es va voler examinar la funció i la importància de la paxilina *in vivo* eliminant tot el gen en ratolins (Hagel et al., 2002). Es va observar que els ratolins que perden la paxilina no són viables, mostren letalitat embrionària primerenca en el dia 9.5 a causa, principalment, del deteriorament de la migració cel·lular i de problemes coronaris. A més, es va observar que la resta de membres de la família de la paxilina com Hic-5 i leupaxina no compensaven la falta de paxilina, indicant que la seva presència era essencial pel desenvolupament embrionari (Hagel et al., 2002). L'eliminació de paxilina en fibroblasts provoca una formació anormal dels focus d'adhesió, anormalitats en l'estructura del citoesquelet d'actina i dels focus d'adhesió, defectes en la migració cel·lular, una distribució ineficient de FAK, una disminució de la fosforilació de FAK induïda per la fibronectina i un retard en la capacitat d'adhesió (*spreading*). Aquests defectes podrien ser els responsables dels errors severos que s'observen durant el desenvolupament embrionari en aquests ratolins. Per tant, la paxilina és un regulador clau de la dinàmica de l'adhesió cel·lular.

2.3. Les GTPases Rho

S'ha vist que la família de les GTPases Rho tenen una gran importància en la regulació de diversos processos biològics com són l'organització de l'actina i les adhesions focals, l'adhesió, la motilitat i la polaritat cel·lulars, la transcripció de gens i la progressió del cicle cel·lular. A més, algunes GTPases Rho i els seus components de senyalització estan sobreexpressats i/o hiperactivats en el càncer demostrant que les GTPases Rho són necessàries en la metastasi *in vivo* de cèl·lules tumorals (Burbelo et al., 2004).

Com les integrines, la paxilina interacciona amb múltiples proteïnes estructurals i reguladores, com són els GEFs i GAPs de GTPases, a través de les quals regula l'activitat de les GTPases Rho i la seva capacitat per controlar l'organització del citoesquelet i la dinàmica de l'adhesió (Deakin and Turner, 2008). La família de les GTPases Rho funciona com interruptors moleculars de forma cíclica, mitjançant una forma inactiva unida a GDP i una forma activa unida a GTP. Aquests cicles estan controlats per un gran grup de GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*) que catalitzen l'intercanvi de GDP per GTP activant la GTPasa, i per GAPs (*GTPase activating protein*) que promouen la hidròlisi de GTP a GDP inactivant la GTPasa (Hoffman and Cerione, 2002) (**Figura 8**). La regulació espacial i temporal de la família de les GTPases Rho, que inclou Cdc42, Rac1 i RhoA, i l'activació d'una àmplia varietat de proteïnes efectores per aquestes GTPases és essencial pel control de la dinàmica del citoesquelet d'actina durant la migració cel·lular polaritzada (Ridley, 2001a; Ridley, 2001b; Raftopoulou and Hall, 2004) (**Figura 9**). Específicament, Cdc42 es requereix per a la polarització i direcció cel·lulars i per la formació de fil·lopodis (protrusions llargues i primes riques en actina a la part davantera de la cèl·lula migratòria), mentre que Rac1 promou l'extensió de lamel·lipodis (protrusions amples, en la mateixa regió de la cèl·lula), i RhoA estimula la formació de fibres d'actina necessàries per a la contractilitat cel·lular i la translocació. Cdc42 i Rac1 també estimulen l'acoblament dels complexos d'adhesió naixents, mentre que RhoA promou la maduració de l'adhesió a la part davantera de la cèl·lula migratòria i el desacoblament de l'adhesió a la part posterior de la cèl·lula migratòria (Raftopoulou and Hall, 2004).

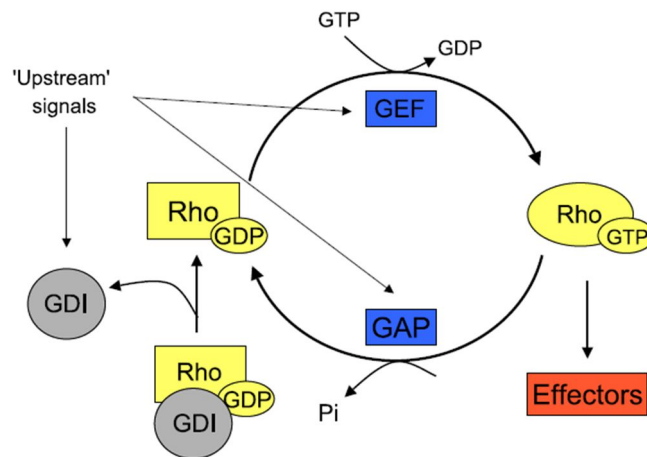


Figura 8. Cicle de les GTPases Rho. Aquest cicle està molt ben regulat principalment pels GEFs que activen les GTPases Rho, pels GAPs que inactiven les GTPases Rho, i pels GDIs que segresten les GTPases Rho inactives al citoplasma. En la forma activa unida a GTP, les GTPasa Rho s'uneixen a moltes molècules efectores com quinases i proteïnes d'acoblament (Raftopoulou and Hall, 2004).

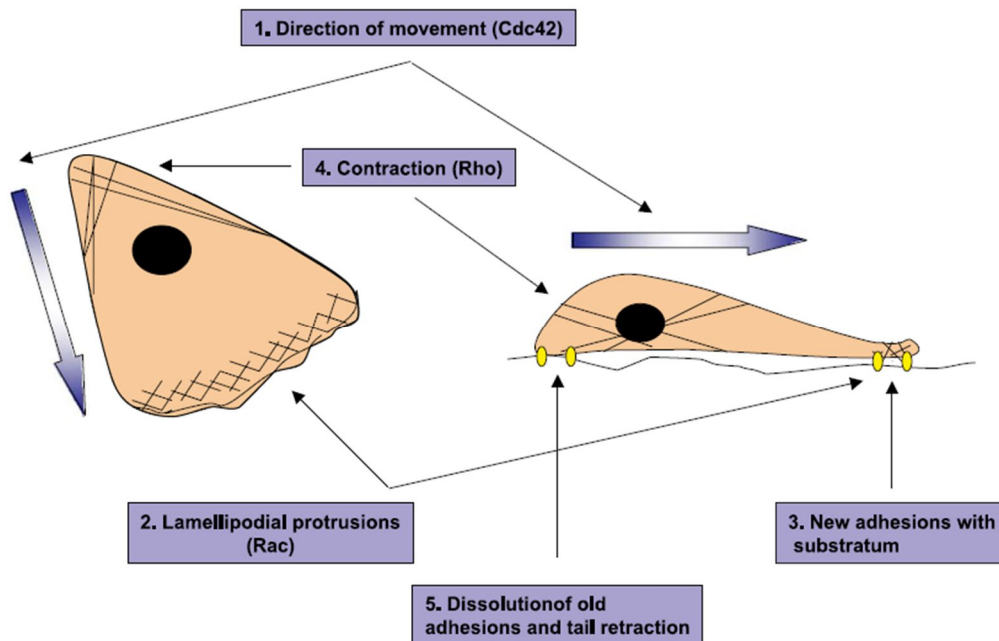


Figura 9. La cèl·lula migratòria requereix l'activitat de les GTPases Rho. La cèl·lula necessita realitzar diferents etapes coordinades per tal de migrar. Cdc42 regula la direcció de migració, Rac1 indueix la formació de protrusions a la membrana a la part davantera de la cèl·lula a través de l'estimulació de la polimerització d'actina i dels focus d'adhesió, i RhoA promou la contracció actina-miosina al llarg de la cèl·lula (Raftopoulou and Hall, 2004).

2.4. Mecanismes que regula paxilina en la migració

En els últims anys, diversos treballs han destacat la importància de la paxilina no només com un component organitzador dels focus d'adhesió, sinó també com una proteïna adaptadora (*scaffold*) capaç de coordinar diferents vies de senyalització, on la seva funció principal és la de servir com a nexa per coordinar, integrar i facilitar una senyalització cel·lular eficient en els processos d'adhesió i migració cel·lulars, a través d'interaccions directes i indirectes amb múltiples proteïnes estructurals i senyalitzadores que constitueixen l'"interactoma" de la paxilina (Deakin and Turner, 2008).

Els canvis dinàmics en les adhesions cèl·lula-matriu extracel·lular són necessaris tant per l'extensió de les cèl·lules (*spreading*) com per la motilitat cel·lular. El ràpid acoblament i desacoblament de les adhesions durant la migració cel·lular s'anomena reciclatge (*turnover*) de l'adhesió, i aquest *turnover* està molt ben regulat i és necessari per a la formació de protrusions (Webb et al., 2004), on les cèl·lules deficientes en paxilina mostren una estabilització i una falta de desacoblament dels focus d'adhesió.

Els focus d'adhesió són estructures dinàmiques que s'han d'acoblar, desacoblar o madurar en la part davantera on s'està estenen la cèl·lula, i s'han de desacoblar a la part posterior de la cèl·lula que s'està contraent per a que es produeixi una migració cel·lular eficient (Webb et al., 2002). La paxilina és una de les primeres proteïnes que es va detectar en les adhesions naixents de la part davantera de la cèl·lula, on s'organitza ràpidament (Digman et al., 2008), el que suggereix que la paxilina exerceix un paper important en l'acoblament de les adhesions focals i en la definició de la seva composició molecular, però no es coneix quin mecanisme regula l'acoblament dels focus d'adhesió a través de paxilina.

Pel que fa al desacoblament de les adhesions focals i al seu reciclatge, hi ha diferents mecanismes que s'han relacionat amb l'acció de la paxilina. La fosforilació en tirosines de la paxilina es produeix en resposta a diversos estímuls fisiològics i esdeveniments d'adhesió cel·lular mediat per les integrines (Schaller, 2001). La paxilina té quatre principals llocs de fosforilació en residus tirosina: Y31, Y40, Y118 i Y181, on la

fosforilació de les tirosines 31 i 118 està molt augmentada durant l'adhesió i la migració cel·lulars (Schaller, 2001). Després del contacte de la integrina amb la fibronectina o el col·lagen de la matriu extracel·lular, la paxilina és fosforilada en els residus de tirosina 31 i 118 d'una manera dependent de les quinases FAK i Src (Petit et al., 2000; Deakin and Turner, 2008). Aquesta fosforilació en tirosines de la paxilina indueix el desacoblament de les adhesions focals, un procés que es produeix ràpidament durant la motilitat cel·lular, a través de la interacció de DOCK180 i de PIX, que són GEFs de Rac1, amb els residus de tirosina 31 i 118 fosforilats de la paxilina; d'aquesta manera s'activa Rac1 i s'indueix la migració cel·lular. Per aquest motiu, la mutació de les tirosines 31 i 118 a aminoàcids no fosforilables perjudica el desacoblament de les adhesions a la part davantera de les cèl·lules migratòries (Webb et al., 2004). La fosforilació de les tirosines 31 i 118 de la paxilina també regula l'activitat de RhoA a través del segrest de p120, un GAP de Ras, per part de paxilina que produeix un increment de p190, un GAP de RhoA, que fa disminuir l'activitat localitzada de RhoA necessària per la migració cel·lular (Tsubouchi et al., 2002) (**Figura 10**). Per tant, la paxilina fosforilada en les tirosines 31 i 118 pot, indirectament, activar Rac1 i inhibir RhoA, i ambdues activitats són necessàries per a la formació de protrusions i de membranes *ruffles* durant la migració cel·lular. Com que la paxilina fosforilada en les tirosines 31 i 118 no pot interaccionar simultàniament amb DOCK180, PIX i p120, serà important determinar quins senyals addicionals, potser en forma de modificacions post-traduccionals o reclutant altres interactors, són necessaris per controlar l'especificitat d'aquestes interaccions amb la paxilina. A més, l'activitat quinasa de PAK, un efector de Rac1, s'ha demostrat que millora la interacció entre PIX i la paxilina; PAK fosforila directament la serina 273 estimulando encara més la senyalització de Rac1 (Nayal et al., 2006). Per tant, es pot apreciar que la modulació de la dinàmica de l'adhesió està molt regulada i té, alhora, una gran complexitat.

En un altre treball, s'ha descrit que l'activació de la quinasa JNK pel factor de creixement EGF fosforila directament la serina 178 de la paxilina, i aquesta fosforilació és necessària per a que FAK interaccioni amb paxilina i la pugui fosforilar en les tirosines 31 i 118, i d'aquesta manera promoure el desacoblament i la migració cel·lulars (Huang et al., 2008) (**Figura 10**). La inhibició de la quinasa JNK amb l'inhibidor específic SP600125, la repressió de l'expressió de paxilina per RNA d'interferència o la sobreexpressió del mutant

de paxilina no fosforilable S178A impedeixen la migració cel·lular induïda per EGF (Huang et al., 2008). A més, amb l'expressió de l'al·lel mutant de paxilina S178A també s'inhibeix la fosforilació de la paxilina en les tirosines 31 i 118 després de l'estimulació amb EGF, indicant que la fosforilació de la serina 178 per la quinasa JNK és necessària per a la fosforilació d'aquestes tirosines en la paxilina. D'acord amb això, la sobreexpressió del mutant fosfomimètic de paxilina Y31E Y118E és capaç d'induir migració cel·lular sense necessitar la fosforilació en la serina 178 per la quinasa JNK (Huang et al., 2008). També s'ha descrit que en glioblastomes, la fosforilació de la paxilina en la serina 178 per la quinasa JNK regula la migració d'aquestes cèl·lules a través de Rac1, i que la inhibició de l'activitat Rac1 fa disminuir la fosforilació de la serina 178 de la paxilina en les adhesions focals (Nomura et al., 2008).

Finalment, un altre mecanisme pel qual paxilina regula la migració és a través de la fosforilació de la serina 83 de la paxilina per la quinasa ERK, que té un paper molt important en la regulació del *turnover* de les adhesions focals. La quinasa ERK fosforila la serina 83 de la paxilina en els focus d'adhesió, després d'estimular cèl·lules epitelials amb HGF, incrementant l'associació amb FAK i la seva fosforilació en els focus d'adhesió (Ishibe et al., 2004) (**Figura 10**). La falta d'activació d'ERK en les adhesions focals, ja sigui per la mutació de la paxilina en el lloc d'associació amb ERK o pel tractament amb l'inhibidor específic de l'activitat ERK U0126, provoca una marcada disminució dels efectes morfogèniques induïts per HGF (Ishibe et al., 2004).

Com era d'esperar, l'acció de les fosfatases també és essencial pel *turnover* de l'adhesió i per la migració cel·lular (Deakin and Turner, 2008; Webb et al., 2004). Un enllaç addicional entre la paxilina i la regulació de les GTPases Rho inclou la tirosina fosfatasa PTPN12, que és reclutada a les adhesions focals mitjançant la unió als dominis LIM3 i LIM4 de la paxilina (Côte et al., 1999). La PTPN12 regula el *spreading*, la migració cel·lular i la formació de protrusions mitjançant la disminució de l'activitat Rac1 (Sastry et al., 2002; Jamieson et al., 2005). La PTPN12 també pot desfosforilar i inactivar Vav2 (un GEF de Rac1) i p190 (un GAP de RhoA), i així pot modular l'equilibri entre l'activitat de Rac1, que impulsa la formació de protrusions, i l'activitat de RhoA, que estabilitza les adhesions a la

part davantera de la cèl·lula i promou el desacoblament a la part posterior (Sastry et al., 2006). A més de PTPN12, altres fosfatases com PP2A i PTPN11 s'han descrit que s'uneixen i desfosforilen la paxilina, i que tenen un paper important en el control de les interaccions de la paxilina, com per exemple, durant la metàstasi (Young et al., 2003).

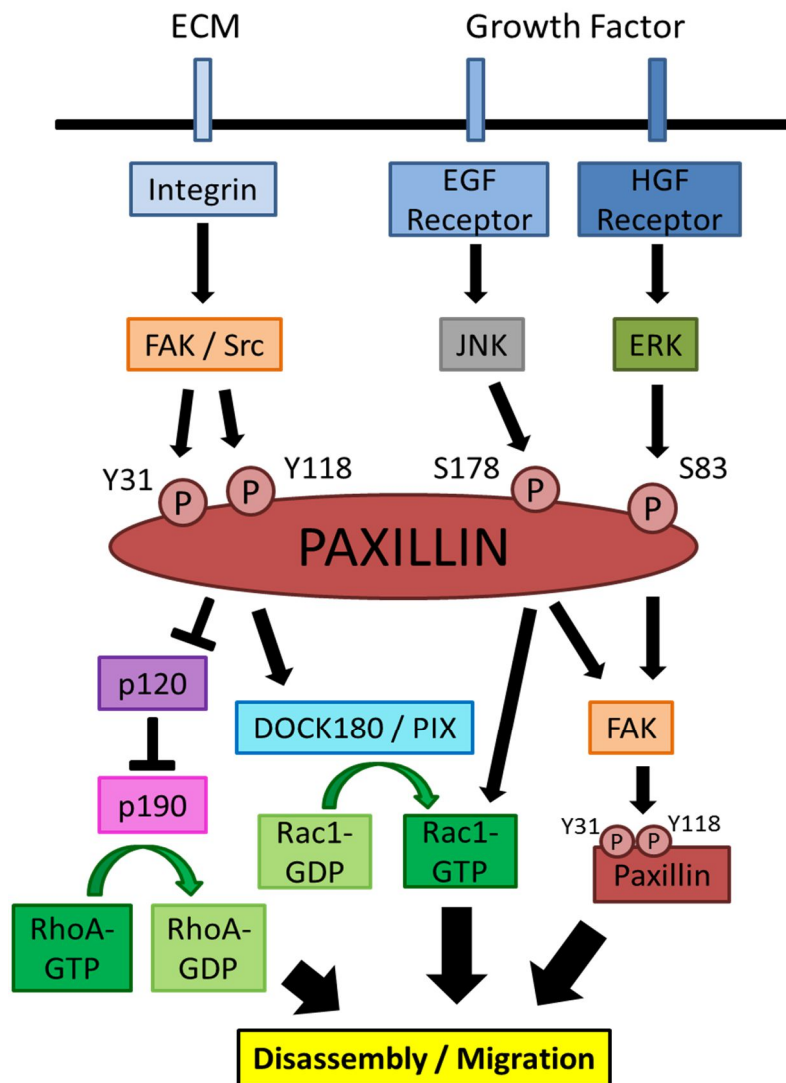


Figura 10. Diagrama de la via de senyalització per a la migració cel·lular dependent de paxilina.

2.5. Paxilina en les membranes *ruffles*

La paxilina també pot ser regulada i tenir rols funcionals en localitzacions cel·lulars diferents de les adhesions focals, com ara en les ondulacions de la membrana plasmàtica anomenades *ruffles* (Matafora et al., 2001; Chen et al., 2004) (**Figura 11A**). S'ha identificat que la tirosina-quinasa Brk és capaç d'unir-se i fosforilar directament la paxilina en les tirosines 31 i 118 en les membranes *ruffles*, després de que Brk hagi estat activada mitjançant EGF. Aquesta fosforilació augmenta l'activitat de la GTPasa Rac1 a través de la funció de CrkII, induint migració i invasió de les cèl·lules en resposta a EGF (Chen et al., 2004) (**Figura 11B**). La GTPasa Rac1 és la principal inductora de membranes *ruffles* i estimula ràpidament l'acumulació de filaments d'actina a la membrana plasmàtica formant aquestes ondulacions de membrana (Ridley et al., 1992). Es va veure que diversos factors de creixement i la proteïna Ras activa també indueixen membranes *ruffles*, però la seva formació es bloqueja quan s'expressa un mutant de Rac1 que inhibeix la seva activitat (S17N), suggerint que es requereix la GTPasa Rac1 activa per formar membranes *ruffles* induïdes per factors de creixement (Ridley et al., 1992).

Alternativament al mecanisme regulat per la quinasa Brk, existeix una altra via on la paxilina també col·labora en l'activació de Rac1 en la membrana. Un model molt interessant mostra com el *turnover* dels focus d'adhesió i el reciclatge de membrana per via endocítica estan acoblats (Matafora et al., 2001). A més, ambdós processos són necessaris per l'activitat protrusiva i la formació de lamel·lipodis. En vesícules de la via endocítica viatjarien paxilina i PIX (GEF de Rac1) fins el front de migració (**Figura 12**). En aquest punt hi hauria l'activació de Rac1 i la formació de *ruffles* i lamel·lipodis. Al mateix temps, paxilina podria ser reciclada per formar nous focus d'adhesió. Aquest model suposa que paxilina transitaria des dels focus d'adhesió madurs fins el front de migració on es formarien les noves adhesions al mateix temps que s'activaria el creixement dels lamel·lipodis i els *ruffles*. Com passava en els focus d'adhesió, hi ha diferents mecanismes d'activació de Rac1 en la membrana i no són excloents.

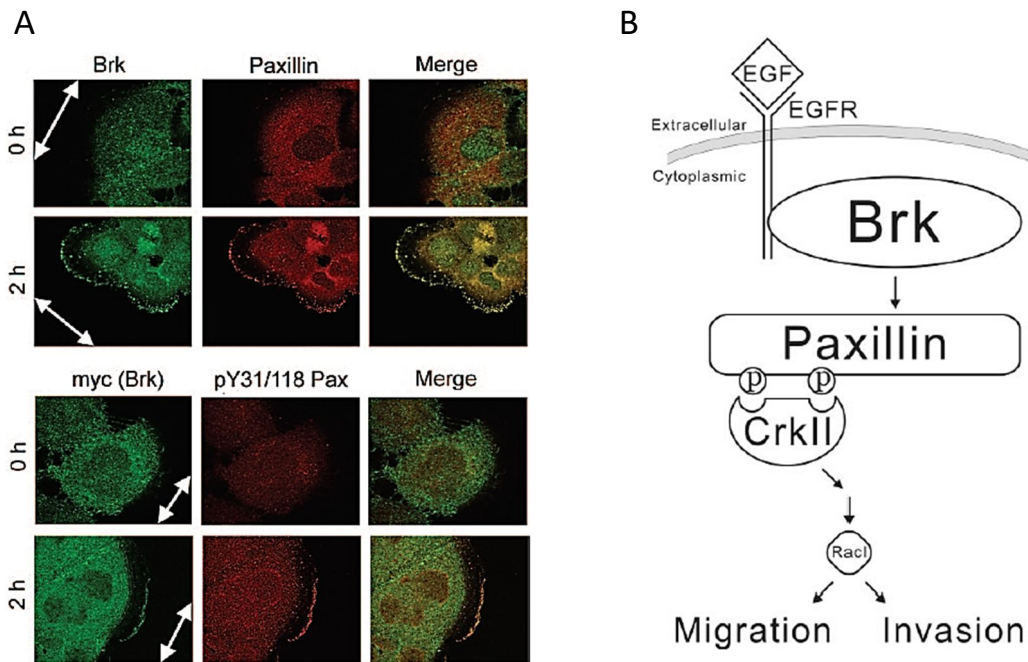


Figura 11. Paxilina induïx migració cel·lular induïda per EGF a través de Brk. (A) Paxilina i Brk co-localitzen en les membranes ruffles però no en les adhesions focals en cèl·lules migratòries. Cèl·lules A431 migrant fixades, on a les 2 hores les cèl·lules mostren membranes ruffles. Les fletxes indiquen la direcció de migració. **(B)** Model que il·lustra la via de senyalització a través de la qual paxilina induïx migració i invasió cel·lulars induïdes per EGF (Chen et al., 2004).

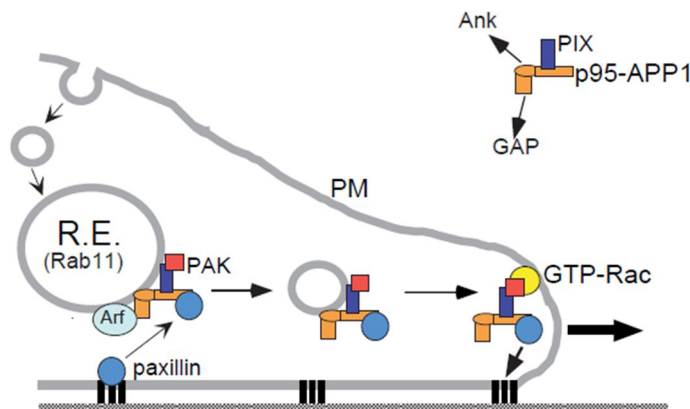


Figura 12. Model del paper del complex p95 en el reciclatge de membrana. La p95-APP1 interacciona amb PIX que seguidament interacciona amb PAK. D'altra banda, el domini C-terminal de p95-APP1 pot interactuar amb la paxilina i induir la seva relocalització als endosomes, fora de les adhesions focals. L'activació de Rac1 en la superfície cel·lular pot induir la translocació del complex p95 i, possiblement, el reciclatge de vesícules a la superfície cel·lular a través de la interacció amb PAK, efector de Rac1. Això donaria lloc al transport a la perifèria de la cèl·lula de nous components d'adhesió focal com la paxilina (Matafora et al., 2001).

3. CÀNCER

El càncer és una malaltia ubiqua en la població humana, tot i que hi ha variacions geogràfiques en la incidència de càncers específics degut a l'exposició a diferents agents cancerígens ambientals. Als Estats Units, el tumor més comú en els homes és el de pròstata i en les dones és el de mama, seguidament del càncer de pulmó i de colon en ambdós sexes. En canvi, en la resta del món desenvolupat els càncers més comuns són el de pulmó, el d'estómac i el de fetge en homes, i el de mama, el de cèrvix i el de pulmó en dones (Kumar et al., 2015). Encara que els factors genètics i ambientals contribueixen al desenvolupament de càncer, la influència ambiental sembla ser el factor de risc dominant en la majoria de tumors. Els factors ambientals que afecten al risc de patir càncer són els agents infecciosos (com el virus del papil·loma), fumar tabac (associat al càncer de boca, de faringe, de laringe, d'esòfag, de pàncrees, de bufeta i en el 90% del càncers de pulmó), el consum d'alcohol, la dieta, l'obesitat, l'exposició acumulada a estimulació d'estrògens i l'exposició a agents cancerígens (raigs UV, contaminants en els aliments...).

El càncer (tumor maligne) es pot diferenciar del tumor benigne en el seu grau de diferenciació, en la taxa de creixement, en la invasió local i en la propagació a distància (metàstasi). Els tumors benignes tenen una estructura similar al teixit d'origen i estan ben diferenciats, conserven funcions de les cèl·lules originals, creixen lentament, estan circumscrits i encapsulats i es mantenen en el lloc d'origen, mentre que els tumors malignes tenen una estructura atípica i poden ser indiferenciats completament, creixen ràpidament, han adquirit noves funcions, no estan encapsulats i envaeixen teixit sa del voltant i poden fer metàstasis en llocs diferents del seu origen. La pèrdua de diferenciació (anaplàsia) és una característica de malignitat, on les cèl·lules tornen a un estat més primitiu, i està associada a una variació de tamany i forma (pleomorfisme), com poden ser canvis de la morfologia nuclear, increment de la mitosis i de la proliferació i pèrdua de la polaritat, entre d'altres (Kumar et al., 2015). L'edat també és una característica important en la probabilitat de tenir càncer. La majoria de carcinomes apareixen en edats avançades (>55 anys). El motiu és l'acumulació de mutacions somàtiques associades a la malignitat de les cèl·lules i a la

posterior aparició del tumor. A més, la disminució de l'eficiència del sistema immune que acompanya a l'edat avançada és un altre factor important. S'ha de tenir en compte que els càncers adults són diferents als que tenen els nens, on predominen les neoplàsies del sistema nerviós central i la leucèmia.

El càncer es produeix després de que la cèl·lula hagi acumulat una sèrie de mutacions somàtiques degut a agents ambientals (no genètics) en proto-oncogens i en gens supressors tumorals involucrats en la proliferació i en l'apoptosi, entre d'altres. Els oncogens són mutacions o sobreexpressions dels proto-oncogens que funcionen autònomament, sense dependència dels senyals que promouen el creixement cel·lular normal. Els proto-oncogens tenen múltiples rols, però tots ells participen d'alguna manera en les vies de senyalització que condueixen a la proliferació. Així, els proto-oncogens codifiquen per factors de creixement, receptors de factors de creixement, transductors de senyal, factors de transcripció o components del cicle cel·lular. Mentre els oncogens són acceleradors de la proliferació cel·lular, les proteïnes codificades pels gens supressors tumorals són frens de la proliferació cel·lular, i mutacions i alteracions en aquests gens condueixen a una insensibilitat dels senyals inhibidors, sent una altra característica de la carcinogènesi. Les proteïnes supressores tumorals, com són pRB i p53, formen part d'una xarxa de punts de control que prevenen el creixement incontrolat i estan implicats en la diferenciació cel·lular, en l'apoptosi i en la reparació del dany al DNA, entre d'altres (Kumar et al., 2015).

Amb el pas dels anys, s'han descobert centenars de gens que es troben mutats en el càncer, i s'intenta explicar les conseqüències funcionals que generen aquestes alteracions. S'ha vist que aquests gens estan implicats en 10 característiques fisiològiques essencials del càncer que promouen la transformació cel·lular i la conseqüent progressió del tumor (Hanahan and Weinberg, 2011) (**Figura 13**):

- Autosuficiència en els senyals de creixement. Els tumors tenen la capacitat de proliferar en absència d'estímuls externs, com a conseqüència de l'activació d'oncogens.

- Insensibilitat a senyals inhibidors del creixement. Els tumors no responen a molècules que inhibeixen la proliferació de cèl·lules normals, com a conseqüència de la inactivació de gens supressors tumorals.
- Metabolisme cel·lular alterat. Els tumors són capaços de realitzar la glicòlisi aeròbica que permet la síntesis de macromolècules i orgànuls necessaris pel creixement cel·lular ràpid, anomenat efecte Warburg, on les cèl·lules requereixen una gran aportació de glucosa i fermentació a lactosa a través de la via glucolítica.
- Evasió de l'apoptosi. Els tumors són resistents a la mort cel·lular programada. L'apoptosi és una resposta protectora a moltes condicions patològiques que podrien contribuir a la malignitat si les cèl·lules es mantenen vives. Molts senyals indueixen apoptosi, com el dany al DNA, expressió d'oncoproteïnes, pèrdua d'adhesió a la matriu extracel·lular, entre d'altres. L'apoptosi s'inicia a través d'una via intrínseca o extrínseca, on ambdues resulten en l'activació d'una cascada proteolítica de caspases que destrueixen la cèl·lula. En les cèl·lules tumorals s'han trobat alteracions en les dues vies, però les mutacions que incapaciten la via intrínseca (mitocondrial) són les més comunes, com les produïdes en les proteïnes de la família Bcl-2.
- Replicació il·limitada (immortalitat). Els tumors no tenen restriccions en la capacitat de proliferació, una propietat de les *stem cells* que els hi permet evitar la senescència.
- Angiogènesi. Les cèl·lules tumorals, igual que les normals, no són capaces de créixer sense nutrients ni oxigen, i sense desfer-se dels productes residuals. Per això, els tumors tenen la capacitat d'induir l'angiogènesi. La vascularització del tumor és essencial pel seu creixement i és controlat mitjançant el balanç entre els factors angiogènics i anti-angiogènics produïts pel tumor en les cèl·lules de l'estroma. La hipòxia produeix angiogènesi a través de la transcripció del factor pro-angiogènic VEGF. La proteïna p53 indueix la síntesis de TSP-1, proteïna inhibidora de l'angiogènesi, mentre que Ras augmenta l'expressió de VEGF i estimula l'angiogènesi. Els inhibidors de VEGF s'utilitzen per tractar el càncers avançats, però no són curatius.

- Capacitat per envair i produir metàstasi. La proliferació descontrolada i la metàstasi són considerades les principals característiques biològiques dels tumors malignes, i la progressió de la metàstasi és la principal causa de morbiditat i mortalitat en nombrosos pacients amb càncer.
- Capacitat per evitar la resposta immune de l'hoste. Les cèl·lules de la immunitat innata i adaptativa reconeixen i eliminen cèl·lules que mostren antígens anormals com són les oncoproteïnes. Però les cèl·lules tumorals tenen moltes alteracions que els permeten evitar la resposta immune de l'hoste.
- Finalment, l'adquisició d'alteracions genètiques i epigenètiques que confereixen aquestes característiques fisiològiques poden ser accelerades a través de la inestabilitat genòmica i de la inflamació causada pel càncer.

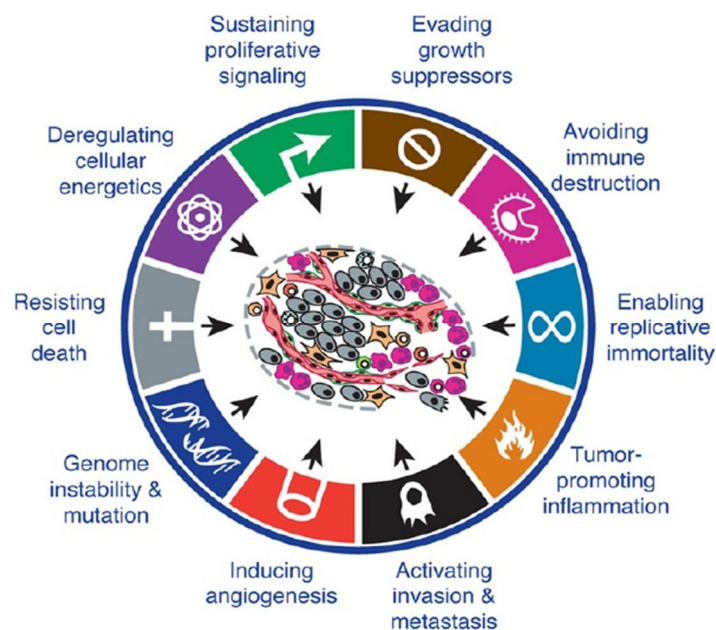


Figura 13. Característiques del càncer (Hanahan and Weinberg, 2011).

El creixement del tumor va acompanyat d'una infiltració progressiva, d'una invasió i de la destrucció del teixit del voltant. La majoria de càncers no reconeixen els límits anatòmics normals i és habitual que penetrin i envaeixin d'altres regions. La metàstasi és la

capacitat que té el tumor de propagar-se en regions físicament discontinües al tumor primari (**Figura 14**). La invasivitat dels càncers els permet penetrar als vasos sanguinis i limfàtics i a les cavitats corporals per tal de propagar-se. Tots els tumors malignes poden metastatitzar, però en alguns d'ells és molt infreqüent, com és el cas dels gliomes en el sistema nerviós central o dels carcinomes basocel·lulars de la pell, on ambdós càncers envaeixen ràpidament però rarament fan metàstasi. A més, hi ha estudis que revelen que el procés de metàstasi és molt ineficient, ja que dels milions de cèl·lules del tumor primari que són alliberades a la circulació, molt poques són capaces de produir metàstasi (Kumar et al., 2015). Per tant, les propietats d'invasió i de metàstasi es poden separar. Aquesta propagació del tumor redueix greument la possibilitat de cura i, per tant, a falta de prevenció del càncer, bloquejar aquesta capacitat metastàtica seria un bon benefici per als pacients. La metàstasi es divideix en dues fases:

- La invasió de la matriu extracel·lular. La capacitat per envair teixits es produeix en 4 etapes: disminució dels contactes cèl·lula-cèl·lula, degradació de la matriu extracel·lular, acoblament a nous components de la matriu extracel·lular i migració de les cèl·lules tumorals.
- La disseminació vascular i la colonització.

Per a la diagnosi del càncer existeixen molts mètodes de mostreig, com la excisió, la biòpsia i els frotis citològics. La immunohistoquímica i la citometria de flux ajuden en la diagnosi i la classificació dels tumors perquè distingeixen diferents patrons d'expressió definint diferents tipus de tumor. A més, també s'utilitzen les anàlisis moleculars per determinar el diagnòstic, el pronòstic i per conèixer la predisposició hereditària al càncer. Les tècniques d'expressió de RNA, de seqüenciació de DNA i l'ús de diferents *arrays* són útils en la caracterització molecular dels tumors, pel seu tractament dirigit i pel pronòstic. Finalment, les proteïnes alliberades pels tumors en el sèrum, com la PSA, s'utilitzen en *screenings* poblacionals per monitoritzar la recurrència del càncer després del tractament (Kumar et al., 2015).

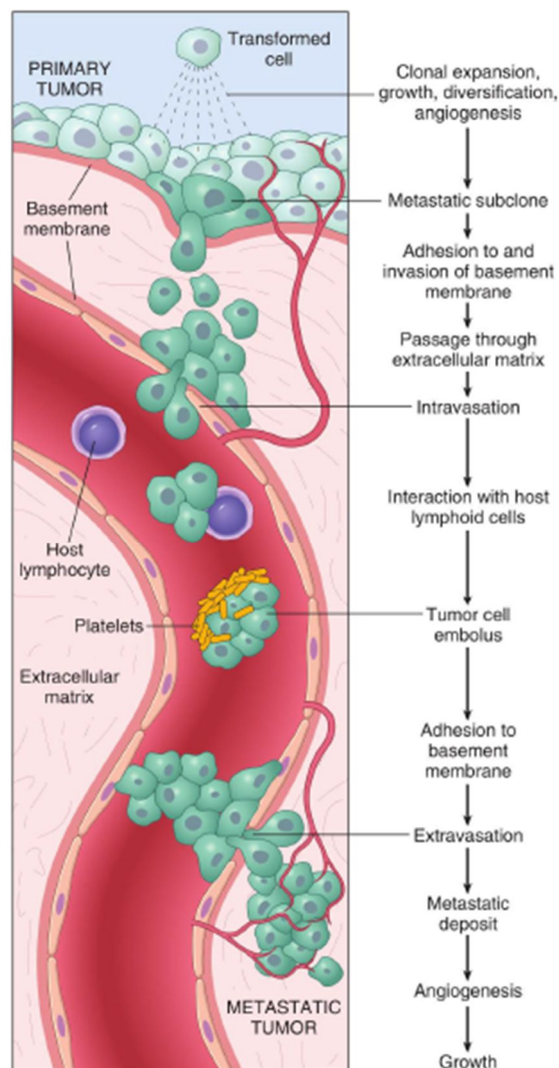


Figura 14. Procés de metastasi (Kumar et al., 2015).

3.1. Ciclina D1 i tumorogènesi

El paper de ciclina D1 en el desenvolupament del càncer s'associa a la seva funció en el cicle cel·lular, de manera que amplificacions del gen induiran la proliferació del tumor (**Figura 15**). D'acord amb això, la sobreexpressió de ciclina D1 en el nucli ha estat detectada per immunohistoquímica en molts tipus de tumors diferents, on els canvis transcripcionals induïts per l'acumulació de ciclina D1 en el nucli donen lloc a la transformació cel·lular (Kim and Diehl, 2009). Per exemple, en el limfoma de cèl·lules del mantell l'acumulació de ciclina D1 en el nucli és utilitzat en els criteris de diagnòstic (Musgrove et al., 2011).

Mechanism of deregulation	Tumour type	Frequency
Amplification and overexpression		
CCND1 amplification	Head and neck squamous cell carcinoma	26–39%
Cyclin D1 overexpression	Head and neck squamous cell carcinoma	20–68%
CCND1 amplification	Non-small-cell lung cancer	5–30%
Cyclin D1 overexpression	Non-small-cell lung cancer	18–76%
CCND1 amplification	Endometrial cancer	26%
Cyclin D1 overexpression	Endometrial cancer	40–56%
CCND1 amplification	Melanoma	0–25%
Cyclin D1 overexpression	Melanoma	30–65%
CCND1 amplification	Pancreatic cancer	25%
Cyclin D1 overexpression	Pancreatic cancer	42–82%
CCND1 amplification	Breast cancer	15–20%
Cyclin D1 overexpression	Breast cancer	50–70%
CCND1 amplification	Colorectal cancer	2.5%
Cyclin D1 overexpression	Colorectal cancer	55%
Chromosomal rearrangement and overexpression		
CCND1: IGH translocation t(11;14)(q13;q32)	Mantle cell lymphoma	>90%
Cyclin D1 overexpression	Mantle cell lymphoma	>90%
CCND1: IGH translocation t(11;14)(q13;q32)	Multiple myeloma	16%
Cyclin D1 overexpression	Multiple myeloma	30–50%
Splice variants and transcript aberrations		
3' UTR rearrangements, microdeletions or point mutations	Mantle cell lymphoma	4–10%
Cyclin D1b overexpression	Breast cancer	22%*
Cyclin D1b overexpression	Prostate cancer	27%*
Mutations affecting nuclear export and proteolysis		
Cyclin D1 T286R; Δ266–295	Oesophageal cancer	4%
Cyclin D1 P287S; P287T; Δ289–292	Endometrial cancer	4%
FBXO4 S8R, S12L, P13S, L23Q, G30N and P76T	Oesophageal cancer	14%

Figura 15. Desregulació de la ciclina D1 en el càncer (Musgrove et al., 2011).

A principis de l'any 2010 es va publicar un estudi realitzat amb més de 3000 mostres de tumors humans amb 26 orígens histològics diferents on es va observar que l'amplificació del gen que codifica ciclina D1 és la segona més comuna en aquests tumors, i l'amplificació del gen que codifica per la seva subunitat catalítica, Cdk4, és la quarta més comuna (Beroukhim et al., 2010). De fet, la ciclina D1 va ser aïllada originalment en dos tipus de tumors diferents com el gen amplificat per una inversió cromosòmica en l'adenoma paratiroide (PRAD1) i per una translocació t(11:14) en el limfoma de cèl·lules B (BCL-1) (Motokura et al., 1991). Alternativament, ciclina D1 també es va aïllar d'una genoteca de glioblastoma humà en una selecció genètica de llevat utilitzant cèl·lules deficientes en les ciclins de la fase G1 del cicle cel·lular (Xiong et al., 1991).

S'ha vist que la sobreexpressió de ciclina D1 en la glàndula mamària és suficient per la inducció del carcinoma de mama (Wang et al., 1994), i en els càncers de mama invasius la ciclina D1 està sobreexpressada en el 50% dels casos (van Diest et al., 1997). Anàlisis funcionals indiquen que la repressió de l'expressió de ciclina D1 pot limitar el creixement de tumors de mama induïts per HER2/neu (Lee et al., 2000), i que ratolins deficients en ciclina D1 són resistents als càncers de mama induïts pels oncogens HER2/neu o Ras (Lee et al., 2000; Yu et al., 2001; Rowlands et al., 2003) i als tumors gastrointestinals induïts per formes mutades del gen *Apc* (Hulit et al., 2004). A més, també s'ha vist que en molts tipus de càncer, com el de pulmó, el de mama, el de colon i el sarcoma, la sobreexpressió de ciclina D1 es produeix per senyals oncogènics, enlloc de mutacions somàtiques o reordenaments del gen de la ciclina D1 (Fu et al., 2004).

Tot i que ciclina D1 és un dels oncogens més freqüents, en fibroblasts de ratolí la sobreexpressió de ciclina D1 redueix la fase G1 del cicle cel·lular i per si sola no provoca la transformació cel·lular ni el creixement tumoral (Quelle et al., 1993; Resnitzky et al., 1994). Hi ha una variant al·lèlica de ciclina D1 (D1b) que sí indueix la transformació cel·lular i el creixement no adherent característic dels tumors en cèl·lules NIH3T3 (Knudsen, 2006). Aquesta variant s'origina com a conseqüència d'un *splicing* defectuós entre els exons 4 i 5 de ciclina D1 (Betticher et al., 1995). A l'al·lel ciclina D1b li falten els 33 aminoàcids últims de l'extrem C-terminal de la proteïna, no té la seqüència PEST ni el residu treonina 286, encara que és idèntica a la ciclina D1 *wild type* en l'extrem N-terminal a través del qual interacciona amb Cdk4, els inhibidors de CDKs i pRB (**Figura 2**). La localització de l'al·lel ciclina D1b ha estat analitzada per immunofluorescència i s'observa que aquesta proteïna es localitza majoritàriament en el nucli (Lu et al., 2003). Tot i la pèrdua de la regió PEST i del residu treonina 286, aquesta variant no és més estable que la ciclina D1 completa (Lu et al., 2003; Solomon et al., 2003). D'altra banda, l'al·lel ciclina D1b no és un potent activador de Cdk4 ni de la fosforilació de pRB. Per tant, és sorprenent que l'al·lel ciclina D1b tingui la capacitat de transformar les cèl·lules sent més o menys igual d'estable que la ciclina D1 completa i sent un pobre activador de Cdk4.

Una qüestió important que encara queda per resoldre és de quina manera la sobreexpressió de ciclina D1 contribueix al desenvolupament de l'oncogènesi. El paper de ciclina D1 en el desenvolupament de tumors podria ser, almenys en part, independent de les seves funcions com a regulador de la proliferació. En aquest sentit, en mostres de tumors de mama s'observa que la sobreexpressió de ciclina D1 no correlaciona amb l'estat de fosforilació de pRB ni amb els nivells d'expressió de gens dependents del factor de transcripció E2F, com ciclina E (Zukerberg et al., 1995; Nielsen et al., 1999). En aquests tumors no es detecta un increment en la proliferació, en canvi en els tumors en els quals s'observa una inactivació de pRB o una sobreexpressió de ciclina E es produeix un augment significatiu de la proliferació (Zukerberg et al., 1995; Jares et al., 1997). Aquests fenotips potser es podrien explicar per la funció que té ciclina D1 en la regulació transcripcional de manera independent de Cdk4 (Neuman et al., 1997).

Tot i que és evident que la sobreexpressió de ciclina D1 és crítica en el procés de formació tumoral per la seva funció en proliferació cel·lular, s'ha descrit en diferents tumors una localització citoplasmàtica de ciclina D1. Per exemple, una elevada expressió de ciclina D1 citoplasmàtica s'ha detectat per immunohistoquímica en les metàstasis de ganglions limfàtics originades a partir de càncer de pròstata i s'associa a una baixa supervivència (Fleischmann et al., 2011). A més, també s'ha vist que ciclina D1 és segregada en el citoplasma de moltes línies cel·lulars tumorals de mamífers (Alao et al., 2006). En un estudi s'ha demostrat que ciclina D1 contribueix a l'adhesió cel·lular, a la migració i a la invasió de cèl·lules endotelials i de macròfags, on s'ha vist que cèl·lules endotelials de ratolins deficientes en ciclina D1 han perdut la capacitat invasiva en el Matrigel, tenen major capacitat d'adhesió i tenen menor nombre de membranes *ruffles* (Holnthoner et al., 2002). La ciclina D1 s'ha associat amb la invasió tumoral i la metàstasi en diferents estudis clínics i en experiments *in vivo*, on per exemple s'ha vist que l'expressió del microRNA-9 inhibeix la proliferació, la invasió i la metàstasi del càncer gàstric a través de la repressió de ciclina D1 (Zheng et al., 2013), i també s'ha descrit que la sobreexpressió de ciclina D1 es relaciona amb la metàstasi del càncer de pròstata a l'os (Drobnjak et al., 2000).

No obstant, encara no s'ha analitzat la possible correlació entre la presència de ciclina D1 en el citoplasma de teixits neoplàsics i la capacitat d'augmentar el seu potencial invasiu i metastàtic. Però s'ha vist que la sobreexpressió de ciclina D1 es correlaciona amb la metastasi del càncer, i s'associa a la funció de ciclina D1 per reduir l'adhesió cel·lular i promoure la migració a través de les GTPases Rho (Burbelo et al., 2004), el que suggereix que ciclina D1 pot ser una nova diana terapèutica per fer front la metastasi.

3.2. Desregulació de paxilina en el càncer

La paxilina pot tenir un paper important en el càncer ja que les alteracions en els nivells d'adhesió i l'augment de la motilitat de les cèl·lules són esdeveniments crítics en el desenvolupament de la metastasi. També, però, cal considerar que aquesta proteïna té funcions implicades en la proliferació i l'apoptosi. La mort cel·lular programada o apoptosi i la proliferació cel·lular són essencials pel desenvolupament embrionari en condicions normals, però alteracions en aquests processos són també essencials en l'establiment de la tumorigènesi. L'apoptosi proporciona protecció contra el càncer, que pot ser induïda per la inestabilitat genètica (Hanahan and Weinberg, 2000). La família de proteïnes Bcl-2 han demostrat que proporcionen senyals anti i pro-apoptòtics (Youle and Strasser, 2008) i són importants en l'embriogènesi, en la resposta immune i en la morfogènesi de teixits. Curiosament, la paxilina s'uneix a la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2, a través de la interacció amb el domini LD4 de la paxilina, i promou la supervivència cel·lular i es requereix per la nefrogènesi durant el desenvolupament del ronyó, encara que el mecanisme d'acció no està clar (Deakin and Turner, 2008). L'anàlisi de l'estructura de Bcl-2 ha revelat que té una tipologia i un domini que és molt anàleg a les proteïnes caracteritzades d'unió als motius LD, com són la vinculina, GIT1 i FAK (Deakin and Turner, 2008).

La interacció de vinculina amb els motius de paxilina LD1 i LD2 (Turner et al., 1999) també s'ha demostrat que regula la supervivència cel·lular. S'ha proposat que el domini *tail* de la vinculina competeix amb FAK per la unió amb paxilina i, per tant, promou la

senyalització d'ERK a través de FAK o de paxilina per prevenir l'apoptosi (Subauste et al., 2004). La paxilina també ha estat relacionada amb l'apoptosi a través de la seva identificació com un substrat de la caspasa-3. Es va proposar l'escissió de la paxilina per la caspasa-3, en sis residus diferents d'àcid aspàrtic (Chay et al., 2002), com un mecanisme per inhibir els senyals de supervivència cel·lular mediat per les integrines i per promoure l'apoptosi causada per la pèrdua d'adhesió de les cèl·lules a la matriu extracel·lular (Frisch and Francis, 1994). Les cèl·lules que expressen una molècula de paxilina que no té aquests llocs de tall de la caspasa-3 estan protegides de l'apoptosi (Chay et al., 2002).

D'acord amb que la paxilina és una proteïna que promou la supervivència cel·lular i la invasió, aquesta s'ha trobat alterada en diferents tipus de càncer. Per exemple, s'ha vist que en càncer de pulmó la paxilina està sobreexpressada, amplificada o mutada. Les mutacions de la paxilina s'agrupen entre els motius LD1 i LD2 i en els dominis LIM. La mutació puntual més freqüent és el canvi d'adenina per treonina en la posició 127 (A127T) i, *in vitro*, millora el creixement de cèl·lules del càncer de pulmó, la formació de colònies, la formació d'adhesions focals i co-localiza amb la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2 (Jagadeeswaran et al., 2008). El silenciament del gen d'aquest mutant de paxilina mitjançant RNA d'interferència produeix una reducció de la viabilitat cel·lular, i l'expressió d'aquest mutant en ratolins mostra un augment en el creixement tumoral, la proliferació i la invasió cel·lulars, suggerint que paxilina té un paper important en el càncer de pulmó (Jagadeeswaran et al., 2008). També s'ha vist que una expressió anormal de paxilina està implicada en el creixement, la invasió, la metastasi i la diferenciació del carcinoma gàstric (Xiao et al., 2014), i l'augment de l'expressió de paxilina es correlaciona amb la progressió del tumor, la invasió i la metastasi en el càncer de mama i, per tant, es pot utilitzar com un indicador de pronòstic en aquests càncers i com un marcador pel desenvolupament de noves teràpies (Omran and Al Sheeha, 2015). A més, s'ha observat l'augment de l'expressió de paxilina en l'epiteli proliferatiu de pròstata i s'ha correlacionat amb l'augment potencial de metastasi, on s'ha vist que augments en la fosforilació de la paxilina en tirosina poden ser importants (Brown and Turner, 2004). De la mateixa manera, s'ha descrit un augment de l'expressió de la paxilina en el síndrome nefrític, en la lesió glomerular i en el carcinoma renal metastàtic (Brown and Turner, 2004).

S'ha analitzat el possible efecte terapèutic de la inhibició del complex Paxilina-FAK-Src per suprimir el neuroblastoma i/o retardar o prevenir la seva metàstasi (Kratimenos et al., 2014). A més, la paxilina pot tenir un paper important, juntament amb FAK, en el càncer pancreàtic (Liao et al., 2013; Kanteti et al., 2016). També s'ha vist que les cèl·lules de glioma resistents a temozolomida, l'anti-cancerigen més efectiu contra els gliomes, tenen molta capacitat d'invasió degut a una hiperactivació de la quinasa JNK i, per tant, de la fosforilació de paxilina en la serina 178 (Ueno et al., 2015). A més, la sobreexpressió de PAK en el carcinoma hepatocel·lular també indueix l'activació de JNK i la fosforilació de paxilina per promoure la metàstasi del càncer (Ching et al., 2007).

La desregulació de la paxilina s'ha correlacionat amb la progressió tumoral i la metàstasi del càncer colorectal, on el microRNA-137 és freqüentment suprimit. La sobreexpressió de paxilina induïda per la supressió del microRNA-137 promou la progressió tumoral i la metàstasi del càncer colorectal, i és predictiu d'un mal pronòstic (Chen et al., 2013). A més, s'ha vist que el microRNA-137 actua com a supressor tumoral a través de la paxilina en el càncer de pulmó, inhibint la proliferació cel·lular, induint apoptosi i suprimint la migració i la invasió cel·lulars en aquest càncer (Bi et al., 2014). A més, el microRNA-145 també actua com a supressor tumoral inhibint la proliferació cel·lular, la migració i la invasió a través de la paxilina en el càncer colorectal (Qin et al., 2015).

La sobreexpressió o la repressió del supressor tumoral PTEN produeix una disminució o un augment, respectivament, de l'expressió de paxilina en cèl·lules de càncer de colon, afectant a la migració i a la invasió, i s'ha vist que PTEN inhibeix la progressió del càncer de colon inhibint l'expressió de paxilina a través de la via PI3K-Akt-NF κ B, on en el promotor de la paxilina hi ha tres llocs d'unió a NF κ B (Zhang et al., 2015).

Totes aquestes dades mostren com la sobreexpressió de paxilina pot incrementar la supervivència i la invasivitat en diferents tumors. En aquest sentit aquesta proteïna dels focus d'adhesió és un candidat a ser diana de teràpies anti-tumorals.

4. HIPÒTESI

S'ha vist que els processos que impliquen motilitat i polaritat cel·lulars són essencials per a la homeòstasi dels teixits, i que una desregulació d'aquests processos pot ser crític en el càncer i en la metàstasi.

S'ha observat que les cèl·lules deficientes en ciclina D1 s'adhereixen més ràpidament a la matriu extracel·lular i tenen un fenotip més estès (*spread*) que les cèl·lules *wild type*. A més, mostren un elevat nombre d'adhesions focals distribuïdes centrípetament, el que suggereix l'existència d'alteracions en la maquinària d'adhesió (Li et al., 2006a). Tenint en compte que els focus d'adhesió són elements centrals pel control de l'adhesió cel·lular i la migració, es va estudiar si la ciclina D1 citoplasmàtica podia interactuar amb components dels focus d'adhesió.

En aquest laboratori, es va observar co-localització de ciclina D1 amb les integrines i amb la paxilina en el citoplasma de cèl·lules MDCK i MEFs, indicant que ciclina D1 podia interaccionar amb aquestes proteïnes implicades en l'adhesió cel·lular. A més, en fibroblasts de ratolí es va trobar co-immunoprecipitació específica (co-IP) a nivell endogen de ciclina D1 i de Cdk4 amb la paxilina (**Figura 16**). Com es pot veure, en fibroblasts deficientes en ciclina D1 no hi ha co-immunoprecipitació de Cdk4 amb paxilina. La immunoprecipitació de ciclina D1 endògena també va fer co-immunoprecipitar paxilina d'una manera específica, encara que la quantitat de paxilina immunoprecipitada va ser molt baixa en comparació amb la paxilina total de l'extracte proteic. Per tant, probablement ciclina D1 i Cdk4 formen complex per tal d'interactuar amb la paxilina. Amb aquestes dades es va plantejar la hipòtesi que el complex ciclina D1-Cdk4 regula la migració i l'adhesió cel·lulars a través de la paxilina i que, a través d'alguna via de senyalització, aquesta interacció és important per a la invasivitat i la metàstasi de les cèl·lules tumorals, i aquest mecanisme pot ser rellevant per explicar les funcions normals i patològiques de l'oncogen ciclina D1. En base a l'heterogeneïtat de les poblacions tumorals, l'acumulació local de ciclina D1 (i/o Cdk4) en el citoplasma d'una població de cèl·lules tumorals podria produir un desequilibri en les funcions de la paxilina i promoure la invasió del tumor i la metàstasi.

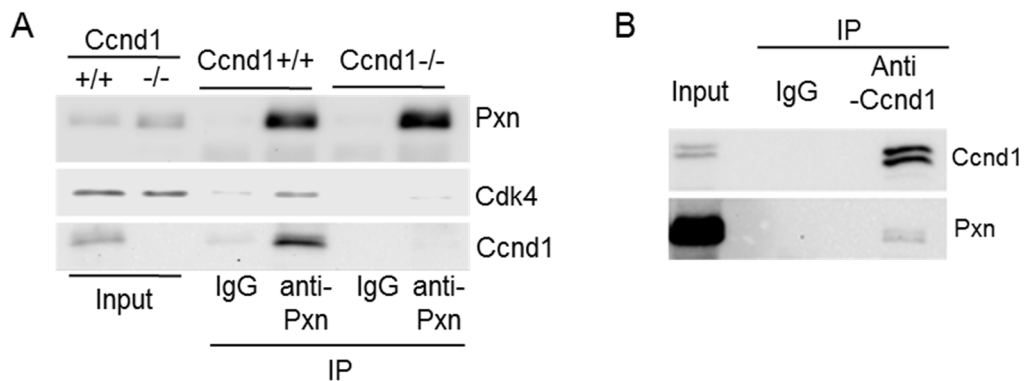


Figura 16. Interacció entre ciclina D1 i paxilina. (A) Immunoprecipitació de paxilina en fibroblasts wild type i deficients en ciclina D1, i co-immunoprecipitació de ciclina D1 i Cdk4. **(B)** Immunoprecipitació de ciclina D1 en fibroblasts wild type i co-immunoprecipitació de paxilina.

5. OBJECTIUS

- 1) Identificar si la paxilina és un substrat del complex ciclina D1-Cdk4 i si la fosforila.
 - 1.1. Caracteritzar les dianes de paxilina que són fosforilades pel complex ciclina D1-Cdk4.
 - 1.2. Analitzar la implicació funcional d'aquesta fosforilació *in vitro* en cultius cel·lulars.
 - 1.3. Analitzar la implicació funcional *in vivo* en ratolins immunodeficients.
- 2) Establir un possible mecanisme efector de la interacció de l'objectiu 1.
- 3) Caracteritzar la importància de la ciclina D1 citoplasmàtica com a marcador d'invasivitat.
 - 3.1. Construcció del mutant de ciclina D1 associat a la membrana plasmàtica.
 - 3.2. Caracteritzar aquest mutant de ciclina D1.
 - 3.3. Analitzar la seva implicació funcional *in vitro* i *in vivo*.

MATERIALS I MÈTODES

1. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA MOLECULAR

1.1. Construccions plasmídiques

En els vectors pcDNA3 o pCMV-SPORT6 estan clonades les seqüències codificants i les fusions de les proteïnes amb les que hem treballat sota el control del promotor CMV, que tot i donar alts nivells d'expressió constitutiva, mostra una clara dependència de sèrum. Per aquesta raó en determinats vectors es va substituir pel promotor del gen de la ubiquitina (Ubi), que es comporta de forma constitutiva independentment de la presència o absència de sèrum. Per realitzar les mutacions puntuals o delecions s'ha utilitzat la mutagènesi dirigida segons el mètode PCR-SDM, basat en el protocol publicat per *Weiner and Costa, 1994*. Aquest mètode presenta la modificació que s'introdueix una diana de restricció en el lloc on es realitza la mutació, per assegurar que la mutagènesi s'ha fet correctament. Les construccions lentivirals s'han fet en el vector pDSL-hpUG (ATCC) després d'eliminar-li la unitat transcripcional GFP i en alguns casos substituint el promotor CMV pel promotor Ubi, seguint els protocols de clonació basats en recombinació *Gateway Technology* (Invitrogen).

Tant la ciclina D1 humana *wild type* com l'al·lel de ciclina D1 K112E que forma un complex inactiu amb Cdk4, es van fusionar amb tres còpies dels epítops FLAG o HA a l'extrem N-terminal sota el control dels promotors CMV en pcDNA3 o Ubi en un vector lentiviral derivat de pDSL (Invitrogen). Per fer les variants de ciclina D1 associades a la membrana, l'extrem 3' de la seqüència codificant de K-Ras que conté el motiu CAAX (GGC TGT GTG AAA ATT AAA AAA TGC ATT ATA ATG TAA) es va fusionar a l'extrem 3' de la seqüència codificant de ciclina D1 o de ciclina D1 K112E.

La paxilina de ratolí (IMAGE ID clon 5309957, BioScience) es va utilitzar per obtenir la fusió GST en N-terminal en pGEX-KG (Clontech) i una fusió 3-HA en N-terminal sota el control del promotor Ubi en el vector derivat de pDSL. La GST-Paxilina conté la paxilina sencera i la GST-Paxilina C-terminal conté només els 4 dominis LIM de la paxilina (aa337-591). La paxilina *wild type* i l'al·lel fosfomimètic S178E inserides en el vector d'expressió de

mamífers pEGFP-C1 que conté l'epítot GFP (BD Biosciences) van ser proporcionats per J. Yamauchi (Yamauchi et al., 2006). Es va utilitzar la mutagènesis dirigida PCR-SDM per obtenir tots els mutants no fosforilables i fosfomimètics de paxilina. La fusió GST-pRB (aa379-928) va ser proporcionat per Neus Agell. El plasmidi pCEFL-AU5-Rac1 Q61L es va obtenir gràcies a P. Crespo a través de X. Bustelo.

Per la interferència de RNA de ciclina D1 i de Ra1B, el shRNA TRCN0000026883 (per ciclina D1) i el shRNA TRCN0000072957 (per Ra1B), ambdós clonats en el vector pLKO.1-puro, es van obtenir de Sigma.

Tots els DNAs plasmídics els hem obtingut utilitzant els reactius de QIAGEN MAXI KIT o SIGMA MINIPREP KIT, sempre seguint les instruccions del fabricant. La qualitat del DNA obtingut s'ha comprovat per electroforesi en gels d'agarosa i tinció amb bromur d'etidi. La concentració de DNA s'ha mesurat utilitzant l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). S'han seguit els protocols descrits a *Current Protocols Biology* (Ausubel et al., 1987) pel que fa a la manipulació i l'anàlisi del DNA per obtenir noves construccions en plasmidis. Els DNAs plasmídics obtinguts s'han comprovat mitjançant la digestió amb enzims de restricció i la producció de proteïna s'ha comprovat per *western blot*. A continuació es mostren els vector plasmídics utilitzats (**Taula 1**).

NOM	VECTOR PLASMÍDIC	DESCRIPCIÓ
pCDNA3	CMVp-3FLAG	Vector control
pNBM 470	pCDNA3-6His-3HA-MCS	Vector control
pEGFP-N1	CMVp-EGFP	Vector control amb GFP (fluorescència verda)
pGEX-KG	pGEX-2T derivative	Vector control GST
pCYC 2111	shRNA SCR (scramble)	Vector control shRNA SCR pLKO.1-puro (Sigma)
pCYC 193	CMVp-3FLAG-CycD1	El fragment de 0.9 kb amplificat per PCR del vector pET-D12 va ser clonat en el vector pcDNA3-FLAG obert amb BamHI-EcoRI.
pCYC 291	CMVp-GFP-CycD1	La EGFP va ser amplificada per PCR del vector pEGFP-N1 i clonada al pCYC195 (CMVp-CycD1) en el lloc BamHI.
pCYC 396	3HA-CBP-CycD1	El fragment de 180 pb amplificat per PCR del vector pCYC314 (3HA-CBP) va ser clonat en el vector pCYC195 (CMVp-CycD1) obert amb HindIII i BamHI.
pCYC 510	pCDNA3-3 FLAG -CYCD1 K112E	Mutagènesis dirigida per canviar la Lisina 112 a Àcid Glutàmic en el vector pCYC193.
pCYC 801	Ubip-3HA-CBP-CyCD1 en pDSL(Δ ubip-GFP) (vector lentiviral)	El fragment de 2.3 kb amplificat per PCR del vector pCYC794a (Ubip-3HA-CBP-CycD1) s'ha introduït en el vector pDSL Δ GFP-UbiC per recombinació amb pDONR.

pCYC 886	CMVp-3HA-RalB	El fragment de 0.6 kb amplificat per PCR i que conté BamHI-RalB-XhoI del vector pCYC879 (pCMVsport6-RalB, GeneService) va ser clonat en el vector pNBM470 obert amb BamHI-XhoI.
pCYC 1066	Paxillin-pCMVsport6	El cDNA complet de la Paxilina de ratolí. CLONE IMAGE 5309957. GeneService
pCYC 2057	3HA-CycD1-CAAX	El fragment de 0.9 kb amplificat per PCR que conté BamHI-CycD1-CAAX-EcoRI s'ha clonat en el vector pNBM470 obert amb BamHI-EcoRI.
pCYC 2058	3HA-CycD1 K112E-CAAX	El fragment de 0.9 kb amplificat per PCR que conté BamHI-CycD1K112E-CAAX-EcoRI s'ha clonat en el vector pNBM470 obert amb BamHI-EcoRI.
pCYC 2062	Ubip-3HA-CycD1-CAAX en lentivirus (pDSL)	El fragment de 0.9 kb amplificat per PCR del vector pCYC2057 i que conté BamHI-CycD1-CAAX-EcoRI s'ha clonat en el vector lentiviral pDSL-hpUG (Δ Ubip i Δ GFP) del pCYC 801, en el fragment de 9 kb obert amb BamHI-EcoRI.
pCYC 2063	Ubip-3HA-CycD1 K112E-CAAX en lentivirus (pDSL)	El fragment de 0.9 kb amplificat per PCR del vector pCYC2058 i que conté BamHI-CycD1K112E-CAAX-EcoRI s'ha clonat en el vector lentiviral pDSL-hpUG (Δ Ubip i Δ GFP) del pCYC 801, en el fragment de 9 kb obert amb BamHI-EcoRI.
pCYC 2064	GST-MmPaxillin	El fragment de 1.6 kb amplificat per PCR del vector pCYC1066 i que conté EcoRI-Paxilina-XhoI s'ha clonat en el vector pGEX-KG obert amb EcoRI-SalI.
pCYC 2066	EGFP-MmPaxillin	El DNA de la Paxilina de ratolí s'ha insertat en els llocs BglII i/o BamHI de pEGFP-C1. Cedit per J. Yamauchi.
pCYC 2067	EGFP-MmPaxillin S178E	El DNA de la Paxilina de ratolí amb la mutació S178E s'ha insertat en els llocs BglII i/o BamHI de pEGFP-C1. Cedit per J. Yamauchi.
pCYC 2068	EGFP-MmPaxillin S178A	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 178 a Alanina en la EGFP-MmPax (pCYC2066).
pCYC 2078	GST-MmPaxillin (aa134-591)	El fragment de 1.35 kb amplificat per PCR del vector pCYC1066 i que conté EcoRI-Paxilina(aa134-591)-XhoI s'ha clonat en el vector pGEX-KG obert amb EcoRI-SalI.
pCYC 2079	GST-MmPaxillin (aa201-591)	El fragment de 1.15 kb amplificat per PCR del vector pCYC1066 i que conté EcoRI-Paxilina(aa201-591)-XhoI s'ha clonat en el vector pGEX-KG obert amb EcoRI-SalI.
pCYC 2080	GST-MmPaxillin (aa270-591)	El fragment de 0.95 kb amplificat per PCR del vector pCYC1066 i que conté EcoRI-Paxilina(aa270-591)-XhoI s'ha clonat en el vector pGEX-KG obert amb EcoRI-SalI.
pCYC 2081	GST-MmPaxillin (aa337-591)	El fragment de 0.75 kb amplificat per PCR del vector pCYC1066 i que conté EcoRI-Paxilina(aa337-591)-XhoI s'ha clonat en el vector pGEX-KG obert amb EcoRI-SalI.
pCYC 2082	GST-MmPaxillin (S243G;S244A)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 243 a Glicina i la Serina 244 a Alanina en la GST-Mm Paxilina (pCYC2064).
pCYC 2084	3HA-CBP-MmPaxillin en lentivirus (pDSL)	El fragment de 1.7 kb amplificat per PCR del vector pCYC2064 i que conté EcoRI-Paxilina-XhoI s'ha clonat en el vector pDSL-hpUG (Δ Ubip i Δ GFP) del pCYC 801, en el fragment de 9 kb obert amb EcoRI-XhoI.
pCYC 2087	GST-MmPaxillin (S83A;S244A)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 83 a Alanina en la GST-Mm Paxilina (pCYC2082).
pCYC 2088	GST-MmPaxillin (S178A;S244A)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 178 a Alanina en la GST-Mm Paxilina (pCYC2082).
pCYC 2090	GST-MmPaxillin (S83A;S178A;S244A)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 178 a Alanina en la GST-Mm Paxilina (pCYC2087).

MATERIALS I MÈTODES

pCYC 2099	3HA-CBP-MmPaxillin (S83E) en lentivirus	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 83 a Àcid Glutàmic en la GST-Mm Paxilina (pCYC2064) i clonatge en el vector lentiviral pDSL-hpUG (Δ Ubp i Δ GFP) del pCYC 801, en el fragment de 9 kb obert amb EcoRI-XhoI.
pCYC 2100	3HA-CBP-MmPaxillin (S83E;S178E) en lentivirus	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 83 i 178 a Àcid Glutàmic en la GST-Mm Paxilina (pCYC2064) i clonatge en el vector lentiviral pDSL-hpUG (Δ Ubp i Δ GFP) del pCYC 801, en el fragment de 9 kb obert amb EcoRI-XhoI.
pCYC 2103	EGFP-MmPaxillin (S83E;S178E)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 83 a Àcid Glutàmic en la EGFP-Mm Paxilina (pCYC2067).
pCYC 2105	EGFP-MmPaxillin (S83A;S178A)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 83 a Alanina en la EGFP-Mm Paxilina (pCYC2068).
pCYC 2106	3HA-GFP-CAAX	El fragment de 0.7 kb amplificat per PCR que conté BamHI-GFP-CAAX-EcoRI s'ha clonat en el vector pNBM470 obert amb BamHI-EcoRI.
pCYC 2107	EGFP-MmPaxillin (S83A)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 83 a Alanina en la EGFP-Mm Paxilina (pCYC2066).
pCYC 2108	EGFP-MmPaxillin (S83E)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 83 a Àcid Glutàmic en la EGFP-Mm Paxilina (pCYC2066).
pCYC 2109	EGFP-MmPaxillin (S83E;S178A)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 83 a Àcid Glutàmic en la EGFP-Mm Paxilina (pCYC2068).
pCYC 2110	EGFP-MmPaxillin (S83A;S178E)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 83 a Alanina en la EGFP-Mm Paxilina (pCYC2067).
pCYC 2133 (FSV)	FSV en lentivirus	FSPsi sense puromicina i amb GFP. Per clonar alguna gen s'ha d'obrir amb 5'Agel i 3'BamHI. (Cedit pel laboratori de Mario Encinas)
pCYC 2134	Ubip-3HA-Rac1 Q61L en lentivirus	El fragment de 0.635 kb amplificat per PCR que conté BamHI-Rac1Q61L-XhoI del vector pCEFL-AU5-Rac1(Q61L) s'ha clonat en el fragment de 9 kb del vector pCYC801 (pDSL) obert amb BamHI-XhoI.
pCYC 2136 (shD1)	Mm CycD1 shRNA83	shRNA contra ciclina D1 de ratolí en el vector pLKO.1-puro TRCN0000026883 (Sigma)
pCYC 2140	627 - packaging helper (Δ R)	Vector empaquetador pHR'82 Δ R que codifica per les proteïnes <i>gag</i> i <i>pol</i> (Cedit pel laboratori de Xavi Dolcet).
pCYC 2141	628 - envelope helper (VSV)	Vector pMD2G que codifica per l'embolcall del virus pVSV.G (Cedit pel laboratori de Xavi Dolcet).
pCYC 2171	GST-MmPaxillin (S83A)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 83 a Alanina en la EGFP-Mm Paxilina (pCYC2064).
pCYC 2172	GST-MmPaxillin (S178A)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 178 a Alanina en la EGFP-Mm Paxilina (pCYC2064).
pCYC 2173	GST-MmPaxillin (S83A;S178A)	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 83 a Alanina en la EGFP-Mm Paxilina (pCYC2172).
pCYC 2175	YFP-PBD	El domini d'unió PAK1 (155 pb) clonat en el vector pEYFP-C1 (4733 pb, Clontech) en els llocs BamHI i BglII. Utilitzat per la localització de Rac1-GTP. Adquirit de Addgene
pCYC2185	3HA-CBP-MmPaxillin (S178E) en lentivirus	Mutagènesis dirigida per canviar la Serina 178 a Àcid Glutàmic en la 3HA-CBP-Mm Paxilina (pCYC2084)
shRalB	Human RalB shRNA	shRNA contra RalB humana en el vector pLKO.1-puro TRCN0000072957 (Sigma)

Taula 1. Vectors plasmídics i lentivirals utilitzats.

2. TÈCNIQUES DE BIOLOGIA CEL·LULAR

2.1. Cultius cel·lulars

Els fibroblasts immortalitzats *Ccnd1* $-/-$ i *Ccnd1* $+/+$ van ser proporcionats per P. Sicinski i les cèl·lules de tumor de pròstata de rata R3327-5'A van ser proporcionades per M. Hendrix. Les cèl·lules HEK293T es van obtenir de l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Les cèl·lules MFE i Ishikawa, dues línies cel·lulars humanes d'adenocarcinoma d'endometri van ser proporcionades per X. Dolcet. Aquestes cèl·lules van ser analitzades per PCR per detectar la presència de micoplasma i no es va detectar contaminació. Els MEFs primaris van ser aïllats d'embrions *Ccnd1* $+/+$ i *Ccnd1* $-/-$ de 14.5 dies. Les cèl·lules es van cultivar en medi DMEM (GIBCO-Invitrogen) suplementat amb un 10% de FBS, 100 µg/mL de penicil·lina/estreptomicina i àcid glutàmic a 2 mM, i es van incubar en una atmosfera humida amb un 5% de CO₂ a 37°C.

Per mantenir les cèl·lules, cada 3-4 dies quan ja hi ha un 90% de confluència es divideixen. Per dividir-les, primer s'aspira el medi de la placa i per eliminar tot el sèrum es renta amb un tampó fosfat salí (PBS) escalfat a 37°C. Es desenganxen les cèl·lules de la placa amb tripsina a 37°C durant 5 minuts i s'inactiva la tripsina amb medi DMEM amb 10% de FBS. Es recullen les cèl·lules i es centrifuguen a 1000 rpm durant 5 minuts. Seguidament el *pellet* de cèl·lules es resuspèn en 1 mL de medi DMEM amb 10% de FBS i antibiòtics, es fa el recompte del nombre de cèl·lules en un hemocitòmetre i es planten en les plaques corresponents, o directament es fa una dilució entre 1:10 i 1:20 depenen del tipus cel·lular. Es deixen incubar en una atmosfera humida amb un 5% de CO₂ a 37°C.

Per la congelació es tracten les cèl·lules amb tripsina i es divideixen tal com s'ha descrit anteriorment. Després de centrifugar, el *pellet* de cèl·lules es resuspèn en 1 mL de medi de congelació (90% de FBS + 10% de DMSO) i s'aliquota en vials de congelació de 2 mL a $1 \cdot 10^6$ o $2 \cdot 10^6$ cèl·lules per vial. Els vials es guarden un mínim de 24 hores a -80°C i després es passen al tanc de nitrogen líquid. Per a la descongelació, primerament es treuen

els vials del tanc de nitrogen líquid i es posen ràpidament en un bany a 37°C. Les cèl·lules es passen a un tub de fons cònic amb 9 mL de medi DMEM amb 10% de FBS i antibiòtics. Es centrifuguen a 1000 rpm durant 5 minuts. S'aspira el medi i es resuspèn el *pellet* de cèl·lules amb 1 mL de medi, i seguidament es planten totes les cèl·lules en una placa de 100 mm de diàmetre juntament amb 9 mL de medi DMEM amb 10% de FBS i antibiòtics.

2.2. Transfecció cel·lular

Per la transfecció transitòria dels vector plasmídics, primer es planten les cèl·lules en plaques, ja siguin plaques de 4 pous de 16 mm, de 6 pous de 35 mm o plaques de 100 mm de diàmetre, tractades amb col·lagen a 100 µg/mL en àcid acètic 0.02 M en el cas de les HEK293T, mentre que per les R3327-5'A i els MEFs no cal el pretractament de les plaques amb col·lagen. Passades unes 24 hores, quan les cèl·lules ja estan a un 70% de confluència, es dilueix el DNA en Opti-MEM (GIBCO-Invitrogen) i es barreja suaument. D'altra banda es barreja la Lipofectamina 2000 (Invitrogen) amb Opti-MEM i s'incuba a temperatura ambient durant 5 minuts. La quantitat de DNA i Lipofectamina que s'ha d'afegir segons el diàmetre de la placa es fa seguint les instruccions del fabricant (**Taula 2**). Després de la incubació es barreja la dilució del DNA i la de Lipofectamina, s'agita suaument i s'incuba durant 20 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'afegeix la barreja de DNA i Lipofectamina a les cèl·lules que prèviament s'han rentat amb Opti-MEM i s'incuben en una atmosfera humida amb un 5% de CO₂ a 37°C durant 15 minuts. Finalment, s'elimina el medi de transfecció, s'afegeix medi DMEM amb 10% de FBS i antibiòtics i es deixen les cèl·lules en l'incubador amb un 5% de CO₂ a 37°C. Per exemple, per a plaques de 4 pous de 16 mm de diàmetre es planten unes 70000 cèl·lules en el cas de les HEK293T i R3327-5'A i unes 35000 cèl·lules de MEFs immortalitzats per pou, i es transfecten amb 0.8 µg de DNA. El DNA es dilueix en 50 µL d'Opti-MEM i s'utilitzen 2 µL de Lipofectamina per pou prèviament diluïda en 50 µL d'Opti-MEM. S'afegeixen els 100 µL de la barreja de transfecció a les cèl·lules sense medi, més 100 µL d'Opti-MEM perquè quedin ben cobertes. Després de la incubació s'elimina la barreja de transfecció i s'afegeixen 500 µL de medi

DMEM amb 10% de FBS i antibiòtics i s'incuba en una atmosfera humida amb un 5% de CO₂ a 37°C de 24 a 48 hores.

El protocol de transfecció amb PEI es descriu en l'apartat següent. Habitualment, utilitzem el protocol de transfecció amb PEI per transfectar les plaques de 100 mm de diàmetre.

2.3. Producció de lentivirus i infecció

Per la producció de lentivirus es transfecten cèl·lules HEK293T amb vectors d'expressió lentiviral, juntament amb el vector de l'embolcall pVSV.G i el vector d'empaquetament pHR'82ΔR en una proporció 2:1:1.

Les cèl·lules HEK293T es sembren 24 hores abans de la transfecció en plaques de 100 mm de diàmetre tractades amb col·lagen a 100 µg/mL en àcid acètic 0.02M, a una densitat de 2·10⁶ cèl·lules per placa (es fan dues plaques per condició). Per transfectar les cèl·lules es necessiten 24 µg de DNA per cada placa de 100 mm de diàmetre a una proporció 2:1:1 dels següents vectors: vector d'expressió lentiviral (diferent en cada cas), el vector pVSV.G que codifica per l'embolcall del virus i el vector empaquetador pHR'82ΔR que codifica per les proteïnes *gag* i *pol*. D'una banda es dilueixen els tres vectors en 1.5 mL d'Opti-MEM i per una altra es dilueixen 240 µL de PEI 10 µM en 1.26 mL d'Opti-MEM (**Taula 2**). S'afegeix la dilució de PEI en la de DNA, es barreja i s'incuba durant 10 minuts a temperatura ambient. Les plaques amb les cèl·lules es renten amb Opti-MEM. Passat el temps d'incubació s'afegeixen a les cèl·lules els 3 mL de la barreja de transfecció, i 3 mL més d'Opti-MEM per a recobrir bé les cèl·lules, i es deixa incubant 1 hora a 37°C. Finalment, s'elimina la solució de transfecció i s'afegeixen 10 mL de medi DMEM amb 10% de FBS i antibiòtics i s'incuba en una atmosfera humida amb 5% de CO₂ a 37°C. Després de 3 dies de la transfecció, ja es pot recollir medi. Aquest medi conté les partícules virals i és filtrat amb una membrana de nitrocel·lulosa de 0.45 µm. La recollida de virus i la manipulació dels

mateixos es realitza a la campana de seguretat biològica Biolla. Per concentrar els virus es centrifuga el sobrenedant filtrat a 3500 rpm durant 30 minuts en tubs VIVASPIN 20 (Sartorius Stedim Biotech) que conté una membrana que no permet el pas a proteïnes majors de 100 KDa. Els lentivirus es mantenen a -80°C . Gairebé sempre s'han utilitzat virus no concentrats, és a dir, s'ha utilitzat el medi filtrat recollit de dues plaques de 100 mm de diàmetre.

Per la infecció de les cèl·lules amb lentivirus es planten $1 \cdot 10^5$ cèl·lules R3327-5'A o MFE en una placa de 6 pous de 35 mm de diàmetre. Al mateix temps s'afegeix 1 mL de virus filtrats no concentrats i 2 μL de polibré. Passades 24 hores es canvia el medi d'infecció per 2 mL de medi DMEM amb 10% de FBS i antibiòtics. Es deixen créixer les cèl·lules 3 dies i després s'amplifiquen a una placa de 100 mm de diàmetre i es planten $2.5 \cdot 10^5$ cèl·lules en una placa de 6 pous de 35 mm de diàmetre per a fer la comprovació de la infecció mitjançant la tècnica *western blot*.

TIPUS DE PLACA	DNA + Opti-MEM	LIPOFECTAMINA + Opti-MEM	PEI + Opti-MEM
24 pous (16 mm Ø)	0.8 μg + 50 μL OPT	2 μL + 50 μL OPT	-
12 pous (23 mm Ø)	1.6 μg + 100 μL OPT	4 μL + 100 μL OPT	-
6 pous (35mm Ø)	4 μg + 250 μL OPT	10 μL + 250 μL OPT	-
60 mm Ø	8 μg + 500 μL OPT	20 μL + 500 μL OPT	80 μL + 420 μL OPT
100 mm Ø	24 μg + 1.5mL OPT	-	240 μL + 1.26mL OPT
150 mm Ø	50 μg + 3.4mL OPT	-	540 μL + 2.84mL OPT

Taula 2. Quantitat de DNA, Lipofectamina i PEI que s'ha d'afegir segons el tamany de la placa.

2.4. Assaig de la capacitat d'adhesió (*spreading*)

Una forma d'estudiar la capacitat d'adhesió de les cèl·lules a la matriu extracel·lular és la quantificació del temps requerit per les cèl·lules per mostrar una morfologia estesa a la placa (*spreading*). Els fibroblasts *wild type* o *knock out* de ciclina D1 o les cèl·lules R3327-5'A es co-transfecten en plaques de 35 mm de diàmetre amb GFP-Paxilina *wild type* o amb els altres al·lels mutants de paxilina, juntament amb HA-Ciclina D1 o un vector buit. Quaranta-vuit hores després de la transfecció, les cèl·lules es tripsinitzen i es sembla la meitat de cèl·lules en medi DMEM sense sèrum en plaques de 6 pous de 35 mm de diàmetre que han estat recoberts amb 5 µg/mL de fibronectina (Invitrogen) durant 24 hores a 4°C. Els fibroblasts s'incuben a 37°C durant trenta minuts i les cèl·lules R3327-5'A s'incuben una hora en fibronectina, fins que aproximadament un 50% de les cèl·lules es troben adherides i presentant una morfologia estesa (*spread*). Després, les cèl·lules es fixen amb 2% de paraformaldehid durant 10 minuts en gel, es treuen fotografies amb l'objectiu 10x del microscopi invertit Olympus IX71 i es compten el nombre de cèl·lules verdes (tenen GFP) que s'han estès ($n \geq 150$ cèl·lules totals verdes s'han avaluat en cada experiment independent). S'ha definit com cèl·lules *spread* les que mostren un fenotip estès i són poc refringents mentre que les cèl·lules rodones i refringents s'han considerat *unspread*.

2.5. Assaig d'invasió

Es realitzen assaigs d'invasió amb cèl·lules R3327-5'A tal com es va descriure anteriorment (Spiczka and Yeaman, 2008). Primerament s'infecten les cèl·lules amb les diferents construccions lentivirals per tal d'estudiar les diferents condicions. La part superior dels filtres de 6.5 mm de diàmetre i un tamany de porus de 8 µm (*transwell*, Corning) es recobreix amb Matrigel que té reducció de factors de creixement (BD Biosciences). Les cèl·lules ($5 \cdot 10^4$) es sembren en el costat inferior del filtre durant quatre hores per permetre la seva adhesió. Després, en els filtres es posa DMEM amb 10% de FBS i s'incuben en plaques de 24 pous que contenen medi DMEM lliure de sèrum durant unes 20 hores en una

atmosfera humida amb 5% de CO₂ a 37°C. En aquestes condicions, algunes cèl·lules migren des del fons fins a la part superior del filtre envaïent el Matrigel (**Figura 17**). Passat el temps d'incubació, s'eliminen les cèl·lules restants de la part inferior del filtre i les cèl·lules de dins del Matrigel es fixen amb 4% de paraformaldehid i es tenyeixen amb Hoescht. Es fan fotos de tot el filtre amb l'objectiu 4x del microscopi invertit Olympus IX71 i es compten totes les cèl·lules del filtre que han envaït el Matrigel mitjançant l'ús del programa *Image J*.

També es pot fer l'assaig d'invasió sembrant les cèl·lules en suspensió en la part superior del filtre, sobre el Matrigel, i incubar durant 6 hores en una atmosfera humida amb 5% de CO₂ a 37°C. En aquestes condicions, les cèl·lules envaeixen el Matrigel des de la part superior cap a la part inferior fins arribar al filtre. Passat el temps d'incubació, s'eliminen les cèl·lules restants de la part superior del filtre i es fixen les cèl·lules que han envaït amb 4% de paraformaldehid, es tenyeixen amb Hoescht i es compten totes les cèl·lules que han envaït el Matrigel.

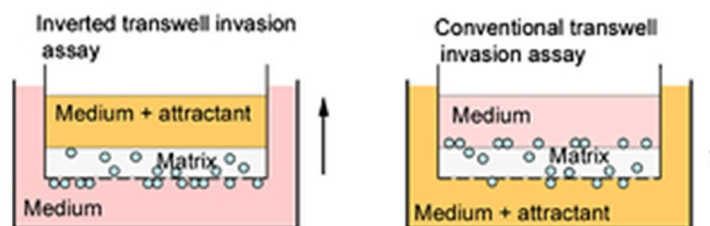


Figura 17. Esquema de l'assaig d'invasió. En l'assaig d'invasió invertit les cèl·lules migren i envaeixen de baix cap a dalt (esquerra) i en el convencional ho fan de dalt cap a baix (dreta).

2.6. Assaig de viabilitat i proliferació

En els assaigs de proliferació del capítol 1 es van sembrar $2 \cdot 10^4$ cèl·lules R3327-5'A co-infectades en plaques de 24 pous de 16 mm de diàmetre i es van cultivar amb DMEM amb 10% de FBS en una atmosfera humida amb 5% de CO₂ a 37°C. Després de tres dies d'incubació, es va determinar el nombre de cèl·lules de cada condició. L'experiment es va repetir cinc vegades i les dades s'expressen com a mitjana \pm SEM amb valors de significació determinats per ANOVA d'una via i per *Tukey-HSD post-test* (** indica $p < 0.01$).

En l'assaig de proliferació i viabilitat realitzat en el capítol 2 les cèl·lules tumorals MFE infectades amb HA-Ciclina D1 i HA-Ciclina D1-CAAX es van sembrar ($1 \cdot 10^4$ cèl·lules) en plaques de 24 pous de 16 mm de diàmetre i es van cultivar amb DMEM amb 10% de FBS en una atmosfera humida amb 5% de CO_2 a 37°C . Es van comptar les cèl·lules en un hemocitòmetre cada 24 hores, i per realitzar l'assaig de viabilitat les cèl·lules es van diluir en el colorant Blau de Tripà. Es van realitzar dos experiments independents.

2.7. Assaig clonogènic

Per realitzar aquest assaig es van sembrar cèl·lules tumorals MFE infectades amb els lentivirus adients (HA-Ciclina D1 i HA-Ciclina D1-CAAX) en plaques de 6 pous de 35 mm de diàmetre a una densitat de $1 \cdot 10^3$ cèl·lules per pou. Les cèl·lules es van incubar durant 15 dies i, després, les colònies es van tenyir amb cristall violeta durant 30 minuts, es van fixar amb 4% de paraformaldehid durant 5 minuts i es van mantenir en 2 mL de PBS. El nombre de colònies formades es va obtenir utilitzant el programa *Quantity One (Colony Counting Quick Guide, Bio-Rad)* i es van realitzar dos experiments per cada condició.

Per l'assaig clonogènic en condicions no adherents, les cèl·lules MFE infectades amb els lentivirus HA-Ciclina D1 i HA-Ciclina D1-CAAX es van resuspendre en 0.3% d'agar diluït amb el medi de cultiu a una concentració de $3 \cdot 10^3$ cèl·lules/mL. Es va afegir 1 mL d'aquestes cèl·lules en suspensió en una placa de cultiu de 6 pous de 35 mm de diàmetre recoberts amb 0.6% d'agar. La placa de cultiu es va incubar a 37°C en una atmosfera humida amb 5% de CO_2 durant 15 dies. Les colònies formades de tres experiments independents es van visualitzar per tinció amb Mitotracker. Finalment, es van comptar les colònies formades amb el programa *Quantity One (Colony Counting Quick Guide, Bio-Rad)*.

3. TÈCNIQUES DE MICROSCÒPIA

3.1. Immunofluorescència

Per la tècnica d'immunofluorescència es planten les cèl·lules adients (10000 MEFs/cm², 20000 R3327-5'A/cm² o 20000 MFE/cm²) transfectades o infectades en plaques de 8 pous de 1 cm² que tenen vidre a sota per poder-les mirar en el microscopi confocal, o en plaques de 4 pous de 2 cm². Es renten les cèl·lules amb PBS i es fixen amb 4% de paraformaldehid a temperatura ambient durant 15 minuts. Després, es renta cada pou dues vegades amb PBS, es permeabilitzen les cèl·lules amb 0.2% de tritó durant 3 minuts a temperatura ambient i es bloqueja amb 3% de BSA (Sigma) durant 30 minuts. Només en la Figura 27A s'utilitzen condicions de baixa permeabilització amb 0.02% de tritó. Els anticossos primaris s'incuben a una dilució 1:200 en PBS amb 0.3% de BSA durant tota la nit a 4°C. L'endemà es renten els pous tres vegades amb PBS i els anticossos primaris es combinen adequadament amb els anticossos secundaris corresponents marcats amb Alexa488 i/o Alexa594 (Molecular Probes) diluïts 1:1000 en PBS amb 0.3% de BSA, i s'incuben 1 hora a temperatura ambient en fosc, juntament amb Hoechst (Sigma) per tenyir els nuclis. S'afegeix *Slow Fade* per evitar que disminueixi la fluorescència. Les imatges han estat adquirides amb l'objectiu 10x i 20x del microscopi invertit Olympus IX71 i el programa DP Controller. Les imatges confocals han estat obtingudes amb els objectius 40x i 60x del microscopi confocal FV1000i. En la **Taula 3** es mostren els anticossos primaris que s'han utilitzat en les diferents immunofluorescències.

Per la detecció del YFP-PBD (Figures 32C i 32D) s'ha utilitzat dos anticossos secundaris anti-GFP diferents: el monoclonal de ratolí 3E6 (Invitrogen, 1:200) i el de conill conjugat amb Alexa488 (Invitrogen, 1:400).

Finalment, la quantificació de cèl·lules amb acumulació de paxilina (Figures 29B i 29D) i Rac1 (Figures 31B i 31D) en *ruffles* es va fer amb el programa Image J.

3.2. Immunohistoquímica

Per la realització de les immunohistoquímiques, primerament es fixen, tota la nit, els pulmons que s'han extret dels ratolins amb 4% de paraformaldehid a temperatura ambient i en agitació. L'endemà es substitueix el paraformaldehid per una solució de 30% de sacarosa en aigua per evitar la sobrefixació dels teixits i crioprotegir-los. En aquest moment, un fragment de cada pulmó s'introdueix en *cassettes* de biòpsies i s'inclouen en parafina pel seu posterior examen histològic per hematoxilina-eosina i immunohistoquímica. Els blocs es van seccionar amb un gruix de 3 μm i es van assecar 1 hora a 65°C abans de ser desparafinats en xilè i rehidratats amb etanol en una sèrie gradual, i després es van rentar amb PBS. La recuperació de l'antigen es va dur a terme per tractament tèrmic en una olla a pressió durant 2 minuts en EDTA a pH 8.9. Abans de la tinció de les seccions, es va bloquejar la peroxidasa endògena. Els anticossos utilitzats van ser anti-ciclina D1 (monoclonal de conill clon EP12, Dako, 1:400), anti-paxilina fosfo-específic de la serina 83 (policlonal de conill, ECM Biosciences, 1:100), anti-Ki67 (monoclonal de conill, clon SP6, Abcam, 1:250) i anti-HA (monoclonal de ratolí, clon 12CA5, Cell Cycle Lab, 1:400). Després de la incubació, la reacció es va visualitzar amb el *kit* de detecció *EnVision* (Dako), utilitzant el cromogen diaminobenzidina com a substrat. Les seccions van ser contrastades amb hematoxilina.

4. TÈCNIQUES BIOQUÍMIQUES

4.1. Anticossos

A continuació hi ha els anticossos primaris que s'han fet servir en el *western blot* i en la immunofluorescència, juntament amb la seva dilució i la casa comercial (**Taula 3**).

Antigen	Origen	Referència	WB	IF
α -Tubulina	Monoclonal ratolí	Clon B-5-1-2, Sigma-Aldrich #T5168	1:10000	-
β -Actina	Monoclonal ratolí	Clon AC-15, Sigma-Aldrich #A1978	1:4000	-
Ciclina D1	Monoclonal ratolí	Clon DCS-6, BD Pharmigen #556470	1:500	-
Ciclina D1	Monoclonal ratolí	Clon 72-13G, Santa Cruz Biotechnology #sc450	-	1:200
Ciclina D1	Monoclonal conill	Clon EP12, Dako #M3642	-	1:200
Cdk4	Policlonal conill	Clon C-22, Santa Cruz Biotechnology #sc260	1:250	-
ERK	Monoclonal ratolí	Clon MK12, Merck Millipore #05-1152	1:2000	-
ERK fosforilat P42/44	Policlonal conill	Cell Signaling Technology #9101	1:800	-
FLAG	Monoclonal ratolí	Clon M2, Sigma-Aldrich #F3165	1:1000	-
GAPDH-Peroxidasa	Monoclonal ratolí	Clon 71.1, Sigma-Aldrich #G9295	1:40000	-
GFP	Monoclonal ratolí	Clons 7.1 i 13.1, Roche #11814460001	1:1000	1:200
GST	Policlonal cabra	GE Healthcare Life Sciences #27-4577	1:2000	-
HA	Monoclonal rata	Clon 3F10, Roche #11867431001	1:2000	1:200
HA	Monoclonal ratolí	Clon 12CA5 (Cell Cycle Lab)	1:2000	-
Paxilina	Monoclonal ratolí	Clon 349, BD Transduction Laboratories #610051	1:1000	1:200
Paxilina fosfo-serina 83	Policlonal conill	ECM Biosciences #PP1341,	1:500	1:200
Paxilina fosfo-serina 178	Policlonal conill	Calbiochem, #ST1069	1:500	-
PCNA	Monoclonal ratolí	Clon PC10, Abcam #ab29	1:1000	-
Rac1	Monoclonal ratolí	Clon 102, BD Transduction Laboratories #610650	1:400	1:200
RalA	Monoclonal ratolí	Clon 8, BD Transduction Laboratories #610222	-	1:200
RalB	Policlonal conill	Cell Signaling Technology #3523	1:500	-
TFR	Monoclonal ratolí	Clon H68.4, Invitrogen #13-6800	1:1000	1:200

Taula 3. Anticossos primaris utilitzats en el *western blot* i en la immunofluorescència.

4.2. Extracció proteica i *Western blot*

Les cèl·lules de la placa de cultiu es renten amb PBS a 4°C i es recullen en el volum necessari de 1xSR (2% de SDS i Tris-HCl 0.125 M a pH 6.8). Per exemple, s'afegeix 60 µL de 1xSR per pou en una placa de 4 pous de 16 mm de diàmetre o 100 µL de 1xSR per pou en una placa de 6 pous de 35 mm de diàmetre, i es recullen amb la punta de la pipeta o amb un raspador. Seguidament les cèl·lules es soniquen a potència 8 durant 10 segons (Soniprep 150 MSE) fins que la mostra ja no està viscosa. En aquest moment mesurem la quantitat de proteïna amb el *kit* de Bio-Rad DC™ Protein Assay per poder carregar la mateixa quantitat de cada mostra. Afegim el volum corresponent de 4xSS (20% de sacarosa i 0.02% de blau de bromofenol) fins a obtenir una concentració final de 1xSS, i un 1% de β-mercaptoetanol. Finalment les mostres es bullen durant 5 minuts a 95°C abans de carregar-les en un gel de poliacrilamida. Els gels de poliacrilamida es preparen a partir d'una solució formada per 30% d'acrilamida i 2% de bis-acrilamida, i la polimerització dels gels s'inicia per addició de TEMED com a iniciador de la reacció i persulfat amònic com a catalitzador. El gel apilador conté un percentatge d'acrilamida baix (5%) i un pH lleugerament àcid (6.8). En aquesta part es carreguen les mostres, s'empaqueten i surten totes les proteïnes del mateix punt de partida. El gel separador és la part on les mostres es resolen electroforèticament, té un pH bàsic (8.8) i el percentatge d'acrilamida que conté serà més alt o baix depenent del pes molecular de la proteïna a estudiar (habitualment utilitzem gels del 10%).

L'electroforesi en gels SDS-PAGE s'utilitza per separar proteïnes segons el seu pes molecular en condicions desnaturalitzants. El dodecil sulfat sòdic (SDS) és un detergent aniònic que desnaturalitza les proteïnes i els dóna una càrrega neta negativa. Quan s'aplica un camp elèctric constant de 20 mA per gel dins una solució tampó electrolítica, les proteïnes es mouen a través d'una matriu porosa de poliacrilamida cap al pol positiu depenent del seu pes molecular. Nosaltres utilitzem el sistema *Miniprotean* de Bio-Rad. Una vegada les proteïnes s'han separat per electroforesi, es transfereixen a una membrana de PVDF (Millipore). Per hidratar les membranes, primer es tracten amb metanol i seguidament es posen a agitar amb el tampó de transferència que conté 20% de metanol. S'utilitza el

sistema de transferència semi-sec i s'aplica un camp elèctric constant de 60 mA per gel. En la transferència, on es treu el gel apilador, les proteïnes carregades negativament i desnaturalitzades es desplacen des del gel d'acrilamida cap al pol positiu i queden retingudes a la membrana. Una vegada les proteïnes estan transferides, la membrana es bloqueja amb una solució formada per 5% de llet desnatada en PBST (PBS + 0.1% de Tween20) durant 1 hora a temperatura ambient per tal de cobrir la resta de llocs on no hi ha proteïna transferida. La membrana es renta amb PBST i s'incuba amb l'anticòs primari diluït en solució I (0.25% de llet desnatada en PBST) durant tota la nit a 4°C. Depenent de l'anticòs que utilitzem es fa una dilució determinada (**Taula 3**). Es torna a rentar la membrana amb PBST i es tracta amb el corresponent anticòs secundari conjugat amb la peroxidasa HRP (GE Healthcare UK Ltd), que rutinàriament s'utilitza a una dilució 1:10000 en solució I durant una hora a temperatura ambient. Es fan els últims rentats amb PBST i s'incuba la membrana durant 5 minuts amb el substrat HRP quimioluminiscent *Immobilon Western* (Millipore). La quimioluminescència de les proteïnes a estudiar es visualitza amb l'aparell ChemiDoc-MP Imaging System (Bio-Rad). La quantificació de bandes es realitza amb el *software* del mateix aparell.

4.3. Immunoprecipitació

Per la immunoprecipitació de l'epítop GFP, les cèl·lules HEK293T transfectades amb les diferents construccions de GFP-Paxilina en plaques de 100 mm de diàmetre es recullen amb un raspador en PBS fred i centrifugant a 1000rpm durant 5 minuts a 4°C per obtenir el *pellet* de cèl·lules. Aquest extracte cel·lular es resuspèn en 600 µL de tampó de lisi fred que conté: Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, sacarosa 300 mM, 1% de tritó i una barreja d'inhibidors de proteases i fosfatases. Les cèl·lules es trenquen amb l'homogeneïtzador Douncer 15x i s'incuben amb el tampó de lisi durant 1 hora a 4°C en rotació per a que es produeixi una lisi cel·lular eficient. Després es centrifuguen els lisats cel·lulars a 300g durant 5 minuts a 4°C i es recupera el sobrenedant. En aquest cas es fa un preclarejat del sobrenedant amb *beads* magnètiques (Dynabeads, Invitrogen) netejades amb

tampó fosfat (NaPO_4 0.1M + 0.01% de Tween20) i sense cap anticòs conjugat per tal d'eliminar totes les unions inespecífiques a les *beads*. Passats els 30 minuts del preclarejat a 4°C en rotació, s'eliminen les *beads* magnètiques i s'agafa mostra del sobrenedant com a extracte soluble i la resta s'incuba amb 50 μL de *beads* magnètiques de proteïna A conjugades amb 3 μg /placa de l'anticòs GFP monoclonal de ratolí (Roche) durant 2 hores a 4°C en rotació. Per tal de conjugar l'anticòs a les *beads*, aquestes han estat rentades 2 vegades i resuspeses en tampó fosfat i s'han incubat amb l'anticòs a temperatura ambient durant un mínim de 15 minuts en rotació. Passades les 2 hores d'immunoprecipitació, es fan 3 rentats amb tampó de lisi fred i s'elueixen les *beads* amb 30 μL de 1xSR (2% de SDS i Tris-HCl 0.125 M a pH 6.8) durant 5 minuts a 37°C. S'agafa el sobrenedant i s'afegeix 10 μL de 4xSS (20% de sacarosa i 0.02% de blau de bromofenol) i 0.4 μL de β -mercaptoetanol, es bull a 95°C durant 5 minuts i les mostres ja estan preparades per fer el *western blot*. Per la immunoprecipitació de paxilina es segueix el mateix protocol però es conjuga a les *beads* magnètiques l'anticòs de paxilina policlonal de conill (H-114, Santa Cruz).

Per la immunoprecipitació de la ciclina D1 endògena de les fraccions soluble i de membrana del fraccionament cel·lular, es va conjugar 5 μL /placa de l'anticòs de ciclina D1 policlonal de conill (06-137, Millipore) a la proteïna A de les *beads* magnètiques (Dynabeads, Invitrogen), on es fa servir 50 μL de *beads* per mostra, resuspeses en tampó fosfat i es van incubar a temperatura ambient durant un mínim de 15 minuts en rotació. S'afegeix les *beads* magnètiques conjugades amb l'anticòs a la fracció soluble i de membrana i s'incuba 2 hores a 4°C en rotació. Es fan 3 rentats amb el tampó de lisi i 2 rentats amb tampó quinasa (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl_2 10 mM, DTT 0.5 mM, EGTA 1 mM i β -glicerofosfat 2.5 mM) i es deixa amb 35 μL de tampó quinasa a -80°C, ja que la finalitat és fer un assaig quinasa amb aquest complex ciclina D1-Cdk4 purificat. S'agafa una mostra de 10 μL per a fer el *western blot* que es barreja amb 10 μL de 2xSSR (4% de SDS, Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, 10% de sacarosa, 2% de β -mercaptoetanol i 0.01% de blau de bromofenol) i es fa bullir a 95°C durant 5 minuts.

4.4. Purificació per afinitat de HA-Ciclina D1 (*HA-pull down*)

En la purificació per afinitat (*pull down*) de HA-Ciclina D1-CAAX i HA-GFP-CAAX s'utilitzen les *beads Anti-HA Affinity Matrix* (Roche) que porten conjugat l'anticòs anti-HA monoclonal de rata 3F10. Les cèl·lules HEK293T transfectades amb HA-Ciclina D1-CAAX i HA-GFP-CAAX, com a control de les interaccions inespecífiques, es recullen amb un raspador en PBS fred i centrifugant a 1000rpm durant 5 minuts a 4°C per obtenir el *pellet* de cèl·lules. Aquest *pellet*, corresponent a 2 plaques de 150 mm de diàmetre, es resuspèn en 1.5 mL de tampó de lisi fred: Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, sacarosa 300 mM, 1% de tritó i una barreja d'inhibidors de proteases i fosfatases. Les cèl·lules es trenquen amb l'homogeneïtzador Douncer 20x i s'incuben amb el tampó de lisi durant 1 hora a 4°C en rotació. Després, es centrifuguen els lisats cel·lulars a 300g durant 5 minuts a 4°C i es recupera el sobrenedant. S'agafa mostra del sobrenedant com a extracte soluble i la resta s'incuba amb 150 µL de *beads* anti-HA durant 2 o 3 hores a 4°C en rotació. Després d'un rentat amb PBS fred, les *beads* d'agarosa s'elueixen amb 150 µL de 0.5% de SDS a 37°C durant 5 minuts. Es centrifuga a 13000 rpm durant 2 minuts i es recupera el sobrenedant, que s'ajunta amb l'altra immunoprecipitació corresponent a les dues altres plaques (en total, 300 µL de proteïna immunoprecipitada). Finalment, es guarda a -80°C fins a ser enviades per realitzar la tècnica iTRAQ. S'agafa una petita mostra per tal de quantificar la proteïna amb el *kit* de Bio-Rad DCTM Protein Assay, utilitzant una recta patró feta amb BSA en 0.5% de SDS. També s'agafa una petita mostra a la que s'afegeix 2xSSR (4% de SDS, Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, 10% de sacarosa, 2% de β-mercaptoetanol i 0.01% de blau de bromofenol) i es fa bullir a 95°C durant 5 minuts, per tal de ser separades per SDS-PAGE juntament amb els extrems solubles i, d'una banda fer la tinció amb Oriole (Bio-Rad), i de l'altra realitzar un *western blot* amb l'anticòs primari anti-HA (clon 12CA5, monoclonal de ratolí) per veure els nivells de proteïna HA-Ciclina D1 i HA-GFP.

4.5. Purificació per afinitat de GST-Paxilina (*GST-pull down*)

La paxilina de ratolí (IMAGE ID clon 5309957, BioScience) es va amplificar per PCR i es va clonar dins del vector d'expressió pGEX-KG (pCYC2064), el qual permet la fusió amb el gen que codifica per la proteïna glutatió-s-transferasa (GST). Aquesta proteïna de fusió té la capacitat d'unir-se específicament a unes *beads* que contenen glutatió, ja que la GST és un enzim que utilitza el glutatió com a substrat.

L'expressió i la purificació d'aquesta proteïna es van fer en la soca DH5 α d'*Escherichia coli*. Les cèl·lules d'*E. coli* transformades amb les diferents fusions de GST-Paxilina es fan créixer en un precultiu de 10 mL de LB amb ampicil·lina a 50 μ g/mL durant tota la nit a 37°C. L'endemà es dilueix en un nou cultiu de 50 mL de LB amb ampicil·lina a 50 μ g/mL fins a una OD₆₀₀ aproximada de 0.05-0.1 (aproximadament una dilució 1:50), i s'incuba unes 2-3 hores a 37°C. Quan el cultiu assoleix una OD₆₀₀ de 0.5 s'indueix l'expressió de les proteïnes amb IPTG 1 mM durant 4 hores a 30°C fins a tenir una OD₆₀₀ de 2-3. Passat aquest temps, es deixa el cultiu 20 minuts en gel i es centrifuga a 7000 rpm durant 10 minuts a 4°C. El *pellet* de cèl·lules es resuspèn en 2 mL d'aigua estèril freda i s'aliqota en 2 *ependorfs* que contenen aproximadament unes 50 OD₆₀₀. Es torna a centrifugar a 10000 rpm durant 5 minuts a 4°C i es treu el sobrenedant. Els substrats de GST-Paxilina es congelen i es mantenen a -80°C.

Per la purificació de la proteïna, el *pellet* de cèl·lules es resuspèn en 1 mL de tampó de lisi: HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, 10% de glicerol, i una barreja d'inhibidors de proteases i fosfatases. Per tal de lisar els bacteris s'afegeix lisozim a una concentració 0.5 mg/mL i s'incuba durant 30 minuts a 4°C en rotació. Posteriorment, per dissoldre les membranes bacterianes s'afegeix tritó a una concentració final de 0.5% i es manté en gel durant 5 minuts. L'extracte cel·lular es sonica durant 10 segons a potència 6 unes tres vegades (Soniprep 150 MSE) i finalment es centrifuga a 15000 rpm durant 10 minuts a 4°C. S'agafa una mostra del sobrenedant com a extracte soluble i la resta s'incuba amb les *beads* de Glutatió-Sefarosa 4B (GE, Healthcare Bio-sciences) durant 2 hores a 4°C en rotació. Les *beads* han estat prèviament rentades i incubades un mínim de 30 minuts a

4°C amb el tampó de lisi. Passades les 2 hores d'incubació, les *beads* ja unides a les fusions GST es renten tres vegades amb el tampó de lisi que conté 0.1% de tritó i s'elueixen amb 75 µL d'una solució que conté glutatió reduït 40 mM, NaCl 20 mM, DTT 0.5 mM i Tris-HCl 65 mM pH 8, durant 10 minuts a temperatura ambient en rotació. Es recull el sobrenedant i s'afegeix novament 75 µL de tampó d'elució i es torna a deixar 10 minuts a temperatura ambient en rotació. En total, 150 µL de proteïna eluïda que es guarda a -80°C. S'agafa una petita mostra de la purificació i, juntament amb les mostres d'extrets solubles, s'analitzen per SDS-PAGE i el gel es tenyeix amb blau brillant de Coomassie (*EZblue™ Gel Staining Reagent, Sigma*). La concentració i la puresa dels substrats es van estimar mitjançant la comparació amb patrons de proteïnes tenyides amb blau brillant de Coomassie.

4.6. Fraccionament cel·lular

El fraccionament de proteïnes es va realitzar amb el *kit* de fraccionament subcel·lular de proteïnes per a cultius cel·lulars (78840, Thermo Scientific-Pierce), a partir del *pellet* de cèl·lules infectades o transfectades obtingut pel mateix mètode que en la immunoprecipitació i la purificació per afinitat. Amb el fraccionament s'ha obtingut una fracció soluble i una fracció de membrana. La fracció soluble correspon a una barreja de fraccions citosòlica i nuclear soluble tal com es descriuen en les instruccions del fabricant.

En aquest protocol s'utilitzen diferents reactius i diferents velocitats de centrifugació per tal d'obtenir les múltiples fraccions. Els punts més importants són calcular el volum inicial del *pellet* de cèl·lules per ajustar al màxim el volum del primer tampó que s'ha d'afegir per resuspendre les cèl·lules, així com la força i el temps d'homogeneïtzació, diferents en cada pas. Amb aquest *kit*, les fraccions obtingudes són utilitzades per fer estudis de localització i de redistribució mitjançant la tècnica *western blot*. Com a controls del fraccionament s'han utilitzat el receptor de la transferrina (TFR) com a marcador de membrana, la tubulina i el GAPDH com a marcadors citosòlics i el PCNA com a marcador de nucleoplasma.

4.7. Assaig d'activitat Rac1 (*Rac1-pull down*)

L'activitat Rac1 s'ha analitzat mesurant la forma activa de Rac1 unida a GTP. Els assaigs s'han realitzat utilitzant *beads* d'agarosa PAK1-PBD (Cell Biolabs, STA-411) d'acord amb les instruccions del fabricant. Els extractes cel·lulars s'han obtingut de la mateixa manera que en la immunoprecipitació, a partir d'una placa 100 mm de diàmetre de fibroblasts i de cèl·lules tumorals R3327-5'A transfectades amb les diferents construccions seguint el protocol de transfecció cel·lular explicat anteriorment. Es resuspenen el *pellets* de cèl·lules amb 1 mL de tampó de lisi (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, MgCl₂ 10 mM, 4% de glicerol, 1% de tritó i una barreja d'inhibidors de proteases i fosfatases). Les cèl·lules es trenquen amb l'homogeneïtzador Douncer 15x i es centrifuguen els lisats cel·lulars a 300g durant 5 minuts a 4°C. S'agafa mostra del sobrenedant com a extracte soluble i la resta s'incuba amb 10 µg de *beads* PAK1-PBD durant 45 minuts a 4°C en rotació. Després de tres rentats amb el tampó de lisi fred, les *beads* d'agarosa s'elueixen amb 2xSSR (4% de SDS, Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, 10% de sacarosa, 2% de β-mercaptoetanol i 0.01% de blau de bromofenol) i es bullen durant 5 minuts a 95°C. Les mostres es separen mitjançant SDS-PAGE i es fa el *western blot* amb l'anticòs primari anti-Rac1 (monoclonal de ratolí, clon 102, BD Biosciences). L'activitat Rac1 es calcula fent la *ratio* entre la quantitat de Rac1 obtinguda de la purificació per afinitat (Rac1-GTP) i la Rac1 de l'extracte soluble (Rac1 total).

4.8. Assaig d'activitat Ral (*Ral-pull down*)

De la mateixa manera que en l'activitat Rac1, l'activitat Ral s'ha analitzat mesurant la forma activa de Ral unida a GTP (van Triest et al., 2001). Per dur a terme aquest assaig s'han utilitzat les *beads* d'agarosa RalBP1 (Upstate, cat# 14-415) seguint les instruccions del fabricant. Els lisats cel·lulars s'han obtingut d'una placa de 100 mm de diàmetre de cèl·lules HEK293T co-transfectades amb HA-RalB (pCYC886) i els diferents al·lels de ciclina D1 (pCYC396 o pCYC2057), resuspenent el *pellet* de cèl·lules amb 600 µL de tampó de lisi fred: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, MgCl₂ 2.5 mM, DTT 2.5 mM, 1% de tritó i una

barreja d'inhibidors de proteases i fosfatases. Les cèl·lules es trenquen amb l'homogeneïtzador Douncer 15x i es centrifuguen els lisats cel·lulars a 300g durant 5 minuts a 4°C. S'agafa mostra del sobrenedant com a extracte soluble i la resta s'incuba amb 10 µg de *beads* RalBP1 durant 30 minuts a 4°C en rotació. Després de tres rentats amb el tampó de lisi fred, les *beads* d'agarosa s'elueixen amb 2xSSR (4% de SDS, Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, 10% de sacarosa, 2% de β-mercaptoetanol i 0.01% de blau de bromofenol) i es bullen durant 5 minuts a 95°C. Les mostres es separen mitjançant SDS-PAGE i es fa el *western blot* amb l'anticòs primari anti-HA (monoclonal de ratolí, clon 12CA5, Cell Cycle Lab) per mirar els nivells de HA-Ciclina D1 i HA-RalB transfectats. L'activitat RalB es va calcular fent la *ratio* entre la quantitat de RalB obtinguda de la purificació per afinitat (RalB-GTP) i la RalB de l'extracte soluble (RalB total).

4.9. Assaig quinasa

Per la reacció quinasa, es barregen 0.2-0.5 µg de substrat (les diferents fusions de GST-Paxilina purificades del *GST-pull down*) amb 1.5 µL de complex actiu ciclina D1-Cdk4 purificat a partir de baculovirus (C0620, Sigma) en 20 µL de tampó quinasa (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, DTT 0.5 mM, EGTA 1 mM i β-glicerofosfat 2.5 mM), juntament amb ATP "fred" a 10 µM, 10 µCi de γ-32P-ATP (PerkinElmer, 3000 Ci/mmol) i, o bé DMSO o bé inhibidor de Cdk4/6 anomenat Palbociclib a 2 µM (S1116, Selleckchem). Com a control s'utilitza el substrat GST-pRB. Aquesta reacció s'incuba durant 20 minuts a 30°C i s'atura afegint 2xSSR (4% de SDS, Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, 10% de sacarosa, 2% de β-mercaptoetanol i 0.01% de blau de bromofenol) i bullint 5 minuts a 95°C. Es separa per electroforesi SDS-PAGE, es deixa assecar el gel i s'exposa amb un *film* a -80°C un cert temps. Les proteïnes fosforilades es visualitzen per autoradiografia en l'aparell revelador OPTIMAX X-Ray Film Processor PROTEC®.

4.10. Assaig d'interacció directa

La FLAG-Ciclina D1 (pCYC193) es va amplificar per PCR, es va transcriure *in vitro* amb la RNA polimerasa T7 (New England Biolabs) i es va traduir *in vitro* en reticulòcits de conill (Promega). Per l'assaig d'interacció directa per purificació per afinitat, 400 ng de GST-Paxilina (pCYC2064) i de GST-Paxilina amb el domini C-terminal (pCYC2081) purificades a partir d'*E. coli*, es van immobilitzar sobre *beads* de Glutatió-Sefarosa 4B (GE, Healthcare Bio-sciences) i es van incubar amb FLAG-Ciclina D1 en el tampó d'unió (HEPES-KOH 20 mM pH 7.5, KCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0.5 mM, 0.1% de NP-40, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 10% de glicerol i inhibidors de proteases i fosfatases) durant 30 minuts a temperatura ambient. Després de quatre rentats amb el mateix tampó, les mostres es van analitzar per SDS-PAGE i *western blot* anti-GST.

5. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

5.1. Consideracions prèvies

El nostre treball s'ha realitzat sota la supervisió del personal pertinent de la nostra institució, respectant totes les disposicions legals i ètiques vigents. A més, aquest procediment ha estat aprovat pel Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal de la Universitat de Lleida. Aquest assaig de metàstasi es va fer seguint les directrius dels Instituts Nacionals de Salut per a la Cura i Ús d'Animals de Laboratori, recollides en les següents disposicions legals: la Llei 5/1995 de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per altres finalitats científiques, i el Decret 214/1997 de 30 de juliol, que desenvolupa la llei anteriorment esmentada.

5.2. Assaig de metàstasi

Els ratolins utilitzats en aquest procediment es van mantenir en cicles de 12 hores de llum/foscor, a una temperatura constant de 22°C i amb accés *ad libitum* a menjar i aigua. Ratolins femella immunodeficients SCID hr/hr de 12 setmanes d'edat (en el capítol 1) i ratolins mascle immunodeficients SCID hr/hr de 8 setmanes d'edat (en el capítol 2) es van mantenir en condicions lliures de patògens específics (SPF), i van ser inoculats mitjançant injecció intravenosa retroorbital. Es van injectar $5 \cdot 10^5$ cèl·lules R3327-5'A co-infectades en l'assaig del capítol 1, i $2.5 \cdot 10^4$ cèl·lules R3327-5'A i $5 \cdot 10^5$ cèl·lules MFE co-infectades en els experiments del capítol 2. Els animals injectats amb cèl·lules tumorals R3327-5'A van ser sacrificats quinze dies després en el capítol 1 i una setmana després en el capítol 2. Els animals injectats amb cèl·lules tumorals MFE van ser sacrificats quatre setmanes després. En l'experiment del capítol 1, es van recuperar els pulmons i es van fixar en solució de Bouin; una mostra es va incloure en parafina per a la tinció d'hematoxilina-eosina. En l'assaig del capítol 2, es va quantificar la luminescència emesa per les cèl·lules injectades que expressen de forma estable la luciferasa, i es van extreure els pulmons per tal de fer la immunohistoquímica amb l'anticòs anti-HA.

RESULTATS

CAPÍTOL 1:

**La ciclina D1 citoplasmàtica regula
l'adhesió cel·lular, la invasió i la metàstasi
a través de la fosforilació de paxilina**

1. LA PAXILINA S'UNEIX I ÉS UN SUBSTRAT *IN VITRO* DEL COMPLEX CICLINA D1-CDK4

El nostre grup prèviament ha descrit en fibroblasts de ratolí a través d'una co-immunoprecipitació específica (co-IP) a nivell endogen, la interacció de ciclina D1 i de Cdk4 amb la paxilina (**Figura 16**). Per tal de confirmar aquest resultat, també s'ha analitzat la interacció entre paxilina i ciclina D1 en condicions heteròlogues. Es va co-transfectar GFP-Paxilina (pCYC2066) i FLAG-Ciclina D1 (pCYC193) en cèl·lules de tumor de pròstata de rata (R3327-5'A) i es va realitzar una immunoprecipitació contra GFP. L'anticòs anti-GFP va co-immunoprecipitar FLAG-Ciclina D1 només quan la GFP estava fusionada a paxilina, però no en les cèl·lules control transfectades únicament amb GFP (**Figura 18A**). Per tal de provar si la interacció entre ciclina D1 i paxilina és directa, es va dur a terme un assaig d'interacció directa per purificació per afinitat en condicions *in vitro*. Fusions de GST-Paxilina de longitud completa (pCYC2064) o només amb el domini C-terminal (pCYC2081), que conté només els 4 dominis LIM de la paxilina, purificades d'*Escherichia coli* es van barrejar amb FLAG-Ciclina D1 (pCYC193) produïda per traducció *in vitro*. Es va recuperar la ciclina D1 unida a les *beads* de glutatió únicament quan es van utilitzar les construccions fusionades a GST, però no en el control amb GST sol (**Figura 18B**). En definitiva, aquests resultats confirmen que hi ha una interacció específica i directa entre paxilina i ciclina D1.

La paxilina està regulada per la fosforilació en diferents residus en resposta a multitud d'estímuls extracel·lulars (Deakin and Turner, 2008). Com que aquesta proteïna conté molts residus serina/treonina susceptibles de ser fosforilats, es va analitzar si paxilina era un substrat del complex ciclina D1-Cdk4. Mitjançant un assaig quinasa vam veure que el complex ciclina D1-Cdk4 purificat a partir de cèl·lules d'insecte fosforilava la GST-Paxilina obtinguda per expressió heteròloga en *E. coli* (**Figura 18C**), i que l'absència del complex ciclina D1-Cdk4 o l'ús de l'inhibidor específic de Cdk4/6 anomenat Palbociclib impedia aquesta fosforilació, confirmant que era deguda al complex ciclina D1-Cdk4 inclòs en l'assaig. Com a control d'aquest assaig quinasa es va utilitzar el GST-pRB.

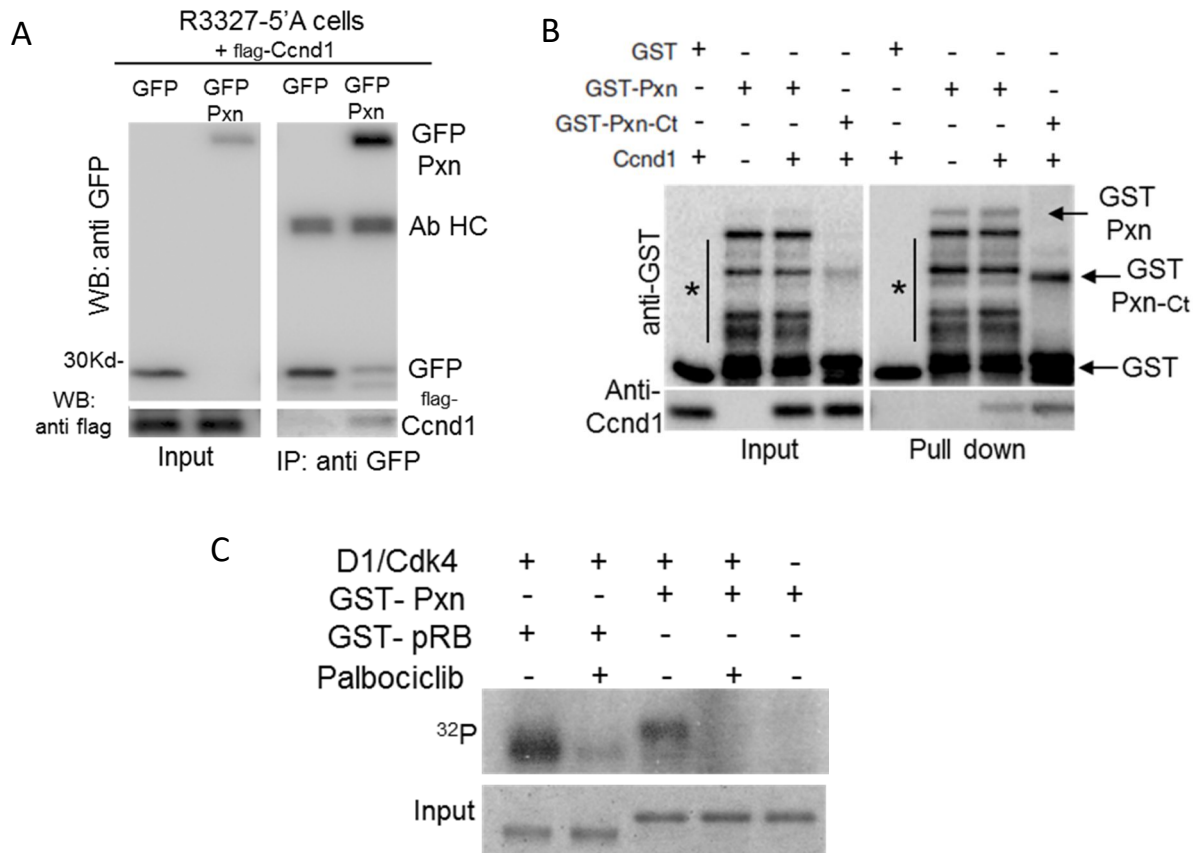


Figura 18. La paxilina s'uneix directament i és un substrat in vitro del complex ciclina D1-Cdk4. (A) Cèl·lules tumorals R3327-5'A es van co-transfectar amb GFP-Paxilina o amb un vector GFP buit, juntament amb FLAG-Ciclina D1. Els lisats cel·lulars es van immunoprecipitar amb un anticòs monoclonal anti-GFP, i es va fer el western blot amb l'anticòs anti-GFP (part superior) o anti-FLAG (part inferior). La cadena pesada de l'anticòs s'indica com a Ab HC. (B) La proteïna ciclina D1 produïda per traducció in vitro es va incubar amb la proteïna GST o GST-Paxilina (de longitud completa o la regió C-terminal que conté els quatre dominis LIM, aa337-591) purificades d'E. coli. Els inputs i els pull down de GST es van analitzar per western blot per detectar ciclina D1 i GST. L'asterisc (*) indica bandes de degradació. (C) Assaig quinasa utilitzant el complex ciclina D1-Cdk4 (Sigma) per determinar l'activitat quinasa contra la GST-Paxilina (longitud completa) i el GST-pRB utilitzat com a control. L'inhibidor de Cdk4/6 anomenat Palbociclib es va afegir a 2 µM. La tinció del gel amb Coomassie s'utilitza com a control de càrrega (part inferior, input).

2. ANÀLISI DE LES DIANES DE FOSFORILACIÓ DE LA PAXILINA I OBTENCIÓ DELS DIFERENTS MUTANTS

Per identificar els residus que es fosforilen en la paxilina, primer es va estudiar la fosforilació *in vitro* de construccions de paxilina amb diferents delecions en l'extrem N-terminal (pCYC2078, pCYC2079, pCYC2080, pCYC2081) mitjançant l'assaig quinasa *in vitro*. Vam observar que si s'eliminaven els primers 270 aminoàcids de la paxilina de ratolí (pCYC2080) desapareixia la fosforilació de la proteïna produïda pel complex ciclina D1-Cdk4 (**Figures 19A i 19B**). Per tal de definir quin residu de la paxilina podia ser el que fosforilava el complex ciclina D1-Cdk4, vam estudiar les serines i treonines que hi havia en aquest domini N-terminal de 270 aminoàcids. Se sap que el residu serina 83 de la paxilina és fosforilat per les quinases ERK i p38 (Ishibe et al., 2004; Huang et al., 2004), el residu serina 178 és fosforilat per la quinasa JNK (Huang et al., 2003; Huang et al., 2008) i ambdós residus estan implicats en migració, mentre que la serina 244 forma part d'una seqüència consens per la quinasa Cdk2 i és fosforilada per Cdk5 durant la diferenciació d'oligodendròcits (Miyamoto et al., 2007). Com que aquestes serines semblaven bones candidates com a dianes de fosforilació, vam crear diferents al·lels de paxilina amb mutacions puntuals en aquests residus mitjançant mutagènesi dirigida amb la tècnica PCR-SDM (**Figura 19C**). L'ús d'aquests al·lels mutants de paxilina en els assaigs quinasa *in vitro* va permetre establir que el complex ciclina D1-Cdk4 fosforila aquestes tres serines en la paxilina (S83, S178 i S244), ja que únicament es pot observar absència de fosforilació en el triple mutant no fosforilable S83A S178A S244A (pCYC2090) (**Figura 19D**). No obstant això, el doble mutant no fosforilable S83A S178A (pCYC2173) presenta una disminució important del senyal de fosforilació respecte al que mostra la paxilina *wild type* (pCYC2064), indicant que el residu serina 244 no sembla tenir tanta importància en la fosforilació *in vitro* de paxilina per part del complex ciclina D1-Cdk4. Aquesta serina 244, al ser un lloc canònic de fosforilació de Cdk2, potser també és fosforilada *in vitro* per Cdk4 de manera inespecífica.

L'absència de fosforilació dels al·lels de paxilina mutants no es deu a la manca d'interacció, ja que vam detectar nivells similars de co-immunoprecipitació de HA-Ciclina D1 (pCYC396) amb la paxilina *wild type* (pCYC2066) i amb els al·lels mutants de paxilina (no fosforilable, pCYC2105, i fosfomimètic, pCYC2103) marcats amb GFP en cèl·lules humanes HEK293T co-transfectades (**Figura 19E**). Per tant, aquests resultats *in vitro* demostren que el complex ciclina D1-Cdk4 fosforila la paxilina, en les serines 83 i 178.

Alternativament, la paxilina fusionada a GST (pCYC2064) es va utilitzar en un assaig quinasa *in vitro* amb el complex ciclina D1-Cdk4 en presència d'ATP o en absència d'ATP com a control, sense radioactivitat. Posteriorment, les mostres es van sotmetre a una electroforesi SDS-PAGE i els gels es van tenyir amb Coomassie. Després de rentar amb aigua, les bandes de proteïnes d'interès es van preparar i presentar a la Fundació Institut de Recerca Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), al Servei de Proteòmica, per a l'anàlisi de les masses moleculars dels pèptids quimiopéptics per HPLC-MSMS. El Servei de Proteòmica ens va suggerir que per a cada banda a assajar es recuperessin tres talls (baixa, mitjana i alta mobilitat) ja que la fosforilació podia alterar la mobilitat de la banda de proteïna. Amb aquesta anàlisi d'espectrometria de masses vam confirmar la fosforilació *in vitro* de la serina 83 de paxilina (**Figures 19F i 20**).

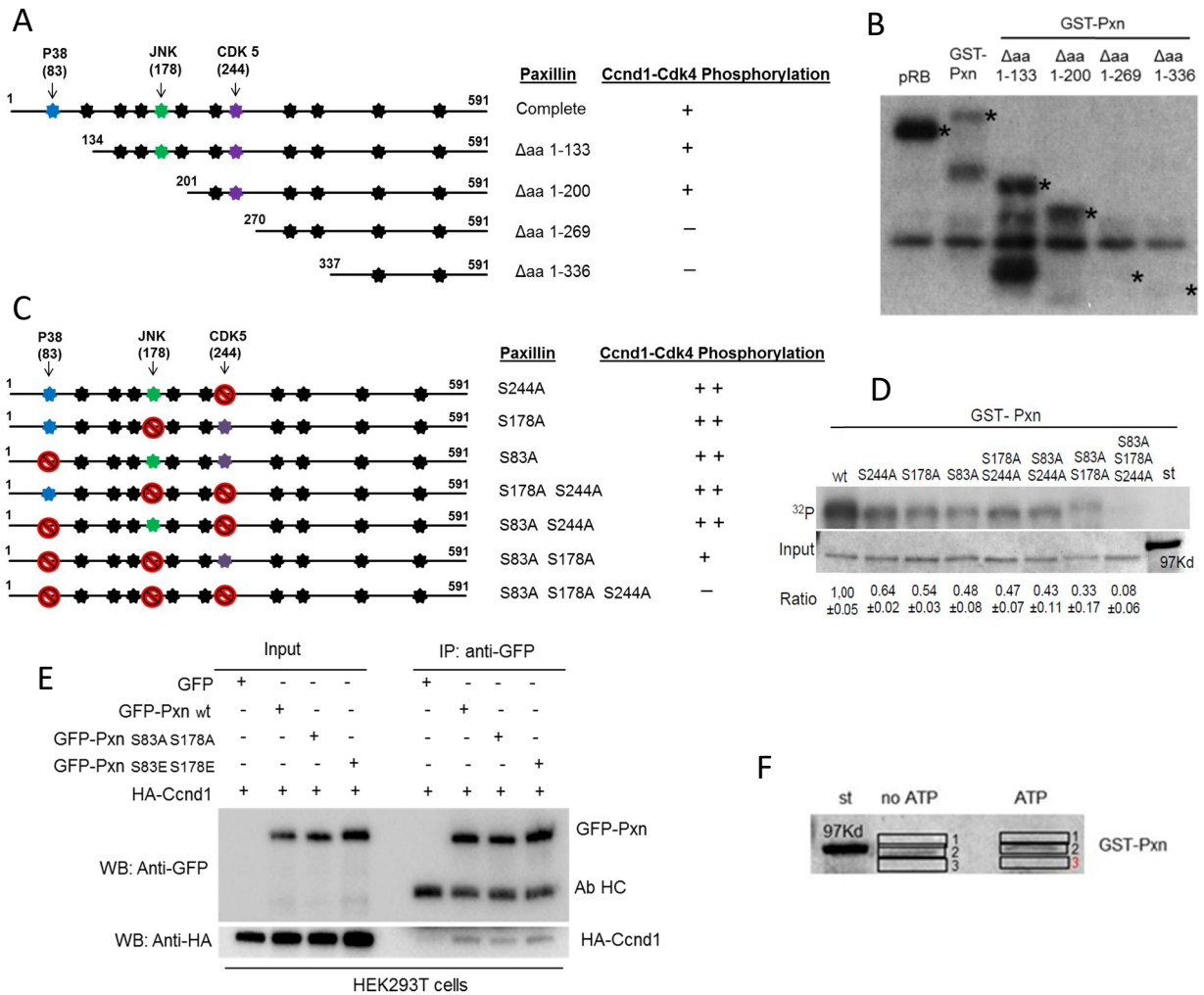


Figura 19. Anàlisi de les dianes de fosforilació de paxilina pel complex ciclina D1-Cdk4. (A) Construccions de paxilina amb delecions en l'extrem N-terminal, les quals s'analitzen mitjançant (B) un assaig quinasa *in vitro* per saber si són fosforilades pel complex ciclina D1-Cdk4 (Sigma). L'asterisc (*) indica les bandes de fosforilació de GST-pRB i de GST-Paxilina. (C) Construccions d'al·lels de paxilina amb residus no fosforilables per tal d'estudiar les dianes de fosforilació de la paxilina. Les mutacions puntuals s'han obtingut per PCR-SDM. (D) Assaig quinasa utilitzant el complex ciclina D1-Cdk4 (Sigma) i fent servir com a substrats els diferents mutants amb residus no fosforilables de paxilina. La tinció del gel amb Coomassie es va utilitzar com a control de càrrega (part inferior, input). La intensitat de les bandes es va quantificar amb el programa ImageJ en condicions d'exposició de senyal no saturat. L'eficiència de la fosforilació es mostra com una relació entre el senyal radioactiu del ³²P incorporat i el input, de dos experiments independents (mitjana ± SD) i relativa a la paxilina wild type; st indica l'estàndard de càrrega. (E) La ciclina D1 s'uneix amb la mateixa eficiència a l'al·lel wild type de paxilina que als al·lels mutants (no fosforilable i fosfomimètic). Cèl·lules HEK293T van ser co-transfectades amb els diferents al·lels de GFP-Paxilina o amb un vector GFP buit, juntament amb la HA-Ciclina D1. Els lisats cel·lulars es van immunoprecipitar amb un anticòs monoclonal anti-GFP i les proteïnes es van detectar per western blot utilitzant els anticossos anti-GFP (part superior) i anti-HA (part inferior). (F) La paxilina fusionada a GST es va utilitzar en un assaig quinasa *in vitro* amb el complex ciclina D1-Cdk4 (Sigma) en presència o absència (control) d'ATP, sense radioactivitat. Posteriorment, les mostres es van separar per electroforesi SDS-PAGE, es van tenyir amb Coomassie i es van recuperar tres fragments de cada mostra (1, 2 i 3 bandes de diferent mobilitat). Les bandes es van enviar per a la seva anàlisi per espectrometria de masses.

A

samples	Band mobility	1 st protein	Score	Coverage (%)	n° peptides	Phospho-peptide
no ATP	1 low	Pxn	1033.78	33.08	18	0
no ATP	2 middle	Pxn	1679.06	47.5	33	0
no ATP	3 high	Pxn	551.05	19.6	11	0
ATP	1 low	No detected				
ATP	2 middle	Pxn	1600.72	42.5	33	0
ATP	3 high	Pxn	730.52	22.8	14	1

B

samples	Band mobility	sequence	m/z	z	$\Delta m/z$	score	modification
no ATP	1 low	AHQPPSPLPVY	667.3790	2	45.56	64.25	
no ATP	2 middle	AHQPPSPLPVY	667.3640	2	23.08	71.51	
no ATP	3 high	AHQPPSPLPVY	667.4050	2	84.52	47.36	
ATP	1 low						
ATP	2 middle	AHQPPSPLPVY	667.3700	2	32.08	77.67	
ATP	3 high	AHQPPSPLPVY	667.3720	2	35.07	44.09	
ATP*	3 high	AHQPPSPLPVY	707.3420	2	14.48	27.93	phospho: 7

Figura 20. Resultats obtinguts de l'espectrometria de masses. (A) En l'espectrometria de masses de les 3 bandes de diferent mobilitat obtingudes de l'assaig quinasa en presència i en absència d'ATP, s'ha identificat la paxilina (Pxn), a excepció de la banda 1 en presència d'ATP que no s'ha identificat cap pèptid. **(B)** En l'anàlisi dels pèptids per espectrometria de masses, s'ha identificat una fosforilació en la banda 3 de l'assaig quinasa en presència d'ATP, i aquesta fosforilació pertany a la serina 83 de paxilina.

3. LA FOSFORILACIÓ DE PAXILINA EN LES SERINES 83 I 178 PEL COMPLEXE CICLINA D1-CDK4 ÉS NECESSÀRIA PER L'ADHESIÓ I LA INVASIÓ CEL·LULARS

Els fibroblasts deficients en ciclina D1 tenen la mateixa mida i diàmetre que els fibroblasts *wild type*, però s'adhereixen i s'estenen sobre la placa (*spreading*) més ràpidament que les cèl·lules de tipus salvatge després de sembrar-les sobre plaques recobertes amb fibronectina (Neumeister et al., 2003; Li et al., 2006a). Ja que es requereix paxilina per a que els fibroblasts s'estenguin de forma ràpida i eficient en fibronectina (Hagel et al., 2002), es va plantejar la hipòtesi que la ciclina D1 podria regular negativament el *spreading* de les cèl·lules a través de la fosforilació de paxilina, en particular de les serines 83 i 178. Per tal de provar això, es van realitzar diferents assaigs funcionals amb els mutants de paxilina no fosforilables (serina a alanina: pCYC2105, pCYC2107 i pCYC2068) i els mutants fosfomimètics simples i doble (serina a glutàmic: pCYC2103, pCYC2108, pCYC2067, pCYC2109 i pCYC2110).

Primerament, es van transfectar fibroblasts de ratolí immortalitzats deficients en ciclina D1 (*Ccnd1* *-/-*) amb els diferents mutants de paxilina, els quals tenen fusionada la proteïna GFP, i es va avaluar la capacitat de les cèl·lules verdes d'estendre's en la placa recoberta amb fibronectina (**Figures 21A i 21B**). En aquestes condicions d'assaig, l'expressió de ciclina D1 va produir un retard en el *spreading* en comparació amb el control, és a dir, que a un determinat temps hi havia més cèl·lules control *Ccnd1* *-/-* que cèl·lules amb ciclina D1 amb un fenotip estès, indicant que l'absència de ciclina D1 afavoreix la capacitat de les cèl·lules per estendre's a la matriu extracel·lular. Aquest efecte també es va produir quan es va transfectar l'al·lel fosfomimètic simple de paxilina S83E (pCYC2108) o el doble mutant S83E S178E (pCYC2103), però no en el cas del mutant simple S178E (pCYC2067), indicant que un residu fosfomimètic en la posició 83 és capaç de rescatar el fenotip de les cèl·lules *wild type* en absència de ciclina D1. D'altra banda, els dobles mutants S83E S178A (pCYC2109) i S83A S178E (pCYC2110) que tenen un residu fosfomimètic (E) i un altre no fosforilable (A) no van produir retard en el *spreading* dels fibroblasts deficients en

ciclina D1 (**Figura 21C**), indicant que es requereix la fosforilació en ambdós llocs pel control de l'adhesió i l'extensió de cèl·lules per part de paxilina, ja que si un d'ells no es pot fosforilar no es produeix el retard en el *spreading*. Aquest punt també queda confirmat quan transfectem els mutants simples amb residus no fosforilables (S83A o S178A) sense alterar l'altre residu (**Figura 21D**). Per aquest motiu, per a que es produeixi el retard en el *spreading* observat amb el mutant simple de paxilina S83E, una quinasa diferent al complex ciclina D1-Cdk4 ha de ser la responsable de la fosforilació de la serina 178. Per contra, el mutant simple de paxilina S178E només va produir retard quan va ser co-transfectat amb ciclina D1, indicant que la fosforilació de la serina 83 de paxilina depèn de ciclina D1. Com a control, també vam analitzar el *spreading* de fibroblasts *wild type*, i vam observar que s'estenien més lentament que els fibroblasts deficients en ciclina D1 (**Figura 21E**), tal com ja s'havia descrit (Neumeister et al., 2003; Li et al., 2006a). A més, el fenotip dels fibroblasts *wild type* que ja tenen ciclina D1 no s'altera per l'expressió de paxilina o de l'al·lel fosfomimètic S83E. Finalment, vam analitzar els nivells de ciclina D1 transfectada en els fibroblasts *Ccnd1 -/-*. Donat que l'eficiència de les transfeccions va ser del 20% i que la banda de transfecció és al voltant del 20% de la ciclina D1 endògena (mesurada amb el programa Image Lab 4.0.1 de Bio-Rad), es pot veure que no hi ha una sobreexpressió significativa de ciclina D1 respecte als nivells endògens en els fibroblasts *wild type* (**Figura 21F**).

També es va analitzar la importància del complex ciclina D1-Cdk4 en la regulació de l'adhesió i el *spreading* en les cèl·lules tumorals R3327-5'A, que mostren un elevat potencial metastàtic (Luo et al., 1997). Es va reprimir l'expressió de ciclina D1 mitjançant RNA d'interferència (*knock down*) i es va veure que augmentava la capacitat de les cèl·lules R3327-5'A per estendre's en la placa recoberta amb fibronectina (**Figures 22A i 22B**), com en els fibroblasts deficients en ciclina D1. A continuació, es van expressar els diferents al·lels mutants de paxilina en aquestes cèl·lules R3327-5'A que tenien reprimida l'expressió de ciclina D1, i es van observar resultats similars als descrits en els fibroblasts, és a dir, l'expressió del doble mutant fosfomimètic S83E S178E (pCYC2103) produeix un retard en el *spreading* en absència de ciclina D1 mentre que no es produeix aquest retard quan aquests dos residus serina no es poden fosforilar. Per tant, la fosforilació de paxilina pel complex ciclina D1-Cdk4 també és important en la regulació del *spreading* en aquests cèl·lules

tumorals. A més, l'expressió del mutant ciclina D1 K112E (pCYC510), que no pot produir complexos ciclina D1-Cdk4 actius, no va rescatar la deficiència de ciclina D1 en les cèl·lules R3327-5'A, confirmant que es requereix l'activitat quinasa del complex ciclina D1-Cdk4 pel control de l'adhesió cel·lular i la seva capacitat per estendre's en la placa (**Figura 22C**).

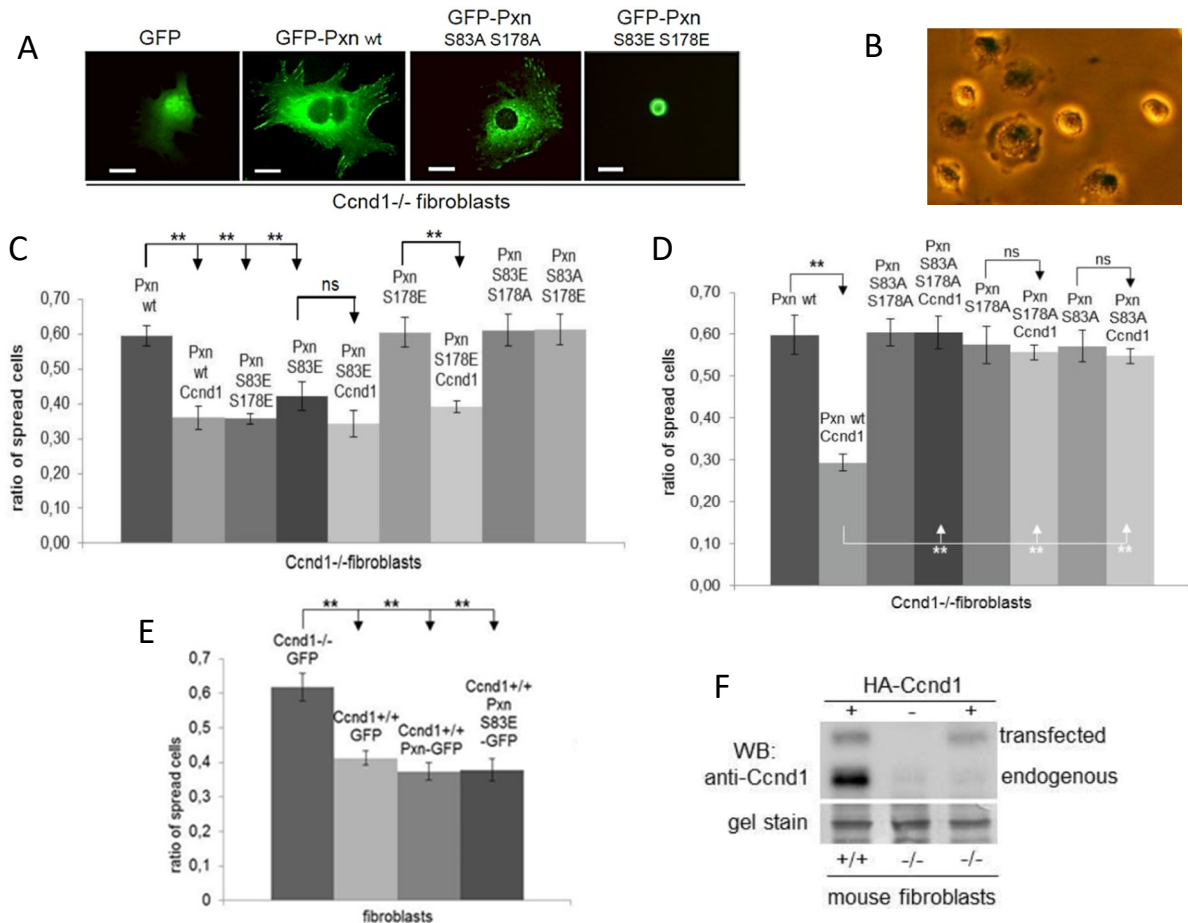


Figura 21. La fosforilació de paxilina en les serines 83 i 178 pel complex ciclina D1-Cdk4 es requereix per disminuir el spreading dels fibroblasts de ratolí. (A) Imatges de la morfologia estesa (spread) i rodona (unspread) de fibroblasts Ccnd1^{-/-}, després de ser transfectats amb diversos al·lels de GFP-Paxilina (barra d'escala = 20 µm). **(B)** Imatge de fibroblasts spread i unspread visualitzats amb contrast de fase amb l'objectiu 10x. **(C i D)** Assaig de spreading de fibroblasts Ccnd1^{-/-} co-transfectats amb diferents al·lels de GFP-Paxilina i amb HA-Ciclina D1 o un vector buit com a control. Quaranta-vuit hores després de la transfecció, les cèl·lules es van tripsinitzar i es van sembrar en medi DMEM sense sèrum en plaques de 6 pous de 35 mm de diàmetre recoberts amb 5 µg/mL de fibronectina. Trenta minuts més tard, es va determinar la proporció de cèl·lules verdes que tenien una morfologia spread respecte el total de cèl·lules verdes. Les dades representen la mitjana ± SEM de tres o més experiments independents. Els valors de significació es van determinar mitjançant ANOVA d'una via i Tukey-HSD post-test (* indica p<0.05, ** indica p<0.01, ns vol dir que no és significatiu). **(E)** Assaig de spreading igual que en C i D de fibroblasts Ccnd1^{+/+} co-transfectats amb GFP, GFP-Paxilina wild type o GFP-Paxilina S83E. També es van transfectar fibroblasts Ccnd1^{-/-} amb GFP com a control. Les dades corresponen a tres experiments independents (** indica p<0.01). **(F)** Western blot per estimar el nivell de proteïna HA-Ciclina D1 transfectada en E.

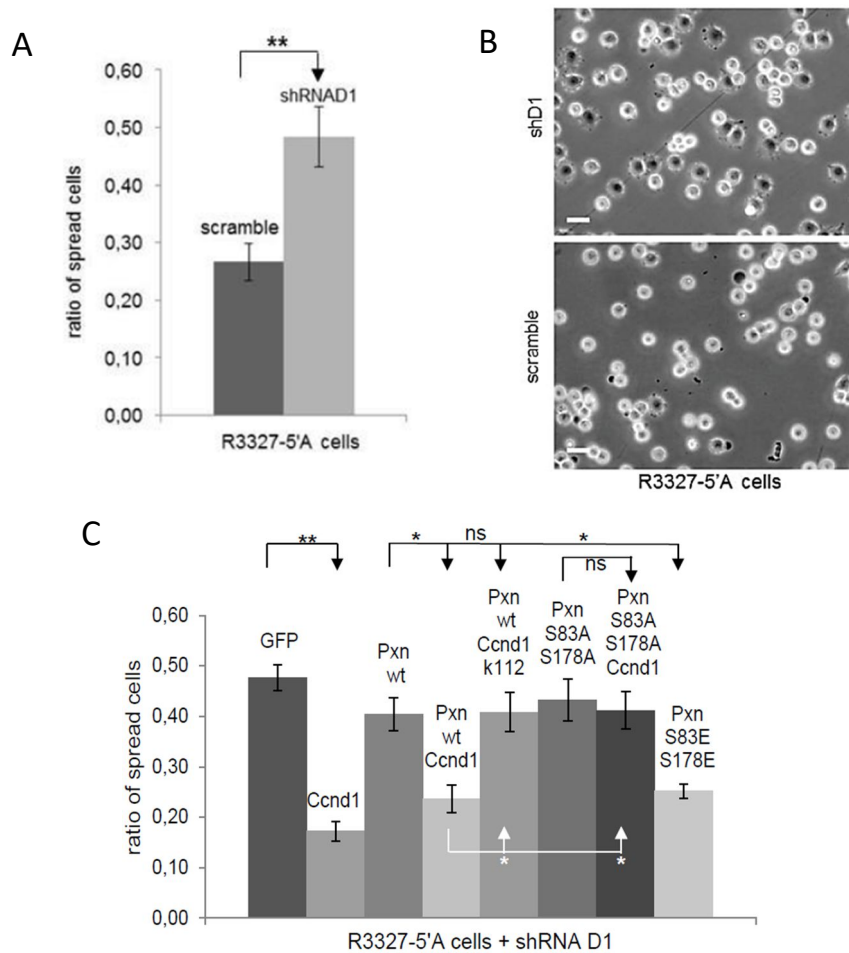


Figura 22. Disminució de la capacitat d'adhesió de les cèl·lules tumorals R3327-5'A deguda a la fosforilació de la paxilina en les serines 83 i 178 per part del complex ciclina D1-Cdk4. (A) Assaig de spreading de cèl·lules R3327-5'A infectades amb RNA d'interferència contra ciclina D1 (shD1) o amb un RNA d'interferència control (scramble). Quaranta-vuit hores després de la transfecció, les cèl·lules es van tripsinitzar i es van sembrar en medi DMEM sense sèrum en plaques de 6 pous de 35 mm de diàmetre recoberts amb 5 µg/mL de fibronectina. Una hora més tard, es va determinar la proporció de cèl·lules verdes que tenien un fenotip estès en la placa (spread). Es representen les dades de tres experiments independents com a mitjana ± SEM. La significació dels valors es va determinar per un T-test. (B) Imatge representativa de cèl·lules R3327-5'A en condicions spread i unspread d'un dels experiments descrits en A (barra d'escala = 50 µm). (C) Assaig de spreading, igual que en A, de cèl·lules R3327-5'A que tenen reprimida l'expressió de ciclina D1 per RNA d'interferència co-transfectades amb GFP com a control, amb l'al·lel wild type de GFP-Paxilina i amb els diferents al·lels mutats de GFP-Paxilina, i amb HA-Ciclina D1 humana o un vector buit. Les dades representen la mitjana ± SEM de tres o més experiments independents. Els valors de significació es van determinar mitjançant ANOVA d'una via i Tukey-HSD post-test (* indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, ns vol dir que no és significatiu).

D'una banda, les cèl·lules deficientes en ciclina D1 migren i envaeixen menys que les cèl·lules *wild type* (Li et al., 2006a; Zhong et al., 2010), i d'una altra banda, la fosforilació de paxilina en les serines 83 i 178 es requereix per a una migració eficient (Ishibe et al., 2004; Huang et al., 2008). Per aquest motiu vam postular que el complex ciclina D1-Cdk4 podria exercir un efecte positiu sobre la migració i la invasió cel·lulars a través de la fosforilació de paxilina. Per tant, es va analitzar la contribució de ciclina D1 en la capacitat de les cèl·lules tumorals R3327-5'A per envair en filtres (*transwells*) recoberts amb Matrigel. Es va comprovar que aquestes cèl·lules tenen un elevat potencial invasiu, i que la repressió de l'expressió de ciclina D1 per RNA d'interferència (*knock down*) redueix dràsticament la capacitat d'invasió d'aquestes cèl·lules (**Figura 23A**). Però aquesta pèrdua de capacitat invasiva deguda a la repressió de ciclina D1 es va restaurar amb l'expressió del doble mutant fosfomimètic de paxilina (HA-Paxilina S83E 178E, pCYC2100). A diferència del que es va observar en l'assaig de *spreading*, els dos mutants fosfomimètics simples HA-Paxilina S83E (pCYC2099) i HA-Paxilina S178E (pCYC2185) són capaços de rescatar la capacitat d'invasió de les cèl·lules deficientes en ciclina D1 (**Figures 23A i 23B**), encara que el mutant HA-Paxilina S178E ho fa de manera parcial, el que suggereix que ciclina D1 pot regular la invasió a través de la fosforilació de paxilina en la serina 83 i en la serina 178. En aquest assaig d'invasió es va comprovar l'expressió, a nivell de proteïna, dels diferents al·lels de paxilina infectats amb lentivirus, així com la reducció de l'expressió de ciclina D1 pel RNA d'interferència (**Figures 23C i 23D**).

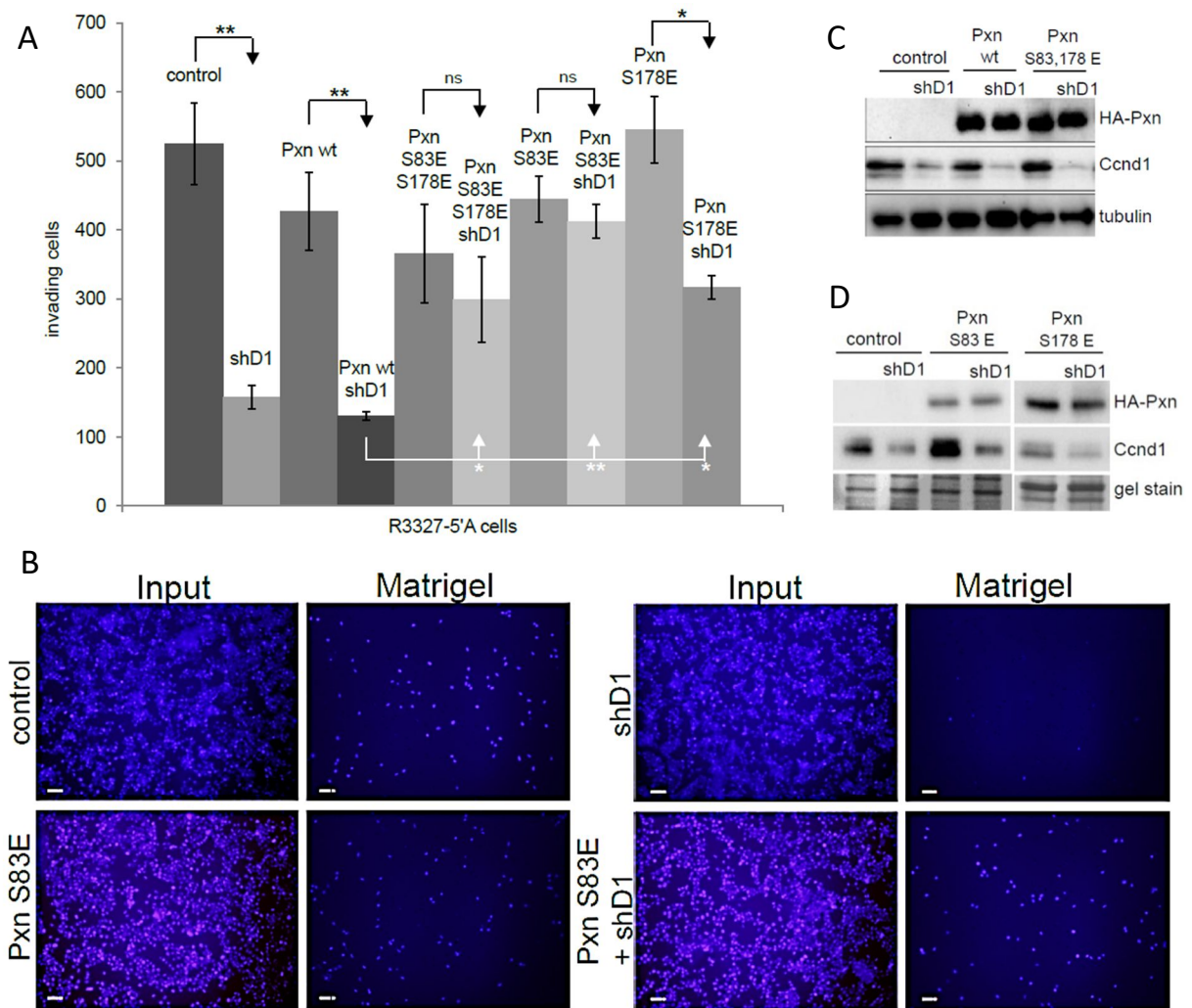


Figura 23. El complex ciclina D1-Cdk4 regula la invasió a través de la fosforilació de la paxilina. (A) Les cèl·lules tumorals R3327-5'A es van infectar amb RNA d'interferència contra ciclina D1 (shD1) o amb RNA d'interferència control. A més, aquestes cèl·lules es van infectar amb HA-Paxilina wild type, amb HA-Paxilina S83E 178E, amb HA-Paxilina S83E o amb HA-Paxilina S178E. Per l'assaig d'invasió, es van sembrar $5 \cdot 10^4$ cèl·lules co-infectades en filtres transwell prèviament recoberts amb Matrigel, en plaques de 24 pous, i es van incubar unes 20 hores per a que es produís la invasió. Els valors s'expressen com a mitjana \pm SEM de tres experiments independents. La significació dels valors es va determinar mitjançant ANOVA d'una via i Tukey-HSD post-test (* indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, ns vol dir que no és significatiu). (B) Imatges representatives (barra d'escala = 100 μ m) de l'assaig d'invasió realitzat en A. Les cèl·lules van ser fixades i tenyides amb Hoescht (input). Les cèl·lules que no havien envaït es van eliminar utilitzant un bastonet de cotó, quedant únicament les cèl·lules que havien envaït el Matrigel. (C i D) Les imatges de western blot mostren l'expressió de paxilina utilitzant l'anticòs de rata anti-HA, i l'expressió de ciclina D1 utilitzant l'anticòs de ratolí (clon DCS6) en les cèl·lules co-infectades. La tubulina o la tinció del gel amb Coomassie s'utilitzen com a control de càrrega.

4. LES CÈL·LULES DEFICIENTS EN CICLINA D1 TENEN NIVELLS REDUÏTS DE PAXILINA FOSFORILADA EN LA SERINA 83

Els assaigs funcionals que s'han realitzat indiquen un paper important de la ciclina D1, a través de la fosforilació de la paxilina, en la regulació de l'adhesió, la capacitat d'estendre's i la invasió de les cèl·lules. Particularment, els resultats dels assaigs de fosforilació *in vitro* i els resultats funcionals suggereixen que el complex ciclina D1-Cdk4 deu fosforilar *in vivo* la paxilina en la serina 83. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi, es va utilitzar un anticòs fosfo-específic per comparar els nivells de paxilina fosforilada en la serina 83 en extrems de proteïna. Es va comparar la fosforilació de la paxilina en la serina 83 entre fibroblasts de ratolí *wild type* i deficients en ciclina D1, en fibroblasts *wild type* i tractats amb Palbociclib 2 μ M, inhibidor específic de l'activitat del complex ciclina D1-Cdk4 (**Figura 24A**), i en cèl·lules tumorals R3327-5'A *wild type* i amb l'expressió de ciclina D1 reprimida (*knock down*) (**Figura 24B**). Es va observar una disminució significativa (30-40%) en la fosforilació de la serina 83 en absència de ciclina D1, tot i que hi havia una contribució important que era independent de ciclina D1. Es va comprovar que l'anticòs fosfo-específic per detectar la fosforilació de la paxilina en la serina 83 funcionés correctament utilitzant el mutant de paxilina no fosforilable (**Figura 24C**), on es va observar que les cèl·lules HEK293T que tenien transfectada l'al·lel de paxilina no fosforilable S83A S178A (pCYC2105) no mostraven senyal utilitzant l'anticòs contra la paxilina fosforilada en la serina 83. En conclusió, el complex ciclina D1-Cdk4 fosforila *in vivo* la serina 83 de la paxilina, tot i que només ho fa en una fracció de la paxilina, i les cèl·lules deficients en ciclina D1 encara tenen una quantitat important de paxilina fosforilada en la serina 83.

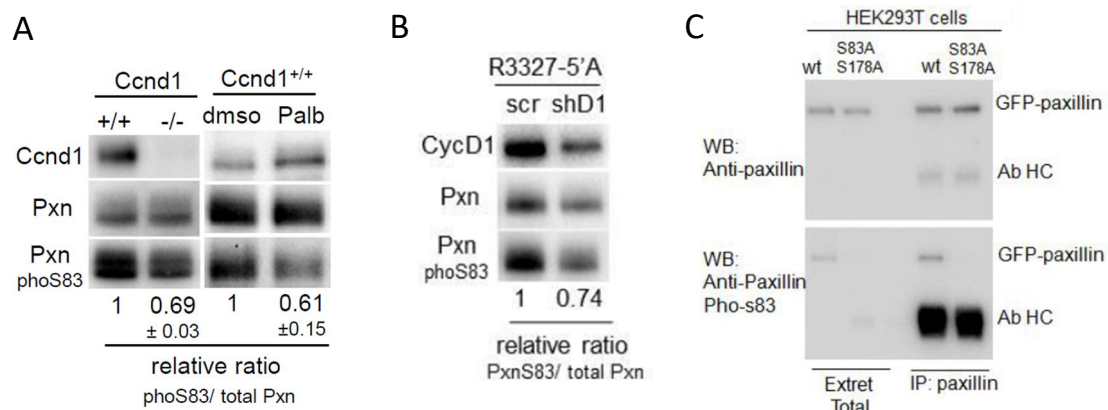


Figura 24. La disminució de l'expressió de ciclina D1 comporta una reducció de la paxilina fosforilada en la serina 83. (A) Per western blot es van determinar els nivells de paxilina fosforilada en la serina 83 (Pxn phoS83) i els nivells de paxilina total en fibroblasts Ccnd1 -/- i Ccnd1 +/+, i també en fibroblasts Ccnd1 +/+ tractats amb Palbociclib 2 µM. La relació de paxilina fosforilada en la serina 83 respecte el total de paxilina es va quantificar amb el programa Image-Lab 4.0.1 de Bio-Rad. Les dades procedeixen de tres experiments independents i s'expressen com a mitjana ± SEM. Els valors de significació es van determinar mitjançant un T-test. (B) També es van determinar els nivells de paxilina fosforilada en la serina 83 i els nivells de paxilina total en cèl·lules tumorals R3327-5'A infectades amb RNA d'interferència contra ciclina D1 (shD1) i amb RNA d'interferència control (scr). Com en A, la relació de paxilina fosforilada en la serina 83 respecte el total de paxilina es va quantificar amb el programa Image-Lab 4.0.1 de Bio-Rad. (C) Control de l'especificitat de l'anticòs contra la paxilina fosforilada en la serina 83. Cèl·lules HEK293T co-transfectades amb l'al·lel de paxilina wild type i amb l'al·lel de paxilina no fosforilable S83A S178A es van immunoprecipitar amb un anticòs policlonal anti-paxilina, i es va detectar la proteïna per western blot utilitzant els anticossos anti-paxilina (part superior) o anti-paxilina fosforilada en la serina 83 (part inferior).

Està descrit que la quinasa ERK fosforila la paxilina en la serina 83 en els focus d'adhesió (Ishibe et al., 2004). Això podria explicar la presència d'alts nivells de paxilina fosforilada en la serina 83 en cèl·lules deficientes en ciclina D1. Així, per observar millor la contribució de ciclina D1 en la fosforilació de la serina 83, es va analitzar la fosforilació de paxilina en presència de l'inhibidor específic de l'activitat ERK anomenat U0126 (Selleckchem). Es van plantar fibroblasts de ratolí Ccnd1 +/+ i Ccnd1 -/- en plaques de 4 pous de 16 mm de diàmetre i es van incubar 24 hores amb medi DMEM amb 10% de FBS en una atmosfera humida amb un 5% de CO₂ a 37°C. Passat aquest temps, van ser deprivats de sèrum per aconseguir uns nivells mínims d'activitat ERK i de ciclina D1. Després de 24 hores, es va tornar a posar sèrum a les cèl·lules juntament amb l'inhibidor de

l'activitat ERK U0126 a una concentració de 10 μ M o DMSO com a control, per tal d'induir únicament l'expressió de ciclina D1, i es van agafar mostres en diferents punts de temps per a l'anàlisi per *western blot* (**Figura 25A**). La quantificació de la paxilina fosforilada en la serina 83 respecte la paxilina total va mostrar una proporció molt més alta de paxilina fosforilada en els fibroblasts ciclina D1 *wild type* que en els fibroblasts deficients en ciclina D1, sobretot després de 6 hores d'incubació amb sèrum i l'inhibidor U0126, temps en el que ciclina D1 ja s'havia induït clarament (**Figura 25B**). Quan no hi ha tractament amb l'inhibidor de l'activitat ERK hi ha una reducció de la paxilina fosforilada respecte la paxilina total d'un 30% aproximadament, atribuïble a la manca de ciclina D1 (**Figura 25C**), tal com s'havia observat anteriorment. I quan tractem els fibroblasts amb l'inhibidor de l'activitat ERK aquesta diferència és molt més significativa ja que desapareix la fosforilació dels focus d'adhesió deguda a la quinasa ERK, i és més evident la contribució de ciclina D1 en la fosforilació de la paxilina en la serina 83.

D'altra banda, es va avaluar el paper de ciclina D1 en la promoció de la fosforilació de paxilina en condicions biològiques similars a les de l'assaig de capacitat d'adhesió (*spreading*). Cèl·lules tumorals R3327-5'A que tenien reprimida l'expressió de ciclina D1 mitjançant RNA d'interferència es van transfectar amb un vector buit o amb ciclina D1 humana (pCYC291). Passades quaranta-vuit hores de la transfecció, es van tripsinitzar les cèl·lules i es van plantar $1.5 \cdot 10^5$ cèl·lules sobre una placa de 24 pous recoberts amb fibronectina. Aquestes cèl·lules es van incubar en absència de sèrum i es van tractar amb inhibidor U0126 a 10 μ M o amb DMSO com a control unes dos hores en una atmosfera humida amb un 5% de CO₂ a 37°C (**Figura 25D**). En aquestes condicions, l'expressió de ciclina D1 promou la fosforilació de paxilina en la serina 83, fins i tot en absència d'activitat ERK (**Figura 25E**). Aquests resultats són consistents amb que ciclina D1 fosforila una subpoblació de la paxilina total, que pot ser important a nivell funcional en la regulació de la invasió i la capacitat d'adhesió de les cèl·lules. A més, aquests resultats també mostren que el complex ciclina D1-Cdk4 i la quinasa ERK poden actuar independentment en la regulació de la paxilina.

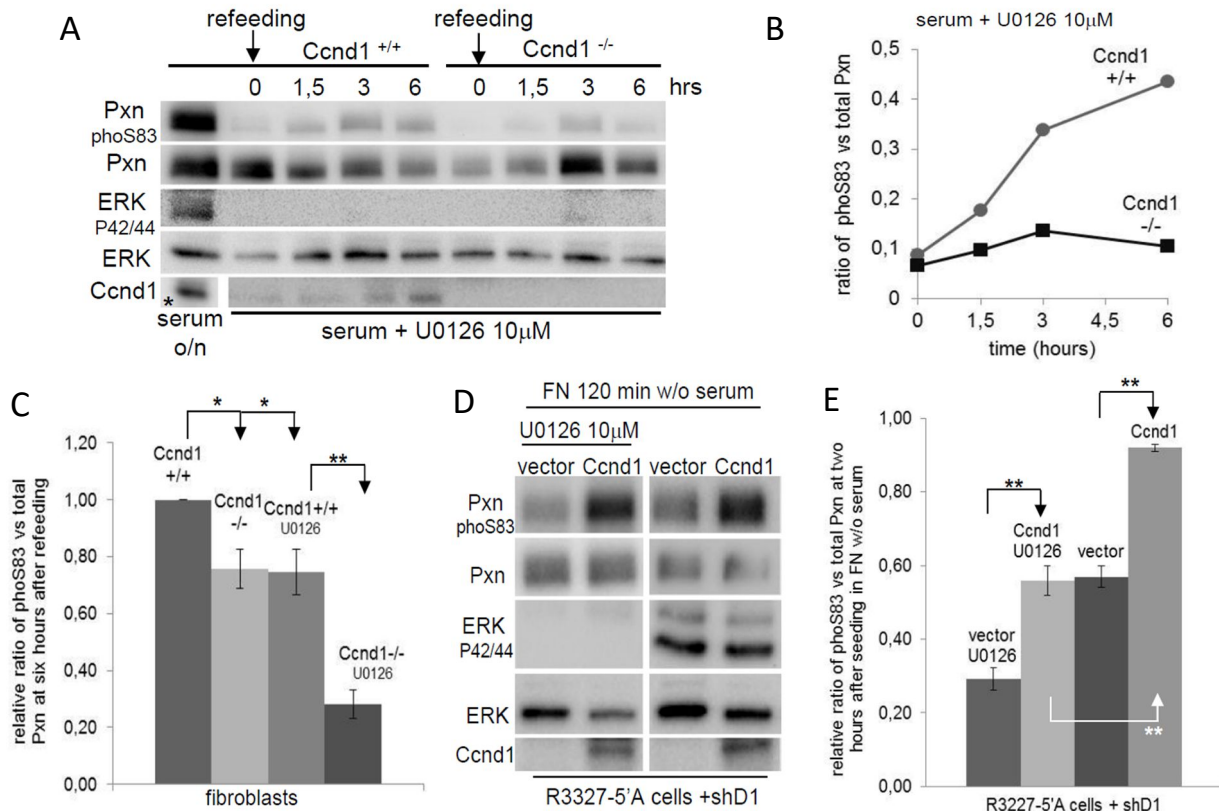


Figura 25. Ciclina D1 i la quinasa ERK poden actuar independentment en la regulació de la paxilina. (A) Westerns blots que mostren l'acumulació de paxilina fosforilada en la serina 83 i de paxilina total en fibroblasts *Ccmd1*^{-/-} i *Ccmd1*^{+/+}, recollits en diferents punts de temps després de la incubació amb sèrum i l'inhibidor específic de l'activitat ERK U0126 a 10 μ M. Els nivells de paxilina total, d'ERK fosforilada i de ciclina D1 es van analitzar en la mateixa membrana, i els nivells de paxilina fosforilada en la serina 83 i d'ERK total es van analitzar en una altra membrana. Es va utilitzar com a control fibroblasts *Ccmd1*^{+/+} incubats en presència de sèrum. L'asterisc (*) indica una menor exposició de la mateixa membrana. (B) Quantificació de la proporció de paxilina fosforilada en la serina 83 respecte la paxilina total de l'experiment A. La proteïna es va quantificar amb el programa Image-Lab 4.0.1 de Bio-Rad. (C) Es representa la proporció de paxilina fosforilada en la serina 83 respecte la paxilina total després de 6 hores d'incubació amb sèrum de 4 experiments independents. Les dades s'expressen com a mitjana \pm SEM. La significació dels valors es va determinar mitjançant ANOVA d'una via i Tukey-HSD post-test (* indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$). (D) Westerns blots que mostren l'acumulació de paxilina fosforilada en la serina 83 i de paxilina total en cèl·lules R3327-5'A sembrades sobre fibronectina. Aquestes cèl·lules, prèviament infectades amb RNA d'interferència contra ciclina D1 (shD1), es van transfectar amb un vector buit o amb ciclina D1 humana i es van sembrar en plaques recobertes amb 5 μ g/mL de fibronectina durant 2 hores. Aquestes cèl·lules R3327-5'A es van incubar en absència de sèrum i es van tractar amb inhibidor U0126 a 10 μ M o amb DMSO com a control. Els nivells de paxilina total, d'ERK fosforilada i de ciclina D1 es van analitzar en la mateixa membrana, i els nivells de paxilina fosforilada en la serina 83 i d'ERK total es van analitzar en una altra membrana. (E) Es representa la proporció de paxilina fosforilada en la serina 83 respecte la paxilina total de 4 experiments independents. Les mostres amb inhibidor U0126 i amb DMSO es van carregar en gels diferents, però la quantificació es va realitzar en relació a la mateixa mostra carregada en tots els westerns blots. La quantificació de proteïna es va realitzar amb el programa Image-Lab 4.0.1 de Bio-Rad. Les dades s'expressen com a mitjana \pm SEM. La significació dels valors es va determinar mitjançant ANOVA d'una via i Tukey-HSD post-test (** indica $p < 0.01$).

5. LA CICLINA D1 CO-LOCALITZA AMB LA PAXILINA EN LA MEMBRANA CEL·LULAR DE FIBROBLASTS I CÈL·LULES TUMORALS

Com que els experiments previs indiquen que ciclina D1 pot unir-se i fosforilar només una porció específica de la paxilina, s'ha analitzat la co-localització de ciclina D1 i paxilina, ja que potser aquesta interacció està limitada per la seva localització subcel·lular. Així, es va estudiar la localització de ciclina D1, paxilina i paxilina fosforilada en la serina 83 per immunofluorescència i microscòpia confocal. Per a aquest experiment, es van sembrar fibroblasts de ratolí en plaques recobertes amb fibronectina i es van incubar durant tres hores abans de ser fixats. Com era d'esperar, es va detectar acumulació de ciclina D1 en el nucli de la majoria de les cèl·lules, però moltes també van mostrar un senyal difús citoplasmàtic (**Figura 26A**). És important destacar que aquest senyal citoplasmàtic és específic ja que és absent en els fibroblasts deficients en ciclina D1. Es va observar que un 30% de les cèl·lules mostraven co-localització de ciclina D1 i paxilina en la membrana cel·lular però, per contra, no es va observar co-localització en els focus d'adhesió (**Figura 26B**).

També es va avaluar la co-localització de ciclina D1 amb la paxilina fosforilada en la serina 83 i es va observar co-localització al llarg de la membrana cel·lular dels fibroblasts (**Figura 27A**). Es pot veure que en fibroblasts deficients en ciclina D1 no existeix aquesta co-localització i que el senyal citoplasmàtic de l'anticòs és específic. Es va obtenir el mateix resultat de co-localització en les cèl·lules tumorals R3327-5'A infectades amb HA-Ciclina D1 (pCYC801) (**Figura 27B**), on també es van detectar els nivells de proteïna infectada per *western blot* (**Figura 27C**). Per tant, ciclina D1 i paxilina fosforilada en serina 83 co-localitzen en la membrana d'aquestes línies cel·lulars.

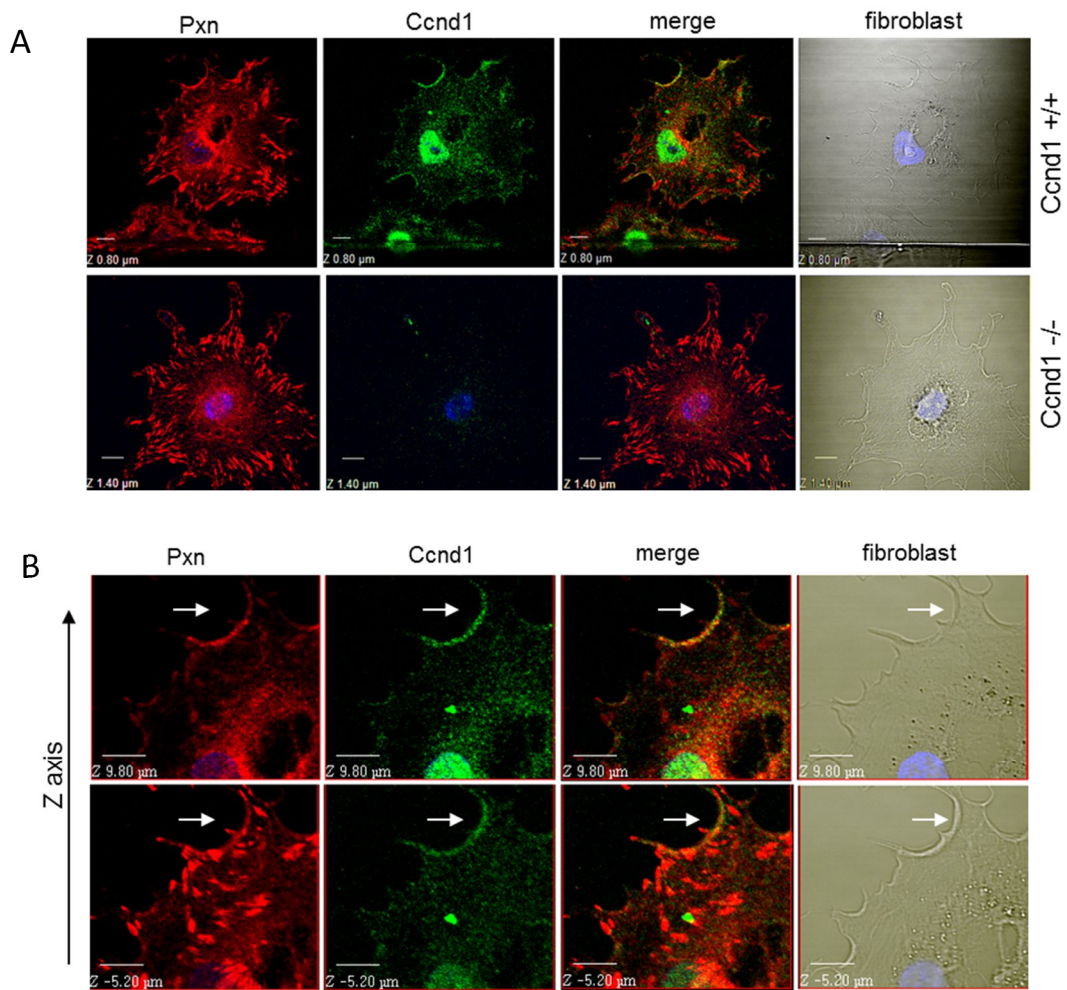


Figura 26. Ciclina D1 co-ocalitza amb la paxilina en la membrana dels fibroblasts de ratolí. (A) Els fibroblasts immortalitzats *Ccnd1* +/+ i *Ccnd1* -/- van ser fixats amb 4% de paraformaldehid i es van permeabilitzar amb 0.2% de trítol. Les imatges van ser adquirides mitjançant microscòpia confocal (barra d'escala = 10 μm). Els nuclis es van teñir amb Hoechst (blau). Es van utilitzar els anticossos anti-paxilina (clon 349, monoclonal de ratolí, vermell) i anti-ciclina D1 (clon EP12, monoclonal de conill, verd). (B) Es mostra una ampliació de la immunofluorescència realitzada en els fibroblasts *Ccnd1* +/+, on es mou l'eix Z per veure que la co-localització es produeix en les ondulacions de la membrana i no en els focus d'adhesió.

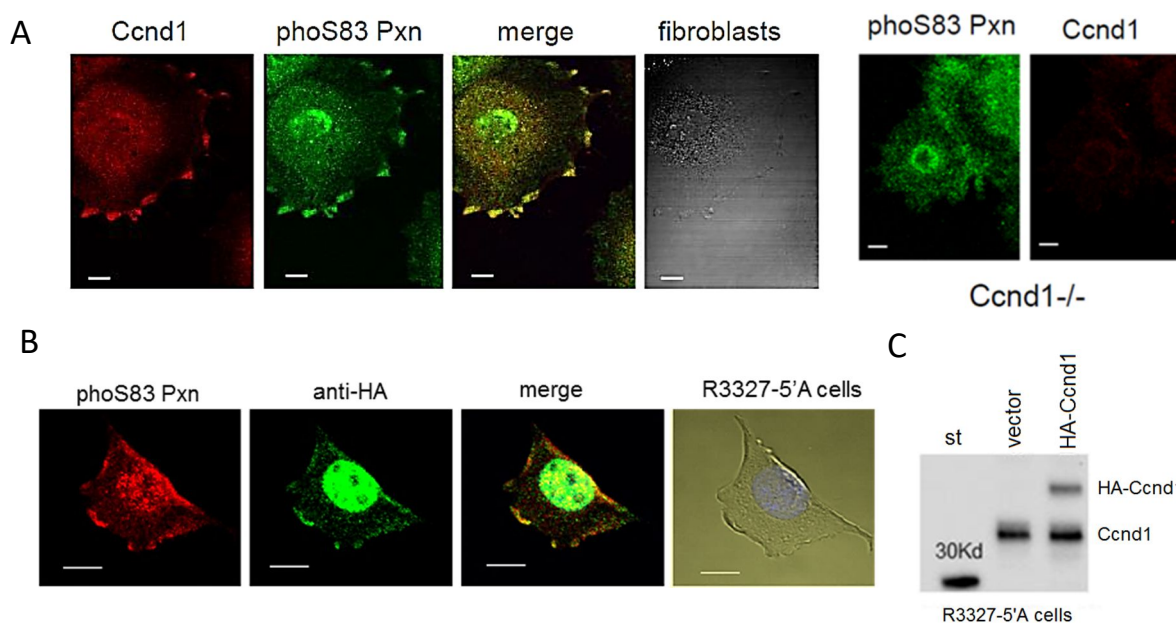


Figura 27. Ciclina D1 co-ocalitza amb la paxilina fosforilada en la serina 83 al llarg de la membrana cel·lular dels fibroblasts i de les cèl·lules tumorals. (A) Els fibroblasts immortalitzats *Ccnd1* +/+ i *Ccnd1* -/- van ser fixats amb 4% de paraformaldehid i es van permeabilitzar amb 0.02% de tritó (condicions de baixa permeabilització). Imatges adquirides per microscòpia confocal (barra d'escala = 10 µm). Els nuclis es van tenyir amb Hoechst (blau). Per la immunofluorescència es van utilitzar els anticossos anti-ciclina D1 (clon 72-13G, monoclonal de ratolí, vermell) i anti-paxilina fosforilada en la serina 83 (policlonal de conill, verd). L'anticòs fosfo-específic contra la serina 83 de la paxilina dona un senyal nuclear que és inespecífic ja que la paxilina mostra exclusió del nucli (referenciat en la fitxa tècnica). **(B)** Cèl·lules tumorals R3327-5'A infectades amb un vector buit o amb HA-Ciclina D1, es van fixar amb 4% de paraformaldehid i es van permeabilitzar amb 0.2% de tritó. Imatges adquirides per microscòpia confocal (barra d'escala = 10 µm). Els nuclis es van tenyir amb Hoechst (blau). Per la immunofluorescència es van utilitzar els anticossos anti-paxilina fosforilada en la serina 83 (policlonal de conill, vermell) i anti-HA (clon 3F10, monoclonal de rata, verd). Es torna a apreciar el senyal nuclear inespecífic referenciat en la fitxa tècnica de l'anticòs fosfo-específic contra la serina 83 de la paxilina. **(C)** Es van visualitzar, mitjançant western blot, els nivells de proteïna ciclina D1 endògena i de HA-Ciclina D1 infectada de les cèl·lules R3327-5'A utilitzades en B. Es van carregar quantitats iguals de proteïna en cada pou.

Ni ciclina D1 ni paxilina semblen estar distribuïdes homogèniament per la membrana cel·lular, sinó que apareixen co-localitzant en regions específiques d'aquesta. Això és consistent amb els resultats previs descrits en la bibliografia que associen ciclina D1 i paxilina a les ondulacions de la membrana anomenades *ruffles* (Chen et al., 2004; Zhong et al., 2010; Meng et al., 2011). La GTPasa Rac1 és essencial per a la formació d'ondulacions (*ruffles*) en la membrana necessàries per a la migració cel·lular, i es pot utilitzar com un

marcador d'aquestes estructures (Ridley et al., 1992). Per tant, per determinar si ciclina D1 es troba localitzada en les membranes *ruffles*, es va estudiar la co-localització de ciclina D1 amb Rac1. Un cop més, al voltant d'un terç de les cèl·lules va mostrar co-localització de ciclina D1 amb Rac1 a la membrana cel·lular, la qual cosa indica que la interacció entre ciclina D1 i paxilina té lloc molt probablement en aquestes membranes *ruffles* (**Figura 28A**). A més, aquestes són regions amb un elevat reciclatge de membrana i, per tant, són zones enriquides amb la proteïna del receptor de transferrina (TFR) (Bretscher and Aguado-Velasco, 1998). En conseqüència, es va examinar la co-localització de ciclina D1 amb el TFR en fibroblasts i, una vegada més, la co-localització només es va observar en regions específiques de la membrana cel·lular (**Figura 28B**), donant suport a la hipòtesi de que hi ha una localització específica de ciclina D1 en els *ruffles*.

Finalment, es va comprovar si la localització de la paxilina en els *ruffles* estava alterada en fibroblasts deficients en ciclina D1. Vam veure que, en la membrana cel·lular, els nivells de paxilina total i de paxilina fosforilada en la serina 83 estaven reduïdes en fibroblasts immortalitzats *Ccnd1* $-/-$ (**Figures 29A i 29B**). Tot i així, en aquestes cèl·lules deficients en ciclina D1 la quantitat de paxilina i de paxilina fosforilada en els focus d'adhesió no variava respecte als fibroblasts *Ccnd1* $+/+$, indicant que ciclina D1 afecta a la fosforilació de la paxilina únicament en la membrana cel·lular i no en els focus d'adhesió. Es van obtenir resultats idèntics en fibroblasts primaris, on la quantitat de paxilina total i de paxilina fosforilada en la serina 83 disminuïa en la membrana cel·lular dels fibroblasts primaris *Ccnd1* $-/-$ respecte als fibroblasts *Ccnd1* $+/+$, sense alterar els nivells de paxilina fosforilada en els focus d'adhesió (**Figures 29C i 29D**). Aquest resultat és consistent amb la disminució parcial (~30%) de la fosforilació que hem vist per *western blot* (veure més amunt la **Figura 24A**). Per tant, aquests resultats ens revelen que una quantitat significativa de ciclina D1 interactua amb una petita fracció de la paxilina total de la cèl·lula, i que probablement el complex ciclina D1-Cdk4 regula només la fracció de paxilina situada en els *ruffles*.

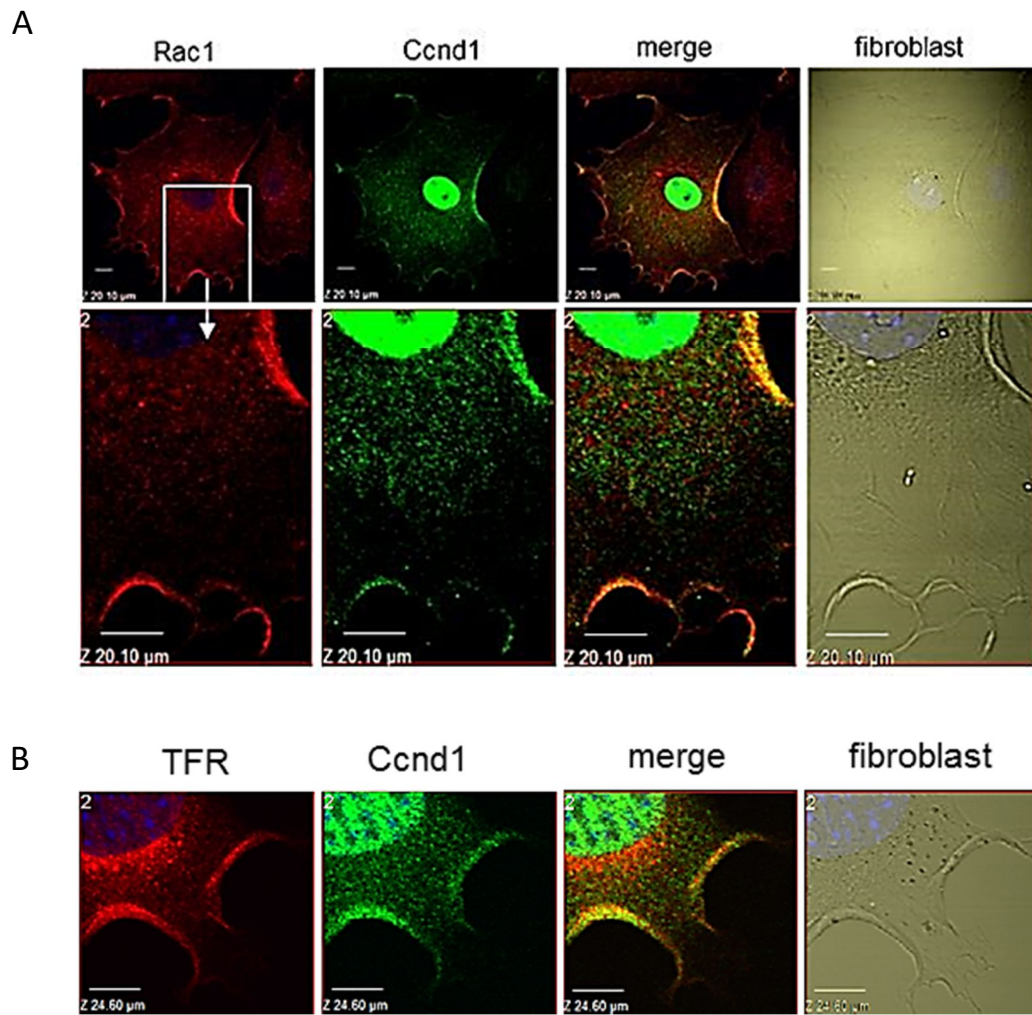


Figura 28. Ciclina D1 es troba localitzada en les ondulacions de la membrana cel·lular (ruffles) dels fibroblasts de ratolí. (A i B) Fibroblasts Ccnd1 +/+ es van fixar amb 4% de paraformaldehid i es van permeabilitzar amb 0.2% de tritó. Les imatges van ser adquirides mitjançant microscòpia confocal (barra d'escala = 10 µm). Els nuclis es van tenir amb Hoechst (blau). Per la immunofluorescència es van utilitzar els anticossos anti-Rac1 (clon 102, monoclonal de ratolí, vermell), anti-TFR (clon H68.4, monoclonal de ratolí, vermell) i anti-ciclina D1 (clon EP12, monoclonal de conill, verd).

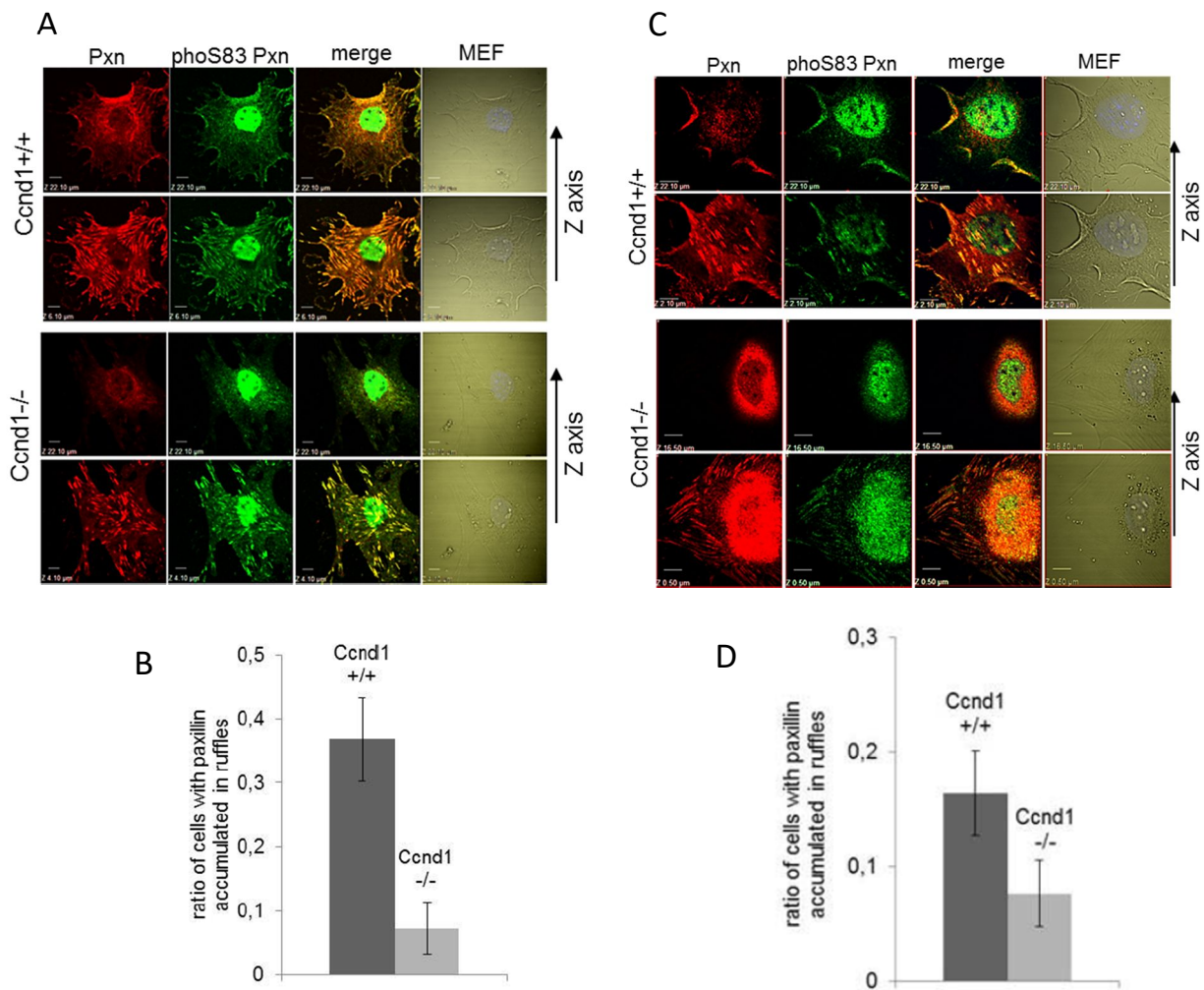


Figura 29. Els nivells de paxilina i paxilina fosforilada en la serina 83 estan disminuïts en les membranes ruffles dels fibroblasts de ratolí deficient en ciclina D1. (A) Immunofluorescència de fibroblasts immortalitzats Ccnd1 ^{+/+} i Ccnd1 ^{-/-}, fixats amb 4% de paraformaldehid i permeabilitzats amb 0.2% de tritó. Les imatges van ser adquirides mitjançant microscòpia confocal (barra d'escala = 10 μm). Els nuclis es van tenyir amb Hoechst (blau). Es van utilitzar els anticossos anti-paxilina (clon 349, monoclonal de ratolí, vermell) i anti-paxilina fosforilada en la serina 83 (policlonal de conill, verd). (B) Es representa la relació de cèl·lules, a partir de les imatges de A, que mostren acumulació de paxilina en les membranes ruffles respecte el total de cèl·lules. El nombre de cèl·lules comptades va ser n≥179. Les barres indiquen els límits de confiança per a una proporció (α=0.05). (C) Immunofluorescència de fibroblasts primaris Ccnd1 ^{+/+} i Ccnd1 ^{-/-} seguint el mateix procediment i els mateixos anticossos que en A. (D) Com en B, es representa la relació de cèl·lules que mostren acumulació de paxilina en les membranes ruffles, a partir de les imatges de C. El nombre de cèl·lules comptades va ser n≥328. Les barres d'error indiquen els límits de confiança per a una proporció (α=0.05).

6. EL COMPLEX CICLINA D1-CDK4 PURIFICAT DE LA MEMBRANA CEL·LULAR ÉS ACTIU

Per confirmar el resultat anterior, es va analitzar la localització de ciclina D1 i paxilina per fraccionament cel·lular utilitzant un *kit* de fraccionament subcel·lular de proteïnes (Thermo Scientific-Pierce). Utilitzant el protocol del fabricant, en fibroblasts de ratolí es va obtenir una fracció soluble que conté proteïnes citosòliques i nuclears solubles, i una fracció enriquida amb proteïnes de membrana tal com indiquen els marcadors de proteïnes de cada fracció, que són el receptor de la transferrina (TFR) com a marcador de membrana, la tubulina com a marcador citosòlic i el PCNA com a marcador de nucleoplasma (**Figura 30A**). Amb aquest fraccionament es va determinar que tant la ciclina D1 com la paxilina es troben en la fracció de membrana dels fibroblasts, tal com s'havia vist en les immunofluorescències. A continuació, per determinar si el complex ciclina D1-Cdk4 era actiu en la membrana i, per tant, era capaç de fosforilar la paxilina, es va realitzar el fraccionament cel·lular en cèl·lules tumorals R3327-5'A, que tenen alts nivells endògens de ciclina D1 en comparació amb els fibroblasts. Seguidament, es va immunoprecipitar ciclina D1 de la fracció de membrana (**Figura 30B**) després de comprovar el fraccionament amb els controls adients: PCNA com a marcador de nucleoplasma, GAPDH com a marcador citosòlic i TFR com a marcador de membrana (**Figura 30C**). Amb aquest complex ciclina D1-Cdk4 immunoprecipitat de la fracció de membrana es va realitzar un assaig quinasa *in vitro* utilitzant GST-Paxilina (pCYC2064) com a substrat (**Figura 30D**). Es pot observar com el complex ciclina D1-Cdk4 immunoprecipitat de la fracció de membrana és capaç de fosforilar la paxilina, i que aquesta fosforilació desapareix en presència de l'inhibidor específic de Cdk4/6 anomenat Palbociclib. D'aquesta manera, es demostra que ciclina D1 i paxilina es troben en la membrana, i que els complexos ciclina D1-Cdk4 purificats de la membrana cel·lular són actius i capaços de fosforilar la paxilina.

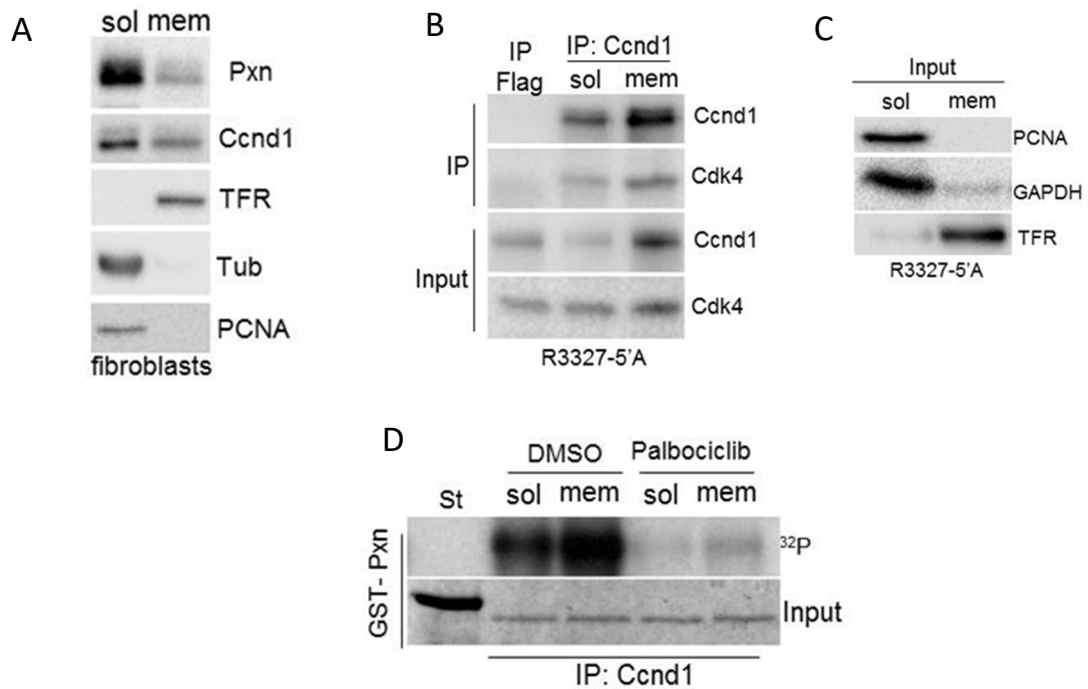


Figura 30. Fraccionament cel·lular dels complexos ciclina D1-Cdk4. (A) Fibroblasts de ratolí immortalitzats es van processar per a realitzar el fraccionament cel·lular, on es va obtenir una fracció soluble (sol) i una fracció de membrana (mem). Per western blot es va detectar ciclina D1 (Ccnd1) i paxilina (Pxn). Com a control del fraccionament es va utilitzar TFR com a marcador de membrana, tubulina (Tub) com a marcador citosòlic i PCNA com a marcador de nucleoplasma. (B) Es va realitzar el fraccionament de cèl·lules tumorals R3327-5'A, i es va immunoprecipitar ciclina D1 amb l'anticòs anti-ciclina D1 policlonal de conill (Millipore) tant de la fracció soluble (sol) com de la fracció de membrana (mem), i per western blot es va detectar ciclina D1 immunoprecipitada i Cdk4 co-immunoprecipitada en ambdues fraccions. Com a control de la immunoprecipitació, es va utilitzar l'anticòs anti-FLAG. (C) Control del fraccionament utilitzant PCNA com a marcador de nucleoplasma, GAPDH com a marcador citosòlic i TFR com a marcador de membrana. (D) El complex ciclina D1-Cdk4 immunoprecipitat de la fracció soluble i de la fracció de membrana obtingut en B es va utilitzar en un assaig quinasa *in vitro* fent servir GST-Paxilina com a substrat. Com a control d'especificitat, les dues reaccions es van tractar amb Palbociclib a 2 μ M, inhibidor de l'activitat Cdk4/6. La tinció del gel amb Coomassie s'utilitza com a control de càrrega (part inferior).

7. CÈL·LULES DEFICIENTS EN CICLINA D1 TENEN UNA ACTIVITAT RAC1 REDUÏDA EN LA MEMBRANA CEL·LULAR

Les cèl·lules deficientes en ciclina D1 mostren una morfologia més estesa sobre la placa que les cèl·lules *wild type* i també tenen un major nombre de focus d'adhesió amb majors nivells de paxilina fosforilada en tirosines (Neumeister et al., 2003; Li et al., 2006a). En aquest treball s'ha observat que hi ha una menor acumulació de paxilina en les membranes de les cèl·lules deficientes en ciclina D1 (**Figura 29**). Aquesta disminució podria ser, de fet, una conseqüència dels canvis morfològics d'aquestes cèl·lules, com ara una reducció de les membranes *ruffles*. La GTPasa Rac1 és la principal inductora de membranes *ruffles* i es requereix per a la migració i la invasió cel·lulars (Chen et al., 2004), i paxilina indueix migració i activació de Rac1 a través de diversos mecanismes que promouen el reclutament a les membranes cel·lulars de GEFs associats a l'activitat Rac1 (Deakin and Turner, 2008). Ja que el complex ciclina D1-Cdk4 regula la fosforilació de la paxilina i la invasió cel·lular, es va plantejar la hipòtesi de que ciclina D1-Cdk4 pot incrementar l'activitat Rac1 a través de la fosforilació de la paxilina i, llavors, una reducció dels nivells de ciclina D1 podria donar lloc a una reducció de les membranes *ruffles* i, com a conseqüència, una disminució de la capacitat invasiva de les cèl·lules ja que aquestes tindrien menys activitat Rac1. Per tant, es va analitzar tant la localització com l'activitat de Rac1 en cèl·lules deficientes en ciclina D1.

D'entrada, per immunofluorescència es va observar que els fibroblasts deficientes en ciclina D1 tenien menys acumulació de Rac1 en els *ruffles* en comparació amb els fibroblasts *wild type*, tant en fibroblasts immortalitzats (**Figures 31A i 31B**) com en fibroblasts primaris (**Figures 31C i 31D**) de ratolí.

També es van transfectar fibroblasts immortalitzats *wild type* i deficientes en ciclina D1 amb el plasmidi YFP-PBD que actua com un biosensor fluorescent de l'activitat Rac1 i és molt utilitzat en la tècnica FRET. La Rac1 unida a GTP, i per tant activa, s'uneix al domini

PBD de PAK1 i aquesta interacció proporciona un bon mètode per tal de localitzar l'activació de Rac1, ja que el domini PBD fusionat a YFP ens permetrà observar on es localitza el Rac1-GTP (Hoppe and Swanson, 2004). Quaranta-vuit hores després de la transfecció, es van plantar les cèl·lules sobre fibronectina durant una hora i es van fixar amb paraformaldehid. Es va observar una clara acumulació del senyal YFP a les membranes dels fibroblasts *Ccnd1* *+/+* en un 35% del total de cèl·lules transfectades (**Figures 32A i 32B**). És important destacar que gairebé cap cèl·lula *Ccnd1* *-/-* mostrava senyal YFP a les membranes, indicant que la presència de Rac1 activa (YFP-PBD) en la membrana cel·lular depenia de la presència de ciclina D1. Es van fer immunofluorescències d'aquestes cèl·lules i aquest senyal YFP co-localitzava amb Rac1 (**Figura 32C**) i amb ciclina D1 (**Figura 32D**), confirmant que el senyal YFP correspon a Rac1 i que ciclina D1 es localitza en les membranes *ruffles* juntament amb Rac1. A més, realitzant un assaig d'activitat Rac1 en fibroblasts de ratolí, es va detectar una reducció del 40% dels nivells de Rac1-GTP en fibroblasts deficients en ciclina D1 respecte als fibroblasts *wild type*, sense que els nivells totals de Rac1 canviessin en aquestes cèl·lules (**Figura 33A**).

Tots aquests resultats suggereixen de forma evident que la GTPasa Rac1 està activa en les membranes de fibroblasts *wild type* en condicions de *spreading*, però no ho està en cèl·lules deficients en ciclina D1. Per tant, es pot relacionar la disminució de paxilina fosforilada en la serina 83 en aquests fibroblasts *Ccnd1* *-/-* amb aquesta disminució de l'activitat Rac1 en les membranes cel·lulars.

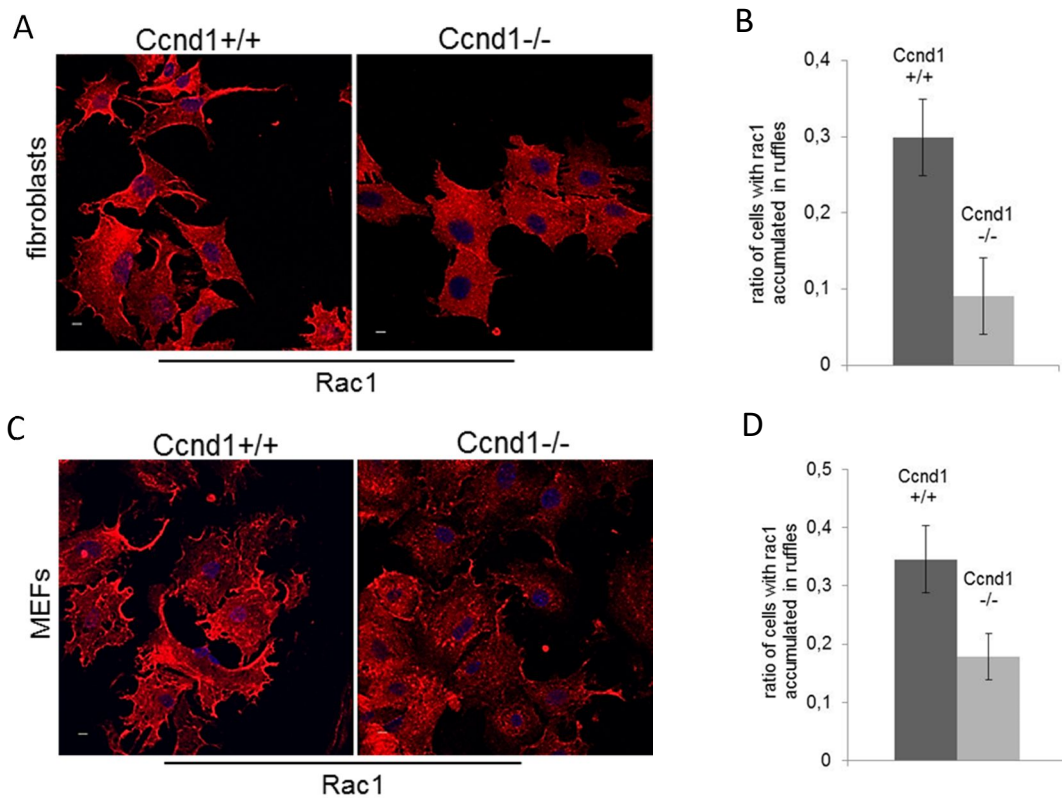


Figura 31. Els fibroblasts de ratolí deficientes en ciclina D1 mostren menor localització de Rac1 en la membrana cel·lular. (A) Fibroblasts immortalitzats Ccnd1 +/+ i Ccnd1 -/- es van fixar amb 4% de paraformaldehid i es van permeabilitzar amb 0.2% de tritó. Les imatges es van adquirir mitjançant microscòpia confocal (barra d'escala = 10 μ m). Els nuclis es van tenyir amb Hoechst (blau) i es va utilitzar l'anticòs anti-Rac1 (clon 102, monoclonal de ratolí, vermell). **(B)** Es representa la proporció de cèl·lules amb Rac1 acumulada en la membrana respecte el nombre total de cèl·lules, a partir de les imatges obtingudes en A. Les barres d'error indiquen els límits de confiança per a una proporció ($\alpha=0.05$). **(C)** Fibroblasts primaris Ccnd1 +/+ i Ccnd1 -/- tractats de la mateixa manera que en A. **(D)** Es representa la proporció de cèl·lules amb Rac1 acumulada en la membrana respecte el nombre total de cèl·lules, a partir de les imatges obtingudes en C. Les barres d'error indiquen els límits de confiança per a una proporció ($\alpha=0.05$).

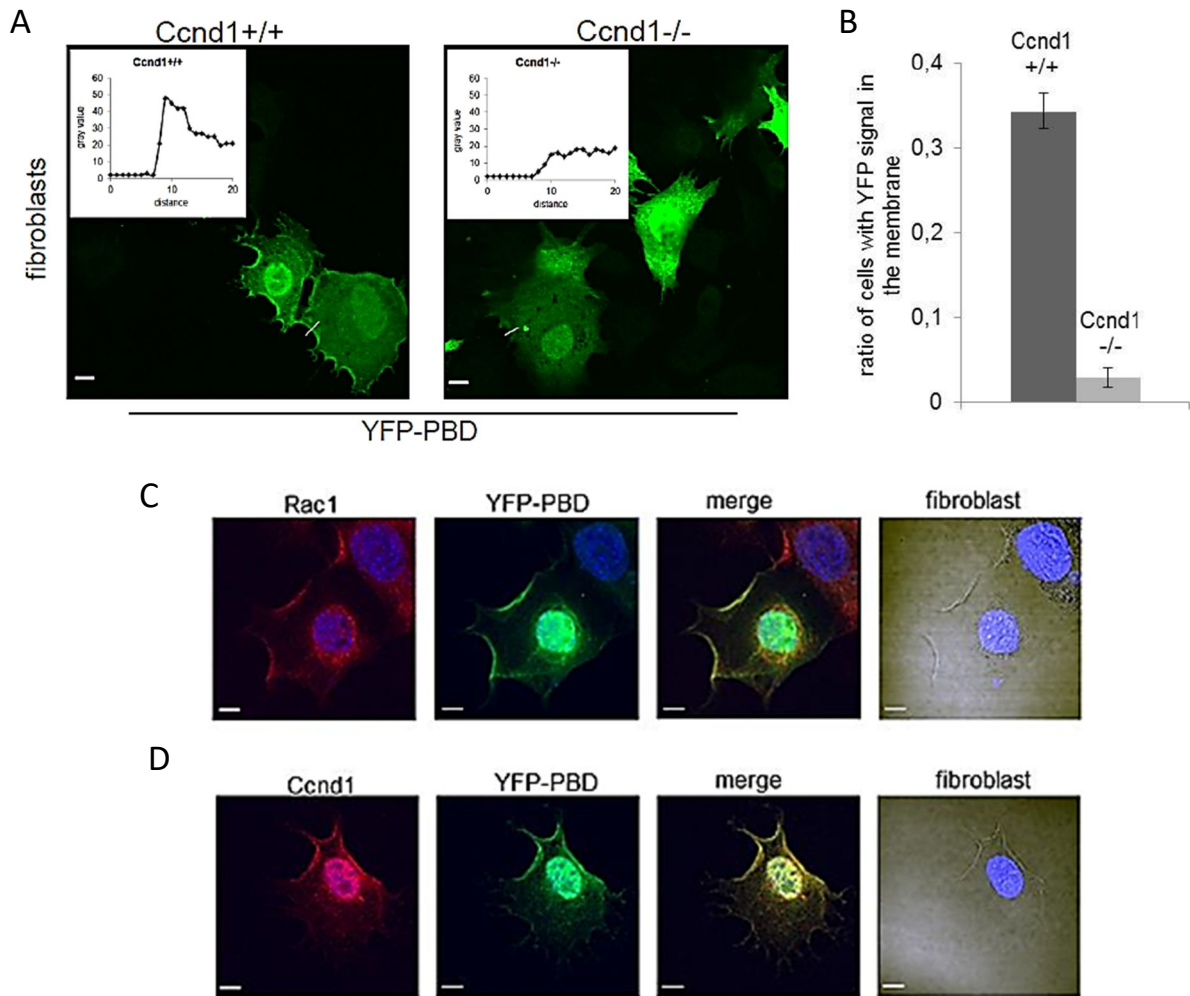


Figura 32. Cèl·lules deficientes en ciclina D1 no presenten Rac1 activa en la membrana cel·lular. (A) Es van transfectar fibroblasts immortalitzats de ratolí Ccnd1 +/+ i Ccnd1 -/- amb YFP-PBD (biosensor de Rac1 activa). Quaranta-vuit hores després de la transfecció es van sembrar les cèl·lules en plaques recobertes amb 5 µg/mL de fibronectina durant una hora i es van fixar en gel amb 2% de paraformaldehid durant 10 minuts per evitar la pèrdua de senyal de YFP. Es van realitzar diferents imatges amb el microscopi Olympus IX71 i es va mesurar el senyal de YFP amb el programa Image J per detectar l'acumulació de senyal de YFP a la membrana. Es mostren dues mesures representatives (barra d'escala = 10 µm). (B) Es representa la relació de cèl·lules que mostren acumulació de senyal YFP en la membrana respecte el nombre total de cèl·lules transfectades, calculada a partir de dos experiments independents (mitjana ± SD). Les cèl·lules comptades van ser n≥200. (C) Es van utilitzar les mateixes cèl·lules Ccnd1 +/+ de A per fer una immunofluorescència, permeabilitzant amb 0.2% de tritó. Les imatges es van adquirir amb microscòpia confocal (barra d'escala = 10 µm) i els nuclis es van tenyir amb Hoechst (blau). Els anticossos utilitzats van ser anti-Rac1 (clon 102, monoclonal de ratolí, vermell) i anti-GFP (Alexa Fluor 488 de conill, verd). (D) Com en C, però utilitzant els anticossos anti-ciclina D1 (clon EP12, monoclonal de conill, vermell) i anti-GFP (clon 3E6, monoclonal de ratolí, verd).

En les cèl·lules tumorals R3327-5'A es va reprimir l'expressió de ciclina D1 per RNA d'interferència (*knock down*) i es va veure que els nivells de Rac1 activa depenien de ciclina D1, ja que la transfecció d'aquestes cèl·lules amb la ciclina D1 humana (pCYC291) augmentava els nivells de Rac1-GTP respecte les cèl·lules control amb l'expressió de ciclina D1 reprimida (**Figura 33B**). No obstant, la co-transfecció de ciclina D1 humana amb un al·lel mutant de paxilina no fosforilable S83A S178A (pCYC2105) no va tenir cap efecte sobre els nivells de Rac1 activa ja que no van augmentar respecte el control (**Figura 33B**), indicant que l'augment de l'activitat Rac1 podria dependre de la fosforilació de paxilina. Es va observar que tant la paxilina *wild type* (pCYC2066) com l'al·lel de paxilina no fosforilable S83A S178A tenien uns nivells similars de sobreexpressió respecte la paxilina endògena de les cèl·lules tumorals R3327-5'A i que la ciclina D1 humana transfectada també mostrava uns bons nivells d'expressió (**Figura 33C**). També es va veure que l'expressió de l'al·lel fosfomimètic de paxilina S83E S178E (pCYC2103) va restaurar l'activitat Rac1 en aquestes cèl·lules R3327-5'A amb l'expressió de ciclina D1 reprimida (**Figura 33D**). Per tant, aquests resultats indiquen que l'activació de la GTPasa Rac1 per ciclina D1 està regulada per la fosforilació de la paxilina. A més, la disminució de l'activitat Rac1 podria ser responsable de les alteracions morfològiques en les cèl·lules deficientes en ciclina D1.

Si ciclina D1 exerceix els seus efectes sobre la migració i la invasió a través d'una ruta que condueix a la regulació de Rac1, el que s'espera és que una hiperactivació de Rac1 ha de rescatar el fenotip d'invasió i adhesió de les cèl·lules deficientes en ciclina D1. En conseqüència, es va provar si l'expressió de l'al·lel Rac1 hiperactiu (Rac1 Q61L, pCYC2134) era capaç de recuperar el potencial invasiu de les cèl·lules tumorals R3327-5'A amb l'expressió de ciclina D1 reprimida, i es va observar que aquest era el cas (**Figura 33E**). Es va veure que les cèl·lules *knock down* de ciclina D1 tenien menys capacitat invasiva que les cèl·lules control, i aquesta es recuperava amb l'expressió de l'al·lel hiperactiu de Rac1 Q61L. A més, l'expressió de l'al·lel hiperactiu Rac1 Q61L produïa un retard en la capacitat d'estendre's (*spreading*) dels fibroblasts deficientes en ciclina D1 d'una manera comparable a les cèl·lules transfectades amb ciclina D1 (**Figura 33F**). En conjunt, tots aquests resultats suggereixen que ciclina D1 regula la migració i la invasió cel·lulars a través d'una cascada d'esdeveniments que condueixen a l'activació de Rac1 a través de la fosforilació de paxilina.

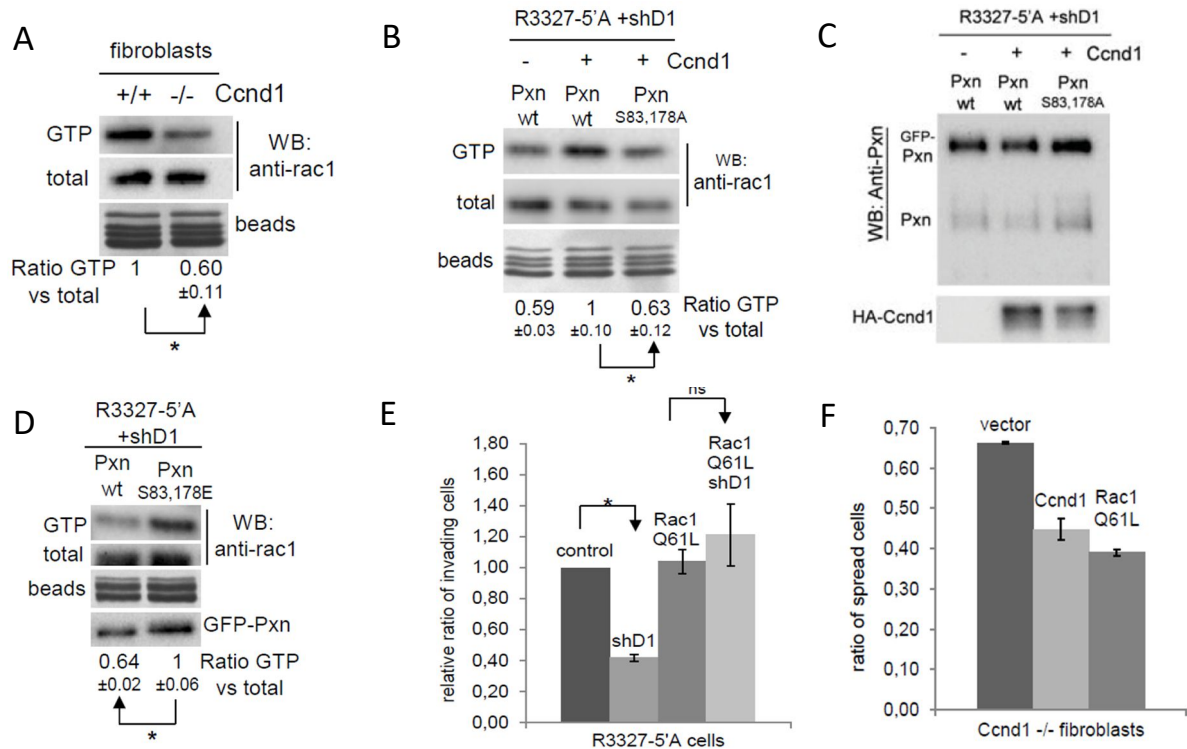


Figura 33. Les cèl·lules deficientes en ciclina D1 mostren una activitat Rac1 reduïda, i aquesta activitat Rac1 promou la invasió i disminueix la capacitat d'adhesió. (A) Assaig d'activitat Rac1 en fibroblasts de ratolí Ccnd1 +/+ i Ccnd1 -/-. La Rac1 unida a GTP es va purificar per afinitat amb les beads PAK1-PBD (Cell Biolabs) i es va detectar per western blot amb l'anticòs anti-Rac1. S'han realitzat 4 experiments independents i s'indica la quantificació de Rac1-GTP relativa a la Rac1 total de l'extracte soluble, i l'activitat Rac1 dels fibroblasts Ccnd1 -/- s'expressa en relació als fibroblasts Ccnd1 +/+ (mitjana ± SEM). La significació dels valors es va determinar mitjançant un T-test (* indica $p < 0.05$). **(B)** Cèl·lules R3327-5'A, infectades prèviament amb RNA d'interferència contra ciclina D1 (shD1), es van transfectar amb GFP-Paxilina o amb l'al·lel no fosforilable GFP-Paxilina S83A S178A, i amb la ciclina D1 humana, i es van utilitzar en l'assaig d'activitat Rac1 com en A. Es mostren els valors relatius de Rac1-GTP respecte a la Rac1 total, i s'expressen com a mitjana ± SEM de 4 experiments independents. La significació dels valors es va determinar mitjançant un T-test (* indica $p < 0.05$). **(C)** Nivells d'expressió de paxilina endògena de GFP-Paxilina transfectada i de HA-Ciclina D1 transfectada de les mostres de B, detectats per western blot amb els anticossos anti-Paxilina (part superior) i anti-HA (part inferior). **(D)** Cèl·lules R3327-5'A infectades prèviament amb RNA d'interferència contra ciclina D1 (shD1) es van transfectar amb GFP-Paxilina o amb l'al·lel fosfomimètic GFP-Paxilina S83E S178E, i es van utilitzar en l'assaig d'activitat Rac1 igual que en A i B. Els valors relatius de Rac1-GTP respecte a la Rac1 total s'expressen com a mitjana ± SEM de 3 experiments independents. La significació dels valors es va determinar mitjançant un T-test (* indica $p < 0.05$). En la part inferior es mostren els nivells d'expressió de GFP-Paxilina transfectada. **(E)** Assaig d'invasió de cèl·lules R3327-5'A infectades primerament amb un RNA d'interferència contra ciclina D1 (shD1) o amb un RNA d'interferència control, i posteriorment amb un vector buit o amb l'al·lel hiperactiu de Rac1 (Rac1 Q61L). Els valors relatius s'expressen com a mitjana ± SEM de 3 experiments independents. La significació dels valors es va determinar mitjançant ANOVA d'una via i Tukey-HSD post-test (* indica $p < 0.05$, ns vol dir que no és significatiu). **(F)** Assaig de spreading de fibroblasts Ccnd1 -/- co-transfectats amb GFP i, o bé amb la ciclina D1 humana, o amb l'al·lel hiperactiu Rac1 Q61L o amb un vector buit. Es representa la proporció de cèl·lules verdes amb un fenotip estès respecte el total de cèl·lules verdes de 2 experiments independents (mitjana ± SD).

8. LA FOSFORILACIÓ DE PAXILINA EN LES SERINES 83 I 178 RESTAURA EL POTENCIAL METASTÀTIC DE LES CÈL·LULES DEFICIENTS EN CICLINA D1

S'ha descrit que ciclina D1 és un marcador de mal pronòstic en càncers i s'ha associat amb la metastasi en diferents estudis clínics (Drobnjak et al., 2000). Conseqüentment, cèl·lules deficientes en ciclina D1 mostren un potencial metastàtic reduït (Huang et al., 2009; Zheng et al., 2013). Ja que tots els resultats d'aquest treball apunten a la paxilina com a mediador dels efectes deguts a ciclina D1 en l'adhesió i la migració cel·lulars, es va voler provar si l'al·lel fosfomimètic de paxilina era capaç de rescatar el baix potencial metastàtic de les cèl·lules deficientes en ciclina D1. Amb aquesta finalitat, es va realitzar un assaig de metastasi *in vivo* mitjançant la injecció de cèl·lules tumorals R3327-5'A en el torrent sanguini de ratolins immunodeficients de 12 setmanes d'edat, on les cèl·lules inoculades expressaven l'al·lel de paxilina *wild type* (pCYC2084) o l'al·lel fosfomimètic de paxilina S83E S178E (pCYC2100). Els animals es van sacrificar dues setmanes després de la injecció, i els seus pulmons van ser examinats macroscòpicament i microscòpicament per tal d'analitzar les metastasis que s'havien produït (**Figura 34A**). La repressió de l'expressió de ciclina D1 per RNA d'interferència va reduir dràsticament les metastasis associades a les cèl·lules R3327-5'A. Altrament, l'expressió de l'al·lel fosfomimètic de paxilina S83E S178E va rescatar el potencial metastàtic d'aquestes cèl·lules deficientes en ciclina D1 (**Figura 34B**). La ciclina D1 és important per mantenir una alta taxa de proliferació en les línies cel·lulars transformades i, com s'esperava, la repressió de l'expressió de ciclina D1 reduïa a la meitat la capacitat proliferativa de les cèl·lules R3327-5'A. No obstant això, es va observar una reducció similar en la proliferació de les cèl·lules que expressen l'al·lel fosfomimètic de paxilina en absència de ciclina D1 (**Figura 34C**). Per tant, el rescat del potencial metastàtic d'aquest al·lel fosfomimètic no pot atribuir-se a canvis en la proliferació d'aquestes cèl·lules. D'altra banda, com es pot veure en la immunohistoquímica del teixit pulmonar, les masses tumorals mostren alts nivells de ciclina D1 nuclear i citoplasmàtica i de paxilina fosforilada en la serina 83 respecte al teixit sa (**Figura 34D**), indicant que ambdues proteïnes s'acumulen

en el tumor. Amb tots aquests resultats, proposem que la fosforilació de paxilina pel complex ciclina D1-Cdk4 és un nou mecanisme pel qual ciclina D1 promou la invasió i la metastasi.

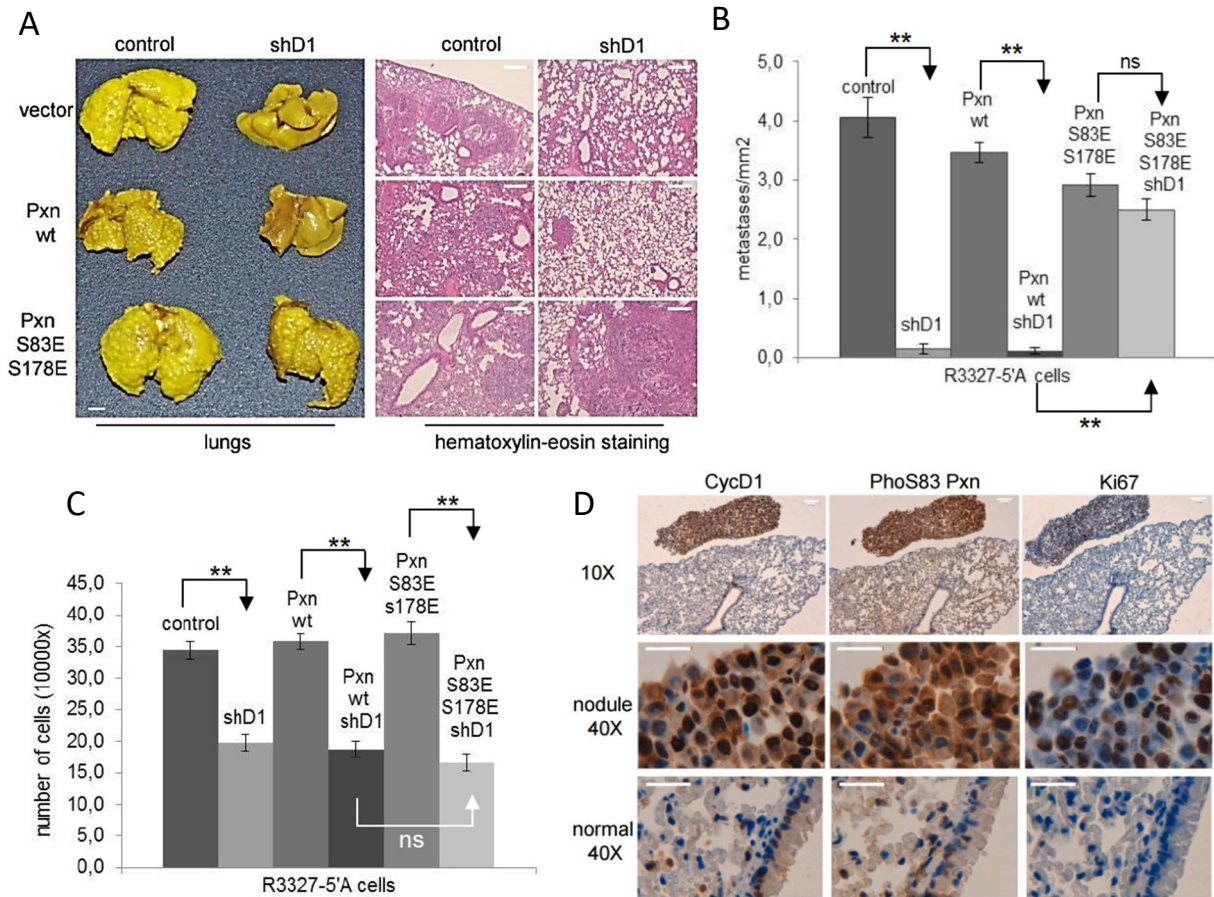


Figura 34. L'al·lel fosfomimètic de paxilina rescata el potencial metastàtic de les cèl·lules tumorals deficientes en ciclina D1. (A) En l'assaig de metastasi, cèl·lules tumorals R3327-5'A es van infectar amb RNA d'interferència contra ciclina D1 (shD1) o amb RNA d'interferència control, i posteriorment es van infectar amb un vector buit, amb la paxilina wild type o amb l'al·lel fosfomimètic de paxilina S83E S178E. Es van inocular $5 \cdot 10^5$ cèl·lules R3327-5'A co-infectades en ratolins immunodeficients (4 animals per condició) per mitjà d'injecció intravenosa retroorbital, i els animals es van sacrificar quinze dies més tard. Es van recuperar els pulmons, es van fixar en solució de Bouin (barra d'escala = 3 mm), i una mostra es va incloure en parafina per la tinció d'hematoxilina-eosina (barra d'escala = 200 μ m). (B) La capacitat metastàtica d'aquestes cèl·lules en el pulmó es va avaluar com a nombre de metastasis per mm^2 , i els resultats de A s'expressen com a mitjana \pm SEM, on els valors de significació es van determinar mitjançant ANOVA d'una via i Tukey-HSD post-test (** indica $p < 0.01$, ns vol dir que no és significatiu). (C) En l'assaig de proliferació, es van sembrar $2 \cdot 10^4$ cèl·lules R3327-5'A co-infectades, utilitzades en l'assaig de metastasi, i es van incubar en medi DMEM amb 10% de FBS a 37°C. Després de tres dies es va determinar el nombre de cèl·lules. L'experiment es va repetir cinc vegades i les dades es representen com a mitjana \pm SEM, on els valors de significació es van determinar mitjançant ANOVA d'una via i Tukey-HSD post-test (** indica $p < 0.01$, ns vol dir que no és significatiu). (D) Un tros de biòpsia del pulmó control de A es va incloure en parafina i es va processar per realitzar immunohistoquímiques per detectar ciclina D1, paxilina fosforilada en la serina 83 i Ki-67. Es mostren diferents augments de teixit tumoral i de teixit sa (barra d'escala = 25 μ m).

CAPÍTOL 2:

**Caracterització de la ciclina D1
citoplasmàtica com a marcador
d'invasivitat en el càncer**

1. L'ADDICIÓ DE LA CUA DE FARNESILACIÓ A LA CICLINA D1 AUGMENTA LA SEVA LOCALITZACIÓ A LA MEMBRANA PLASMÀTICA

Sabem per treballs previs que el complex ciclina D1-Cdk4 s'uneix a Rgl2, que és un GEF de les GTPases Ral (Fernández et al., 2011), i aquestes GTPases incrementen la motilitat cel·lular. Es va plantejar la hipòtesi que el complex ciclina D1-Cdk4 promou la invasió cel·lular a través de l'activació de Ral via Rgl2, a més de fer-ho a través de paxilina i Rac1 tal com hem vist en el capítol 1. Per a l'activació de Ral, Rgl2 ha de ser reclutat a la membrana a través de la GTPasa Ras. Un al·lel mutant de Rgl2 que conté el motiu d'ancoratge a la membrana de K-Ras promou l'activació constitutiva de la GTPasa Ral (Wolthuis et al., 1997). A més, s'ha vist que la ciclina D1 s'associa a la membrana plasmàtica de fibroblasts i de cèl·lules tumorals MFE quan aquestes s'estenen i s'estan adherint a la matriu extracel·lular (**Figures 35A i 35B**).

Amb aquests precedents, es va decidir construir una ciclina D1 amb el mateix motiu d'ancoratge a la membrana de K-Ras fusionat a l'extrem C-terminal, per provar si l'associació forçada de ciclina D1 a la membrana plasmàtica podria induir la invasió i la metàstasi de les cèl·lules tumorals, i així avaluar la funció citoplasmàtica de ciclina D1 de manera independent de la funció nuclear. Per construir aquest al·lel de ciclina D1 associat a la membrana, es van fusionar 11 aminoàcids que contenen la seqüència d'ancoratge de la proteïna humana K-Ras, en l'extrem 3' de la seqüència codificant de la ciclina D1. Aquesta seqüència d'ancoratge conté un domini polibàsic que sembla conduir la proteïna a la membrana carregada negativament i un motiu CAAX amb un residu de cisteïna per unir una cua de farnesilació (Hancock, 2003) (**Figura 36A**). Per comprovar aquesta nova construcció de ciclina D1, primerament es van transfectar cèl·lules de la línia cel·lular endometrial MFE amb els al·lells HA-Ciclina D1 (*wild type*, pCYC396) o HA-Ciclina D1-CAAX (associada a la membrana, pCYC2057) i es van incubar durant quaranta-vuit hores. Després, es van fixar les cèl·lules i es van processar per realitzar una immunofluorescència utilitzant l'anticòs

anti-HA per visualitzar la localització de la ciclina D1 exògena transfectada. Es va observar que l'al·lel *wild type* de ciclina D1 es localitzava en el nucli i el citoplasma mentre que l'al·lel ciclina D1-CAAX es va localitzar principalment a la membrana i el citoplasma de les cèl·lules (**Figura 36B**). Es va repetir aquest experiment però infectant aquesta línia cel·lular endometrial MFE amb lentivirus que contenen els al·lells HA-Ciclina D1 (pCYC801) o HA-Ciclina D1-CAAX (pCYC2062). Com abans, també es va observar que l'al·lel *wild type* de ciclina D1 es localitzava en el nucli i el citoplasma mentre que l'al·lel ciclina D1-CAAX es localitzava principalment a la membrana i el citoplasma de les cèl·lules infectades (**Figura 36C**). D'altra banda, es va determinar que només l'al·lel ciclina D1-CAAX co-localitzava clarament a la membrana amb la GTPasa RalA, que conté un motiu de farnesilació i es localitza *per se* a la membrana. Aquests resultats indiquen que l'addició del motiu de farnesilació de K-Ras a la ciclina D1 pot segrestar eficaçment aquesta ciclina a la membrana plasmàtica.

Per confirmar aquest resultat, es va analitzar la localització dels al·lells de ciclina D1 *wild type* i de ciclina D1 associada a la membrana (Ccnd1-CAAX) per fraccionament cel·lular. Les cèl·lules de la línia cel·lular endometrial Ishikawa es van infectar amb ciclina D1 i ciclina D1-CAAX i es van processar pel fraccionament cel·lular utilitzant un *kit* de fraccionament subcel·lular de proteïnes (Thermo Scientific-Pierce). Utilitzant el protocol del fabricant, es va obtenir una fracció soluble que conté les proteïnes solubles citosòliques i nuclears i una fracció de membrana tal com s'indica amb els controls de les proteïnes de referència, que són la tubulina com a marcador citosòlic, el receptor de la transferrina com a marcador de membrana i el PCNA com a marcador de nucleoplasma (**Figura 36E**). Es va observar que l'al·lel ciclina D1-CAAX es va enriquir àmpliament en la fracció de membrana si es compara amb l'al·lel de ciclina D1 *wild type*, que predomina en la fracció soluble (**Figura 36D**). Curiosament, la ciclina D1 *wild type* endògena i exògena també es va veure en la fracció de membrana, tot i que amb uns nivells força reduïts, d'acord amb treballs previs que suggereixen que ciclina D1 interactua amb proteïnes associades a la membrana com filamina A o RalA (Zhong et al., 2010; Fernández et al., 2011). En aquests treballs, es suggereix que les funcions citoplasmàtiques de ciclina D1 depenen de Cdk4. Per aquesta raó, es va voler veure si Cdk4 també era present en la fracció de membrana. Com era

d'esperar, una porció de Cdk4 es trobava a la membrana i també es va enriquir després de l'expressió del gen ciclina D1-CAAX (**Figura 36F**). Tots aquests resultats indiquen que l'expressió de l'al·lel ciclina D1-CAAX associat a la membrana promou l'acumulació de complexos ciclina D1-Cdk4 en la membrana.

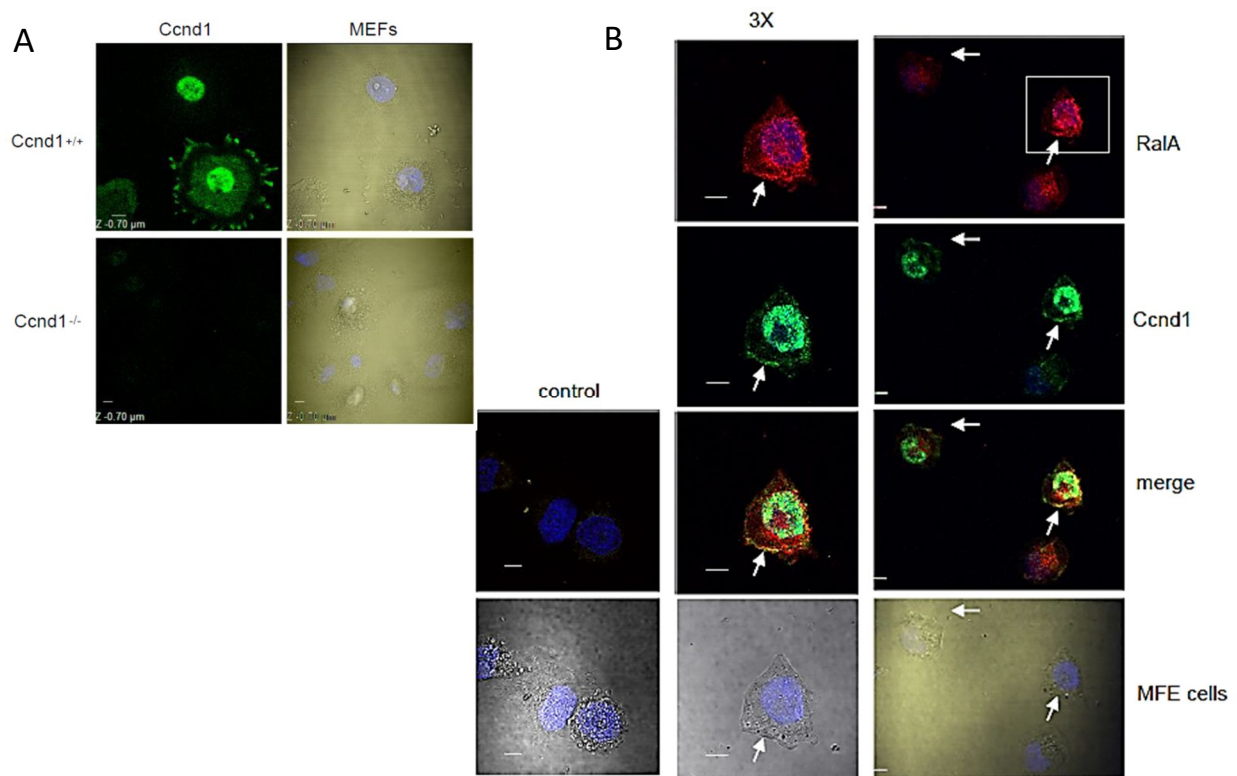


Figura 35. La ciclina D1 s'associa a les membranes dels fibroblasts i de les cèl·lules tumorals durant l'extensió sobre la matriu extracel·lular. (A) Fibroblasts immortalitzats de ratolí *Ccnd1* ^{+/+} i *Ccnd1* ^{-/-} sembrats sobre fibronectina, fixats amb 4% de paraformaldehid i permeabilitzats amb 0.2% de tritó. Les imatges van ser adquirides mitjançant microscòpia confocal (barra d'escala = 10 µm). Els nuclis estan tenyits amb Hoechst (blau). Per la immunofluorescència s'ha utilitzat l'anticòs anti-ciclina D1 (clon EP12, monoclonal de conill, verd). **(B)** Cèl·lules tumorals MFE processades igual que en A. S'han utilitzat els anticossos anti-ciclina D1 (clon EP12, monoclonal de conill, verd) i anti-RalA (clon 8, monoclonal de ratolí, vermell). Es mostra una cèl·lula ampliada 3x. Les fletxes indiquen la presència de ciclina D1 a la membrana co-localitzant amb RalA. Les cèl·lules incubades només amb els anticossos secundaris Alexa488 i Alexa594 es van utilitzar com a control.

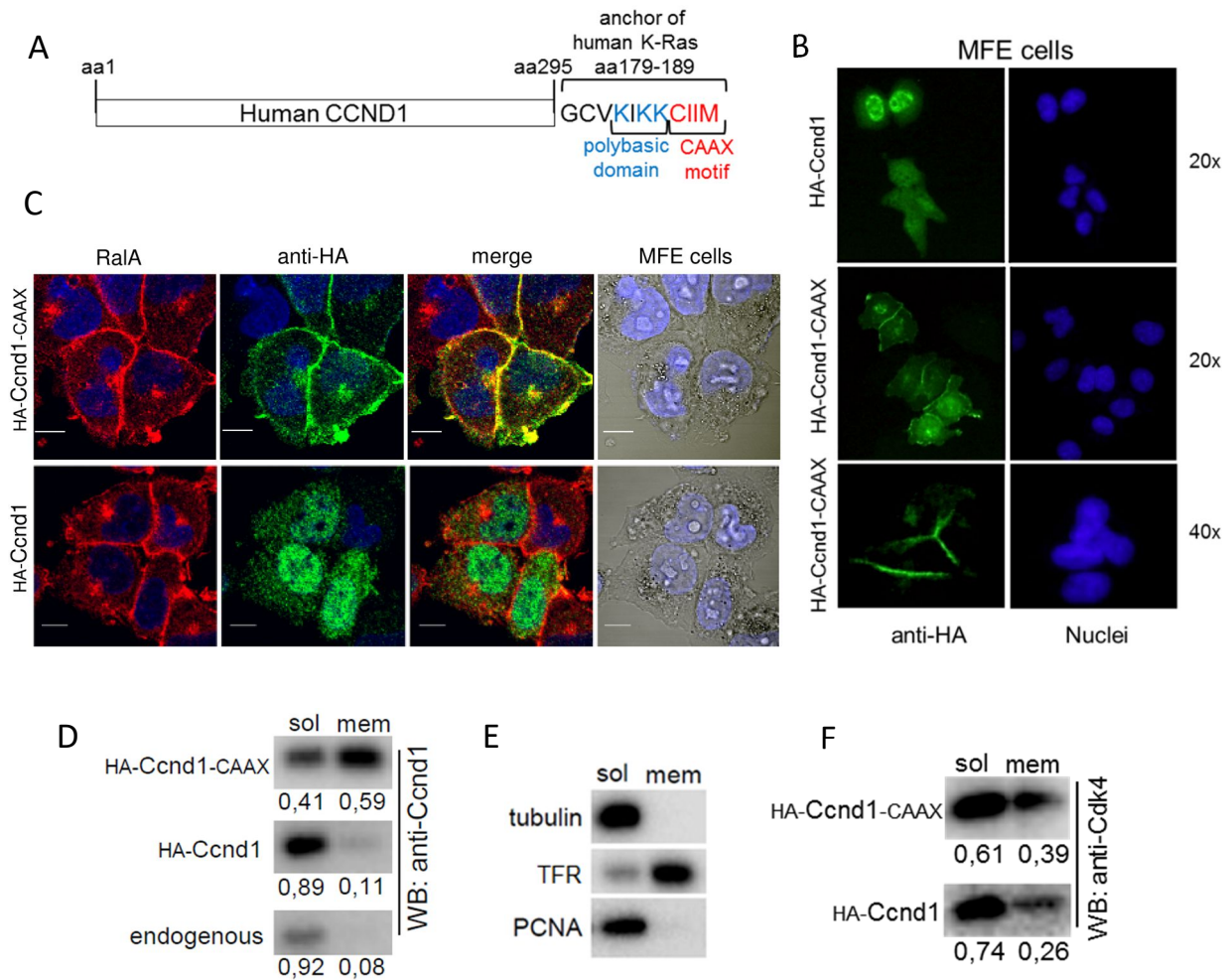


Figura 36. L'al·lel ciclina D1-CAAX es localitza en les membranes de les cèl·lules tumorals. (A) Representació esquemàtica de la fusió C-terminal del motiu d'ancoratge de la proteïna K-Ras humana amb la ciclina D1. (B) Immunofluorescència de cèl·lules tumorals MFE transfectades amb HA-Ciclina D1 o HA-Ciclina D1-CAAX, fixades amb 4% de paraformaldehid i permeabilitzades amb 0.2% de tritó. Les imatges van ser adquirides amb el microscopi Olympus IX71. Els nuclis es van tenyir amb Hoechst (blau). L'anticòs utilitzat va ser anti-HA (clon 3F10, monoclonal de rata, verd). (C) Cèl·lules MFE infectades amb HA-Ciclina D1 o HA-Ciclina D1-CAAX, fixades amb 4% de paraformaldehid i permeabilitzades amb 0.2% de tritó. Les imatges van ser adquirides mitjançant microscòpia confocal (barra d'escala = 10 µm). Els nuclis es van tenyir amb Hoechst (blau). Per la immunofluorescència s'han utilitzat els anticossos anti-HA (clon 3F10, monoclonal de rata, verd) i anti-RalA (clon 8, monoclonal de ratolí, vermell). (D) Cèl·lules Ishikawa infectades amb HA-Ciclina D1 o HA-Ciclina D1-CAAX i recollides quaranta-vuit hores després de ser sembrades per tal de realitzar un fraccionament cel·lular. Es van analitzar les fraccions per mitjà de western blot per detectar ciclina D1 en la fracció soluble i en la de membrana, on es mostra la quantificació dels nivells de ciclina D1 feta amb el programa Image-Lab 4.0.1 de Bio-Rad. (E) Control del fraccionament cel·lular a través de diferents marcadors: tubulina com a marcador citosòlic, TFR com a marcador de membrana i PCNA com a marcador de nucleoplasma. (F) Distribució de Cdk4 en la fracció soluble i en la fracció de membrana. Es mostra la quantificació dels nivells de Cdk4 feta amb el programa Image-Lab 4.0.1 de Bio-Rad.

2. EL RECLUTAMENT DE CICLINA D1 A LA MEMBRANA PLASMÀTICA AUGMENTA LA INVASIVITAT DE LES CÈL·LULES TUMORALS

En un treball realitzat en col·laboració amb el grup d'Anatomia Patològica del HUAV, hem analitzat la localització de ciclina D1 en càncers de teixits humans (Fusté et al., 2016). Els resultats mostren una correlació entre els nivells citoplasmàtics de ciclina D1 i el nivell d'invasivitat de les cèl·lules tumorals. Per aquesta raó es va analitzar si l'al·lel de ciclina D1 associat a la membrana podria augmentar significativament la invasivitat de les cèl·lules tumorals en comparació amb l'al·lel *wild type* de ciclina D1. Es van utilitzar cèl·lules tumorals R3327-5'A que tenien l'expressió de ciclina D1 reprimida per RNA d'interferència (*knock down*) i es van infectar amb lentivirus que contenen els al·lells humans HA-Ciclina D1 *wild type* (pCYC801), HA-Ciclina D1-CAAX (pCYC2062), HA-Ciclina D1 K112E-CAAX (pCYC2063), o un vector buit. Després de cinc dies de creixement en medi complet, les cèl·lules es van processar per realitzar l'assaig d'invasió *in vitro* per veure el seu potencial invasiu, tot i que abans es va comprovar l'expressió de proteïna dels diferents al·lells de ciclina D1 per *western blot* (**Figura 37C**). Es va observar que l'expressió de ciclina D1-CAAX induïa significativament la invasivitat de les cèl·lules R3327-5'A *knock down* de ciclina D1 en comparació amb l'expressió de l'al·lel de ciclina D1 *wild type* o el vector buit (**Figura 37A**), tal com es pot veure en les imatges representatives del Matrigel (**Figura 37B**). Anteriorment, s'havia descrit que la participació de ciclina D1 en la regulació de la invasió cel·lular era dependent de Cdk4 (Li et al., 2014). D'acord amb aquest resultat, també es va observar que l'expressió de l'al·lel ciclina D1 K112E-CAAX, que forma un complex inactiu amb Cdk4, era incapaç de promoure la invasió de les cèl·lules tumorals *knock down* de ciclina D1. De tots aquests resultats, es conclou que el segrest d'un complex actiu ciclina D1-Cdk4 en la membrana cel·lular augmenta el potencial invasiu de les cèl·lules tumorals.

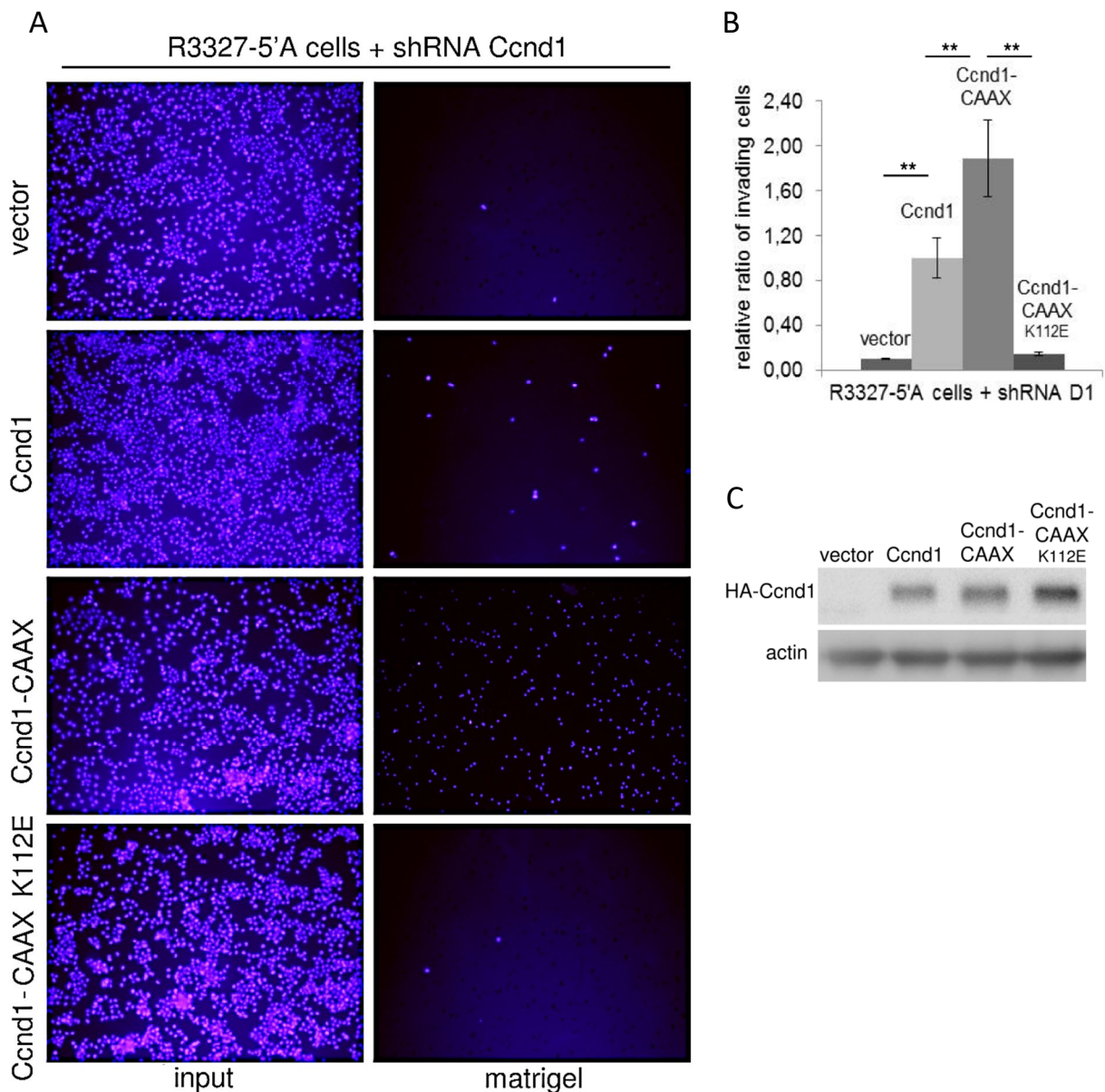


Figura 37. La ciclina D1 associada a la membrana augmenta la invasivitat de les cèl·lules tumorals. (A) Assaig d'invasió de cèl·lules tumorals R3327-5'A amb l'expressió de ciclina D1 reprimida per mitjà de RNA d'interferència (shD1) infectades amb HA-Ciclina D1, HA-Ciclina D1-CAAX, HA-Ciclina D1 K112E-CAAX o amb un vector lentiviral control. Es van sembrar $5 \cdot 10^4$ cèl·lules infectades en filtres transwell recoberts prèviament amb Matrigel, i passades unes 20 hores es van fixar les cèl·lules amb 4% de paraformaldehid i es van tenyir amb Hoechst. Es mostren imatges representatives del filtre transwell sense netejar (input) i després de netejar (matrigel). (B) Els valors relatius de cèl·lules que han envaït el Matrigel es representen com a mitjana \pm SEM. Les dades són d'almenys tres experiments independents. La significació dels valors es va determinar mitjançant ANOVA d'una via i Tukey-HSD post-test (** indica $p < 0.01$). (C) Western blot que mostra l'expressió de HA-Ciclina D1 en les cèl·lules tumorals co-infectades utilitzant l'anticòs anti-HA. En la part inferior es mostra l'actina com a control de càrrega.

3. EL RECLUTAMENT DE CICLINA D1 A LA MEMBRANA PLASMÀTICA DISMINUEIX LA CAPACITAT D'ADHESIÓ DE LES CÈL·LULES TUMORALS I DELS FIBROBLASTS

Com en l'apartat 3 del capítol 1, es va voler avaluar si aquest nou al·lel de ciclina D1 associat a la membrana tenia algun efecte funcional en l'adhesió i en la capacitat d'estendre's de les cèl·lules sobre la matriu extracel·lular (*spreading*). Es van utilitzar cèl·lules tumorals R3327-5'A on se'ls hi va reprimir l'expressió de ciclina D1 mitjançant RNA d'interferència, i es van infectar amb un vector buit, amb l'al·lel *wild type* de ciclina D1 (pCYC801), amb l'al·lel ciclina D1-CAAX (pCYC2062) associat a la membrana i amb l'al·lel ciclina D1 K112E-CAAX (pCYC2063) que forma un complex inactiu amb Cdk4. Es va observar el mateix resultat del capítol 1, on l'expressió de ciclina D1 feia disminuir la capacitat d'extensió sobre la placa recoberta amb fibronectina respecte les cèl·lules control deficientes en ciclina D1. I en aquest cas, es va veure que l'expressió de l'al·lel ciclina D1-CAAX encara feia disminuir més aquesta capacitat de *spreading* (**Figures 38A i 38B**), indicant que aquestes cèl·lules podien tenir major capacitat migratòria, tal com s'ha vist anteriorment en l'assaig d'invasió, ja que si la cèl·lula presenta una capacitat d'adhesió elevada és indicatiu de que té un potencial de migració i d'invasió baix. A més, aquesta capacitat d'estendre's en la placa depenia de l'activitat Cdk4, ja que encara que la ciclina D1 estigui associada a la membrana, si no pot formar un complex actiu amb Cdk4, no disminueix el *spreading* de manera significativa. Aquest experiment també s'ha realitzat en fibroblasts immortalitzats de ratolí deficientes en ciclina D1 co-transfectant aquests al·lells de ciclina D1 juntament amb GFP per avaluar únicament les cèl·lules transfectades, i s'ha obtingut el mateix resultat que en les cèl·lules tumorals R3327-5'A *knock down* de ciclina D1 infectades (**Figura 38C**).

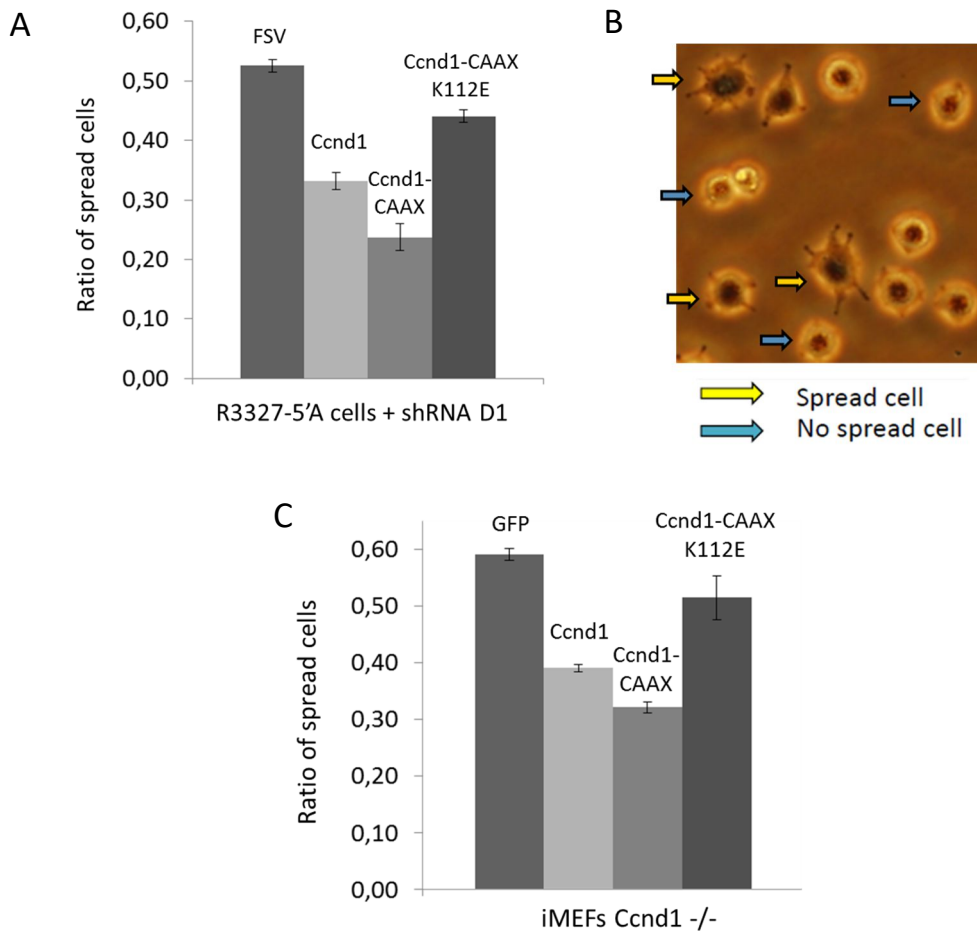


Figura 38. Disminució de la capacitat d'adhesió de les cèl·lules tumorals R3327-5'A degut a l'expressió de la ciclina D1 associada a la membrana. (A) Assaig de spreading de cèl·lules tumorals R3327-5'A que tenen reprimida l'expressió de ciclina D1 per mitjà de RNA d'interferència (shD1) infectades amb els al·lels humans de ciclina D1 wild type, ciclina D1-CAAX, ciclina D1 K112E-CAAX o amb un vector buit (FSV). Aquestes cèl·lules es van sembrar en medi DMEM sense sèrum en plaques de 6 pous de 35 mm de diàmetre recoberts amb 5 µg/mL de fibronectina. Una hora més tard, es va determinar la proporció de cèl·lules que tenien una morfologia estesa (spread) respecte el total de cèl·lules. Les dades representen la mitjana ± SEM d'almenys dos experiments independents. **(B)** Imatge representativa de cèl·lules R3327-5'A en condicions de spread i unspread d'un dels experiments descrits en A. **(C)** Assaig de spreading de fibroblasts immortalitzats Ccnd1 -/- co-transfectats amb ciclina D1 wild type, amb ciclina D1-CAAX, amb ciclina D1 K112E-CAAX o amb un vector buit, juntament amb GFP. Quaranta-vuit hores després de la transfecció, les cèl·lules es van sembrar en medi DMEM sense sèrum en plaques de 6 pous de 35 mm de diàmetre recoberts amb 5 µg/mL de fibronectina. Trenta minuts més tard, es va determinar la proporció de cèl·lules verdes que tenien morfologia estesa respecte el total de cèl·lules verdes. Les dades representen la mitjana ± SEM de tres experiments independents.

4. LA CICLINA D1 ASSOCIADA A LA MEMBRANA NO ALTERA LA PROLIFERACIÓ NI LA CAPACITAT DE FORMACIÓ DE COLÒNIES

S'ha descrit que la sobreexpressió de ciclina D1 redueix el temps de duplicació de les cèl·lules i augmenta el creixement clonogènic i el creixement independent de substrat en cèl·lules transformades (Biliran et al., 2005; Ikeda et al., 2013). D'altra banda, els al·lels mutants de ciclina D1 que augmenten l'acumulació nuclear promouen un major increment en el creixement clonogènic en comparació amb l'al·lel *wild type*, fins i tot en les cèl·lules no transformades (Lu et al., 2003; Solomon et al., 2003). Llavors sorgeix la qüestió de si l'al·lel de ciclina D1 associat a la membrana pot exercir algun efecte sobre la proliferació i el creixement cel·lulars. Es van infectar cèl·lules tumorals MFE amb lentivirus que contenen HA-Ciclina D1 (pCYC801), HA-Ciclina D1-CAAX (pCYC2062) o un vector buit. Després de comprovar la infecció (**Figura 39D**), les cèl·lules van ser preparades per determinar la taxa de proliferació, el creixement clonogènic i el creixement independent de substrat. Es va observar que l'expressió de ciclina D1-CAAX associada a la membrana no va canviar significativament la taxa de proliferació de les cèl·lules tumorals MFE en comparació amb les cèl·lules que expressaven la ciclina D1 *wild type* (**Figura 39A**). A més, l'expressió de l'al·lel ciclina D1-CAAX no afectava la viabilitat d'aquestes cèl·lules. També es va observar que l'expressió de la ciclina D1-CAAX no va fer canviar ni el creixement clonogènic (**Figura 39B**) ni el creixement no adherent (**Figura 39C**) de les cèl·lules tumorals MFE. Aquests resultats suggereixen que el reclutament de ciclina D1 a la membrana no modifica cap forma de creixement de les cèl·lules tumorals, i que el fenotip observat en l'augment del potencial invasiu no es deu a un increment en la proliferació de les cèl·lules.

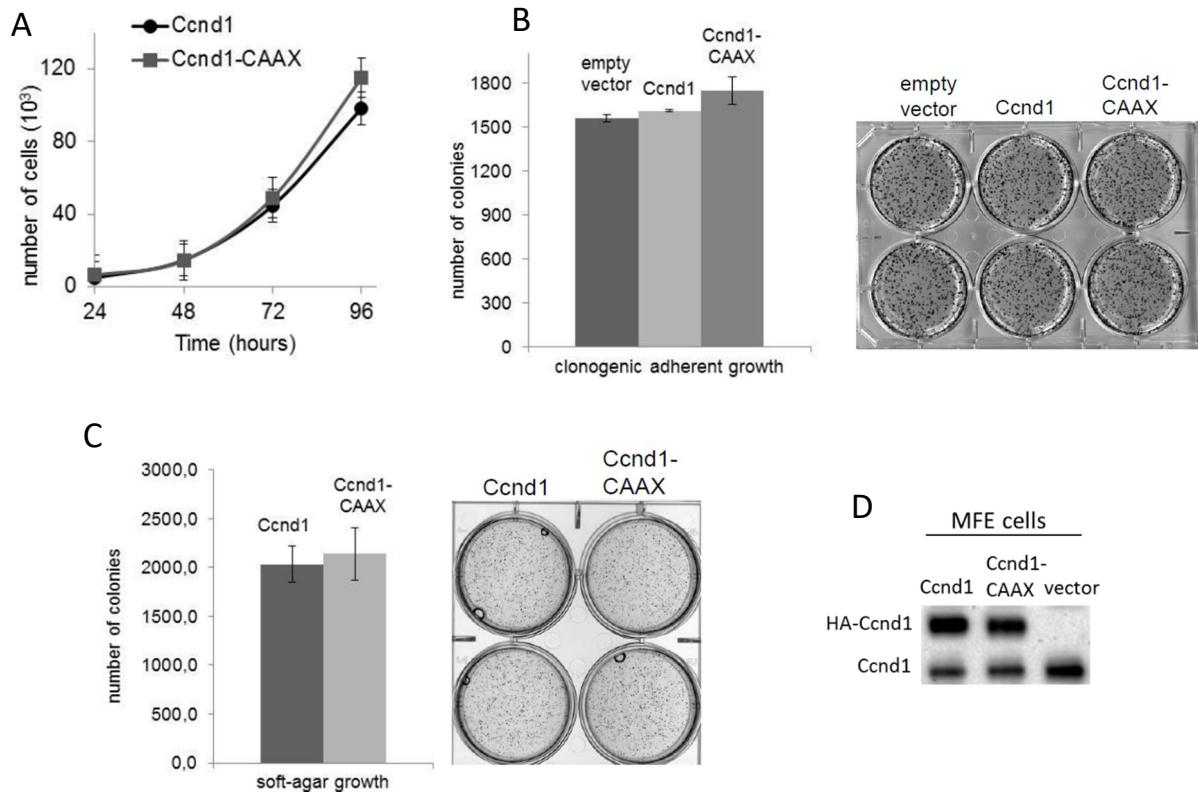


Figura 39. L'expressió de l'al·lel ciclina D1-CAAX no canvia la proliferació de les cèl·lules tumorals. (A) Assaig de proliferació en cèl·lules tumorals MFE. Aquestes van ser infectades amb lentivirus que porten HA-Ciclina D1 wild type o HA-Ciclina D1-CAAX associada a la membrana. Després de comprovar la infecció, es van sembrar $1 \cdot 10^4$ cèl·lules en plaques de 24 pous de 16 mm de diàmetre i es van comptar les cèl·lules cada 24 hores durant 4 dies. Es representen les corbes de creixement de cada condició i cada punt expressa la mitjana \pm SD de dos experiments independents. No es van detectar diferències significatives. (B) Assaig clonogènic de cèl·lules MFE infectades amb lentivirus que porten HA-Ciclina D1, HA-Ciclina D1-CAAX o un vector buit com a control. Es van sembrar $1 \cdot 10^3$ cèl·lules en plaques de 6 pous de 35 mm de diàmetre i, després de quinze dies d'incubació, les colònies es van tenyir amb cristall violeta (dreta), es van fixar amb 4% de paraformaldehid i es van comptar les colònies formades. El resultat es representa com a mitjana \pm SEM de dos experiments independents (esquerra). No es van detectar diferències significatives. (C) Assaig clonogènic en condicions no adherents. Cèl·lules MFE infectades com en A, es van tripsinitzar, es van resuspendre en 0.3% d'agar en medi DMEM a una concentració de $3 \cdot 10^3$ cèl·lules/mL i es van sembrar en plaques de 6 pous de 35 mm de diàmetre recoberts amb 0.6% d'agar. Després de quinze dies d'incubació, es van visualitzar les colònies formades tenyint-les amb Mitotracker (dreta) i es van comptar les colònies formades. El resultat es representa com a mitjana \pm SEM (esquerra) de tres experiments independents. No es van detectar diferències significatives. (D) Es van obtenir extractes proteics de les cèl·lules MFE infectades amb HA-Ciclina D1 o amb HA-Ciclina D1-CAAX i es va analitzar per western blot la quantitat de ciclina D1 infectada amb l'anticòs anti-ciclina D1.

5. LA UNIÓ DE LA CICLINA D1 A LA MEMBRANA PROMOU L'ACTIVACIÓ DE LES GTPASES RALB I RAC1

Resultats previs mostren que l'expressió de ciclina D1 augmenta l'activitat de les GTPases Ral i que aquesta activació pot explicar, en part, l'augment de la motilitat cel·lular per ciclina D1 (Fernández et al., 2011). Llavors, s'esperava que la unió de ciclina D1 a la membrana plasmàtica augmentaria l'activació de les GTPases Ral, i això incrementaria l'eficiència de la invasió. Per analitzar aquesta possibilitat, es va co-transfectar HA-RalB (pCYC886) juntament amb ciclina D1 (pCYC396), ciclina D1-CAAX (pCYC2057) o un vector buit en cèl·lules HEK293T, i després es va determinar els nivells de HA-RalB activa unida a GTP mitjançant l'assaig d'activitat Ral (**Figura 40A**). L'expressió de ciclina D1-CAAX augmenta més l'activitat de RalB que l'expressió de ciclina D1 *wild type*, tot i que aquest increment en l'activitat RalB no és estadísticament significatiu si es comparen els dos al·lels de ciclina D1, però sí que ho és si es compara amb el vector buit (**Figura 40B**). Atès que la unió de ciclina D1 a la membrana és capaç de millorar sensiblement la invasivitat de les cèl·lules tumorals, es va voler provar si la millora d'aquesta capacitat d'invasió depenia de RalB. La repressió de l'expressió de RalB per mitjà de RNA d'interferència en cèl·lules tumorals R3327-5'A que expressaven l'al·lel ciclina D1-CAAX reduïa parcialment la capacitat d'invasió d'aquestes cèl·lules tumorals (**Figures 40C i 40D**), indicant una certa dependència de RalB. Totes aquestes dades suggereixen que la ciclina D1 associada a la membrana promou la invasió, en certa mesura, a través de l'activació de RalB, però hi pot haver altres interactants o substrats a més de les GTPases Ral per tal d'explicar completament el paper de ciclina D1 a la membrana, com pot ser la paxilina, entre d'altres.

En l'apartat 7 del capítol 1 s'ha vist que les cèl·lules deficientes en ciclina D1 tenen una menor activació de Rac1. Com que la GTPasa Rac1 es requereix per a la migració i la invasió cel·lulars (Chen et al., 2004), es va plantejar la hipòtesi que aquest nou al·lel de ciclina D1 associat a la membrana cel·lular pot augmentar l'activitat Rac1 i aquesta activació pot ser la causa de l'augment del potencial invasiu d'aquestes cèl·lules tumorals. Per aquest motiu, es va realitzar un assaig de l'activitat Rac1 en cèl·lules tumorals R3327-5'A on se'ls hi

va reprimir l'expressió de ciclina D1 per mitjà de RNA d'interferència. En aquestes cèl·lules es va transfectar la ciclina D1 humana, o bé l'al·lel *wild type* o l'al·lel associat a la membrana. Es va veure que la ciclina D1-CAAX associada a la membrana produeix un major augment de l'activitat Rac1 en comparació amb la ciclina D1 *wild type* (**Figura 41**) explicant, en part, el perquè aquest al·lel de ciclina D1 associat a la membrana fa que les cèl·lules siguin més migratòries i invasives.

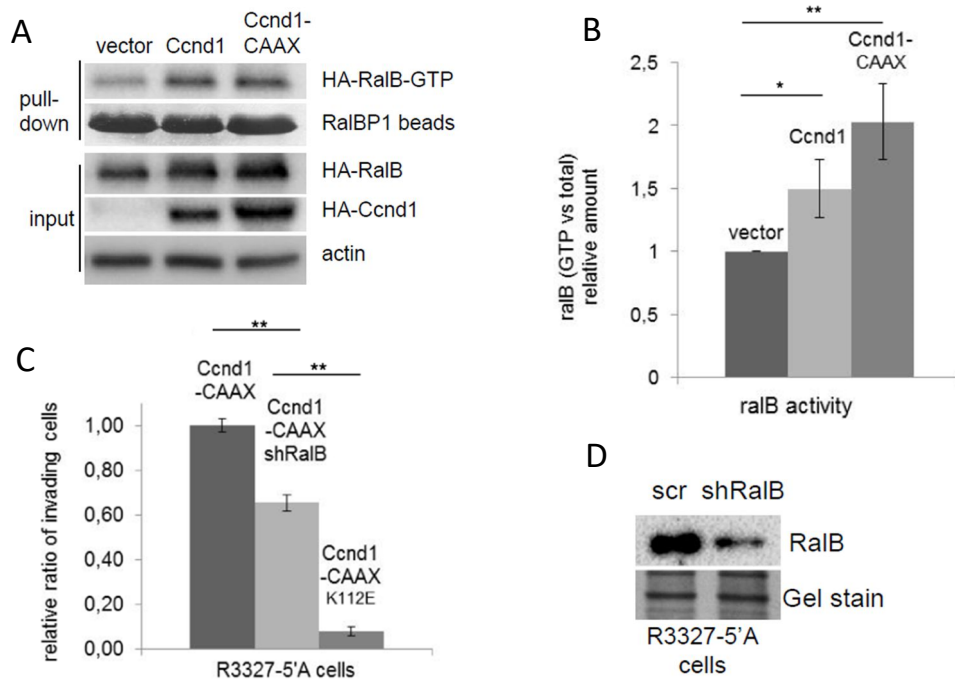


Figura 40. L'al·lel ciclina D1-CAAX promou l'activació de la GTPasa RalB. (A) Assaig d'activitat Ral de cèl·lules HEK293T co-transfectades amb HA-RalB juntament amb HA-Ciclina D1, HA-Ciclina D1-CAAX o un vector buit com a control. Vint-i-quatre hores després de la transfecció es van obtenir els lisats cel·lulars i es va purificar per afinitat la RalB activa unida a GTP mitjançant les beads RalBP1 (Upstate). Per western blot es va detectar HA-Ciclina D1, HA-RalB total i HA-RalB unida a GTP amb l'anticòs anti-HA. La quantitat de beads RalBP1 i l'actina es mostren com a control de càrrega. (B) Es representa la relació entre la RalB-GTP respecte la RalB total i s'expressa com a mitjana \pm SEM de quatre experiments independents. La significació dels valors es va determinar mitjançant ANOVA d'una via i Tukey-HSD post-test (* indica $p < 0.05$; ** indica $p < 0.01$). (C) Assaig d'invasió convencional de cèl·lules tumorals R3327-5'A infectades primerament amb RNA d'interferència contra RalB (shRalB) o amb RNA d'interferència control (scr), i posteriorment amb HA-Ciclina D1-CAAX o HA-Ciclina D1 K112E-CAAX. Es van sembrar $5 \cdot 10^4$ cèl·lules co-infectades en suspensió en la part superior del filtre recobert amb Matrigel. Després de 6 hores d'incubació a 37°C , s'eliminen les cèl·lules restants de la part superior del filtre i es compten les cèl·lules tenyides amb Hoescht que han envaït el Matrigel. Es representen els valors relatius de cèl·lules que han envaït i s'expressen com a mitjana \pm SEM de tres experiments independents. La significació dels valors es va determinar mitjançant ANOVA d'una via i Tukey-HSD post-test (** indica $p < 0.01$). (D) Western blot dels nivells d'expressió de RalB de les cèl·lules utilitzades en C. La tinció del gel amb Coomassie s'utilitza com a control de càrrega (part inferior).

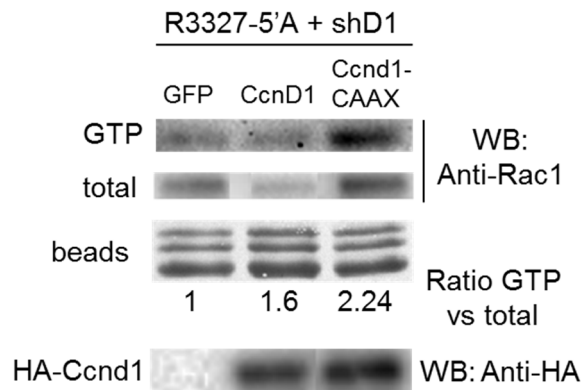


Figura 41. L'al·lel ciclina D-CAAX augmenta l'activitat Rac1. Assaig d'activitat Rac1 de cèl·lules tumorals R3327-5'A, infectades prèviament amb RNA d'interferència contra ciclina D1 (shD1), i posteriorment transfectades amb HA-Ciclina D1, HA-Ciclina D1-CAAX o GFP com a control. La Rac1 activa unida a GTP es va purificar per afinitat amb les beads PAK1-PBD (Cell Biolabs) a partir de lisats cel·lulars i es va detectar mitjançant western blot amb l'anticòs anti-Rac1. Es mostren els valors relatius de la quantificació de la Rac1-GTP respecte a la Rac1 total de l'extracte soluble. Es van utilitzar les beads com a control de càrrega. En la part inferior es mostren els nivells de HA-Ciclina D1 transfectada detectats per western blot amb l'anticòs anti-HA.

6. LA PRESÈNCIA DE LA CICLINA D1 A LA MEMBRANA DE LES CÈL·LULES TUMORALS ESTIMULA LA INVASIÓ I LA METÀSTASI

La ciclina D1 ha estat descrita com un inductor de metàstasis en ratolins i en estudis clínics (Drobnjak et al., 2000; Huang et al., 2009; Zheng et al., 2013). La nostra hipòtesi és que la importància de ciclina D1 en la metàstasi pot estar relacionada amb les seves funcions citoplasmàtiques. Per mesurar *in vivo* la rellevància de la unió a la membrana de ciclina D1 en la inducció de metàstasis, es va injectar cèl·lules tumorals MFE infectades amb ciclina D1 *wild type* i ciclina D1-CAAX associada a la membrana directament al torrent sanguini de ratolins immunodeficients de 8 setmanes d'edat. Els animals es van sacrificar quatre setmanes després de la injecció, es van examinar els seus pulmons, i es va avaluar la presència de nòduls al pulmó (**Figura 42A**). En aquest assaig de metàstasi es va observar que l'expressió de ciclina D1-CAAX va estimular significativament les metàstasis produïdes per les cèl·lules MFE, on sis dels vuit animals mostraven nòduls aparents. En canvi, després de quatre setmanes, només un animal manifestava metàstasis en els pulmons després d'injectar cèl·lules MFE que expressaven l'al·lel de ciclina D1 *wild type* (**Figura 42B**). Les metàstasis van ser causades per l'expressió de HA-Ciclina D1-CAAX en cèl·lules MFE ja que es va detectar el senyal HA en les immunohistoquímiques dels teixits de pulmó, i no es va detectar senyal HA en el teixit sa. A més, aquest senyal es localitzava al citoplasma/membrana de les cèl·lules (**Figura 42C**). Finalment, també es va comprovar que la major quantitat de metàstasis en les mostres que expressen ciclina D1-CAAX respecte a les que expressen ciclina D1 *wild type* no era a causa de diferències en els nivells d'expressió de proteïna de les cèl·lules injectades (**Figura 42D**).

Es va repetir aquest assaig de metàstasi injectant cèl·lules tumorals R3327-5'A infectades que també expressaven ciclina D1 *wild type* i ciclina D1-CAAX associada a la membrana. Aquestes cèl·lules són més agressives que les cèl·lules MFE i produeixen metàstasis amb menys temps. Per aquest motiu, es van injectar menys cèl·lules que en els

assaigs de metàstasi convencionals per veure més clarament la rellevància de la ciclina D1 associada a la membrana. També es van inocular aquestes cèl·lules R3327-5'A infectades directament al torrent sanguini de ratolins immunodeficients de 8 setmanes d'edat mitjançant injecció intravenosa retroorbital. Els animals es van sacrificar una setmana després de la injecció, es van examinar els seus pulmons, i es va calcular la presència de nòduls al pulmó (**Figura 43A**). El resultat també va ser molt clar: les cèl·lules R3327-5'A que expressaven HA-Ciclina D1-CAAX van produir metàstasis abans que les cèl·lules que expressaven la ciclina D1 *wild type* (**Figura 43B**). I pel senyal HA de les immunohistoquímiques, les metàstasis es van produir com a conseqüència de l'expressió de HA-Ciclina D1-CAAX en les cèl·lules R3327-5'A (**Figura 43C**). També es pot apreciar que el senyal HA de la ciclina D1-CAAX mostra una localització clarament citoplasmàtica i es veu associada a la membrana. A més, aquest augment en la formació de metàstasis per l'al·lel HA-Ciclina D1-CAAX respecte a l'al·lel control HA-Ciclina D1 no es pot explicar per diferències en l'expressió de proteïna, ja que es pot veure que tenen uns nivells d'expressió molt similars en les cèl·lules injectades (**Figura 43D**).

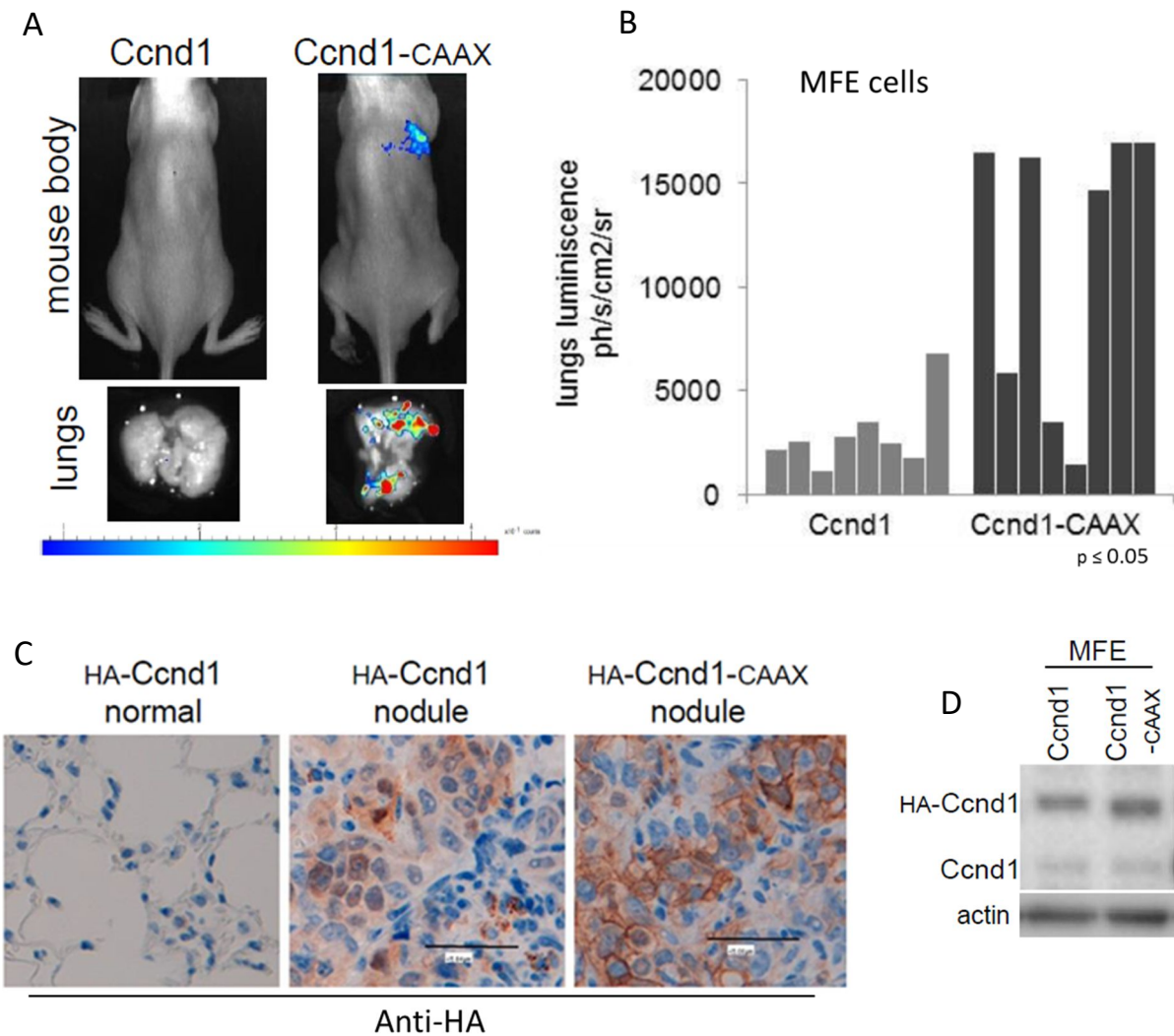


Figura 42. L'al·lel ciclina D1-CAAX augmenta l'activitat metastàtica de les cèl·lules tumorals endometrials. (A) Cèl·lules tumorals MFE que expressen de forma estable la luciferasa es van utilitzar per l'assaig de metastasi. Es van inocular $5 \cdot 10^5$ cèl·lules MFE infectades amb HA-Ciclina D1 o HA-Ciclina D1-CAAX per mitjà d'injecció intravenosa retroorbital en ratolins immunodeficients (8 animals per condició). Es mostren imatges representatives de la luminescència del cos (a dalt) i dels pulmons (a baix). (B) Després de 4 setmanes, es van extreure els pulmons dels animals i es va quantificar la luminescència que tenien. Es representa la luminescència pulmonar de tots els animals, que es correlaciona amb el nombre de nòduls metastàtics que tenen els pulmons. Els valors de significació es van determinar per mitjà del Mann-Whitney test ($p \leq 0.05$). (C) Es van fixar els pulmons i una mostra es va incloure en parafina per a realitzar la immunohistoquímica amb l'anticòs anti-HA. Es mostren imatges representatives d'aquesta immunohistoquímica. (D) Es van obtenir extractes proteics de les cèl·lules MFE infectades amb HA-Ciclina D1 i HA-Ciclina D1-CAAX abans de ser injectades als ratolins, i per western blot es va analitzar la quantitat de ciclina D1 infectada amb l'anticòs anti-ciclina D1. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega (part inferior).

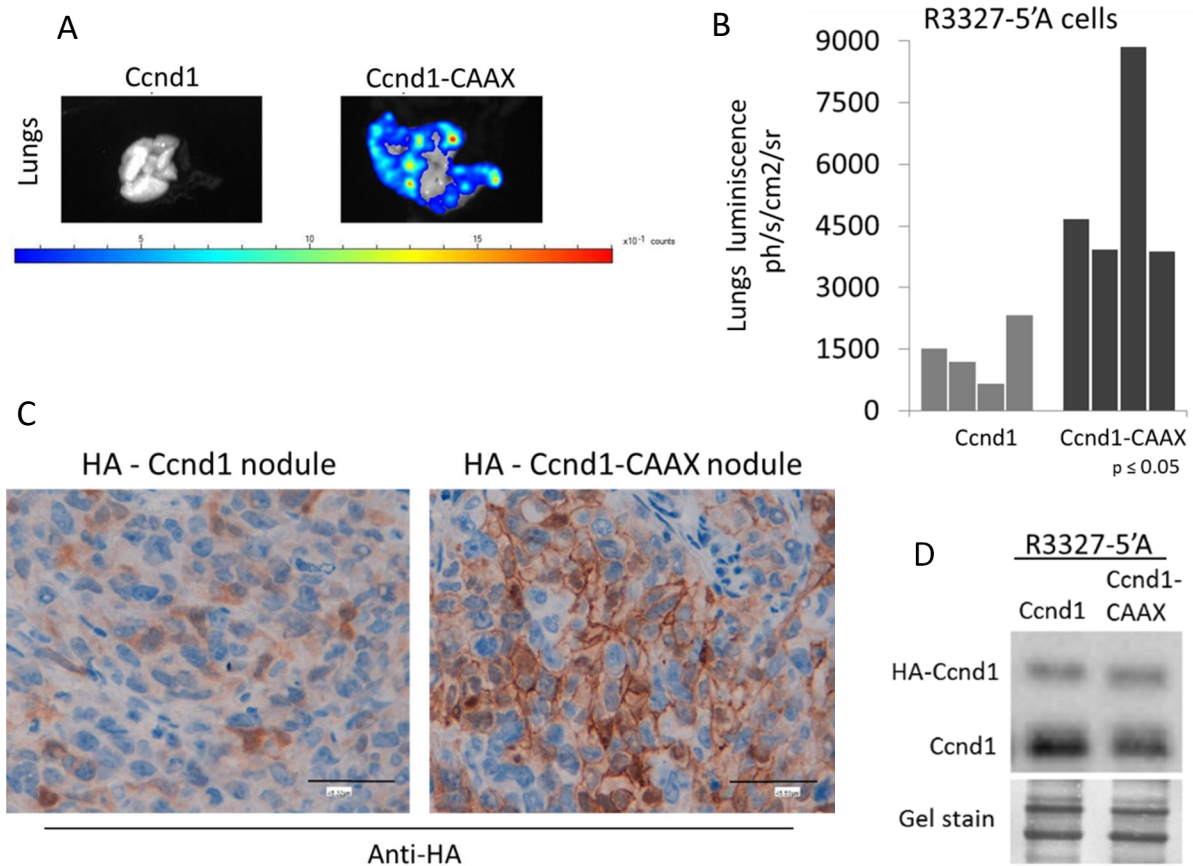


Figura 43. L'al·lel ciclina D1-CAAX augmenta l'activitat metastàtica de les cèl·lules tumorals de pròstata de rata. (A) Es van utilitzar per l'assaig de metastasi cèl·lules tumorals R3327-5'A que expressen de forma estable la luciferasa. Es van inocular $5 \cdot 10^4$ cèl·lules R3327-5'A infectades amb HA-Ciclina D1 o HA-Ciclina D1-CAAX per mitjà d'injecció intravenosa retroorbital en ratolins immunodeficients (4 animals per condició). Es mostren imatges representatives de la luminescència dels pulmons. (B) Una setmana després de la injecció, tots els animals que tenien injectades cèl·lules R3327-5'A que expressaven HA-Ciclina D1-CAAX van mostrar metastasi de pulmó. Es van extreure els pulmons dels animals i es va quantificar la luminescència que tenien. Es representa la luminescència pulmonar de tots els animals, que es correlaciona amb el nombre de nòduls metastàtics que tenen els pulmons. Els valors de significació es van determinar per mitjà del Mann-Whitney test ($p \leq 0.05$). (C) Es van fixar els pulmons i una mostra es va incloure en parafina per a realitzar la immunohistoquímica anti-HA. Es mostren imatges representatives d'aquesta immunohistoquímica. (D) Es van obtenir extractes proteics de les cèl·lules R3327-5'A infectades amb HA-Ciclina D1 o HA-Ciclina D1-CAAX abans de ser injectades als ratolins, i per western blot es va analitzar la quantitat de ciclina D1 infectada amb l'anticòs anti-ciclina D1. La tinció del gel amb Coomassie s'utilitza com a control de càrrega (part inferior).

7. OBTENCIÓ DE NOUS INTERACTORS DE CICLINA D1 PER LA TÈCNICA iTRAQ

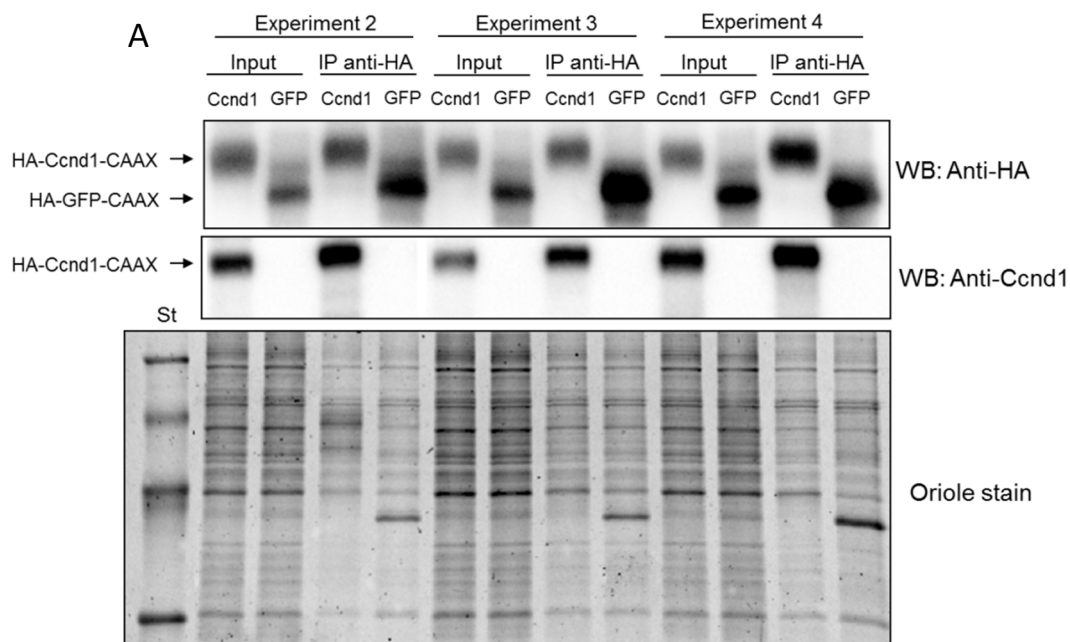
7.1. Preparació de les mostres

Veient que la ciclina D1 associada a la membrana és capaç d'augmentar el potencial invasiu i metastàtic de les cèl·lules tumorals, vam decidir utilitzar l'al·lel ciclina D1-CAAX per aïllar noves proteïnes interactores de ciclina D1 que ens ajudessin a explicar la funció citoplasmàtica de la ciclina D1 en la invasió i la metastasi. Per fer-ho, es va utilitzar una tècnica proteòmica anomenada iTRAQ.

Per realitzar aquesta tècnica, primerament es van transfectar cèl·lules HEK293T amb els vectors HA-Ciclina D1-CAAX (pCYC2057) o HA-GFP-CAAX (pCYC2106) com a control per descartar interaccions passives causades per la localització a la membrana de la cua de farnesilació CAAX, i d'aquesta manera obtenir només les proteïnes que interaccionen amb la ciclina D1 associada a la membrana. Per realitzar la tècnica iTRAQ es necessitava una gran quantitat de proteïna purificada, i per aquest motiu es van transfectar les cèl·lules en plaques de 150 mm de diàmetre (quatre plaques per cada condició). Després de 24 hores de la transfecció, es van recollir les cèl·lules HEK293T transfectades amb PBS fred utilitzant un raspador i centrifugant a 1000 rpm durant 5 minuts a 4°C per obtenir el *pellet* de cèl·lules.

A partir dels extractes cel·lulars, es va realitzar una purificació per afinitat utilitzant les *beads* anti-HA (Roche) per tal d'immunoprecipitar la HA-Ciclina D1-CAAX i el control HA-GFP-CAAX. La proteïna purificada es va guardar a -80°C, i es va agafar una mostra per quantificar-la amb el *kit* de Bio-Rad DCTM Protein Assay i per analitzar-la mitjançant electroforesi en gel de poliacrilàmida amb Oriole (Bio-Rad). També es va fer un *western blot* dels extrems solubles i de les immunoprecipitacions per veure els nivells de proteïna HA-GFP-CAAX i HA-Ciclina D1-CAAX, utilitzant l'anticòs monoclonal de ratolí anti-HA (**Figura 44A**). Finalment, es van enviar les mostres de quatre experiments independents al Beth

Israel Deaconess Medical Center (Harvard Medical School) per a que fossin analitzades per un servei extern mitjançant la tècnica iTRAQ (**Figura 44B**).



B

tube#	total yield on acetone ppt (ug)	normalized to lowest amount (ug)	iTRAQ label
1	23,5	14,1	113
2	48,6	14,1	114
3	14,1	14,1	115
4	42,7	14,1	116
5	16,5	14,1	117
6	20,4	14,1	118
7	37,6	14,1	119
8	30,6	14,1	121

Figura 44. Purificació per afinitat de la ciclina D1 associada a la membrana per a la realització de la tècnica iTRAQ. (A) Cèl·lules HEK293T sembrades en plaques de 150 mm de diàmetre es van transfectar amb HA-Ciclina D1-CAAX o amb HA-GFP-CAAX com a control. Vint-i-quatre hores després de la transfecció es van recollir i es va realitzar la purificació per afinitat amb les beads d'agarosa anti-HA (Roche), i la proteïna immunoprecipitada es va guardar a -80°C. Es va agafar una petita mostra per realitzar els western blot de comprovació amb l'anticòs anti-HA (part superior) i amb l'anticòs anti-ciclina D1 (part central). També es va agafar mostra per quantificar amb el kit de Bio-Rad DC™ Protein Assay, així com tenyint un gel amb Oriole (Bio-Rad) (part inferior). Es mostren tres dels quatre experiments independents que s'han realitzat. **(B)** Taula on es mostra la quantitat de proteïna purificada en cada experiment i el marcatge utilitzat per cada mostra.

7.2. Anàlisi dels resultats obtinguts en l'iTRAQ

Es van identificar unes 150 proteïnes que tenien com a mínim un pèptid amb una significació del 95%. D'aquestes 150 proteïnes identificades, es van seleccionar les que tenien una *ratio* superior a 1, és a dir, que estaven enriquides en la mostra immunoprecipitada de HA-Ciclina D1-CAAX respecte el control. Es va dividir la mostra amb HA-Ciclina D1-CAAX pel seu control HA-GFP-CAAX i es va identificar quines proteïnes estaven enriquides en la ciclina D1-CAAX immunoprecipitada, fent una mitjana dels 4 experiments independents i ordenant-les de més a menys enriquiment. Ciclina D1 va ser la proteïna més enriquida, com caldria esperar ja que aquesta és la proteïna immunoprecipitada directament. Aquest resultat valida el procediment (**Figura 45**). Fent servir la classificació “component molecular” de Gene Ontology, es va comprovar que aquesta llista estava enriquida en proteïnes associades a membrana i a vesícules extracel·lulars (exosoma, secretoma...) (**Figura 46**). Tot això indica que l'ancoratge de la ciclina D1 a la membrana fa que aquesta interacció amb múltiples proteïnes, ja siguin extracel·lulars, unides a la membrana i que formen part de vesícules extracel·lulars.

Name	Peptides(95%)	113:114	115:116	117:118	119:121	ratio	log	
G1/S-specific cyclin-D1 OS=Homo sapiens GN=CCND1 PE=1 SV=1	11	24,89	6,37	4,17	16,29	12,93	3,69	CCND1
Coiled-coil domain-containing protein 81 OS=Homo sapiens GN=CCDC81 PE=1 SV=1	1	4,88	3,28	1,91	6,73	4,20	2,07	CCDC81
Pleckstrin homology domain-containing family H member 2 OS=Homo sapiens GN=PLEKHH2 PE=1 SV=1	1	1,45	1,19	2,29	5,50	2,61	1,38	PLEKHH2
Disabled homolog 2-interacting protein OS=Homo sapiens GN=DAB2IP PE=1 SV=1	1	1,29	4,92	1,50	1,61	2,33	1,22	DAB2IP
Membrane-associated progesterone receptor component 1 OS=Homo sapiens GN=PGRMC1 PE=1 SV=1	6	4,92	1,42	1,49	1,03	2,21	1,15	PGRMC1
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A OS=Homo sapiens GN=FKBP1A PE=1 SV=1	2	4,66	1,37	1,71	0,85	2,14	1,10	FKBP1A
ATPase inhibitor, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATPIF1 PE=1 SV=1	6	2,19	1,31	3,50	1,37	2,09	1,06	ATPIF1
MARCKS-related protein OS=Homo sapiens GN=MARCKSL1 PE=1 SV=2	2	2,96	0,17	1,74	3,05	1,98	0,99	MARCKSL1
Non-histone chromosomal protein HMG-17 OS=Homo sapiens GN=HMGN2 PE=1 SV=1	4	1,14	2,44	2,91	0,73	1,81	0,85	HMGN2
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Homo sapiens GN=UBA52 PE=1 SV=1	7	2,49	1,94	1,85	0,72	1,75	0,81	UBA52
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial isoform b [Homo sapiens]	6	1,69	2,00	2,01	0,92	1,65	0,73	
Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=3 SV=1	5	1,33	1,49	1,60	2,19	1,65	0,72	VIM
Prothymosin alpha OS=Homo sapiens GN=PTMA PE=4 SV=1	8	2,01	1,60	1,71	0,90	1,56	0,64	PTMA
Putative coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein CHCHD29 OS=Homo sapiens GN=CHCHD29 PE=1 SV=1	2	1,47	1,12	2,54	1,01	1,53	0,62	CHCHD29
Lamin-B1 OS=Homo sapiens GN=LMNB1 PE=1 SV=2	1	1,14	1,12	1,79	1,64	1,42	0,51	LMNB1
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX5A PE=1 SV=1	3	1,53	1,03	1,32	1,34	1,30	0,38	COX5A
Transgelin-2 OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=3	1	1,18	1,66	1,45	0,90	1,30	0,38	TAGLN2
Eukaryotic translation initiation factor 4H OS=Homo sapiens GN=EIF4H PE=1 SV=1	1	1,18	1,15	1,84	1,02	1,30	0,37	EIF4H
RNA-binding protein 14 OS=Homo sapiens GN=RBM14 PE=1 SV=2	1	1,11	1,69	1,51	0,79	1,27	0,35	RBM14
Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3	5	1,18	1,37	0,97	1,50	1,26	0,33	P4HB
Bcl-2-associated transcription factor 1 OS=Homo sapiens GN=BCLAF1 PE=1 SV=1	1	1,41	1,19	1,71	0,58	1,22	0,29	BCLAF1
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	1	1,11	1,16	1,53	0,90	1,17	0,23	KRT10
Serine/arginine-rich splicing factor 5 OS=Homo sapiens GN=SRSF5 PE=1 SV=1	2	1,47	1,15	1,56	0,50	1,17	0,23	SRSF5
Serine/arginine-rich splicing factor 9 OS=Homo sapiens GN=SRSF9 PE=1 SV=1	2	1,13	0,77	1,27	1,41	1,14	0,19	SRSF9
Histone H1.4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1E PE=1 SV=2	27	1,15	0,73	1,29	1,18	1,09	0,12	HIST1H1E

Figura 45. Proteïnes identificades en l'iTRAQ que estan enriquides en la mostra amb ciclina D1-CAAX immunoprecipitada respecte el control.

GO molecular component (28 proteins enriched more than $\log_2 0,2$ in Ccnd1-caax)				
Term	genome	Sample	Expected	P-value
extracellular vesicle	2665	14	2.933e+00	1.076e-04
extracellular vesicular exosome	2665	14	2.933e+00	1.076e-04
extracellular organelle	2666	14	2.935e+00	1.082e-04
extracellular membrane-bounded organelle	2666	14	2.935e+00	1.082e-04
membrane-bounded vesicle	3375	14	3.715e+00	2.078e-03
vesicle	3477	14	3.827e+00	2.996e-03

Figura 46. Representació dels resultats obtinguts en l'anàlisi d'enriquiment de la llista de candidats obtinguda en l'iTRAQ utilitzant la classificació "component molecular" de Gene Ontology.

D'aquestes proteïnes identificades, s'ha iniciat l'estudi de les tres primeres. Després de ciclina D1, les proteïnes més enriquides amb les que s'ha trobat interacció amb ciclina D1 són la proteïna anomenada CCDC81 (*Coiled-coil domain-containing protein 81*), la proteïna PLEKHH2 (*Pleckstrin homology domain-containing family H member 2*) i la proteïna DAB2IP (*Disabled homolog 2-interacting protein*).

La proteïna CCDC81 té 76 KDa i s'ha descrit que forma part dels centrosomes (Firat-Karalar et al., 2014). La gran majoria dels tumors tenen més de dos centrosomes (Godinho et al., 2014) i la sobreexpressió de determinats oncogens i la repressió de gens supressors de tumors causen inestabilitat d'aquests (Fukasawa, 2007). En aquesta línia, s'ha descrit que la sobreexpressió de ciclina D1 pot induir una amplificació dels centrosomes (Nelsen et al., 2005) i que la sobreexpressió o la repressió de Cdk4 indueix o evita, respectivament, l'amplificació dels centrosomes (Adon et al., 2010). La proteïna PLEKHH2 té 120 KDa i està implicada en adhesió a la matriu extracel·lular i en la dinàmica del citoesquelet d'actina (Perisic et al., 2012). Finalment, la proteïna DAB2IP (110 KDa) és un GAP de Ras i per tant, és un regulador negatiu de Ras, relacionada amb migració (Wang et al., 2002; Lee et al., 2012), proliferació i invasió cel·lulars (Shen et al., 2014).

Per tant, amb aquests resultats hem trobat nous candidats que ens poden ajudar a explicar la funció citoplasmàtica de ciclina D1 en l'adhesió i la migració cel·lulars.

DISCUSSIÓ

1. UNA FUNCIÓ CITOPLASMÀTICA DE CICLINA D1

La importància del complex ciclina D1-Cdk4 sempre s'ha centrat en l'estudi de la seva funció com un regulador transcripcional en el nucli. Inicialment, les ciclines, les CDKs i els CKIs van ser descrits exclusivament com proteïnes nuclears implicades en la regulació i en les transicions del cicle cel·lular. Nosaltres, en aquest treball mostrem que la localització del complex ciclina D1-Cdk4 en la membrana dels fibroblasts i de les cèl·lules tumorals té un paper actiu en la inducció de la migració i la invasió cel·lulars a través de la fosforilació de la paxilina. L'expressió de ciclina D1 no disminueix l'adhesió de la cèl·lula a la matriu extracel·lular ni l'activació de Rac1 en presència de l'al·lel no fosforilable de paxilina S83A S178A. Per contra, l'expressió dels al·lells fosfomimètics de paxilina S83E S178E rescaten els defectes d'activació de Rac1, migració, invasió i metastasi deguts a l'absència de ciclina D1. A més, si segrestem el complex ciclina D1-Cdk4 a la membrana cel·lular a través de l'expressió de l'al·lel ciclina D1-CAAX veiem que hi ha un increment en la capacitat de migració i d'invasió de les cèl·lules, però no de la seva proliferació. Així doncs, nosaltres proposem l'existència d'una ruta molecular regulada pel complex ciclina D1-Cdk4 que en la membrana de fibroblasts i de cèl·lules tumorals fosforilaria la paxilina en les serines 83 i 178. La paxilina fosforilada en aquests residus provocaria l'activació de la GTPasa Rac1 i dels processos migratoris. Aquest treball és el primer on es fa referència explícita i es caracteritza una ruta molecular exclusivament citoplasmàtica amb la participació del complex ciclina D1-Cdk4. Treballs publicats amb anterioritat ja proposaven l'existència de rutes citoplasmàtiques controlades per ciclina D1 a partir d'estudis d'interacció proteica; per exemple ciclina D1 pot interaccionar amb diverses proteïnes citoplasmàtiques, com filamina A, PACSIN2, RhoA i Rgl2 (Besson et al., 2004; Zhong et al., 2010; Fernández et al., 2011; Meng et al., 2011). La reducció de l'expressió de ciclina D1 o l'expressió de l'inhibidor de Cdk4/6 p16 redueix la fosforilació de filamina A i d'altres proteïnes d'unió a actina, el que suggereix un paper directe d'una quinasa associada a la ciclina D1 en la regulació del citoesquelet d'actina (Zhong et al., 2010). A més, s'ha descrit que ciclina D1 té efectes en la migració cel·lular de manera independent de CDK mitjançant la regulació transcripcional de DICER, una endoribonucleasa requerida pel processament de microRNA (Yu et al., 2013).

La inducció de la transició G1/S del cicle cel·lular per la ruta canònica d'inactivació de pRB per fosforilació no és un mecanisme aïllat, ja que molts estudis mostren com el complex ciclina D1-Cdk4 controla el procés de proliferació cel·lular a través de molts altres mecanismes. Per exemple aquest complex activa la proliferació de les cèl·lules de la retina a través de la inducció transcripcional de Notch1 (Bienvenu et al., 2010). De la mateixa manera, sembla que el complex ciclina D1-Cdk4 regula els processos d'adhesió i migració cel·lulars a través de múltiples mecanismes a més del proposat en aquest treball (**Figura 47**). Inicialment es va demostrar que ciclina D1 regulava la migració a través de la modulació de l'activitat de la GTPasa RhoA per mecanismes transcripcionals i post-transcripcionals (Li et al., 2006a). El mecanisme post-transcripcional ja deixava entreveure una possible activitat citoplasmàtica ja que l'activitat ciclina D1-Cdk4 és important per mantenir els nivells de l'inhibidor CIP/KIP p27, que inhibeix la senyalització de RhoA en el citoplasma (Besson et al., 2004; Li et al., 2006b). Cal notar que la migració requereix reduir l'activitat RhoA i augmentar l'activitat Rac1 en la part davantera de la cèl·lula migratòria (Iden and Collard, 2008). Per tant, ciclina D1 estaria actuant doblement sobre la migració inhibint l'activitat RhoA i induint l'activitat Rac1. A més, en un treball inicial del grup de Cicle Cel·lular, es va demostrar que el complex ciclina D1-Cdk4 fosforila *in vitro* el GEF de Ral anomenat Rgl2, i que s'uneix a les GTPases RalA i RalB modulant l'activitat Ral d'una manera dependent de Cdk4, suggerint que el complex ciclina D1-Cdk4 augmenta l'activitat Ral per permetre el reciclatge d'integrines i l'acoblament eficient de l'exocist, i promoure la migració cel·lular (Fernández et al., 2011). En el treball citat ja es suggeria un mecanisme completament citoplasmàtic.

Totes aquestes dades ens permeten establir un escenari on el complex ciclina D1-Cdk4 podria regular diferents processos cel·lulars en funció d'on es trobi localitzat. L'acumulació nuclear ens indicaria activitat proliferativa mentre que l'acumulació citoplasmàtica o en membrana seria inductora de processos de polaritat com els canvis morfològics deguts a l'adhesió i la migració. Nosaltres creiem que la funció nuclear és compatible amb la presència de complexos ciclina D1-Cdk4 citoplasmàtics que exerceixen funcions addicionals que són rellevants en el desenvolupament i l'oncogènesi, com ara la regulació de la motilitat i la invasivitat cel·lulars. Les nostres dades i altres evidències (Zhong

et al., 2010) estan a favor d'aquesta idea. D'una banda, s'ha vist que els canvis en els nivells de ciclina D1 citoplasmàtica podrien ser crítics per coordinar la proliferació cel·lular, la migració i la diferenciació en circumstàncies normals. Per exemple, en el desenvolupament del cervell, els progenitors neurals han d'inhibir la proliferació, desacoblar-se i migrar a les capes superiors per tal de diferenciar-se en l'escorça cerebral (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009) i, d'acord amb això, la ciclina D1 s'acumula en el citoplasma durant la diferenciació neuronal (Sumrejkanchanakij et al., 2003) i es requereix pel desenvolupament de neurites (Marampon et al., 2008). A més, durant la diferenciació dels queratinòcits, ciclina D1 co-localitza amb Sec6 (també es coneix com Exoc3, una subunitat del complex exocist implicat en el tràfic de vesícules), amb la β 1-integrina i amb RalA. La sobreexpressió de ciclina D1 augmenta el reciclatge de la β 1-integrina en la diferenciació, i condueix a la reducció de l'adhesió dels queratinòcits a la matriu extracel·lular (Fernández-Hernández et al., 2013). En un altre estudi també s'ha vist que ciclina D1 és essencial en l'adhesió cel·lular, la motilitat i la migració de macròfags de medul·la òssia (Neumeister et al., 2003). En comparació amb els macròfags *wild type*, els macròfags deficients en ciclina D1 presenten major adhesió i *spreading*, amb una morfologia plana i circular i amb menys membranes *ruffles*, i la reexpressió de ciclina D1 en aquestes cèl·lules deficients en ciclina D1 restaura el fenotip *wild type*, suggerint que ciclina D1 és necessària i suficient per regular l'adhesió cel·lular, tal com s'ha vist també en el nostre treball. Per tant, ciclina D1, a través de la regulació de les interaccions de diferents substrats citoplasmàtics amb la matriu extracel·lular, contribueix a la capacitat d'invasió i/o en la metàstasi, de forma independent a la funció que té en la progressió del cicle cel·lular. D'altra banda, en situacions anòmales aquest treball suggereix que la regulació espacial de ciclina D1 durant la progressió tumoral podria ser rellevant per adquirir un fenotip invasiu, i que en cèl·lules tumorals l'augment de l'expressió de ciclina D1 al citoplasma (potser a causa de la sobreexpressió) pot alterar les funcions relacionades amb paxilina, Rac1 i Ral, i promoure la propagació del tumor i la metàstasi. Per tant, la importància de ciclina D1 com a oncogèn no depèn d'una sola funció, i la seva capacitat per controlar diferents mecanismes cel·lulars crítics seria la causa del seu gran potencial oncogènic.

Finalment, el nostre treball no exclou que l'acumulació del complex ciclina D1-Cdk4 fora del nucli tingui altres funcions. Per exemple, l'oncògen Ras indueix una relocalització en el citoplasma del complex ciclina D1-Cdk4 i promou l'aturada de la proliferació en els queratinòcits humans primaris, probablement com un mecanisme de defensa contra la neoplàsia generada per Ras (Lazarov et al., 2002). Un altre exemple és la regulació de la proliferació per les *tight junctions* a través del segrest del complex ciclina D1-Cdk4 a la membrana de les cèl·lules epitelials MDCK (Balda et al., 2003). Per tant, també és assumible que en algunes circumstàncies la relocalització del complex ciclina D1-cdk4 sigui un mecanisme de control de la proliferació cel·lular.

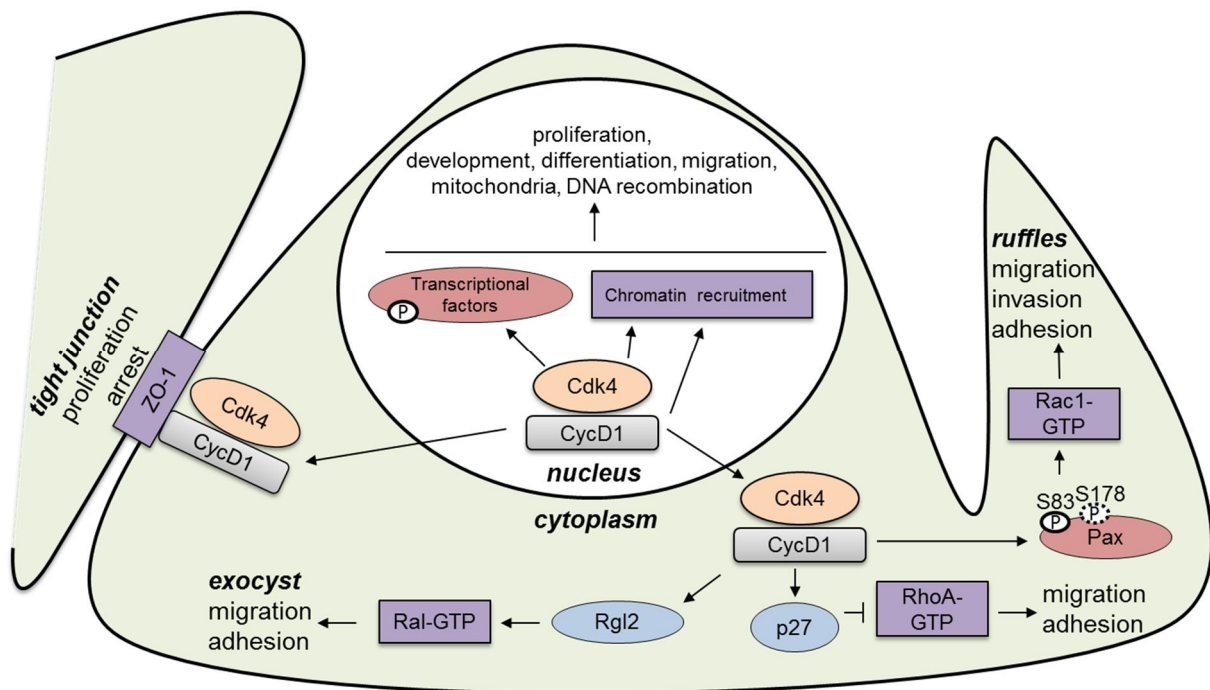


Figura 47. Esquema de les funcions de ciclina D1. Ciclina D1 apareix en diferents localitzacions subcel·lulars. Al nucli, ciclina D1 és important per regular molts processos com la proliferació, la diferenciació, la migració, etc., mitjançant diferents mecanismes dependents o independents de Cdk4. En les cèl·lules epitelials, el complex ciclina D1-Cdk4 és segrestat a la membrana citoplasmàtica per proteïnes de les *tight junctions* per aturar la proliferació cel·lular. El complex ciclina D1-Cdk4 citoplasmàtic regula la migració, l'adhesió i la dinàmica de l'exocist a través de les GTPases Ral, fosforilant Rgl2, un GEF de Ral, i també a través de diferents interaccions amb proteïnes citoplasmàtiques com filamina A i PACSIN2. Finalment, el complex ciclina D1-Cdk4 associat a la membrana cel·lular té també un paper actiu en la regulació de l'adhesió cel·lular, la migració i la invasió en fibroblasts i en cèl·lules tumorals a través de la fosforilació de la paxilina i l'activació de la GTPasa Rac1, i inactivant l'activitat RhoA a través de la proteïna CIP/KIP p27.

2. MECANISME D'ACTUACIÓ DE PAXILINA A TRAVÉS DE CICLINA D1

Treballs previs han indicat que la paxilina té un paper important en l'adhesió i la invasió cel·lulars (Panetti, 2002), on l'efecte de la paxilina en la motilitat i la invasió depèn de la fosforilació en els residus serina i tirosina (Schaller, 2001). En aquest treball hem vist que la ciclina D1 s'uneix i co-localitza amb la paxilina en la membrana cel·lular, i que el complex ciclina D1-Cdk4 és capaç de fosforilar la paxilina *in vitro* en les serines 83 i 178. Les nostres dades mostren que la fosforilació en ambdues serines 83 i 178 és necessària per a la funció de ciclina D1 ja que, per exemple, l'expressió d'aquesta ciclina no té cap efecte sobre l'adhesió cel·lular (*spreading*) en presència de només un dels dos mutants no fosforilables, ja sigui S83A o S178A. Per contra observem un comportament diferent quan utilitzem els mutants fosfomimètics en experiments de rescat de les funcions de ciclina D1. En absència d'aquesta ciclina, l'expressió del mutant fosfomimètic S178E no rescata i rescata parcialment els fenotips d'adhesió i invasió, respectivament. Això indica que ciclina D1 es requereix per la fosforilació de l'altra serina (S83). Aquesta afirmació està d'acord amb els resultats on mostrem *in vivo* que els nivells de paxilina fosforilada en la serina 83 disminueixen en absència de ciclina D1. En canvi, l'expressió del mutant S83E rescata completament els fenotips d'adhesió i invasió en absència de ciclina D1; per tant, existeix una altra quinasa que fosforila la serina 178 quan no hi ha ciclina D1. Llavors, es planteja la qüestió de quin altre mecanisme pot estar implicat en la fosforilació de paxilina en la serina 178, a part de ciclina D1, i quina funció pot tenir.

Referent a aquesta incògnita, s'ha demostrat que la quinasa JNK també fosforila la paxilina en la serina 178 i aquesta fosforilació promou el *spreading* i la migració en les cèl·lules epitelials en una via dependent d'EGF, i que implica la fosforilació de paxilina en les tirosines 31 i 118 per FAK, on aquesta fosforilació permet induir la migració cel·lular a través de l'activació de Rac1 (Huang et al., 2003; Huang et al., 2008). Alternativament, hi ha un estudi que mostra com la paxilina pot ser fosforilada en la serina 178 per altres quinases a més de JNK (Ueno et al., 2015). En aquest estudi demostren que la fosforilació de paxilina

en la serina 178 té un paper essencial en la formació d'invasió durant el procés d'invasió, especialment en els gliomes, però que el bloqueig de l'activitat de la quinasa JNK no redueix el nombre d'invasió ni la capacitat invasiva del glioma. En aquest cas, i tenint en compte les nostres dades, ciclina D1 podria substituir a la quinasa JNK i ser la responsable de la fosforilació de la paxilina en la serina 178 en els gliomes de forma independent de JNK. De totes maneres, a diferència del cas amb la serina 83, no hem trobat un anticòs específic contra la forma fosforilada de paxilina en la serina 178 i, per tant, no hem pogut comprovar *in vivo* si en el nostre model és el complex ciclina D1-Cdk4 o la quinasa JNK la que fosforila la paxilina en la serina 178 en condicions normals.

Pel que fa a la fosforilació de paxilina en la serina 83, en un altre estudi es va veure que la quinasa ERK també fosforila la paxilina en la serina 83 en els focus d'adhesió i promou el *spreading* i la migració de les cèl·lules en una via dependent de HGF (Ishibe et al., 2004). No obstant, ERK i ciclina D1 tenen un efecte discordant en la capacitat d'extensió de les cèl·lules. L'activació d'ERK induïda per HGF promou el *spreading* de cèl·lules epitelials (Ishibe et al., 2004) mentre que els fibroblasts de ratolí *Ccnd1* *-/-* i les cèl·lules tumorals *knock down* de ciclina D1 tenen un *spreading* més ràpid. Aquesta discrepància podria estar relacionada amb una localització subcel·lular diferent de la paxilina fosforilada en la serina 83. Hem observat fosforilació de paxilina en la serina 83 tant en la membrana cel·lular com en els focus d'adhesió, però només hem detectat co-localització amb ciclina D1 en la membrana cel·lular. Hem comprovat que ciclina D1 s'uneix a la regió C-terminal de la paxilina, als dominis LIM, i que es requereixen aquests dominis LIM per a la localització de la paxilina en els focus d'adhesió (Brown et al., 1996). Llavors, es pot pensar que la interacció de paxilina amb ERK i ciclina D1 podria ser mútuament exclouent. És possible que la fosforilació de paxilina per ERK en els focus d'adhesió produeixi un *spreading* més ràpid i eficient, mentre que la fosforilació de paxilina pel complex ciclina D1-Cdk4 en la membrana cel·lular tingui un efecte oposat. Els nostres resultats ens mostren que ciclina D1 fosforila paxilina en la serina 83 d'una manera independent d'ERK i, per tant, aquesta fosforilació en la membrana cel·lular pot induir una funció diferent i/o oposada a la que fa ERK en els focus d'adhesió. Per exemple, la fosforilació de paxilina en les tirosines 31 i 118 està present en diverses localitzacions per promoure efectes diferents en l'adhesió cel·lular (Chen et al.,

2004). Les tirosina-quinases FAK i Brk fosforilen la paxilina en els focus d'adhesió i en els lamel·lipodis, respectivament, i ambdues promouen la invasió de les cèl·lules. No obstant això, la fosforilació de paxilina per FAK és important pel reciclatge dels focus d'adhesió i per a l'adhesió cel·lular, mentre que la fosforilació de paxilina per Brk no altera l'adhesió cel·lular (Chen et al., 2004).

D'altra banda, també hem observat que el complex ciclina D1-Cdk4 fosforila *in vitro* la paxilina en la serina 244, però no hem associat la fosforilació en aquest lloc amb l'adhesió i la migració cel·lulars, i tampoc hi ha cap treball en la literatura que la relacioni. Aquesta serina 244 forma part d'un lloc canònic de fosforilació per CDKs i potser per això és fosforilada per Cdk4, però no podem descartar la possibilitat que la fosforilació de paxilina en la serina 244 pel complex ciclina D1-Cdk4 pugui tenir un paper *in vivo* en els processos d'adhesió i migració cel·lulars.

3. LA FUNCIO DE LA GTPASA RAC1

La funció de la GTPasa Rac1 és essencial per la formació de membranes *ruffles* i per la formació de protrusions en les cèl·lules, necessàries per la migració (Iden and Collard, 2008). Els fibroblasts deficients en Rac1 mostren una morfologia més estesa a la matriu extracel·lular que les cèl·lules *wild type* i tenen defectes en la migració (Steffen et al., 2013), i aquest fenotip és el mateix que hem vist nosaltres en les cèl·lules deficients en ciclina D1. Això ens fa pensar que Rac1 pot ser un efector de ciclina D1 i que pot ser molt important en la invasió i en el càncer. En diversos estudis s'han vist nivells elevats de la GTPasa Rac1 en el càncer de mama i en metàstasis en els ganglis limfàtics (Schnelzer et al., 2000), on els pacients amb una recurrència del càncer de mama mostraven un augment en la localització de Rac1 a la membrana, indicant que la translocació de Rac1 a la membrana cel·lular podia causar una activació constitutiva de la senyalització de Rac1 en els càncers de mama més agressius (Schnelzer et al., 2000). També s'ha vist que en diferents tumors, com en el de pròstata, l'expressió de Rac1 està sobreexpressada i promou migració, invasió i metàstasis de cèl·lules tumorals, i utilitzant un inhibidor de Rac1 es poden bloquejar aquests fenotips (Zins et al., 2013).

Veient aquests antecedents, en aquest treball proposem que el complex ciclina D1-Cdk4 indueix l'activació de Rac1 a través de la fosforilació de la paxilina en la serina 83 en la membrana cel·lular. Es demostra que els fibroblasts deficients en ciclina D1 no només tenen una reducció de la paxilina fosforilada en la serina 83, sinó també en els nivells de Rac1 activa unida a GTP, i mostren una disminució de membranes *ruffles* després de ser sembrades sobre fibronectina. A més, també hem vist que si segreguem la ciclina D1 a la membrana cel·lular mitjançant l'expressió de l'al·lel ciclina D1-CAAX hi ha una major activació de Rac1 respecte a l'expressió de l'al·lel *wild type* de ciclina D1, suggerint que la migració i la invasió cel·lulars induïdes per Rac1 poden ser conseqüència de l'activitat citoplasmàtica de ciclina D1.

D'altra banda, l'expressió de l'al·lel hiperactiu de Rac1 Q61L rescata els fenotips d'invasió i *spreading* observats en les cèl·lules deficientes en ciclina D1, en el mateix nivell que ho fa l'al·lel fosfomimètic de paxilina S83E S178E, indicant que formen part de la mateixa via reguladora. És important destacar que el complex ciclina D1-Cdk4 només indueix l'activació de Rac1 en presència de l'al·lel normal de paxilina, i no ho fa en presència de l'al·lel no fosforilable de paxilina S83A S178A. Aquest resultat planteja la qüestió de com la paxilina fosforilada indueix l'activació de Rac1. En els focus d'adhesió, la fosforilació de la serina 83 de la paxilina per la quinasa ERK millora la interacció de paxilina amb FAK, que promou la fosforilació de la paxilina en les tirosines 31 i 118 (Ishibe et al., 2004). Seguidament, la fosforilació de paxilina en aquestes tirosines produeix el reclutament d'un factor GEF (DOCK180) que indueix l'activitat de Rac1 i la migració cel·lular (Deakin and Turner, 2008). Aquest mecanisme no es pot aplicar en el nostre cas ja que els fibroblasts deficientes en ciclina D1 mostren un augment en la quantitat de paxilina fosforilada en la tirosina 118 (Li et al., 2006a), i hem observat nivells més baixos de Rac1 activa en cèl·lules deficientes en ciclina D1. Llavors, hi ha d'haver vies alternatives que impliquin altres GEFs reclutats per la paxilina fosforilada, com PIX i Vav2, que podrien intervenir en l'activació de Rac1 de manera dependent de ciclina D1 (Deakin and Turner, 2008; Jones et al., 2013).

4. CICLINA D1 I PAXILINA EN EL CÀNCER

L'entrada d'un tumor maligne en un procés metastàtic és sovint intractable, i és una preocupació important en la terapèutica del càncer. Les cèl·lules metastàtiques modifiquen la seva capacitat d'adhesió a la matriu extracel·lular i adquireixen una major motilitat. A més, l'activitat de ciclina D1 augmenta amb freqüència durant el creixement del tumor i la metastasi (Drobnjak et al., 2000; Huang et al., 2009; Beroukhim et al., 2010; Zheng et al., 2013). La seva importància en aquests processos ha estat atribuïda no només al seu paper en el control de la proliferació cel·lular, sinó també a la regulació de l'adhesió de la cèl·lula a la matriu extracel·lular i a la migració cel·lular (Velasco-Velázquez et al., 2011).

En aquest treball hem demostrat un efecte inhibidor del potencial metastàtic de les cèl·lules tumorals quan es reprimeix l'expressió de ciclina D1, i que aquest efecte es pot revertir per l'expressió de l'al·lel fosfomimètic de paxilina S83E S178E, demostrant la importància de la funció citoplasmàtica de ciclina D1 en la metastasi a través de la interacció amb la proteïna citoplasmàtica paxilina. Aquest efecte es correlaciona amb el que s'ha descrit que es requereix la paxilina fosforilada per a la formació de metastasis en diferents models de tumor (Brown and Turner, 2004; Deakin et al., 2012; Lu et al., 2014). S'ha vist que la quinasa MLK3 indueix la fosforilació de paxilina en la serina 178 i en la tirosina 118 i que promou la invasió, i també s'ha vist que les cèl·lules de càncer de mama derivades de la metastasi al pulmó tenen elevats nivells de paxilina fosforilada en la serina 178 (Chen and Gallo, 2012). El silenciament o la inhibició de MLK3, de JNK o l'expressió de l'al·lel de paxilina S178A disminueix la formació de metastasis del càncer de mama en el pulmó, suggerint que la senyalització MLK3-JNK-paxilina pot representar una possible diana terapèutica i/o un marcador de pronòstic en les metastasis del càncer de mama (Chen and Gallo, 2012).

El coneixement de la localització subcel·lular de ciclina D1 pot ser interessant per determinar la capacitat proliferativa i invasiva de tumors específics. Està acceptat que l'acumulació nuclear ciclina D1 és indicatiu que el tumor té una activitat mitòtica significativa.

Per exemple, s'ha observat la localització citoplasmàtica de ciclina D1 en els carcinomes de pròstata de baix grau amb expressió reduïda de Ki-67, mentre que la ciclina D1 nuclear s'associa amb els carcinomes de pròstata d'alt grau i una expressió elevada de Ki-67 (Comstock et al., 2007). Per contra, l'expressió citoplasmàtica de ciclina D1 no s'ha tingut en compte com un indicador de l'estat del tumor que no sigui l'estat no proliferatiu. No obstant, diferents patrons d'invasió en el carcinoma d'endometri, de pròstata i de colon mostren una expressió membranosa-citoplasmàtica de ciclina D1 que s'ha associat amb l'agressivitat del tumor (Stewart et al., 2009; Wang et al., 2009; Betge et al., 2012; Euscher et al., 2013; Hertel et al., 2014; Lai et al., 2014; Salhia et al., 2015).

En col·laboració amb el grup d'Anatomia Patològica de l'IRBLleida es va analitzar per immunohistoquímica l'expressió i la localització de ciclina D1 en els carcinomes d'endometri, de mama, de pròstata i de colon amb diferents tipus d'invasió (Fusté et al., 2016). Es va observar un augment de l'expressió membranosa-citoplasmàtica de ciclina D1 en cèl·lules tumorals en determinats patrons d'invasió i també es va apreciar una major expressió membranosa-citoplasmàtica de ciclina D1 en les cèl·lules perifèriques en comparació amb les cèl·lules internes del tumor (Fusté et al., 2016). Tenint en compte aquestes dades, es va plantejar la hipòtesi que la presència de ciclina D1 al citoplasma i associada a la membrana cel·lular podria ser un indicador del fenotip invasiu. D'acord amb això, l'al·lel ciclina D1-CAAX associat a la membrana cel·lular indueix major invasivitat de les cèl·lules tumorals d'endometri i de pròstata, i també augmenta la formació de metàstasis pulmonars en ratolins a través d'un mecanisme dependent de RalB. Però la nostra proposta no s'ha d'entendre com que ciclina D1 té dues funcions excloents com a oncogèn, proliferativa quan està acumulada al nucli i invasiva quan s'acumula al citoplasma. Per immunohistoquímica, hem vist que ciclina D1 mostra un patró de localització divers en els teixits de càncer, i l'acumulació citoplasmàtica no significa l'exclusió nuclear i viceversa (Comstock et al., 2007; Fusté et al., 2016). Per tant, podem imaginar que quan una quantitat detectable de ciclina D1 es mou al citoplasma pot ser indicatiu d'un increment en el potencial invasiu de les cèl·lules.

En l'actualitat, els complexos ciclina D-Cdk4/6 es consideren dianes rellevants per la teràpia del càncer, i s'estan utilitzant tres inhibidors diferents específics de Cdk4/6 en diversos assaigs clínics: Palbociclib (Pfizer), Ribociclib (Novartis) i Abemaciclib (Lilly) (VanArsdale et al., 2015). Per exemple, el Palbociclib ja ha estat aprovat pel tractament del càncer de mama metastàtic HER2-negatiu/receptor d'estrogen-positiu. Les nostres dades reforcen la importància d'aquests inhibidors en la teràpia del càncer suggerint que la inactivació dels complexos ciclina D-Cdk4/6 no només ha de produir la regressió del tumor, com s'espera pel seu paper en la proliferació cel·lular, sinó que també ha d'evitar la propagació del tumor i la metastasi. Referent a això, nosaltres hem vist que el tractament de cèl·lules tumorals amb Palbociclib redueix la fosforilació de paxilina *in vitro* i *in vivo* i, per tant, això pot tenir efectes en la migració i la invasió cel·lulars. A més, reforça la importància d'estudiar els inhibidors dels efectors de ciclina D1, com paxilina, Rac1 i RalB, i de les seves vies de senyalització per tal d'evitar la invasió i la metastasi dels tumors (Nagaraj et al., 2010; Zins et al., 2013; Xiong et al., 2015). Recentment, s'ha identificat un mecanisme a través del qual els estrògens regulen la motilitat cel·lular i la invasió del càncer de mama a través de la paxilina (Shortrede et al., 2016), i que l'administració de docetaxel té un efecte anti-cancerígen induint l'apoptosi de les cèl·lules tumorals del càncer de pròstata a través de la supressió de la via de senyalització de la paxilina i la cofilina (Xiao et al., 2016). També s'ha analitzat l'efecte de l'agent citotòxic antroquina en el càncer de bufeta, que té efectes anti-proliferatius i anti-metastàtics en cèl·lules tumorals de càncer de bufeta, i inhibeix la migració i la invasió d'aquestes cèl·lules en concentracions no citotòxiques a través de la inactivació de la paxilina i induint l'expressió de proteïnes pro-apoptòtiques (Chiu et al., 2016).

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Primera

Paxilina s'uneix i és un substrat citoplasmàtic del complex ciclina D1-Cdk4.

Segona

El complex ciclina D1-Cdk4 fosforila la paxilina en les serines 83 i 178, i aquesta fosforilació és necessària per regular els processos d'adhesió i invasió cel·lulars.

Tercera

Ciclina D1 i la quinasa ERK actuen de forma independent sobre paxilina, en la membrana cel·lular i en els focus d'adhesió, respectivament.

Quarta

Ciclina D1, a través de la fosforilació de paxilina, augmenta l'activitat Rac1 necessària per la migració i la invasió cel·lulars.

Cinquena

La localització citoplasmàtica de ciclina D1 promou la migració i la invasió cel·lulars a través de l'activació de les GTPases Rac1 i RalB, de manera dependent de Cdk4.

Sisena

L'activitat citoplasmàtica del complex ciclina D1-Cdk4 no altera la proliferació cel·lular ni el creixement clonal.

Setena

En models de xenotransplantament, ciclina D1 és necessària per la metàstasi, i l'activitat citoplasmàtica de ciclina D1 indueix metàstasis pulmonars a través de la fosforilació de paxilina en la via Ciclina D1-Cdk4-Paxilina-Rac1.

BIBLIOGRAFIA

- A**don, A. M., Zeng, X., Harrison, M. K., Sannem, S., Kiyokawa, H., Kaldis, P. and Saavedra, H. I. Cdk2 and Cdk4 regulate the centrosome cycle and are critical mediators of centrosome amplification in p53-null cells. *Mol. Cell. Biol.* 30, 694-710 (2010).
- Alam, T., Alazmi, M., Gao, X., Arold, S. T.** How to find a leucine in a haystack? Structure, ligand recognition and regulation of leucine–aspartic acid (LD) motifs. *Biochem. J.* 460, 317-329 (2014).
- Alao, J. P.** The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol. Cancer* 6:24, 1-16 (2007).
- Alao, J. P., Gamble, S. C., Stavropoulou, A. V., Pomeranz, K. M., Lam, E. W., Coombes, R. C. and Vigushin, D. M.** The cyclin D1 proto-oncogene is sequestered in the cytoplasm of mammalian cancer cell lines. *Mol. Cancer* 5, 1-11 (2006).
- Alhaja, E., Adan, J., Pagan, R., Mitjans, F., Cascalló, M., Rodríguez, M., Noé, V., Ciudad, C. J., Mazo, A., Vilaró, S. and Piulats, J.** Anti-migratory and anti-angiogenic effect of p16: a novel localization at membrane ruffles and lamellipodia in endothelial cells. *Angiogenesis* 7, 323-333 (2004).
- Alt, J. R., Cleveland, J. L., Hannink, M. and Diehl, J. A.** Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev.* 14, 3102-3114 (2000).
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moora, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K.** Current protocols in molecular biology (1987).
- B**alda, M. S., Garrett, M. D. and Matter, K. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J. Cell Biol.* 160, 423-432 (2003).
- Bendris, N., Lemmers, B. and Blanchard, J. M.** Cell cycle , cytoskeleton dynamics and beyond : the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell Cycle* 14, 1786-1798 (2015).
- Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J., Urashima, M., Mc Henry, K.T., Pinchback, R.M., et al.** The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899-905 (2010).

- Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A. and Roberts, J. M.** p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev.* *18*, 862-876 (2004).
- Betge, J., Kornprat, P., Pollheimer, M. J., Lindtner, R. A., Schlemmer, A., Rehak, P., Vieth, M. and Langner, C.** Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* *19*, 3706-3712 (2012).
- Betticher, D. C., Thatcher, N., Altermatt, H. J., Hoban, P., Ryder, W. D. and Heighway, J.** Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* *11*, 1005-1011 (1995).
- Bi, Y., Han, Y., Bi, H., Gao, F. and Wang, X.** miR-137 impairs the proliferative and migratory capacity of human non-small cell lung cancer cells by targeting paxillin. *Hum. Cell.* *27*, 95-102 (2014).
- Bienvenu, F., Jirawatnotai, S., Elias, J. E., Meyer, C. A., Mizeracka, K., Marson, A., Frampton, G. M., Cole, M. F., Odom, D. T., Odajima, J., Geng, Y., Zagodzón, A., Jecrois, M., Young, R. A., Liu, X. S., Cepko, C. L., Gygi, S. P. and Sicinski, P.** Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic-proteomic screen. *Nature* *463*, 374-378 (2010).
- Biliran, H., Wang, Y., Banerjee, S., Xu, H., Heng, H., Thakur, A., Bollig, A., Sarkar, F. H., and Liao, J. D.** Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line. *Clin. Cancer Res.* *11*, 6075-6086 (2005).
- Bockstaele, L., Coulonval, K., Kooken, H., Paternot, S., and Roger, P. P.** Regulation of CDK4. *Cell Div.* *1*, 1-16 (2006).
- Bretscher, M. S. and Aguado-Velasco, C.** EGF induces recycling membrane to form ruffles. *Curr. Biol.* *8*, 721-724 (1998).
- Brown, M. C., Curtis, M. S. and Turner, C. E.** Paxillin LD motifs may define a new family of protein recognition domains. *Nat. Struct. Biol.* *5*, 677-678 (1998b).
- Brown, M. C., Perrotta, J. A. and Turner, C. E.** Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J. Cell Biol.* *135*, 1109-1123 (1996).
- Brown, M. C., Perrotta, J. A. and Turner, C. E.** Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin. *Mol. Biol. Cell* *9*, 1803-1816 (1998a).

- Brown, M. C. and Turner, C. E.** Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* 84, 1315-1339 (2004).
- Burbelo, P., Wellstein, A. and Pestell, R. G.** Altered Rho GTPase signaling pathways in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 84, 43-48 (2004).
- Burrige, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., Turner, C.** Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 487-525 (1988).
- Chay, K. O., Park, S. S. and Mushinski, J. F.** Linkage of caspase-mediated degradation of paxillin to apoptosis in Ba/F3 murine pro-B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 14521-14529 (2002).
- Chen, D. L., Wang, D.S., Wu, W. J., Zeng, Z. L., Luo, H. Y., Qiu, M. Z., Ren, C., Zhang, D. S., Wang, Z. Q., Wang, F. H., Li, Y. H., Kang, T. B. and Xu R. H.** Overexpression of paxillin induced by miR-137 suppression promotes tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 34, 803-811 (2013).
- Chen, H. Y., Shen, C. H., Tsai, Y. T., Lin, F. C., Huang, Y. P. and Chen, R. H.** Brk activates rac1 and promotes cell migration and invasion by phosphorylating paxillin. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10558-10572 (2004).
- Chen, J. and Gallo, K. A.** MLK3 regulates paxillin phosphorylation in chemokine-mediated breast cancer cell migration and invasion to drive metastasis. *Cancer Res.* 72, 4130-4140 (2012).
- Ching, Y. P., Leong, V. Y., Lee, M. F., Xu H. T., Jin, D. Y. and Ng, I. O.** P21-activated protein kinase is overexpressed in hepatocellular carcinoma and enhances cancer metastasis involving c-Jun NH2-terminal kinase activation and paxillin phosphorylation. *Cancer Res.* 67, 3601-3608 (2007).
- Chiu, K. Y., Wu, C. C., Chia, C. H., Hsu, S. L. and Tzeng, Y. M.** Inhibition of growth, migration and invasion of human bladder cancer cells by antrocin, a sesquiterpene lactone isolated from *Antrodia cinnamomea*, and its molecular mechanisms. *Cancer Lett.* 373, 174-184 (2016).
- Comstock, C. E., Revelo, M. P., Buncher, C. R. and Knudsen, K. E.** Impact of differential cyclin D1 expression and localisation in prostate cancer. *Br. J. Cancer* 96, 970-979 (2007).

- Côte, J. F., Turner, C. E. and Tremblay, M. L.** Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST. *J. Biol. Chem.* 274, 20550-20560 (1999).
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B. A.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789 (1995).
- Deakin, N. O., Pignatelli, J. and Turner, C. E.** Diverse roles for the paxillin family of proteins in cancer. *Genes Cancer* 3, 362-370 (2012).
- Deakin, N. O. and Turner, C. E.** Paxillin comes of age. *J. Cell Sci.* 121, 2435-2444 (2008).
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F. and Sherr, C. J.** Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499-3511 (1998).
- Diehl, J. A., Zindy, F. and Sherr, C. J.** Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11, 957-972 (1997).
- Digman, M. A., Brown, C. M., Horwitz, A. F., Mantulin, W.W. and Gratton, E.** Paxillin dynamics measured during adhesion assembly and disassembly by correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 94, 2819-2831 (2008).
- Drobnjak, M., Osman, I., Scher, H. I., Fazzari, M. and Cordon-Cardo, C.** Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone. *Clin. Cancer Res.* 6, 1891-1895 (2000).
- Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R. and Greenberg, M. E.** Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase akt. *Science* 275, 661-665 (1997).
- Efimov, A., Schiefermeier, N., Grigoriev, I., Brown, M. C., Turner, C. E., Small, J. V. and Kaverina, I.** Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites. *J. Cell Sci.* 121, 196-204 (2008).
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A.** Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635 (2002).

- Euscher, E., Fox, P., Bassett, R., Al-Ghawi, H., Ali-Fehmi, R., Barbuto, D., Djordjevic, B., Fraumenhoffer, E., Kim, I., Hong, S. R., Montiel, D., Moschiano, E., Roma, A., Silva, E. and Malpica, A.** The pattern of myometrial invasion as a predictor of lymph node metastasis or extrauterine disease in low-grade endometrial carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 37, 1728-1736 (2013).
- Fantl, V., Stamp, G., Andrews, A., Rosewell, I. and Dickson, C.** Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev.* 9, 2364-2372 (1995).
- Fernández, R. M. H., Ruiz-Miró, M., Dolcet, X., Aldea, M. and Garí, E.** Cyclin D1 interacts and collaborates with Ral GTPases enhancing cell detachment and motility. *Oncogene* 30, 1936-1946 (2011).
- Fernández-Hernández, R., Rafel, M., Fusté, N. P., Aguayo, R. S., Casanova, J. M., Egea, J., Ferrezuelo, F. and Garí, E.** Cyclin D1 localizes in the cytoplasm of keratinocytes during skin differentiation and regulates cell-matrix adhesion. *Cell Cycle* 12, 2510–2517 (2013).
- Firat-Karalar, E.N., Sante, J., Elliott, S. and Stearns, T.** Proteomic analysis of mammalian sperm cells identifies new components of the centrosome. *J. Cell Sci.* 127, 4128-4133 (2014).
- Fleischmann, A., Rocha, C., Saxer-Sekulic, N., Zlobec, I., Sauter, G. and Thalmann, G.N.** High-level cytoplasmic cyclin D1 expression in lymph node metastases from prostate cancer independently predicts early biochemical failure and death in surgically treated patients. *Histopathology* 58, 781-789 (2011).
- Frisch, S. M., and Francis, H.** Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell. Biol.* 124, 619-626 (1994).
- Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T. and Pestell, R. G.** Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145, 5439-5447 (2004).
- Fukasawa, K.** Oncogenes and tumor suppressors take on centrosomes. *Nat. Rev. Cancer* 7, 911-924 (2007).
- Fusté, N. P., Castelblanco, E., Felip, I., Santacana, M., Fernández-Hernández, R., Gatus, S., Pedraza, N., Pallarés, J., Cemeli, T., Valls, J., Tarres, M., Ferrezuelo, F., Dolcet, X., Matias-Guiu, X. and Garí, E.** Characterization of cytoplasmic cyclin D1 as a marker of invasiveness in cancer. *Oncotarget* 7, 26979-26991 (2016).

- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. and Yamada, K. M.** Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 793–805 (2001).
- Godinho, S.A., Picone, R., Burute, M., Dagher, R., Su, Y., Leung, C.T., Polyak, K., Brugge, J.S., Thery, M. and Pellman, D.** Oncogene-like induction of cellular invasion from centrosome amplification. *Nature* 510, 167-171 (2014).
- Hagel, M., George, E. L., Kim, A., Tamimi, R., Opitz, S. L., Turner, C. E., Imamoto, A. and Thomas, S. M.** The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol. Cell. Biol.* 22, 901–915 (2002).
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674 (2011).
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.** The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000).
- Hancock, J.F.** Ras proteins: different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 373–384 (2003).
- Herreros, L., Rodríguez-Fernandez, J. L., Brown, M. C., Alonso-Lebrero, J. L., Cabañas, C., Sánchez-Madrid, F., Longo, N., Turner, C. E. and Sánchez-Mateos, P.** Paxillin localizes to the lymphocyte microtubule organizing center and associates with the microtubule cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 275, 26436-26440 (2000).
- Hertel J, D., Huettner, P. C. and Pfeifer, J. D.** Lymphovascular space invasion in microcystic elongated and fragmented (MELF)-pattern well-differentiated endometrioid adenocarcinoma is associated with a higher rate of lymph node metastasis. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 33, 127-134 (2014).
- Hochegger, H., Takeda, S. and Hunt, T.** Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 910-916 (2008).
- Hoffman, G. R. and Cerione, R. A.** Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS Letters* 513, 85-91 (2002).
- Holthoner, W., Pillinger, M., Groger, M., Wolff, K., Ashton, A. W., Albanese, C., Neumeister, P., Pestell, R. G. and Petzelbauer, P.** Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 45847-45853 (2002).

- Hoppe, A. D. and Swanson, J. A.** Cdc42, Rac1 and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* 15, 1895-1903 (2004).
- Huang, C., Borchers, C. H., Schaller, M. D. and Jacobson, K.** Phosphorylation of paxillin by p38MAPK is involved in the neurite extension of PC-12 cells. *J Cell Biol.* 164, 593-602 (2004).
- Huang, C., Rajfur, Z., Borchers, C., Schaller, M. D. and Jacobson, K.** JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* 424, 219-23 (2003).
- Huang, H., Hu, Y., Li, N. and Zhu, Y.** Inhibition of tumor growth and metastasis by non-small cell lung cancer cells transfected with cyclin D1-targeted siRNA. *Oligonucleotides* 19, 151-162 (2009).
- Huang, Z., Yan, D. P. and Ge, B. X.** JNK regulates cell migration through promotion of tyrosine phosphorylation of paxillin. *Cell. Signal.* 20, 2002-2012 (2008).
- Huard, J. M., Forster, C. C., Carter, M. L., Sicinski, P. and Ross, M. E.** Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development* 126, 1927-1935 (1999).
- Hulit, J., Wang, C., Albanese, C., Di Vizio, D., Mahmood, R., Augenlicht, L. H., Russell, R. and Pestell, R. G.** Cyclin D1 genetic heterozygosity regulates colonic epithelial cell differentiation and tumor number in ApcMin mice. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7598-7611 (2004).
- Hynes, R.O.** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687 (2002)
- Iden, S. and Collard, J. G.** Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 846-859 (2008).
- Ikeda Y, Oda K, Hiraike-Wada O, Koso T, Miyasaka A, Kashiyama T, Tanikawa M, Sone K, Nagasaka K, Maeda D, Kawana K, Nakagawa S, et al.** Cyclin D1 harboring the T286I mutation promotes oncogenic activation in endometrial cancer. *Oncol. Rep.* 30, 584-588 (2013).
- Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z. X. and Cantley, L. G.** Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Mol. Cell* 16, 257-267 (2004).

- Jagadeeswaran, R., Surawska, H., Krishnaswamy, S., Janamanchi, V., Mackinnon, A. C., Seiwert, T. Y., Loganathan, S., Kanteti, R. et al.** Paxillin is a target for somatic mutations in lung cancer: implications for cell growth and invasion. *Cancer Res.* 68, 132-142 (2008).
- Jamieson, J. S., Tumbarello, D. A., Halle, M., Brown, M. C., Tremblay, M. L. and Turner, C.E.** Paxillin is essential for PTP-PEST-dependent regulation of cell spreading and motility: a role for paxillin kinase linker. *J. Cell Sci.* 118, 5835-5847 (2005).
- Jares, P., Rey, M. J., Fernández, P. L., Campo, E., Nadal, A., Muñoz, M., Mallofré, C., Muntané, J., Nayach, I., Estapé, J. and Cardesa, A.** Cyclin D1 and retinoblastoma gene expression in human breast carcinoma: Correlation with tumour proliferation and oestrogen receptor status. *J. Pathol.* 182, 160-166 (1997).
- Jones, M. C., Machida, K., Mayer, B. J. and Turner, C. E.** Paxillin kinase linker (PKL) regulates Vav2 signaling during cell spreading and migration. *Mol. Biol. Cell* 24, 1882-1894 (2013).
- Kadmas, J. L. and Beckerle, M. C.** The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 920–931 (2004).
- Kanteti, R., Batra, S. K., Lennon, F. E. and Salgia, R.** FAK and paxillin, two potential targets in pancreatic cancer. *Oncotarget* 7, 31586-31601 (2016).
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E. and Sherr, C. J.** Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* 7, 331-342 (1993).
- Kim, J. K. and Diehl, J. A.** Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. *J. Cell. Physiol.* 220, 292-296 (2009).
- Knudsen, K. E.** The cyclin D1b splice variant: An old oncogene learns new tricks. *Cell Div.* 1, 1-12 (2006).
- Kozar, K., Ciemerych, M. A., Rebel, V. I., Shigematsu, H., Zagodzón, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R. T., Akashi, K. and Sicinski, P.** Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118, 477-491 (2004).

- Kratimenos, P., Koutroulis, I., Marconi, D., Syriopoulou, V., Delivoria-Papadopoulos, M., Chrousos, G. P. and Theocharis, S.** Multi-targeted molecular therapeutic approach in aggressive neuroblastoma: the effect of Focal Adhesion Kinase-Src-Paxillin system. *Expert. Opin. Ther. Targets* 18, 1395-1406 (2014).
- Kriegstein, A. and Alvarez-Buylla, A.** The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149-184 (2009).
- Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C.** Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Elsevier Saunders, Ninth Edition - Chapter 7; 265-340 (2015).
- Lai, Y. H., Wu, L. C., Li, P. S., Wu, W. H., Yang, S. B., Xia, P., He, X. X. and Xiao, L. B.** Tumour budding is a reproducible index for risk stratification of patients with Stage II colon cancer. *Colorectal Dis.* 16, 259-264 (2014).
- Lam, E. W., Glassford, J., Banerji, L., Thomas, N. S., Sicinski, P. and Klaus, G. G.** Cyclin D3 compensates for loss of cyclin D2 in mouse B-lymphocytes activated via the antigen receptor and CD40. *J. Biol. Chem.* 275, 3479-3484 (2000).
- Lazarov, M., Kubo, Y., Cai, T., Dajee, M., Tarutani, M., Lin, Q., Fang, M., Tao, S., Green, C. L. and Khavari, P. A.** CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nat Med.* 8, 1105-1114 (2002).
- Lee, G. H., Kim, S. H., Homayouni, R. and D'Arcangelo, G.** DAB2IP regulates neuronal migration and neurite outgrowth in the developing neocortex. *PLoS One.* 7, 1-14 (2012).
- Lee, R. J., Albanese, C., Fu, M., D'Amico, M., Lin, B., Watanabe, G., Haines, G. K. 3rd, Siegel, P. M., Hung, M. C., Yarden, Y., Horowitz, J. M., Muller, W. J. and Pestell R. G.** Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20, 672-683 (2000).
- Li, Z., Chen, K., Jiao, X., Wang, C., Willmarth, N. E., Casimiro, M. C., Li, W., Ju, X., Kim, S. H., Lisanti, M. P., Katzenellenbogen, J. A. and Pestell, R.G.** Cyclin D1 integrates estrogen-mediated DNA damage repair signaling. *Cancer Res.* 74, 3959-3970 (2014).
- Li, Z., Jiao, X., Wang, C., Ju, X., Lu, Y., Yuan, L., Lisanti, M. P., Katiyar, S. and Pestell, R. G.** Cyclin D1 induction of cellular migration requires p27 (KIP1). *Cancer Res.* 66, 9986-9994 (2006b).

- Li, Z., Wang, C., Jiao, X., Lu, Y., Fu, M., Quong, A. A., Dye, C., Yang, J., Dai, M., Ju, X., Zhang, X., Li, A., Burbelo, P., Stanley, E. R. and Pestell, R. G.** Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4240-4256. (2006a).
- Liao, Y., Mu, G., Zhang, L., Zhou, W., Zhang, J. and Yu, H.** Lysophosphatidic acid stimulates activation of focal adhesion kinase and paxillin and promotes cell motility, via LPA1-3, in human pancreatic cancer. *Dig. Dis. Sci.* 58, 3524-3533 (2013).
- Lu, F., Gladden, A. B. and Diehl, J. A.** An Alternatively Spliced Cyclin D1 Isoform, Cyclin D1b, Is a Nuclear Oncogene. *Cancer Res.* 63, 7056-7061 (2003).
- Lu, W., Wei, W., de Bock, G. H., Zhou, H., Li, Q. and Shen, X.** The roles of Wnt5a, JNK and paxillin in the occurrence of metastasis of pancreatic adenocarcinoma. *Int J Clin Oncol.* 19, 1011-1019 (2014).
- Luo, J., Sharma, N., Seftor, E. A., De Larco, J., Heidger, P. M., Hendrix, M. J. and Lubaroff, D. M.** Heterogeneous Expression of Invasive and Metastatic Properties in a Prostate Tumor Model. *Pathol. Oncol. Res.* 3, 264-271 (1997).
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P. and Barbacid, M.** Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118, 493-504 (2004).
- Malumbres, M.** Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 15, 1-10 (2014).
- Marampon, F., Casimiro, M. C., Fu, M., Powell, M. J., Popov, V. M., Lindsay, J., Zani, B. M., Ciccarelli, C., Watanabe, G., Lee, R. J. and Pestell, R. G.** Nerve growth factor regulation of cyclin D1 in PC12 cells through a p21RAS extracellular signal-regulated kinase pathway requires cooperative interactions between Sp1 and nuclear factor-kappaB. *Mol. Biol. Cell* 19, 2566-2578 (2008).
- Matafora, V., Paris, S., Dariozzi, S. and de Curtis, I.** Molecular mechanisms regulating the subcellular localization of p95-APP1 between the endosomal recycling compartment and sites of actin organization at the cell surface. *J. Cell Sci.* 114, 4509-4520 (2001).
- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J. and Kato, J. Y.** D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2066-2076. (1994).
- Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A. and Sherr, C. J.** Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65, 701-713 (1991).

- Meng, H., Tian, L., Zhou, J., Li, Z., Jiao, X., Li, W. W., Plomann, M., Xu, Z., Lisanti, M. P., Wang, C. and Pestell, R. G.** PACSIN 2 represses cellular migration through direct association with cyclin D1 but not its alternate splice form cyclin D1b. *Cell Cycle* 10, 73-81 (2011).
- Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Chan, J. R., Okada, A., Tomooka, Y., Hisanaga, S. and Tanoue, A.** Cdk5 regulates differentiation of oligodendrocyte precursor cells through the direct phosphorylation of paxillin. *J. Cell Sci.* 120, 4355–4366 (2007).
- Motokura, T., Bloom, T., Kim, H. G., Jüppner, H., Ruderman, J. V., Kronenberg, H. M. and Arnold, A.** A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 350, 512-515 (1991).
- Musgrove, E. A., Caldon, C. E., Barraclough, J., Stone, A., and Sutherland, R. L.** Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 558–572 (2011).
- Nagaraj NS, Smith JJ, Revetta F, Washington MK, Merchant NB.** Targeted inhibition of SRC kinase signaling attenuates pancreatic tumorigenesis. *Mol Cancer Ther.* 9, 2322-2332 (2010).
- Nayal, A., Webb, D. J., Brown, C. M., Schaefer, E. M., Vicente-Manzanares, M. and Horwitz, A. R.** Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J. Cell Biol.* 173, 587-589 (2006).
- Nelsen, C.J., Kuriyama, R., Hirsch, B., Negron, V.C., Lingle, W.L., Goggin, M.M., Stanley, M.W. and Albrecht, J.H.** Short term cyclin D1 overexpression induces centrosome amplification, mitotic spindle abnormalities, and aneuploidy. *J. Biol. Chem.* 280, 768-776 (2005).
- Neuman, E., Ladha, M. H., Lin, N., Upton, T. M., Miller, S. J., DiRenzo, J., Pestell, R. G., Hinds, P. W., Dowdy, S. F., Brown, M. and Ewen, M. E.** Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5338-5347 (1997).
- Neumeister, P., Pixley, F. J., Xiong, Y., Xie, H., Wu, K., Ashton, A., Cammer, M., Chan, A., Symons, M., Stanley, E. R. and Pestell, R. G.** Cyclin D1 governs adhesion and motility of macrophages. *Mol. Biol. Cell* 14, 2005-2015 (2003).
- Nielsen, N. H., Loden, M., Cajander, J., Emdin, S. O. and Landberg, G.** G1-S transition defects occur in most breast cancers and predict outcome. *Breast Cancer Res. Treat.* 56, 105-112 (1999).

- Nomura, N., Nomura, M., Mizuki, N. and Hamada, J.** Rac1 mediates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced migration of glioblastoma cells via paxillin. *Oncol. Rep.* 20, 705-711 (2008).
- Omran, O. M. and Al Sheeha, M.** Cytoskeletal Focal Adhesion Proteins Fascin-1 and Paxillin Are Predictors of Malignant Progression and Poor Prognosis in Human Breast Cancer. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 34, 201-212 (2015).
- Panetti, T. S.** Tyrosine phosphorylation of paxillin, FAK, and p130CAS: effects on cell spreading and migration. *Front Biosci.* 7, 143-150 (2002).
- Perisic, L., Lal, M., Hulkko, J., Hultenby, K., Önfelt, B., Sun, Y., Dunér, F., Patrakka, J., Betsholtz, C., Uhlen, M., Brismar, H., Tryggvason, K., Wernerson, A. and Pikkarainen, T.** Plekh2, a novel podocyte protein downregulated in human focal segmental glomerulosclerosis, is involved in matrix adhesion and actin dynamics. *Kidney Int.* 82, 1071-1083 (2012).
- Pestell, R. G.** New roles of cyclin D1. *Am. J. Pathol.* 183, 3-9 (2013).
- Petit, V., Boyer, B., Lentz, D., Turner, C. E., Thiery, J. P. and Vallés, A. M.** Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *J. Cell Biol.* 148, 957-970 (2000).
- Qin, J., Wang, F., Jiang, H., Xu, J., Jiang, Y. and Wang, Z.** MicroRNA-145 suppresses cell migration and invasion by targeting paxillin in human colorectal cancer cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 1328-1340 (2015).
- Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J. Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M. F. and Sherr, C. J.** Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* 7, 1559-1571 (1993).
- Raftopoulou, M. and Hall, A.** Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* 265, 23-32 (2004).
- Reed, S. I.** The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8, 529-561 (1992).
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. and Reed, S. I.** Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1669-1679 (1994).

- Ridley, A. J.** Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11, 471-477 (2001a)
- Ridley, A. J.** Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* 114, 2713-2722 (2001b).
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A.** The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410 (1992).
- Rowlands, T. M., Pechenkina, I. V., Hatsell, S. J., Pestell, R. G. and Cowin, P.** Dissecting the roles of beta-catenin and cyclin D1 during mammary development and neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11400-11405 (2003).
- Salhia, B., Trippel, M., Pfaltz, K., Cihoric, N., Grogg, A., Lädach, C., Zlobec, I. and Tapia, C.** High tumor budding stratifies breast cancer with metastatic properties. *Breast Cancer Res. Treat.* 150, 363-371 (2015).
- Sastry, S. K., Lyons, P. D., Schaller, M. D. and Burridge, K.** PTP-PEST controls motility through regulation of Rac1. *J. Cell Sci.* 115, 4305-4316 (2002).
- Sastry, S. K., Rajfur, Z., Liu, B. P., Cote, J. F., Tremblay, M. L. and Burridge, K.** PTP-PEST couples membrane protrusion and tail retraction via VAV2 and p190RhoGAP. *J. Biol. Chem.* 281, 11627-11636 (2006).
- Schaller, M. D.** Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 20, 6459-6472 (2001).
- Schmeichel, K. L. and Beckerle, M. C.** The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* 79, 211-219 (1994).
- Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M. and Lengyel, E.** Rac1 in human breast cancer; overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* 19, 3013-3020 (2000).
- Shen, Y.J., Kong, Z.L., Wan, F.N., Wang, H.K., Bian, X.J., Gan, H.L., Wang, C.F. and Ye, D.W.** Downregulation of DAB2IP results in cell proliferation and invasion and contributes to unfavorable outcomes in bladder cancer. *Cancer Science* 105, 704-712 (2014).
- Sherr, C. J.** D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* 20, 187-190 (1995).
- Sherr, C. J.** Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-1065 (1993).

- Sherr, C. J. and Roberts, J. M.** CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512 (1999).
- Shortrede, J. E., Uzair, I. D., Neira, F. J., Flamini, M. I. and Sanchez, A. M.** Paxillin, a novel controller in the signaling of estrogen to FAK/N-WASP/Arp2/3 complex in breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 430, 56-67 (2016).
- Sicinski, P., Donaher, J. L., Geng, Y., Parker, S. B., Gardner, H., Park, M. Y., Robker, R. L., Richards, J. S., McGinnis, L. K., Biggers, J. D., Eppig, J. J., Bronson, R. T., Elledge, S. J. and Weinberg, R. A.** Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 384, 470-474 (1996).
- Sicinski, P., Donaher, J. L., Parker, S. B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S. Z., Bronson, R. T., Elledge, S. J. and Weinberg, R. A.** Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 82, 621-630 (1995).
- Sicinska, E., Aifantis, I., Le Cam, L., Swat, W., Borowski, C., Yu, Q., Ferrando, A. A., Levin, S. D., Geng, Y., von Boehmer, H. and Sicinski, P.** Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell* 4, 451-461 (2003).
- Solomon, D. A., Wang, Y., Fox, S. R., Lambeck, T. C., Giesting, S., Lan, Z., Senderowicz, A. M. and Knudsen, E. S.** Cyclin D1 splice variants: Differential effects on localization, RB phosphorylation, and cellular transformation. *J. Biol. Chem* 278, 30339-30347 (2003).
- Solvason, N., Wu, W. W., Parry, D., Mahony, D., Lam, E. W., Glassford, J., Klaus, G. G., Sicinski, P., Weinberg, R., Liu, Y. J., Howard, M. and Lees, E.** Cyclin D2 is essential for BCR-mediated proliferation and CD5 B cell development. *Int. Immunol.* 12, 631-638 (2000).
- Spiczka, K. S. and Yeaman, C.** Ral-regulated interaction between Sec5 and paxillin targets exocyst to focal complexes during cell migration. *J. Cell Sci.* 121, 2880-2891 (2008).
- Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J. H., Noegel, A., Schleicher, M. and Shapiro, S. S.** Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 138-145 (2001).
- Steffen, A., Ladwein, M., Dimchev, G. A., Hein, A., Schwenkmezger, L., Arens, S., Ladwein, K. I., Margit Holleboom, J., Schur, F., Victor Small, J., Schwarz, J., Gerhard, R., Faix, J., Stradal, T. E., Brakebusch, C. and Rottner, K.** Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation. *J. Cell Sci.* 126, 4572-4588 (2013).

- Stewart, C. J., Brennan, B. A., Leung, Y. C. and Little, L.** MELF pattern invasion in endometrial carcinoma: association with low grade, myoinvasive endometrioid tumours, focal mucinous differentiation and vascular invasion. *Pathology* 41, 454-459 (2009).
- Streit, M., Velasco, P., Riccardi, L., Spencer, L., Brown, L. F., Janes, L., Lange-Asschenfeldt, B., Yano, K., Hawighorst, T., Iruela-Arispe, L. and Detmar, M.** Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. *EMBO J.* 19, 3272-3282 (2000).
- Subauste, M. C., Pertz, O., Adamson, E. D., Turner, C. E., Junger, S. and Hahn, K. M.** Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J. Cell Biol.* 165, 371-381 (2004).
- Sumrejkanchanakij, P., Tamamori-Adachi, M., Matsunaga, Y., Eto, K. and Ikeda, M. A.** Role of cyclin D1 cytoplasmic sequestration in the survival of postmitotic neurons. *Oncogene* 22, 8723-8730 (2003).
- Tsubouchi, A., Sakakura, J., Yagi, R., Mazaki, Y., Schaefer, E., Yano, H. and Sabe, H.** Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J. Cell Biol.* 159, 673-683 (2002).
- Tumbarello, D. A., Brown, M. C. and Turner, C. E.** The paxillin LD motifs. *FEBS Letters* 513, 114-118 (2002).
- Turner, C. E.** Paxillin interactions. *J. Cell Sci.* 113, 4139-4140 (2000)
- Turner, C. E., Brown, M. C., Perrotta, J. A., Riedy, M. C., Nikolopoulos, S. N., McDonald, A. R., Bagrodia, S., Thomas, S. and Leventhal, P. S.** Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J. Cell Biol.* 145, 851-863 (1999).
- Turner, C. E., Glenney, J. R., Jr and Burridge, K.** Paxillin: A new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol.* 111, 1059-1068 (1990).
- Turner, C. E. and Miller, J.T.** Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J. Cell Sci.* 107, 1583-1591 (1994).

- Ueno, H., Tomiyama, A., Yamaguchi, H., Uekita, T., Shirakihara, T., Nakashima, K., Otani, N., Wada, K., Sakai, R., Arai, H. and Mori, K.** Augmentation of invadopodia formation in temozolomide-resistant or adopted glioma is regulated by c-Jun terminal kinase-paxillin axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468, 240-247 (2015).
- VanArsdale, T., Boshoff, C., Arndt, K. T. and Abraham, R. T.** Molecular Pathways: Targeting the Cyclin D-CDK4/6 Axis for Cancer Treatment. *Clin Cancer Res.* 21, 2905-2910 (2015).
- van Diest, P. J., Michalides, R. J., Jannink, L., van der Valk, P., Peterse, H. L., de Jong, J.S., Meijer, C. J. and Baak, J. P.** Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. Correlations and prognostic value. *Am. J. Pathol.* 150, 705-711 (1997).
- van Triest, M., de Rooij, J. and Bos, J. L.** Measurement of GTP-bound ras-like GTPases by activation-specific probes. *Methods Enzymol.* 333, 343-348 (2001).
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G. and Waterfield, M. D.** Phosphoinositide 3-kinases: A conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* 22, 267-272 (1997).
- Velasco-Velázquez, M. A., Li, Z., Casimiro, M., Loro, E., Homsí, N. and Pestell, R. G.** Examining the role of cyclin D1 in breast cancer. *Future Oncol.* 7, 753-765 (2011).
- Wang, L. M., Kevans, D., Mulcahy, H., O'Sullivan, J., Fennelly, D., Hyland, J., O'Donoghue, D. and Sheahan, K.** Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* 33, 134-141 (2009).
- Wang, T. C., Cardiff, R. D., Zukerberg, L., Lees, E., Arnold, A. and Schmidt, E. V.** Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 369, 669-671 (1994).
- Wang, Z., Tseng, C.P., Pong, R.C., Chen, H., McConnell, J.D., Navone, N. and Hsieh, J.T.** The mechanism of growth-inhibitory effect of DOC-2/DAB2 in prostate cancer. Characterization of a novel GTPase-activating protein associated with N-terminal domain of DOC-2/DAB2. *J. Biol. Chem.* 277, 12622-12631 (2002).
- Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T. and Horwitz, A. F.** FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* 6, 154-161 (2004).

- Webb, D. J., Parsons, J. T. and Horwitz, A. F.** Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells-over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* 4, 97-100 (2002).
- Weiner, M. P. and Costa, G. L.** Rapid PCR site-directed mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 4, 131-136 (1994).
- Wolthuis, R. M., de Ruiter, N. D., Cool, R. H. and Bos, J. L.** Stimulation of gene induction and cell growth by the Ras effector Rlf. *EMBO J.* 16, 6748-6761 (1997).
- Xiao, L. J., Zhao, E. H., Zhao, S., Zheng, X., Zheng, H. C., Takano, Y. and Song, H. R.** Paxillin expression is closely linked to the pathogenesis, progression and prognosis of gastric carcinomas. *Oncol. Lett.* 7, 189-194 (2014).
- Xiao, P., Ma, T., Zhou, C., Xu, Y., Liu, Y. and Zhang, H.** Anticancer effect of docetaxel induces apoptosis of prostate cancer via the cofilin-1 and paxillin signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 13, 4079-4084 (2016).
- Xiong, X. Y., Hu, X. J., Li, Y. and Liu, C. M.** Inhibitory Effects of Enterolactone on Growth and Metastasis in Human Breast Cancer. *Nutr Cancer* 67, 1324-1332 (2015).
- Xiong, Y., Connolly, T., Futcher, B. and Beach, D.** Human D-type cyclin. *Cell* 65, 691-699 (1991).
- Yamauchi, J., Miyamoto, Y., Sanbe, A. and Tanoue, A.** JNK phosphorylation of paxillin, acting through the Rac1 and Cdc42 signaling cascade, mediates neurite extension in N1E-115 cells. *Exp. Cell Res.* 312, 2954-61 (2006).
- Youle, R. J. and Strasser, A.** The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47-59 (2008).
- Young, M. R., Liu, S. W. and Meisinger, J.** Protein phosphatase-2A restricts migration of Lewis lung carcinoma cells by modulating the phosphorylation of focal adhesion proteins. *Int. J. Cancer* 103, 38-44 (2003).
- Yu, Q., Geng, Y. and Sicinski, P.** Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 411, 1017-1021 (2001).
- Yu, Z., Wang, L., Wang, C., Ju, X., Wang, M., Chen, K., Loro, E., Li, Z., Zhang, Y., Wu, K., Casimiro, M. C., Gormley, M., Ertel, A., Fortina, P., Chen, Y., Tozeren, A., Liu, Z. and Pestell, R. G.** Cyclin D1 induction of Dicer governs microRNA processing and expression in breast cancer. *Nat. Commun.* 4, 1-20 (2013).

- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. and Geiger, B.** Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* **9**, 858–867 (2007).
- Zhang, L. L., Mu, G. G., Ding, Q. S., Li, Y. X., Shi, Y. B., Dai, J. F. and Yu, H. G.** Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) Represses Colon Cancer Progression through Inhibiting Paxillin Transcription via PI3K/AKT/NF- κ B Pathway. *J. Biol. Chem.* **290**, 15018-15029 (2015).
- Zheng, L., Qi, T., Yang, D., Qi, M., Li, D., Xiang, X., Huang, K. and Tong, Q.** microRNA-9 suppresses the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer cells through targeting cyclin D1 and Ets1. *PLoS One* **8**, 1-14 (2013).
- Zhong, Z., Yeow, W. S., Zou, C., Wassell, R., Wang, C., Pestell, R. G., Quong, J. N. and Quong, A. A.** Cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells. *Cancer Res.* **70**, 2105-2114 (2010).
- Zins, K., Lucas, T., Reichl, P., Abraham, D. and Aharinejad, S.** A Rac1/Cdc42 GTPase-specific small molecule inhibitor suppresses growth of primary human prostate cancer xenografts and prolongs survival in mice. *PLoS One* **8**, 1-13 (2013).
- Zukerberg, L. R., Yang, W. I., Gadd, M., Thor, A. D., Koerner, F. C., Schmidt, E. V. and Arnold, A.** Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: Approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Mod. Pathol.* **8**, 560-567 (1995).
- Zwijsen, R. M., Wientjens, E., Klompaker, R., van der Sman, J., Bernards, R. and Michalides, R. J.** CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* **88**, 405-415 (1997).

ANNEX

PUBLICACIONES

1. *Cyclin D1 promotes tumor cell invasion and metastasis by cytoplasmic mechanisms.*

Fusté NP, Ferrezuelo F, Garí E.

Molecular & Cellular Oncology, June 2016. doi: 10.1080/23723556.2016.1203471

2. *Cytoplasmic cyclin D1 regulates cell invasion and metastasis through the phosphorylation of paxillin.*

Fusté NP, Fernández-Hernández R, Cemeli T, Mirantes C, Pedraza N, Rafel M, Torres-Rosell J, Colomina N, Ferrezuelo F, Dolcet X, Garí E.

Nature Communications, May 2016. doi: 10.1038/ncomms11581

3. *Characterization of cytoplasmic cyclin D1 as a marker of invasiveness in cancer.*

Fusté NP, Castelblanco E, Felip I, Santacana M, Fernández-Hernández R, Gatus S, Pedraza N, Pallarés J, Cemeli T, Valls J, Tarres M, Ferrezuelo F, Dolcet X, Matias-Guiu X, Garí E.

Oncotarget, April 2016. doi: 10.18632/oncotarget.8876

4. *Erk1/2 activation in stromal fibroblasts from sporadic basal cell carcinomas.*

Aguayo RS, Rafel M, Santacana M, **Fusté NP**, Garí E.

Dermatologic Surgery, June 2015. doi: 10.1097/DSS.0000000000000367

5. *Cyclin D1 localizes in the cytoplasm of keratinocytes during skin differentiation and regulates cell-matrix adhesion.*

Fernández-Hernández R, Rafel M, **Fusté NP**, Aguayo RS, Casanova JM, Egea J, Ferrezuelo F, Garí E.

Cell Cycle, August 2013. doi: 10.4161/cc.25590

