

“TRANSCRIPTION FACTOR 4) COMO BIOMARCADOR DE AGRESIVIDAD EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO.”

Programa de Doctorado en Biomedicina

Adrián González González

Directores:

Sergio Granados Principal

Juan Antonio Marchal Corrales

Universidad de Granada





Universidad de Granada

Programa de Doctorado en Biomedicina

Unidad de Gestión Clínica de Oncología Médica, Hospital Universitario de Jaén

Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO)

Tesis Doctoral

“Estudio de ATF4 (Activating Transcription Factor 4) como biomarcador de agresividad en cáncer de mama triple negativo.”

Adrián González González

Directores de tesis:

Sergio Granados Principal

Juan Antonio Marchal Corrales



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA



Complejo
Hospitalario
de Jaén



FIBAO

FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA
INVESTIGACIÓN BIOSANITARIA DE ANDALUCÍA ORIENTAL
ALEJANDRO OTERO

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Adrián González González
ISBN: 978-84-1306-599-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63611>

Agradecimientos

Toda esta experiencia de la tesis doctoral ha sido, como muchos otros señalarían, otra lección más de la vida. Todo este tiempo ha pasado en un abrir y cerrar de ojos. Como un borrón, han quedado esas primeras horas de aprendizaje de técnicas y trabajo en cultivos, y durante 3 años, he crecido a la par que mis habilidades y conocimientos. Si bien la constancia y el esfuerzo han sido dos rasgos que padres, mentores o profesores han intuido y potenciado en mí, admito que a veces he ansiado hacer las cosas por mi cuenta prematuramente, con la inocente intención de demostrar la suficiente aptitud a quienes me habían guiado, probando con ello, que su tiempo invertido en mí no fue inútil. Mas ese afán de estar a la altura de lo requerido me fue reconduciendo paulatinamente a mi casilla de salida: Paciencia y contención... dos valores que he intentado interiorizar a lo largo de este proceso, consciente de que formaban parte, al igual que cualquier técnica de laboratorio practicada, de un aprendizaje paralelo indispensable. Espero haberlas afianzado en la mayor medida posible.

No hace falta recordar que si bien esta es mi tesis doctoral, este trabajo existe gracias a la participación y esfuerzo de mucha gente, y a todos ellos creo que les debo unas palabras de agradecimiento. En primer lugar, mis tres grandes maestros que han conseguido que hoy yo esté aquí.

A Paqui, quien ha sido mi mentora en todo el tema técnico y práctico. A ella le debo el haber aprendido a trabajar en un laboratorio como un buen investigador: siempre con rigor, pero al mismo tiempo en un ambiente distendido y en el que la colaboración entre todos era esencial. Así mismo, debo agradecerle la confianza depositada en mí al implicarme en labores diversas con las que enfrentarme, y así fuese adquiriendo seguridad, destreza e incluso empezar a enseñar a aquellos que han llegado después. Aunque, siendo sincero, también tengo que darle las gracias a tus pequeños Sergio y Alvaro, que sus constantes catarros y conjuntivitis propios de guardería, me dio la oportunidad de estar en más de una

ocasión solo ante el peligro, pero de nuevo, gracias a tu adiestramiento, pude salir siempre airoso.

A Juan A. Marchal, ya fuese mi profesor en mi primer máster, o profesor y coordinador en mi segundo máster o actualmente codirector de tesis, siempre ha puesto en valor mis ideas, aportaciones y propuestas. Me ha animado a seguir adelante, a superar todos los obstáculos que apareciesen por el camino y, cuando he dudado, me ha recordado que siempre debo luchar por alcanzar todas mis metas, sin importar cuanto tiempo requiera.

Y a Sergio, mi tutor y director de mi tesis, mi maestro Jedi. Son mil cosas las que tendría que agradecerle: gracias por atender en tu despacho una calurosa tarde de verano, a un perfecto desconocido que se presentó deseoso de poder hallar un lugar, no tan hostil como en experiencias pasadas, donde poder terminar de formarme y crecer como investigador. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de tu grupo, de tu trabajo, de todo. Gracias por aceptar que usase constantemente en cada "*Lab meeting*" la palabra "rol". Sinceramente, son tantas las cosas por agradecerte que no sé cómo recopilarlas todas. Deseo, con ello, dejar constancia hasta qué punto estaré en deuda con contigo, pero lo que sí puedo decir es: gracias por creer en mí. Me has enseñado qué tipo de investigador quiero llegar a ser.

De igual manera quiero agradecer a todos los compañeros y estudiantes de mi grupo que me han acompañado este tiempo. A Marisa, Marta, Araceli, Tamara, Jose Lucas, Luis, Marina, María, Esperanza, gracias por los ánimos y la ayuda en los momentos que me fue imposible atender a mil cosas a la vez, y, gracias por cada 20 de febrero compartir conmigo, con agasajos, un plato de mis tallarines caseros.

Gracias también a todos los compañeros y estudiantes de TFG/TFM y doctorandos con los que coincidí, por todas esas horas en cultivos que echamos (era nuestra segunda casa prácticamente), los cafés y las risas que compartimos con tal de no decaer en las horas

bajas. Al personal de Genyo: responsables de unidades, técnicos, investigadores, etc., a todos, gracias por vuestro tiempo y dedicación.

A mis amigos, os agradezco el estar ahí cuando lo necesité: a Sandra, Jose, Luismi Araceli, por los fines de semana de bromas y juegos de mesa que pasamos, siempre y cuando las células no requiriesen de mis “mimos”. A Belén, Carmen, Mónica, Carla, Marina, Alice, gracias por todas las tardes de charlas, meriendas y cervezas, con las que desconectar y recuperar fuerzas para la siguiente semana de trabajo. A Lidia y a Laura, agradecerles todo lo anterior, pero sobre todo por darme el impulso suficiente como para volcarme en un proyecto personal durante la cuarentena del Covid-19, incorporando a este encierro un nuevo reto que alteró sustancialmente el confinamiento, haciéndolo mucho más desafiante y enriquecedor, y al mismo tiempo, permitiéndome cumplir un íntimo deseo tantas veces postergado.

Por último quiero también darle las gracias a mi familia: gracias, papá y mamá, por aguantar mis cambios de humor intermitentes, por escuchar las mil y una charlas sobre la tesis (seguro que cualquiera de los dos podría defenderla ahora mismo tan bien o mejor que yo después de lo pesado que he sido). Gracias por chincharme siempre hacia el buen hacer y no dejarme llevar por mis impulsos, gracias por esas retahílas de realidad para que mantuviera siempre los pies en la tierra, y no dar por sentado las cosas, en un intento de que la razón siempre prevaleciera a lo emocional.

Y Lionel: aun siendo hermanos, la vida hizo que a veces nuestros mundos fuesen completamente diferentes. Pero créeme cuando te digo que jamás he considerado que eso nos hiciera en el fondo tan diferentes. La vida te ha cargado con unas dificultades y vivencias de difícil gestión, envolviéndote a veces, en un halo constante de temor y dudas sobre si algún día, tú también podrás ser y alcanzar aquello que anhelas. Pero recuerda lo que tu director de Hogwarts favorito decía: *“no son nuestras habilidades las que muestran como*

somos, sino nuestras elecciones"; y en ese sentido, recordarte que las habilidades simplemente se adquieren con práctica pero tus elecciones siempre se han basado en tu buen corazón, en el esfuerzo y en renuncias dolorosas que te hacen hoy muy grande.

Abreviaturas

ER: estrogen receptor (receptor de estrógenos).

ER-: receptor de estrógenos negativo.

ER+: receptor de estrógeno positivo.

PR: (progesterone receptor) receptor de progesterona.

HER2: human epidermal grow factor receptor 2 (factor de crecimiento epidermial humano 2).

TNBC: triple negative breast cancer (cáncer de mama triple negativo).

BL1: basal 1.

BL2: basal 2.

EGF: epidermal growth factor.

IM: inmunomodulador.

M: mesenquimal.

MSL: mesenquimal "*stem-like*".

LAR: luminal receptor androgénico.

TGF β : transforming growth factor- β (factor de crecimiento transformante beta).

TGF β 1: transforming growth factor- β 1 (factor de crecimiento transformante beta 1).

TGCA: the cancer genome atlas (atlas del genoma del cancer).

CSCs: cancer stem cells (células madre tumorales).

EMT: transición epitelio mesenquimal.

ALDH1: aldehído deshidrogenasa 1.

ALDH+: aldehído deshidrogenasa positiva.

ORF: open reading frame (marco abierto de lectura).

TFEB: factores de transcripción EB

TFE3: factor de transcripción E3.

ISR: integrated stress respond (respuesta integrada al estrés).

DDIT3: DNA damage-inducible transcript.

eIF2 α : alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2.

PKR: double-stranded RNA-dependent protein kinase.

CARE: C/EBT-ATF response element.

AP-1: activator protein 1.

NRF2: nuclear factor-like 2.

PERK: PKR-like ER kinase.

HRI: heme-regulated eIF2a kinase.

GCN2: general control nonderepressible 2.

GRP78: 78-kDa glucose-regulated protein.

UPR: unfolded protein response.

tRNAs: ARN de transferencia deacetilado.

PP1: proteína fosfatasa 1.

PP1c: subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1.

GADD34: growth arrest and DNA damage-inducible protein.

LDH: enzima lactato deshidrogenasa.

VEGF: vascular endothelial growth factor.

SBE: SMAD binding element.

DMEM: dulbecco's modified eagle medium.

FBS: suero bovino fetal.

SRE: elemento de respuesta de SMAD.

CIOMS: council for international organizations of medical sciences (consejo de organizaciones internacionales de las ciencias médicas).

siRNA: small interfering RNA.

SCR: scrambled (siRNA no codificante).

TG: taspargina.

BME: basement membrane extract.

MSFE: eficiencia de formación de mamosferas.

qPCR: RT-PCR cuantitativa.

CHiP: chromatin immunoprecipitation (inmunoprecipitación de cromatina).

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

SDS: sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico).

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel.

TG: tris-glycine.

TGS: tris-glycine-SDS.

PBS: phosphate buffered saline.

PBS-T: phosphate buffered saline-tween.

ECL: reactivo de quimioluminiscencia.

PDX: patient-derived xenografts (xenógrafo derivado de pacientes).

NSG: NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ.

CHEMO: quimioterapia.

DOPC: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina.

DEAB: dietilaminobenzaldehido.

FPKM: fragments/kilobase/million.

RFS: relapse-free survival (supervivencia libre de recaídas).

OS: overall survival (supervivencia global).

LOOCV: leave-one-out cross validation (validación cruzada "leave-one-out").

ROC: receiver operating characteristic.

ALL_BC: todos los tipos de cancer de mama.

Att.: cultivadas en adherencia.

1MS: mamosferas primarias.

2MS: mamosferas secundarias.

FC: fold change.

NA: no disponible.

CTCs: células tumorales circulantes.

NGS: next generation sequencing.

Resumen.

El cáncer de mama es uno de los tumores más frecuentemente diagnosticados a nivel global, y tiene un importante impacto sanitario en la población de mujeres debido a su gran incidencia y tasa de mortalidad asociada. Entre los diferentes subtipos que existen, atendiendo a la presencia, o no, de los receptores de estrógeno, progesterona y HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), encontramos el cáncer de mama triple negativo (TNBC), denominado así por la ausencia de estos tres receptores. Este subtipo es el más agresivo de cáncer de mama, debido en gran medida a su heterogeneidad celular, favorecida además por procesos como la transición epitelio mesenquimal (EMT), y a la capacidad metastásica junto a la resistencia a la radio/quimioterapia debida a la población de células madre tumorales (CSCs). Todas estas propiedades tumorigénicas están reguladas por diferentes vías de señalización, como es el caso de la ruta de TGF β .

Estudios anteriores de nuestro grupo revelaron que al estimular con TGF β 1 las células mamarias MCF10A, se observaba una sobreexpresión del gen ATF4 (Activating Transcription Factor 4), sin que hubiese estrés celular. Al contrastar la expresión de este gen en las bases de datos de pacientes de cáncer de mama, vimos que se podía asociar altos niveles de expresión con un peor pronóstico.

Bajo estas premisas, investigamos si ATF4 puede regular o mediar la agresividad inducida por TGF β en TNBC, y afectar de este modo a la supervivencia de las pacientes. En este trabajo, contrastamos los datos existentes de expresión de ATF4 en pacientes con cáncer de mama mediante análisis de Kaplan-Meier, y confirmamos la correlación entre una alta expresión de ATF4 y un peor pronóstico. Al mismo tiempo, bajo estimulación de TGF β 1, analizamos como varía la expresión de ATF4 en diferentes líneas celulares de

TNBC, y qué elementos de las diferentes rutas canónica y no canónica de TGF β son los encargados de regular la expresión de ATF4. Demostramos que la expresión y actividad de ATF4, estimulada por TGF β 1, está regulada principalmente por las rutas TGF β /SMAD2/3/4 y TGF β /PI3K/mTORC2-RHOA-RAC1, que se integran y modulan gracias circuitos de “*feedback*” positivos.

Para estudiar el efecto de ATF4 sobre la agresividad tumoral en líneas celulares de TNBC, bajo estimulación de TGF β 1, inhibimos su expresión mediante siRNAs específicos. Observamos como al silenciar ATF4, afectaba a: la movilidad celular (ensayo de “*wound-healing*”), la capacidad invasiva de las células, proliferación (WST), su efecto sobre la expresión de inductores EMT (western blot) y la población de CSCs (cultivo de mamíferas y expresión proteica de marcadores de “*stemness*”). Con respecto a los ensayos *in vivo* en modelos PDX, la inhibición de ATF4 mediante siRNAs tuvo como consecuencia una reducción en las metástasis de hígado y pulmones, reducción del crecimiento tumoral, y aumento de la supervivencia de los ratones, además de una re-sensibilización de los tumores frente al docetaxel.

Analizando la expresión de ATF4 y los elementos de la ruta de señalización de TGF β que interaccionan con este, pudimos identificar una firma génica con un gran valor pronóstico en pacientes con cáncer de mama que podría ayudar al diseño de terapias dirigidas combinadas, identificar las pacientes respondedoras, así como predecir y ayudar a superar la resistencia al tratamiento.

Este trabajo es el primero en demostrar el potencial de ATF4 como un nuevo biomarcador pronóstico y diana terapéutica frente al cáncer de mama triple negativo.

Summary.

Breast cancer is one of the most frequently diagnosed tumors and has a significant health impact on the female population due to its high incidence and associated mortality rate. Among the different subtypes that exist, depending on the presence or absence of hormonal receptors for estrogen, progesterone and HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), we find the triple negative breast cancer subtype (TNBC), that lacks those three receptors. This subtype is the most aggressive of all breast cancers, due to cellular heterogeneity, favored by processes such as mesenchymal epithelial transition (EMT), its metastatic capacity along with resistance to radio / chemotherapy, by the population of cancer stem cells (CSCs). All these tumorigenic properties are regulated by different signaling pathways, as the TGF β pathway.

Our previous studies of our group revealed that upon stimulating the MCF10A mammary cell line with TGF β 1, an overexpression of the ATF4 gene (Activating Transcription Factor 4) was observed, in absence of cellular stress. By contrasting the expression of this gene in the databases of breast cancer patients, we observed that high levels of expression could be associated with a worse prognosis.

Under these premises, we investigated whether ATF4 can regulate or mediate TGF β -induced aggressiveness in TNBC, and thus affect patient survival. In this work, we compared existing data on ATF4 expression in breast cancer patients using Kaplan-Meier analysis, and confirmed the correlation between high ATF4 expression and a worse prognosis. At the same time, under stimulation of TGF β 1, we analyzed how ATF4 expression is modified in different TNBC cell lines, and which elements of the different canonical and non-canonical TGF β pathways are responsible for regulating ATF4 expression. We show that the expression and

activity of ATF4, stimulated by TGF β 1, is mainly regulated by the TGF β /SMAD2/3/4 and TGF β / PI3K / mTORC2-RHOA-RAC1 pathways, which are integrated and modulated thanks to positive feedback loops.

To study the effect of ATF4 on tumor aggressiveness in TNBC cell lines, under TGF β 1 stimulation, we inhibited its expression by specific siRNAs. We herein demonstrate that ATF4 knockdown reduces tumor cell motility (wound-healing assay), their invasive capacity, proliferation (WST), the expression of EMT inducers (western blot) and the CSC population (culture of mammospheres and protein expression of stemness markers).

In vivo assays in PDX models show that inhibition of ATF4 by siRNAs resulted in a reduction in liver and lung metastases, tumor growth, and a concomitant increase of mice survival. Also, the resistance to docetaxel was inhibited.

By analyzing the expression of ATF4 and the elements of the TGF β signaling pathway that interact with it, we were able to identify a gene signature with great prognostic value in patients with breast cancer that could help design combined targeted therapies, identify the sensitive patients, as well as predict and help overcome resistance to treatment.

This work is the first to demonstrate the potential of ATF4 as a new prognostic biomarker and therapeutic target against triple negative breast cancer.

Índice.

I. Introducción	1
1. Cáncer de Mama Triple Negativo	3
2. ATF4 (Activating Transcription Factor 4)	9
2.1. Funciones de ATF4	10
2.2. Expresión de ATF4	11
2.3. Respuesta integrada al estrés celular (ISR)	14
2.4. ATF4 y cáncer	18
II. Justificación e hipótesis	21
III. Objetivos	24
IV. Material y Métodos	26
1. Cultivos celulares	27
2. Muestras de tejido de pacientes	27
3. Preparación de las muestras para inmunohistoquímica	28
4. Estimulación con TGF β 1 y silenciado génico transitorio mediante siRNA (small interfering RNA)	29
5. Inhibidores farmacológicos	30
6. Inducción de estrés de retículo endoplasmático (RE)	31
7. Proliferación celular	31
8. Migración celular	32
9. Ensayo de invasión	33
10. Eficiencia de formación de mamosferas (MSFE)	35
11. RT-PCR cuantitativa (qPCR)	36
12. ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)-qPCR	36
13. Western blot	38
14. Determinación de la actividad de TGF β	42

15. Ensayos <i>in vivo</i>	42
15.1. Modelos animales de tumores xenógrafos derivados de pacientes (Patient-Derived Xenografts, PDX)	42
15.2. Generación de un modelo PDX de metástasis a pulmón	43
15.3. Inmunohistoquímica en tejido murino	45
15.4. Preparación de nanopartículas liposómicas	45
15.5. Determinación de células madre tumorales ALDH+ mediante citometría de flujo	45
16. Secuenciación de ARN y análisis bioinformático	47
17. Análisis estadístico	48
17.1. Análisis bioinformático	48
17.1.1 . Metaanálisis	49
17.1.2 . Análisis de la firma génica	50
17.2. Ensayos funcionales	50
17.3. Análisis de los datos de los modelos PDX	51
V. Resultados	52
1. La sobreexpresión de ATF4 se correlaciona con un mal pronóstico	53
2. Relación entre ATF4 y la señalización de TGF β	57
2.1. TGF β 1 induce la expresión de ATF4	57
2.2. La expresión de ATF4, inducida por TGF β , depende de SMADs	59
2.3. SMAD2/3 regula la expresión transcripcional de ATF4 uniéndose a su promotor	60

2.4. “Feedback” de ATF4 sobre la ruta de TGFβ	63
2.5. Relevancia pronóstica de la coexpresión de ATF4 y elementos de la ruta de señalización de TGFβ en pacientes de cáncer de mama	66
3. La inhibición de ATF4 reduce la agresividad de las células de TNBC	69
3.1. El silenciado de ATF4 inhibe la migración y capacidad invasiva de las células de TNBC	70
3.2. El bloqueo de ATF4 afecta a la proliferación celular	72
3.3. La ausencia de ATF4 produce la inhibición de marcadores e inductores del proceso de EMT	74
3.4. Efecto de la inhibición de ATF4 sobre las CSCs	75
3.4.1. La inhibición de ATF4 reduce la formación de mamosferas	76
3.4.2. La expresión de ATF4 está vinculada a la de marcadores de “stemness”	78
4. Estudios <i>in vivo</i> en modelos PDX de TNBC	80
4.1. La inhibición de ATF4 reduce la aparición de metástasis y el crecimiento tumoral	80
5. ATF4 es diana de mTORC2 y participa en la regulación de mTOR/RAC1-RHOA independiente al estrés	87
5.1. TGFβ regula ATF4 independientemente de la respuesta integrada al estrés (ISR)	87
5.2. La regulación proteica de ATF4 podría estar mediada por la ruta no canónica TGFβ/PI3K/mTOR	88
5.3. ATF4 modula la señalización de mTOR a través de un mecanismo de retroalimentación positiva	93

6. Diseño de una firma génica basada en el mecanismo descrito para ATF4 con poder pronóstico en pacientes con cáncer de mama	97
VI. Discusión	103
VII. Conclusiones	121
VIII. Bibliografía	124

I. Introducción

El cáncer de mama es, hasta la fecha, el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en mujeres (se estima que al año se diagnostican 2.1 millones de nuevos casos), y al mismo tiempo es una de las principales causas de muerte en mujeres relacionadas con cáncer. Los últimos datos de 2018 han registrado 627000 mujeres fallecidas debido a esta enfermedad, lo que supone un 15% de las muertes por cáncer en mujeres (1). Es cierto que en las últimas décadas, los avances en medicina para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, el diagnóstico precoz y “*screening*” molecular de biomarcadores con carácter pronóstico, han incrementado notoriamente la esperanza de vida de las pacientes, consiguiendo en algunos casos erradicar por completo la enfermedad (libre de recaídas), o cronificarla pero bajo control (2).

A la hora de clasificar los diferentes tipos de tumores de mama, se pueden diferenciar atendiendo a la presencia de receptores hormonales/factores de crecimiento en la superficie celular, obteniendo así cuatro subtipos:

- Luminal A: este subtipo presenta receptores para estrógenos y progesterona (ER y PR, respectivamente), pero no presenta receptores para HER2 (Human Epidermal Grow Factor Receptor 2). Se caracteriza además por presentar unos niveles de la proteína Ki-67 (empleado como biomarcador de proliferación) bajos. Se lo considera por ello el subtipo con mejor pronóstico (3,4).
- Luminal B: a diferencia del luminal A, este subtipo de tumores puede presentar además de receptores tipo ER y PR , los de tipo HER2; y debido a que los niveles de proteína Ki-67 son mucho mayores, su naturaleza es más agresiva que el primer subtipo(3,4).

- HER2: como su nombre indica, este subgrupo presenta exclusivamente receptores de HER2. De entre los tumores de mama con receptores hormonales, este era hasta hace pocos años uno de los que peor pronóstico tenían, pero gracias a los avances mencionados anteriormente, se ha mejorado muy significativamente el pronóstico de las pacientes, empleando inmunoterapias específicas frente al receptor de HER2, como el Trastuzumab (4).
- Basal: en este subgrupo se incluyen todos aquellos tumores de mama que no pertenecen a los anteriores. Aquí se incluye nuestro objeto de estudio, el Cáncer de Mama Triple Negativo (en inglés, TNBC), el cual describiremos en detalle a continuación (3–5).

1. Cáncer de Mama Triple Negativo.

Como su nombre indica, todos los tumores mamarios denominados triple negativo no poseen en su superficie celular ninguno de los tres receptores comentados anteriormente, por lo que todos los tratamientos recientes basados en terapias hormonales o usar los receptores como diana terapéutica no son efectivos (3,4). Representa el 15-20% de los tumores de mama totales diagnosticados a nivel mundial, y el 25% de las muertes totales por cáncer de mama. Se ha observado que afecta mayoritariamente a mujeres jóvenes de origen hispano, africano o americano; y que presentan mutaciones de origen germinal en BRCA1 (gen supresor tumoral muy estudiado en tumores de mama) (4,6).

Los tumores de mama triple negativo se pueden subdividir en hasta 6 subclases, atendiendo al perfil de expresión génica que presenten:

- Basal 1 y 2 (BL1 y BL2, respectivamente), caracterizados por una importante inestabilidad génica que afecta mayoritariamente a genes relacionados con el control del ciclo celular y la proliferación (BRCA1/2 inhibidos y altos niveles de proteína Ki-67, entre otros). Se distingue el BL2 del BL1 debido a que el subtipo 2, además de la sobreexpresión de genes de proliferación, expresa una amplia gama de genes relacionados con la señalización, mediante factores de crecimiento, de la ruta de EGF (Epidermal Growth Factor) o la ruta Wnt/ β -catenina (7).
- El subtipo inmunomodulador (IM), como su nombre indica, son aquellos tumores capaces de regular la presencia de células del sistema inmune, impidiendo su detección y eliminación. Para ello, expresan genes relacionados con las rutas de señalización de células inmunitarias (linfocitos Th1 y Th2, células NK, linfocitos B), expresión de citoquinas inmunomoduladoras y encargadas del procesamiento de antígenos (7).
- Subtipo mesenquimal (M) y mesenquimal “*stem-like*” (MSL): ambos subtipos expresan de forma notoria genes vinculados a la movilidad celular a través de la actina (mediada por la proteína Rho); así como genes pertenecientes a rutas de diferenciación celular (proceso de transición epitelio mesenquimal, EMT) y factores de crecimiento: TGF β (Transforming Growth Factor- β) o Wnt/ β -catenina. Las diferencias entre el subtipo mesenquimal y mesenquimal “*stem-like*” son la expresión de diferentes elementos relacionados con

angiogénesis en este último, tales como VEGFR2, así como una menor expresión de genes de proliferación celular, pero si un mayor número de genes asociados a la naturaleza “*stem*” de las células (7).

- Luminal receptor androgénico (LAR): es el subtipo que más difiere con respecto a los mencionados anteriormente. Aun siendo ER negativo, muchas rutas de señalización ligadas a hormonas aparecen activas, lo que dio lugar a estudiar si intervenían otras hormonas diferentes a estrógenos y progesterona, llegando a la conclusión de que dichas rutas de señalización dependientes de hormonas proceden de la señalización por andrógenos (7).

Es importante señalar que esta clasificación propuesta por Lehmann *et al.*, (2011) (8) se llevó a cabo estudiando la respuesta de los tumores al efecto de los diferentes agentes quimioterapéuticos más frecuentemente empleados, junto con la ontología génica única que cada subtipo de TNBC presentaba. Sin embargo, estos mismos autores han propuesto una nueva clasificación de los subtipos de TNBC: se estudió, además del tejido tumoral en sí, el estroma adyacente (incluidas células normales) y los componentes del sistema inmunitario que hubiera a su alrededor, y ver si variaban e influían en cada subtipo de TNBC. Mediante análisis histológico, microdissección laser, aislamiento de ARN y análisis de expresión de genes, la clasificación pasó de 6 subtipos: BL1, BL2, IM, M, MSL y LAR; a sólo 4: BL1, BL2, M y LAR, incluyendo en el subtipo mesenquimal al IM y MSL. Esta nueva clasificación que propusieron se evaluó gracias a los datos de la TCGA (The Cancer Genome Atlas), evaluando la supervivencia, edad de diagnóstico, grado del tumor, si se

detectaban signos tumorales en nódulos linfáticos adyacentes, enriquecimiento celular dependiendo del subtipo, y preferencia a la hora de generar metástasis (8).

Entre las características más representativas de TNBC están la heterogeneidad celular, la alta tasa de proliferación de las células, y su gran agresividad. Y es que es el subtipo de cáncer de mama que peor pronóstico tiene, puesto que presenta mayor capacidad metastásica (normalmente a pulmones, y cerebro), resistencia a fármacos, mayor número de recaídas y descenso en la tasa de supervivencia (la media está en torno a los 5 años tras el diagnóstico) (4,9). Si además, como ya mencionamos, las nuevas terapias hormonales resultan inefectivas frente estos tumores, los recursos disponibles para combatir esta patología de forma eficaz resultan limitados.

Atendiendo a la genética de los tumores de TNBC, se han realizado estudios acerca de la inestabilidad génica en muestras de pacientes con TNBC, demostrando la presencia de una serie de mutaciones, que se repiten en la mayoría de estos procesos tumorales, en los genes BRCA1, TP53, PIK3CA, PTEN (los tres últimos se ven afectados en estadios tempranos del tumor) (4,6,9–11). Así mismo, entre las rutas de señalización activas durante el desarrollo de los procesos tumorales en TNBC, destacan Wnt/ β -catenina, TGF β , PI3K, mTORC1, mTORC2/AKT, SMAD2/3, entre otras (12). Concretamente, la ruta de señalización de TGF β puede favorecer a la agresividad tumoral promoviendo la aparición de células madre tumorales (Cancer Stem Cells, CSCs) (13,14). En los tumores de TNBC se ha demostrado la importancia de la población de CSCs, y varios autores apoyan que muchas de las propiedades agresivas de este tipo de tumores se debe precisamente a la presencia de éstas

(4,15). Se postula que las CSCs son las responsables del origen de los tumores (ya sea primario o metastásico), y debido a la naturaleza “stem” y a las propiedades de diferenciación y autorrenovación que estas células poseen, generan la heterogeneidad celular típica de los tumores. La presencia de CSCs explicaría como se iniciaría un proceso tumoral, el origen de las recidivas y la metástasis a partir de la migración e implantación de estas células en otro tejido. Esto se vería apoyado por el proceso EMT, que es frecuente en las CSCs, dotando a estas células de la capacidad migratoria, resistencia a apoptosis e invasividad. Del mismo modo, se explicaría la ineficacia de los tratamientos quimioterapéuticos, debido a la naturaleza resistente intrínseca de las CSCs, y en general, la agresividad e invasividad de estos tumores (15–18).

Debido al impacto que suponen estas poblaciones celulares en el desarrollo del cáncer, la comunidad científica tiene un gran interés en desarrollar estrategias para la detección, y eliminación de forma eficaz y temprana, de las CSCs con el fin de mejorar el pronóstico de las pacientes y evitar futuras recaídas. Sin embargo, la identificación de estas poblaciones celulares no resulta nada sencillo debido a que cada tipo de tumor puede presentar uno o varios tipos de marcadores, de superficie o intracelulares, relacionados con la naturaleza “stem”. Además, las CSCs de otro tumor pueden presentar otros distintos, y hasta la fecha no se tiene constancia de marcadores universales para estas células. Por ello, a día de hoy la forma más precisa de identificar y aislar poblaciones de CSCs en un tumor es el uso de diferentes marcadores, ajustando a cada tipo de cáncer los que sean más frecuentes (10). En el caso de TNBC, algunos de los marcadores para CSCs más usados son la sobreexpresión de la enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), la expresión de CD44⁺/CD24^{-/low} o

el marcador CD49f o integrina $\alpha 6$. La enzima ALDH1 actúa como detoxificante celular, otorgando a las CSCs su resistencia intrínseca a fármacos, además de estar relacionada con invasividad. Con respecto a la presencia de CD44 y CD24 en la superficie celular, la presencia de CD44 se ha observado en células tumorales malignas y metastásicas procedentes de diferentes tipos de cáncer, y se ha relacionado con algunos procesos de EMT. Por otra parte, CD24 está asociado al proceso de reconocimiento de las células para inducir su apoptosis, por lo que la ausencia de éste en las células tumorales (concretamente las CSCs) por inhibición de su expresión o internalización, favorecerá la supervivencia de las mismas. Este fenotipo de CD44⁺/CD24^{-/low} se ha observado en diferentes líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231, SUM159PT, entre otras), así como en muestras de pacientes de tumores primarios, los cuales presentaban una naturaleza más agresiva y su pronóstico era peor (10,19–23). Con respecto a CD49f, al igual que otras integrinas, éste pertenece a la familia de glucoproteínas transmembrana de tipo I, y está presente en múltiples tipos de células normales de naturaleza pluripotentes o multipotentes (24). En el caso de tumores, como por ejemplo glioblastoma y TNBC, se ha observado que existe una población celular de CSCs CD49f+, las cuales dotan a los tumores de la capacidad de generar nuevas neoplasia, así como la resistencia a agentes quimioterapéuticos como son los taxanos. En TNBC incluso, se ha observado que el tratamiento prolongado con docetaxel en modelos animales aumenta la proporción de células CD49f+, y al bloquear la expresión de éste, la sensibilidad de las células frente al taxano aumenta (25,26).

Para complementar la caracterización de la población de CSCs, puede estudiarse la expresión de genes como NANOG, SOX2, OCT4, c-MYC, entre otros. Estos genes están presentes durante el desarrollo embrionario, y están encargados de mantener la pluripotencia y/o la proliferación celular. No obstante, se ha observado su presencia y/o sobreexpresión en diferentes tipos de tumores, lo que se relaciona con una naturaleza más agresiva y un peor pronóstico (27,28).

2. ATF4 (Activating Transcription Factor 4).

Este gen está localizado en el brazo largo del cromosoma 22, región 1, banda 3, sub-banda 1 (22q13.1), entre los pares de bases 38.241.069–38.243.191. Conocido anteriormente como CREB-2, pertenece a la superfamilia de proteínas de unión al ADN entre las cuales se incluyen la familia de factores de transcripción AP-1 (Activator Protein 1), proteínas de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREBs y CREBs-like) y proteínas de unión a CREBs (mediante su unión a éstas, se coactivan los factores de transcripción). Como su nombre indica, su función es la de unirse al ADN y promover o inhibir la transcripción de diferentes genes que a su vez cumplen otra función biológica (29).

Si analizamos la estructura de su ARN mensajero encontramos tres marcos abiertos de lectura (ORF, Open Reading Frame) que preceden a la secuencia codificante, y cuya organización es esencial a la hora de cumplir las funciones relacionadas con estrés celular. La proteína codificada por este gen consta de 351 aminoácidos y su estructura secundaria y terciaria genera un conjunto de dominios esenciales (dominios cremallera de leucina) para la

homo/heterodimerización de ATF4, la unión al ADN y el mantenimiento de la propia estructura de la proteína de ATF4. Esta estabilidad, mantenida gracias esos dominios o motivos, es a su vez de gran importancia para la regulación del papel de ATF4 en la respuesta al estrés (29).

2.1. Funciones de ATF4.

- Como factor de transcripción:

Se sabe que ATF4 es de suma importancia tanto en procesos metabólicos normales como en situaciones de estrés. En condiciones normales se ha relacionado con la homeostasis de la glucosa, la plasticidad neural, control del gasto energético o la diferenciación de osteoblastos, concretamente en la mineralización de la matriz celular de estas células. Su mutación o inhibición durante el desarrollo embrionario puede desencadenar malformaciones en el feto. Es importante señalar que aunque ATF4 actúa mayoritariamente como factor de transcripción activador de un importante número de genes esenciales para el correcto desarrollo fisiológico, puede tener funciones como represor de otros, y que está íntimamente relacionado con detener el mantenimiento de la memoria a largo plazo (11,29–34).

También destaca su papel en respuesta a situaciones de estrés celular en el marco de la respuesta integrada al estrés o ISR (Integrated Stress Response), en la que la elevada traslación del ARN mensajero de ATF4 incrementa la expresión y traducción de genes de respuesta al estrés. La ISR es un proceso celular estrechamente relacionado con el mantenimiento de la homeostasis y/o la inducción de la apoptosis. Como consecuencia, ATF4, por sí mismo o mediante la interacción con otros factores de transcripción, como es el caso de

la interacción con DDIT3 (DNA Damage-Inducible Transcript 3), es capaz de activar la autofagia y procesos de ayuno celular o “*starvation*” (35).

La regulación por parte de ATF4 de sus genes diana se lleva a cabo mediante la unión de éste a secuencias CARE (C/EBT-ATF Response Element), que median la activación de la transcripción de diferentes genes ante una batería de estímulos diferentes (11).

- **Función en combinación con otras proteínas:**

Además de las funciones como factor de transcripción, la proteína de ATF4, gracias a su dominio cremallera leucina, forma homodímeros o heterodímeros con las otras proteínas y/o factores de transcripción. La capacidad de ATF4 para llevar a cabo una transcripción selectiva está mediada por la unión a otras proteínas de naturaleza bZIP o AP-1, generando diferentes heterodímeros, y gracias a ello, obtener las diferentes respuestas de la ISR (11).

2.2. Expresión de ATF4.

La expresión de ATF4 está regulada a nivel de transcripción, traducción y post-traducción, unido además a la regulación llevada a cabo al interactuar con otros factores de transcripción. Debido al complejo sistema de regulación al que ATF4 se encuentra sometido, se consigue una amplia variedad de efectos fenotípicos frente a las diferentes situaciones de estrés celular o la intensidad de éstas.

- Regulación a nivel de transcripción: se ha observado que en situaciones en las que no hay estrés celular, los niveles de ARN mensajero son bastante bajos. Cuando se induce la transcripción de ATF4, diferentes factores de transcripción participan según el origen del estrés: NRF2 (Nuclear Factor-like 2) induce a ATF4 ante situaciones de estrés oxidativo, o TFEB y TFE3 (Factores de Transcripción EB/E3) en situaciones de privación de nutrientes y estrés del retículo endoplasmático (RE). Además, encontramos una retroalimentación positiva a la hora de inducir ATF4 por parte de genes diana de éste, como es el caso de NUPR1. Debido a su importante papel en respuestas a estrés celular, en situaciones de hipoxia no se bloquea la expresión génica de ATF4 (a diferencia del resto de genes). Al contrario, ésta se incrementa gracias a mecanismos a nivel traduccionales y postraduccionales (11).
- Regulación a nivel de traducción: es el principal mecanismo de control de la expresión proteica de ATF4 según el tipo de estrés celular al que se vean sometidas las células. En humanos, la regulación de la traducción se lleva a cabo gracias a los tres ORFs presentes en el ARN mensajero de ATF4: uORF1, uORF2, y uORF3 previos a la secuencia codificante de ATF4. En condiciones normales, el proceso de traducción comienza en el uORF1, generando un péptido de 3 aminoácidos, y a continuación se reinicia la desde el uORF2. Este es un paso clave, ya que impide la traducción del ARN mensajero puesto que se solapa uORF3 con la secuencia codificante del gen. En situaciones de estrés celular, los ribosomas comienzan la translocación en el uORF3 y se reinicia en la secuencia codificante del gen (**Figura 1**) (11).

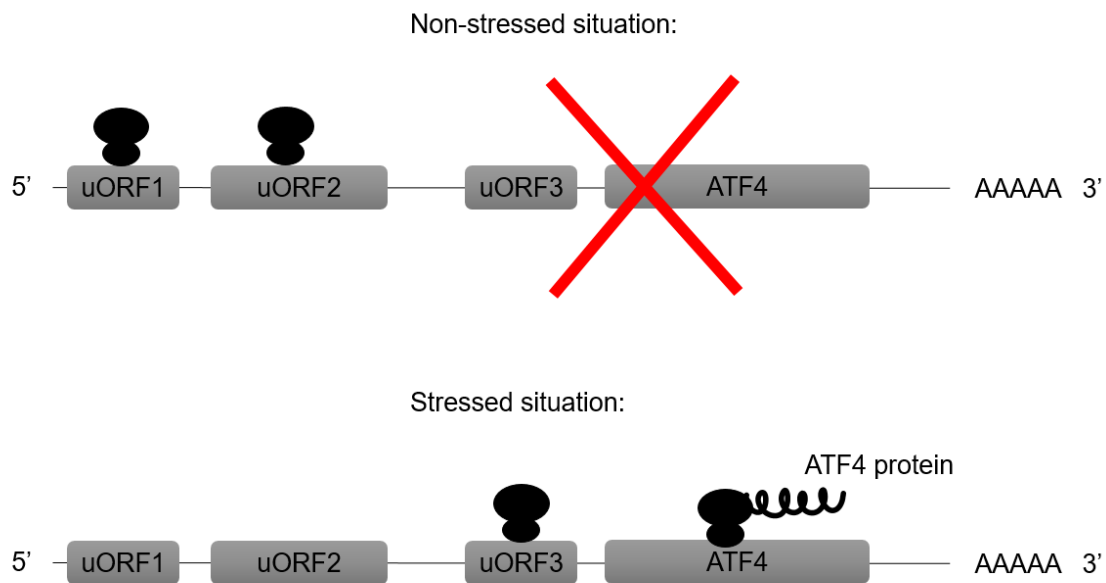


Figura 1. Regulación a nivel de traducción de la expresión de ATF4.

- Regulación postraduccional y estabilidad proteica: debido a la naturaleza inestable de la proteína de ATF4 (su vida media está en torno a los 30-60 minutos), requiere de una serie de modificaciones postraduccionales, principalmente ubiquitinización (relacionada con su degradación), y fosforilación en diferentes aminoácidos (11). Entre los principales responsables de esos procesos postraduccionales están las E3 ubiquitina ligasas de la familia F-box (que llevan a cabo la ubiquitinización dependiente de fosforilación), como son β TrCP, vinculado a la regulación de los puntos de control del ciclo celular (36), o Skp2, también relacionado con regulación del ciclo celular durante la fase G_0 y a su vez considerado un protooncogén, ya que su sobreexpresión favorece el crecimiento y la tumorigénesis en linfomas, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, melanoma y cáncer de mama (37). Otro miembro interesante de la familia de las E3 ubiquitina ligasas

es Fbxw7, cuya función de degradación de MYCN lo convierte en un supresor tumoral (38).

2.3. Respuesta integrada al estrés celular (ISR).

Se podría definir como un complejo sistema de rutas de señalización exclusivo de células eucariotas que se activan como consecuencia de múltiples tipos de variaciones fisiológicas y/o patológicas debidas a un agente o situación de estrés: hipoxia, privación de glucosa o aminoácidos, acumulación de proteínas en el retículo endoplasmático (estrés del RE), infecciones virales o incluso por acción de algunos oncogenes. A pesar de la gran variedad de causas o agentes que desencadenan la ISR, los procesos de señalización convergen en un punto común, la fosforilación de eIF2 α (alpha subunit of eukaryotic translation Initiation Factor 2), en la serina 51. Se ha estudiado que dependiendo del tipo de estrés al que se vean sometido las células, las encargadas de realizar la fosforilación son un grupo de quinasas, tipo serina/treonina, específicas para eIF2 α : PERK (PKR-like ER kinase, PKR (double-stranded RNA-dependent Protein Kinase), HRI (Heme-Regulated eIF2 α kinase), y GCN2 (General Control Nonderepressible 2). Estas cuatro quinasas comparten bastante homología a nivel de dominios catalíticos, pero sus dominios de regulación difieren, puesto que cada una se activa en respuesta a diferentes condiciones ambientales y/o fisiológicas. Así, GCN2 se activa en caso de privación de aminoácidos, PKR señala una infección vírica, HRI ante una reducción de los niveles de las proteínas de tipo hemo (hemoglobina principalmente) y PERK como respuesta al estrés del RE (11) **(Figura 2)**.

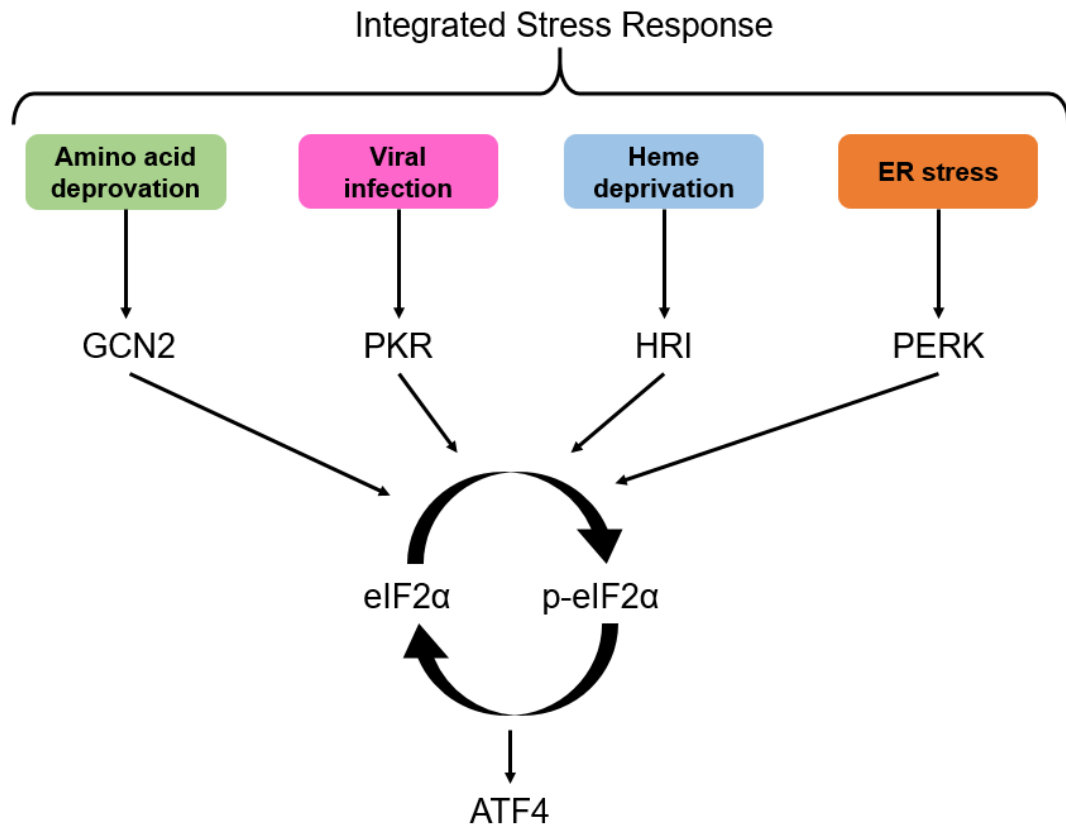


Figura 2. Esquema del funcionamiento de la ruta de activación de eIF2 α -ATF4 mediada por las diferentes quinasas específicas frente a un tipo de estrés.

- *PERK.*

Debido a su relación con el estrés del RE, se localiza en la membrana de este orgánulo celular (en el lumen, unido a ésta por una proteína denominada GRP78, 78-kDa Glucose-Regulated Protein). La activación de PERK puede deberse a la acumulación de proteínas desplegadas de forma incorrecta, fenómeno conocido como UPR (Unfolded Protein Response) en el interior del retículo endoplasmático, situaciones de redox celular, pérdida de la homeostasis energética o niveles bajos de calcio, entre otras situaciones. Se han propuesto dos modelos de activación de PERK: 1) la presencia de proteínas mal desplegadas debido a la UPR, hace que PERK se escinda de la proteína GRP78,

permitiendo su autofosforilación y activación; 2) la activación de PERK puede deberse a la propia unión de éste con las proteínas mal desplegadas (11,29) .

- *GCN2.*

GCN2 responde a la falta de aminoácidos o por privación de glucosa (puede ser un efecto indirecto ante el uso de los aminoácidos para la obtención de energía), y se lleva a cabo gracias a la unión de ésta al ARN de transferencia deacetilado (tRNAs) mediada por la histidil-ARNt sintetasa (11).

- *PKR.*

Se activa principalmente por acción de los ARN de doble cadena procedente de los virus al infectar las células. PKR se dimeriza en su dominio quinasa C-terminal, promoviendo la autofosforilación en T446, y con ello activándose la quinasa. Es interesante señalar el efecto de eIF2 α fosforilado por PKR durante el proceso infeccioso viral, que reduce notoriamente la síntesis proteica tanto de la célula huésped, como la del virus. Sin embargo, PKR puede activarse también debido a otras situaciones como el estrés oxidativo, estrés del RE, privación de citoquinas o factores de crecimiento o infección bacteriana, pero siguiendo otro mecanismo independiente de los ARN de doble cadena. Esta activación se lleva a cabo mediante caspasas, y tiene lugar durante estadios muy tempranos de la apoptosis celular, denotando así el importante papel de PKR durante la apoptosis, bloqueando la síntesis proteica (11).

- *HRI*.

A diferencia de las otras quinasas que se encuentran en todos los tejidos, HRI se localiza principalmente en eritrocitos, debido a su función de activar a eIF2 α durante la eritropoyesis. Éste participa en la traslación del ARN mensajero de la globina y genera junto con los grupos hemo, la hemoglobina, evitando la acumulación de los agregados de globina, tóxicos para las células humanas. La activación de la quinasa HRI esta mediada por la presencia de los grupos hemo, inhibiendo la actividad quinasa de la enzima mediante la formación de puentes disulfato entre los monómeros que conforman la enzima HRI (forma inactiva en forma dimérica). Ante la ausencia de grupos hemo, no se generan las interacciones covalentes mencionadas anteriormente, por lo que HRI se autofosforila y activa. Se ha observado que HRI puede activarse ante otras situaciones de estrés, ya sea de tipo osmótico, calor, estrés oxidativo debido a la presencia de óxido nítrico u oxoaniones de arsénico (11).

La función de eIF2 α , una vez fosforilado, es la de paralizar o reducir la síntesis proteica en la célula, permitiendo que factores de transcripción generados por otros genes, como es el caso de ATF4 puedan trasladarse al núcleo, y activen los mecanismos necesarios para intentar recuperar la homeostasis celular. En caso de que la situación de estrés finalice, y con ello la respuesta integrada al estrés, se desfosforila, pero si el estrés celular resulta muy severo o prolongado, los diferentes elementos de esta ruta de señalización pueden inducir la apoptosis celular. Por lo tanto, los niveles de eIF2 α y ATF4, y la duración de su fosforilación, determinarán en última instancia el resultado de la ISR (11).

Para finalizar la señalización de la ISR, se requiere que eIF2 α quede desfosforilado, recuperándose así las funciones celulares normales y vuelvan a sintetizarse proteínas con normalidad. El responsable de generar la desfosforilación es el complejo formado por la proteína fosfatasa 1 (PP1), su subunidad catalítica (PP1c) y una de las dos subunidades reguladoras. La regulación de este proceso se lleva a cabo a su vez por PPP1R15A (también conocida como GADD34, (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein) que se expresa durante la propia ISR, o por su parólogo PPP1R115B, un inhibidor constitutivo de la fosforilación eIF2 α (CReP). En condiciones de homeostasis y ausencia de estrés celular, CReP interactúa con PP1c para mantener bajos los niveles de fosforilación de eIF2 α , y gracias a eso, la homeostasis traduccional. Por contraposición, la expresión de GADD34, se regula “*downstream*” de eIF2 α y ATF4, en los estadios de finales de la ISR (11).

2.4. ATF4 y cáncer.

Debido a su papel como regulador e inductor de la respuesta integrada al estrés, muchos grupos de investigación han estudiado la participación de ATF4 en la progresión de diferentes tipos de cánceres, debido a que el estrés celular suele ser bastante frecuente en estas patologías y juegan un importante papel. La hipoxia parcial, la presencia de radicales libres de oxígeno y la privación de nutrientes son características bastante comunes durante el desarrollo de tumores sólidos, debido al microambiente generado como consecuencia de la alta tasa metabólica que presentan estas células, y la imposibilidad de que lleguen por los vasos sanguíneos ordinarios una cantidad suficiente de nutrientes y oxígeno (39–41). Este ambiente de estrés celular, unido a las mutaciones en

diferentes genes, y rutas de señalización relacionados con la supervivencia celular favorecen la proliferación/inducción de CSCs, el proceso de EMT, metástasis y angiogénesis tumoral. Se ha demostrado incluso en modelos de tumores en animales, que los ciclos de hipoxia y reoxigenación pueden incrementar la agresividad y capacidad metastásica de los tumores (29).

Son muchos los estudios realizados sobre situaciones de estrés celular en cáncer, demostrándose en ellos la participación en mayor o menor medida de ATF4. En tumores en los que se observa estrés del RE prolongado, la progresión tumoral y la inhibición de los mecanismos para inducir la apoptosis de las células tumorales puede deberse al fenómeno UPR (que activa el eje PERK/eIF α /ATF4), y a la alteración que este produce sobre la activación de la apoptosis vía CHOP-proteína 21 (35,42).

La hipoxia en cánceres metastásicos avanzados se asocia con un peor pronóstico, puesto que actúa como inductor de diferentes procesos que favorecen la agresividad tumoral. Se ha descrito como HIF-1 α está relacionado con la resistencia inducida por hipoxia frente a quimio y radioterapia, y como, al bloquear su expresión, la resistencia desaparece. HIF-1 α favorece el proceso de glucólisis y síntesis de lactato gracias a la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), para la obtención rápida de ATP vía anaerobia. La diana de HIF-1 α , PDK1 (a través de sus efectores eIF2 α /ATF4), impide la entrada de piruvato en las mitocondrias (inactiva la enzima aldehído deshidrogenasa), induciendo la autofagia mitocondrial, impidiendo la muerte celular, y en última instancia, favoreciendo la resistencia terapéutica. Además, el microambiente celular ácido generado como consecuencia de la acumulación de lactato por la hipoxia,

favorece también la quimioresistencia, activando procesos como EMT y que las células tumorales adquieran un fenotipo “*stem*” (41,42).

Con respecto a la formación de nuevos vasos sanguíneos en los tumores, se ha demostrado en modelos de ratones con cáncer de mama que ATF4 induce la expresión de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) a través de la osteopontina y las rutas de señalización Brk/NF- κ B/ATF4. Se ha observado también que ATF4 promueve la angiogénesis gracias al reclutamiento de macrófagos en el microambiente tumoral. Gracias a que se promueve la angiogénesis en estos tumores, se puede decir que ATF4 favorece de forma indirecta el crecimiento tumoral en estos casos (43).

Los estudios que se están llevando a cabo en torno al oncogén MYC han revelado que, durante las situaciones de estrés celular, éste sobreactiva ATF4 a través de GCN2. Al activarse, se puede unir a la región promotora de hasta 30 genes diana de MYC (por ejemplo, genes encargados de regular la síntesis de aminoácidos y proteínas). Usando modelos de ratón, si se bloqueaba la expresión de ATF4, la progresión tumoral dependiente de MYC quedaba inhibida y la supervivencia de los animales aumentaba, demostrándose así que ATF4 puede ser una diana terapéutica prometedora para bloquear los efectos de MYC sobre tumores en situaciones de estrés celular (38).

II. Justificación e hipótesis.

La mayoría de los estudios en los que se investiga la relación entre ATF4 y el cáncer se han centrado, como hemos observado anteriormente, en cómo las células tumorales emplean y/o modifican las diferentes rutas de señalización de la respuesta integrada al estrés en su beneficio, ya sea evitando la apoptosis, induciendo autofagia, y/o latencia para el mantenimiento de las CSCs, y/o promover la angiogénesis (35,38,41–43). Sin embargo, estudios anteriores de nuestro grupo revelaron que en células de MCF10A de mama, la agresividad tumoral mediada por la ruta de señalización de TGF β (estimulación con TGF β 1), estaba acompañada por un aumento en la expresión de ATF4, en ausencia de condiciones de estrés (44). Este hecho, unido a que se ha correlacionado un peor pronóstico en pacientes con cáncer cuando la expresión de ATF4 es mayor (45), nos planteó la hipótesis de que ATF4 pueda participar de alguna manera en la agresividad tumoral en TNBC ligada a la ruta de señalización de TGF β .

Por lo tanto, ATF4, independientemente de la respuesta adaptativa al estrés, podría mediar el mantenimiento de las CSCs de mama a través de la interacción con la señalización de TGF β , y la activación del proceso EMT para generar células metastásicas con características iniciadoras de tumores. Estas condiciones conforman el escenario perfecto para promover recidivas, resistencia al tratamiento y eventos metastásicos en TNBC, lo que a la postre tendrá un impacto sobre la mortalidad de los pacientes (13,46–48). Si nuestra hipótesis se confirma, se podrían diseñar nuevos fármacos o emplear agentes terapéuticos ya existentes, cuya diana terapéutica fuesen ATF4. En el caso de fármacos preexistentes, su aprobación y puesta en el mercado se realizarían en plazos más cortos de tiempo, gracias a que las primeras fases de los ensayos

clínicos y toxicidad ya se habrían realizado, obteniendo así una terapia nueva, eficaz y que mejoraría de manera muy significativa el pronóstico de las pacientes.

III. Objetivos.

- *Objetivo principal.*

Estudiar la relación entre ATF4 con la agresividad y mal pronóstico en TNBC (ligado a la presencia de TGF β), y determinar su valor como biomarcador pronóstico en pacientes con TNBC.

- *Objetivos específicos.*

Objetivo 1. Estudiar la correlación entre ATF4 y peor pronóstico en TNBC.

Objetivo 2. Determinar la existencia de una relación directa entre TGF β y ATF4.

Objetivo 3. Conocer el papel de ATF4 sobre la agresividad inducida por TGF β en líneas celulares, CSCs y modelos de ratón de TNBC.

Objetivo 4. Establecer las vías moleculares a través de las cuales se activa ATF4 en presencia de TGF β 1 en TNBC.

Objetivo 5. Diseñar una firma génica basada en el mecanismo de acción de ATF4 útil para determinar el pronóstico y para la toma de decisiones terapéuticas en pacientes con TNBC.

IV. Material y Métodos.

1. Cultivos celulares.

Para la realización de este proyecto se emplearon las líneas celulares de TNBC SUM159PT (Asterand Bioscience), MDA-MB-231 y BT549 (American Type Culture Collection, ATCC). La actividad de la señalización de TGF β se determinó con la línea celular reportera del SMAD Binding Element (SBE) SBE-HEK293 (BPS Bioscience), que contiene un gen de luciferasa de luciérnaga integrado de forma estable bajo el control del elemento de respuesta de SMAD (SRE, SMAD Responsive Element). Así, en respuesta a la activación de la señalización de TGF β , se forma el complejo SMAD que se une a regiones específicas de ADN (SRE), y se produce luciferasa, que reacciona en presencia de luciferina y cuya luminiscencia puede ser cuantificada.

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con suero bovino fetal (FBS, Thermo Fisher Scientific) al 10% y antibiótico-antifúngico (Gibco) al 1% (medio de crecimiento). Las células SBE-HEK293 se cultivaron en condiciones selectivas en presencia de Geneticin (400 μ g/ml, Sigma).

2. Muestras de tejido de pacientes.

Las muestras de pacientes con TNBC que no recibieron terapia (n=35), conservadas en bloques de parafina, junto con toda la información de naturaleza patológica y los consentimientos informados de los pacientes procedían del nodo de Jaén del Biobanco del Sistema de Salud Pública de Andalucía (Hospital Universitario de Jaén). El uso de todas las muestras se aprobó por parte del Comité de Ética de Investigación de Jaén a fecha de 28 de febrero de 2016, siguiendo todos los preceptos de la Declaración de Helsinki y las pautas éticas

internacionales para la investigación biomédica que involucre a pacientes humanos (CIOMS).

3. Preparación de las muestras para inmunohistoquímica.

Las muestras de tejido tumoral se tiñeron para ATF4, siguiendo el protocolo empleado en nuestros estudios anteriores (49). Brevemente, las muestras de pacientes embebidas en parafina se sometieron a un tratamiento de Tris-Cl buffer (ph 9.0) para recuperar los antígenos presentes en ellas, se bloquearon mediante el “Antibody Blocking Kit” (Vector Laboratories) y durante toda la noche con el anticuerpo primario frente a ATF4 (CREB-2, clon B-3, Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:50. Las muestras se revelaron usando el Envision system (DAKO), comparándose con controles negativos y así eliminar posibles falsos positivos. Como contraste a la tinción, se empleó hematoxilina.

La evaluación de ATF4 en el tejido tumoral parafinado se llevó a cabo por 3 patólogos de forma independiente, evaluando intensidad y grado de tinción de las células tumorales con la siguiente escala semicuantitativa para cada parámetro:

a) Intensidad de tinción (granular y citoplasmática):

0=No hay tinción.

1=Tinción débil.

2=Tinción moderada.

3=Tinción intensa.

b) Grado de tinción:

0=0-25%.

1=26-50%.

2=51-75%.

3=76-100%.

Por último, se obtuvo una puntuación tras la ponderación de los resultados del siguiente modo: los valores de grado de tinción se multiplicaron por aquellos correspondientes a la intensidad. De este modo, la puntuación 0 se multiplicó por 0, la de 1+ por 1, la de 2+ por 2, y la 3+ por 3. La suma de los valores (entre 0 y 7) se corresponde con la puntuación final. Valoración a modo de ejemplo: a los valores negativo=10%, 1+=50%, 2+=30% y 3+=10% se les asigna los valores 0, 1, 1, 0, respectivamente, por lo que puntuación de tinción de ATF4 es $(0 \times 0) + (1 \times 1) + (1 \times 2) + (0 \times 3) = 3$.

4. Estimulación con TGF β 1 y silenciado génico transitorio mediante siRNA (small interfering RNA).

Para la realización de los distintos experimentos se emplearon dos secuencias distintas de siRNA frente a ATF4 (25 nmol/L, ATF4 TRILENCER-27 HUMAN siRNA, Origene), donde el siRNA#1 se corresponde con la secuencia C (CUUUGCCCGCCACAGAUGUAGU) y el siRNA#2 con la secuencia A (CCUUCUGACCACGUUGGAUGACA) del kit. Los siRNAs frente a SMAD2/3, SMAD4, PERK, PKR, GCN2, HRI, eIF2 α (EIFS1), RPTOR, RICTOR, TAK1 (MAP3K7) y RAS (50 nmol/L) se adquirieron en Santa Cruz Biotechnology. Un siRNA no codificante (scrambled, SCR, Origene), de secuencia

CGUUAUCGCGUAUAAUACGCGU, fue empleado como control negativo. Para estudios posteriores, los siRNAs frente ATF4 y SCR se obtuvieron a través de Sigma (custom oligos). Los “Overhang” de siRNA#1, #2 y SCR fueron [dT][dT], [dC][dT] y [dA][dT], respectivamente. La transfección transitoria se realizó con Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen). La estimulación con TGFβ1 recombinante humano (10 ng/ml, Peprotech) se realizó durante 24 o 72 horas una vez transcurridas 48 horas de la transfección, dependiendo del experimento.

5. Inhibidores farmacológicos.

Los inhibidores y pequeñas moléculas empleadas (**Tabla 1**) fueron administrados a los cultivos celulares una hora antes del tratamiento con TGFβ1, y se mantuvieron durante 24 y 72 horas.

Inhibidor (concentración)	Diana(s)	Procedencia
LY2157299, Galunisertib (5 μM)	TGFβRI	MedChem Express
U0126 (10μM)	MEK1/2	MedChem Express
SB203580 (10 μM)	P38-MAPK	MedChem Express
BKM120, Buparlisib (5 μM)	PI3K (isoforma catalítica p110α/β/δ/γ)	MedChem Express
LY294002 (10 μM)	PI3K (isoforma catalítica p110α/β/δ)	MedChem Express
GSK690693 (10 μM)	Akt1, Akt2, Akt3	MedChem Express
Sirolimus, Rapamycin (10 μM)	mTOR (mTORC1/2)	MedChem Express
GSK2334470 (10 μM)	PDK1	MedChem Express

BI-D1870 (10 μ M)	pan-RSK	MedChem Express
GSK650394 (10 μ M)	SGK1/2	MedChem Express
CHIR-99021 (10 μ M)	GSK3 α / β	MedChem Express
ISRIB (trans-isomer) (5 μ M)	PERK/eIF2 α	MedChem Express
(5Z)-7-Oxozeaenol (1 μ M)	TAK1 MAPKKK	Sigma

Tabla 1. Inhibidores y dianas moleculares.

6. Inducción de estrés de retículo endoplasmático (RE).

La respuesta integrada al estrés derivada del RE se indujo mediante la estimulación con taspigargina (TG, Santa Cruz Biotechnology) durante 24, 48 y 72 horas, con una concentración de 100nM para la línea celular BT549 y 50 nM para SUM159PT y MDA-MB-231.

7. Proliferación celular.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y, tras la renovación del medio de crecimiento a las 24 horas, se transfectaron durante 48 horas con siRNA de ATF4 y estimularon con TGF β 1 durante 24 horas (líneas SUM159PT y BT549) o 72 horas (MDA-MB-231) adicionales. El siRNA SCR fue empleado como control negativo de silenciado. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo WST-1 (Roche), una sal de tetrazolio estable, basado en la formación de formazán dependiente de la producción glucolítica de NAD(P)H en las células viables. La cantidad de formazán generada se correlaciona de forma directa con el número de células metabólicamente activas en el cultivo. Transcurrida la transfección, se administró reactivo WST-1 a cada pocillo

(dilución 1:10) y las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C. La cantidad de formazán generado se determinó mediante espectrofotometría (450 nm) en un TECAN NanoQuant Infinite M200. La absorbancia medida se correlaciona directamente con el número de células viables.

8. Migración celular.

La capacidad migratoria de las células se evaluó gracias al ensayo de curación de herida o "*wound-healing*". Antes de sembrar las células, dibujamos debajo de cada pocillo una serie de líneas calibradas que servirán como referencia a la hora de hacer las heridas (**Figura 3**). El ensayo consiste en sembrar las células en placas de 6 pocillos, y dejar que crezcan hasta que generen una monocapa. Durante ese tiempo, aplicamos nuestros tratamientos, transfectando las células con siRNA frente ATF4 y control (SCR) durante 48 horas, y estimuladas con TGFβ1 durante 24 horas. Una vez finalizados los tratamientos, se realizó una herida en la monocapa del cultivo, empleando una punta de pipeta de 100 µl. Tras realizar la herida se tomaron fotografías a las 0, 14 y 24 horas. El índice de migración se calculó como la distancia recorrida por las células tumorales en los tiempos 14 y 24 horas con respecto al inicio (0 horas). Esta distancia (pixels) fue determinada mediante el software Image J y normalizadas frente al control negativo SCR.

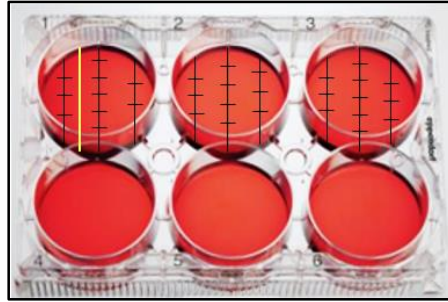


Figura 3. Representación de una placa de 6 pocillos usada en el ensayo de “wound-healing”, con las líneas de referencia (negro) y herida (amarillo) en la monocapa.

9. Ensayo de invasión.

El estudio de la capacidad invasiva de las células tumorales se llevó a cabo empleando el “Cultrex BME Cell Invasion Assay Kit” de Trevigen. La placa de 96 pocillos facilitada por el kit (1X-BME-coated transwell chamber), posee una serie de insertos que contienen Basement Membrane Extract (BME), o matriz proteica, y una membrana de policarbonato de 8 μm en su base.

Antes de empezar el ensayo, las células se sembraron en placas de 6 pocillos y fueron transfectadas durante 48 horas con siRNA frente ATF4 y el control negativo SCR, y posteriormente estimuladas con TGF β 1 durante 24 horas (SUM159PT y BT549) o 72 horas (MDA-MB-231). Por otra parte, la placa de 96 pocillos con cámaras de invasión se atempera durante una hora a temperatura ambiente. Las cámaras se rehidrataron con 25 μl de medio DMEM libre de suero a 37 $^{\circ}\text{C}$ en un incubador de CO $_2$ durante una hora. Una vez finalizados los tratamientos, se retiró el medio con los complejos de transfección y se pusieron en condiciones de privación con medio libre de FBS durante 16-24 horas. Tras este periodo, se recogieron las células, se centrifugaron a 200xg durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se volvieron a resuspender en DMEM libre de suero. Tras rehidratar las cámaras se añadieron 25 μl de células (25×10^3 células) y se sembraron en la parte superior de la cámara de la placa 96 pocillos,

mientras que en la placa se añadieron 150 μ l de medio DMEM con 10% FBS como quimioatrayente. Después, se montó la cámara sobre la placa, quedando separadas por la membrana de policarbonato, y el conjunto se incubó a 37 °C durante 24 horas. Al finalizar el periodo de incubación, se eliminó el contenido de las cámaras invirtiéndolas sobre un plato y se lavaron con 50 μ l de buffer 1X. Una vez lavadas las cámaras, se pasaron a una placa de 96 pocillos negra, y se añadió 100 μ l de solución disociadora de células/calceína (proporción 1 μ l de calceína por cada ml de solución de lisis) al fondo de los pocillos, y se incubó a 37 °C durante una hora. Por último, se golpeó levemente la cámara 10 veces para que cayeran las células adheridas a la membrana en los pocillos, y se leyó la placa en un aparato NanoQuant Infinite M200 (TECAN), a 485 nm de excitación y 520 nm de emisión. El número de células que han invadido se calcula al trasponer los datos de absorbancia en una curva de calibrado realizada previamente con distintas densidades de células (**Figura 4**).

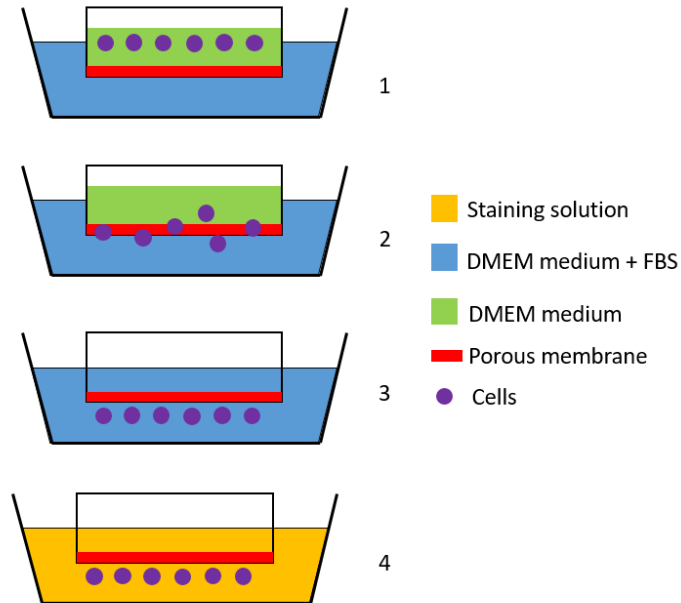


Figura 4. Esquema del funcionamiento del ensayo de invasión: **1)** se siembran las células en un inserto con BME 1X en medio DMEM libre de FBS, y que queda separado del pocillo inferior por una membrana de 8 μm de tamaño de poro. En dicho pocillo inferior se dispone medio de crecimiento. **2 y 3)** Las células con capacidad invasiva atraviesan la matriz proteica (BME) y la membrana, dirigiéndose hacia la zona donde hay más nutrientes. **4)** Se emplea una solución de calceína para su cuantificación.

10. Eficiencia de formación de mamosferas (MSFE).

Para el cultivo y determinación del porcentaje de eficiencia de formación de mamosferas (%MSFE) se siguió la metodología empleada en estudios previos de nuestro grupo y que evita la agregación (44,50). Para ello, las líneas celulares se sembraron en placas de 6 pocillos, se transfectaron con ATF4-siRNA#1 y ATF4-siRNA#2 y estimularon durante 24 horas con TGF β 1. Finalizado el tratamiento, se levantaron y sembraron en placas de baja adherencia a una densidad de 500 células/cm² en medio MammoCult y 0.5% de metilcelulosa (MethoCult) (STEMCELL Technologies). El recuento de mamosferas se llevó a cabo tras 72 horas de incubación, y se empleó un contador GelCount colony counter (Oxford Optronix). Para calcular el %MSFE, el número de mamosferas se dividió por el de células sembradas y se multiplicó por 100.

11. RT-PCR cuantitativa (qPCR).

La extracción y purificación del ARN total de las células se realizó con el “E.N.Z.A. MicroElute Total RNA Kit” (Omega Biotek). La síntesis de cDNA a partir del ARN total se realizó con el “qScript cDNA Synthesis Kit” (Quantabio). La PCR cuantitativa se llevó a cabo con iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en un QuantStudio 6 Flex Real Time PCR (Thermo Fisher Scientific).

Con respecto a los “*primers*” empleados, a continuación, enumeraremos cada uno de ellos junto a su secuencia (**Tabla 2**, Fw – Forward; Rv – Reverse):

Gen	Secuencia Forward (Fw)	Secuencia Reverse (Rv)
ATF4	CCTTCACCTTCTTACAACCT	GTAGTCTGGCTTCCTATCTC
NANOG	GTCAAGAAACAGAAGACCAG	GCCACCTCTTAGATTTTCATTC
SOX2	ATAATAACAATCATCGGCGG	AAAAAGAGAGAGGCAAACCTG
OCT4	GATCACCTGGGATATACAC	GCTTTGCATATCTCCTGAAG
NOTCH1	AAGATATGCAGAACAACAGG	TCCATATGATCCGTGATGTC
CXCL10	AAAGCAGTTAGCAAGGAAAG	TCATTGGTCACTTTTAGTG
GAPDH	ATCACCATCTTCCAGGAGC	CATGGTTCACACCCATGAC

Tabla 2. Secuencias de los “*primers*” empleados para la RT-qPCR.

12. ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)-qPCR.

Se siguió el protocolo descrito por Johnson *et al.*, (2007) (51). Brevemente, para favorecer la interacción proteína-proteína y su entrecruzamiento, se añadió al medio con las células (5×10^6) formaldehído al 1% durante 15 minutos y a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo glicina (125 mM) durante 5 minutos. Una vez finalizado, las células se lisaron empleando 500 μ l

de buffer de lisis (50 mM Tris pH 8.1, 10 mM EDTA – ácido etilendiaminotetraacético – y 1% SDS – dodecilsulfato sódico –) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). A continuación, el lisado celular se diluyó en 1,5 ml de buffer de inmunoprecipitación (25 mM Tris pH 8.0, 150 mM de NaCl, 0.01% de SDS, 0.5% desoxicolato, 1% Triton X-100 y 5 mM EDTA), y se sometió a sonicación para generar fragmentos de cromatina de entre 200 y 600 pares de bases. Para que los fragmentos de cromatina precipitasen, se emplearon partículas magnéticas con 5 µg de cada anticuerpo primario. Las partículas con los inmunocomplejos se lavaron dos veces con diferentes buffer: buffer salino (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% desoxicolato, 1% NP40, 1 mM EDTA), buffer de alta salinidad (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% desoxicolato, 1% NP40, 1 mM EDTA), buffer de lavado (50 mM Tris pH 8.0, 250 mM LiCl, 0.5% desoxicolato, 1% NP40, 1 mM EDTA), y buffer Tris-EDTA (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) durante 10 minutos a 4 °C. Los inmunocomplejos se diluyeron en un buffer de dilución (1% SDS, 0,1 M NaHCO₃) durante una hora a 65 °C. Para la realización del entrecruzamiento inverso, la incubación fue de 6 horas a 65 °C. Para realizar el “*ChIP sequencing*”, los primeros inmunocomplejos diluidos en el buffer de dilución, se diluyeron de nuevo en el buffer de inmunoprecipitación a 37 °C durante una hora y media. Para que inmunoprecipiten los complejos, se usaron partículas magnéticas a las que están adheridos los anticuerpos secundarios, lavándolos y volviéndolos a diluir con el buffer de dilución durante una hora a 65 °C. El ADN obtenido del entrecruzamiento reverso se purificó y aisló mediante el método fenol/cloroformo y posteriormente usando el kit QIAquick PCR purification (Qiagen).

Cabe señalar que, a pesar de seguir el protocolo anteriormente descrito, se hicieron algunas modificaciones puntuales. Concretamente, se emplearon 2×10^6 células en la línea BT549 para cada reacción de inmunoprecipitación con anti-SMAD2/3 (R&D Systems, AF3797). El ADN inmunoprecipitado se purificó usando el método de fenol/cloroformo y se analizó mediante qRT-PCR, empleando “*primers*” específicos para cada locus y GoTaq qPCR Master Mix (Promega, A6002). La lista de “*primers*” empleados junto a sus secuencias se enumeran a continuación (**Tabla 3**).

Gen	Secuencia Forward (Fw)	Secuencia Reverso (Rv)
SERPINE1	GCAGGACATCCGGGAGAGA	CCAATAGCCTTGGCCTGAGA
MMP2	TCCCAGGCCTGCCCATGTCA	GGAGCTGGTGGGTGGAAAGCC
ATF4	CGTCCCCATAGAGACGAAGTC	GGCGGGCAAAGTAGAAATG
LAMB3	TTGCCCTGCACTACAACACA	GTAACACACCAGGCCCACTT
HPRT1	TGTTTGGGCTATTTACTAGTTG	ATAAAATGACTTAAGCCCAGAG

Tabla 3. Secuencia de los “*primers*” empleados para los ChIP-qPCR.

13. Western blot.

La metodología seguida para el western blot fue la misma empleada en trabajos anteriores por nuestro grupo de investigación (44,49,52). En primer lugar, se sembraron las células en placas de 6 pocillos, y una vez adheridas y a una confluencia de entre 50-60%, fueron tratadas según el experimento (transfección con siRNA, estimulación con TGF β 1 y/o inhibición farmacológica). Finalizado el tratamiento, las células se lisaron con buffer de lisis 1X (Cell Signaling Technology) y un cóctel de inhibidor proteasa/fosfatasa 1X (Thermo Fisher Scientific). Tras el lisado de las células mediante vórtex intermitente en

hielo durante 15 minutos, cada muestra se centrifugó a 4° C a 10000 rpm durante 10 minutos. La concentración de proteína en el sobrenadante se determinó mediante el método de BCA con el kit Pierce™ BCA Protein Assay, empleando una curva patrón de albúmina y aplicando el método de mínimos cuadrados.

La desnaturalización de cada muestra de proteína (30 µg) se realizó mezclando cada una con “*sample buffer*” en proporción 1:4 (Thermo Fisher Scientific) y β-mercaptoetanol al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), y posterior choque térmico a 95 °C durante 5 minutos en un thermoblock (Hera Scientific).

Las muestras se resolvieron mediante electroforesis SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel) en geles de poliacrilamida con gradiente de concentración (4-20%) (Bio-Rad) durante 30 minutos a 200V con buffer TGS (Tris-Glycine-SDS) (Bio-Rad). Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en presencia de buffer de transferencia TG (Tris-Glycine) (Bio-Rad) durante 1 hora a 50V. Tras el bloqueo de las membranas con una solución de leche desnatada (5%) (Bio-Rad) en PBS al 1X (Phosphate Buffered Saline) y Tween 20 (VWR International) al 1% (PBS-T), durante 1 hora, éstas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes, cada uno a una determinada dilución (**Tabla 4**) durante 24 horas a 4 °C. Finalizada la incubación, las membranas se lavaron con PBS-T tres veces durante 10 minutos y fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (dilución 1:2000) (**Tabla 4**) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esta incubación, las membranas se lavaron como se ha indicado anteriormente y se incubaron con reactivo de quimioluminiscencia (ECL) durante 5 minutos. Los reactivos de ECL empleados fueron: Immobilon Classico,

Crescendo (Merk Millipore), o SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific). Las bandas de proteínas se detectaron en el sistema de documentación de geles ImageQuant LAS 4000 digital imager (GE Healthcare) y el análisis densitométrico se llevó a cabo con software Image J.

Anticuerpo	Dilución	Proveedor
ATF4 (CREB-2)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
ATF4 (C-20)	1:1000	
ATF4 (B-3)	1:1000	
SMAD4 (B-8)	1:1000	
TWIST1 (Twist2C1a)	1:1000	
BCDL2 (C-2)	1:1000	
MCL1 (22)	1:1000	
CD44 (HCAM)	1:1000	
CD44 (DF1485)	1:1000	
SOX2 (E-4)	1:1000	
HRI (D12)	1:1000	
RAPTOR (10E10)	1:1000	
RICTOR (H-11)	1:1000	
TAK1 (H-5)	1:1000	
RHOA (26C4)	1:1000	
β -actina	1:1000	Cell Signaling
Fosfo-SMAD2 (Ser465/467)/3(Ser426/425)	1:1000	
SMAD2/3	1:1000	

N-Caderina (D4R1H)	1:1000	Cell Signaling
ZEB1 (D80D3)	1:1000	
SNAIL (C15D3)	1:1000	
SLUG (C19g7)	1:1000	
NANOG (D73G4))	1:1000	
Cleaved NOTCH1 (Val1744) (D3B8)	1:1000	
OCT4	1:1000	
PERK (C33E10)	1:1000	
PKR	1:1000	
GCN2	1:1000	
eIF2 α	1:1000	
Fosfo-AKT (Ser473)	1:1000	
Fosfo-P70S6K (Thr389)	1:1000	
Fosfo-NDRG1 (Thr346)	1:1000	
RAS	1:1000	
Anti-rabbit	1:2000	
Anti-mouse	1:2000	
RAC1 (102)	1:1000	BD Bioscience

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en western blot.

14. Determinación de la actividad de TGFβ.

La línea celular SBE-HEK293 se transfectó con ATF4-siRNA#2 y estimuló con TGFβ1 durante 24 horas. La actividad del SBE se analizó de acuerdo con las instrucciones del kit ONE-Step Luciferase Assay System (BPS Bioscience). Para ello, se incubaron las células en presencia de los buffers A y B del kit durante 15 minutos. La señal de luminiscencia se determinó con el luminómetro GloMax-Multi Detection System (Promega).

15. Ensayos *in vivo*.

15.1. Modelos animales de tumores xenógrafos derivados de pacientes (Patient-Derived Xenografts, PDX).

Todos los experimentos y procedimientos fueron aprobados por el Methodist Hospital Research Institute Animal Care and Use Review Office. En base a los niveles de expresión de ATF4 mediante secuenciación de ARN e inmunohistoquímica, los modelos PDX de TNBC empleados fueron BCM-3887 y BCM-4664, correspondientes al subtipo intrínseco de cáncer de mama basal (49,53). Para la inducción de los tumores, una pieza de tejido se implantó en el tejido adiposo mamario (tras la retirada del epitelio glandular) de ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) hembra de 4-5 semanas de edad. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de entre 150 y 200 mm³, los ratones fueron distribuidos de manera aleatoria en los siguientes grupos experimentales:

- 1.- Grupo control, tratados con un siRNA control no codificante – SCR.
- 2.- Grupo tratado con ATF4-siRNA#2 – siRNA#2.
- 3.- Grupo tratado con siRNA control y docetaxel (20 mg/kg) (Houston Methodist Hospital) – SCR+Chemo.
- 4.- Grupo tratado con ATF4-siRNA#2 y docetaxel (20 mg/kg) – siRNA#2+Chemo.

La administración de cada siRNA se hizo por vía intraperitoneal 2 veces por semana durante 6 semanas (5 µg/ratón), mientras que el docetaxel se inyectó por vía intraperitoneal una vez por semana en los días 1, 14 y 28. El volumen tumoral y el peso de los animales se midieron cada dos días. Finalizadas las 6 semanas del experimento, los ratones fueron sacrificados y los tumores extirpados (52). Para estudiar las recaídas, se empleó específicamente el modelo sensible a docetaxel BCM-4664 tratado con 33 mg/kg de este taxano para conseguir la desaparición de los tumores. Por razones éticas, los animales fueron sacrificados si aparecían signos de morbilidad, pérdida de un 20% del peso corporal o en el caso de que los tumores alcanzasen un volumen de 2 cm³.

15.2. Generación de un modelo PDX de metástasis a pulmón.

Con respecto al modelo PDX para el estudio del papel de ATF4 en el proceso metastásico, se empleó el modelo BCM-3887, descrito por su capacidad de originar metástasis en pulmón (49,53), para el desarrollo de un modelo altamente metastásico (3887-LM) mediante trasplante seriado de nódulos metastásicos en pulmones. Para ello, tras el implante de una porción de tejido tumoral BCM-3887 en ratones NSG, y cuando los tumores alcanzaron un volumen de 200-250 mm³, éstos fueron extirpados y, tras el cierre de la herida, los ratones se mantuvieron

con vida hasta la aparición de signos de morbilidad o pérdida de peso. En ese momento, tras la eutanasia, se extrajeron los pulmones y se aisló cualquier nódulo metastásico presente. Los nódulos se incluyeron en medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) con 10% de FBS, y posteriormente se transplantaron ortotópicamente de forma seriada en nuevos ratones NSG hembra de entre 4-5 semanas de edad. Dicho proceso se repitió hasta obtener la segunda generación (denominado modelo 3887-LM), que fue empleado en nuestros experimentos.

Para el presente estudio, se trasplantó un fragmento de tejido tumoral 3887-LM en la grasa mamaria de ratones hembra NSG, de entre 4-5 semanas (n=10). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 150-200 mm³, se extirparon y los animales se mantuvieron una semana en proceso de recuperación postquirúrgica. En ese momento, se asignaron de manera aleatoria a dos grupos experimentales (n=5/grupo): 1) SCR y 2) siRNA#2. Cada siRNA se administró por vía intraperitoneal dos veces en semana durante 6 semanas a una dosis de 5 µg/ratón. Una vez finalizado el tratamiento, los ratones fueron sacrificados ante la presencia de signos de morbilidad metastásica o pérdida de peso, extrayendo los pulmones e hígado para el estudio macroscópico en búsqueda de metástasis y se conservaron en formaldehído para el posterior análisis inmunohistoquímico.

15.3. Inmunohistoquímica en tejido murino.

Para evaluar la metástasis en pulmones e hígado derivados del estudio en el modelo metastásico 3887-LM, dichos órganos se tiñeron para la proteína Ki67 (Dako, M7240) (dilución 1:100) y ATF4 (Abcam, ab28830) (dilución 1:50), como hemos publicado previamente (44,49,52). El contraste se consiguió mediante la tinción con hematoxilina y eosina.

15.4. Preparación de nanopartículas liposómicas.

Para la administración de los tratamientos con siRNA control y ATF4-siRNA#2 en los ratones, éstos se encapsularon en liposomas de DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) (Avanti Polar Lipids, Alabaster) siguiendo el protocolo de Vivas-Mejia *et al.*, (2013) (54). Para ello, los diferentes siRNA se mezclaron con el DOPC en exceso de tertbutanol (1:10, w/w) añadiendo inmediatamente después Tween-20. La mezcla se congeló mediante un baño de acetona/hielo seco y posterior liofilización. Antes de la administración *in vivo*, se rehidrató con PBS a 25 µg/ml.

15.5. Determinación de células madre tumorales ALDH+ mediante citometría de flujo.

Para el estudio de la población aldehído deshidrogenasa positiva (ALDH+) de CSCs procedentes de los tumores PDX tras la inhibición de ATF4, se empleó el kit de Aldefluor (STEMCELL Technologies). Una vez extraídos los tumores del ratón, se disoció el tejido para aislar las células tumorales (52).

El ensayo de Aldefluor se basa en la presencia del enzima ALDH, que se encuentra mayormente en poblaciones de células de naturaleza “*stem*” y cuya

función como detoxificante favorece la resistencia a fármacos en CSCs. El reactivo de Aldefluor, al reaccionar con esta enzima da lugar una luminiscencia específica, y al analizar las muestras por el citómetro, toda célula que emita dicha luminiscencia se contabilizará como célula ALDH+ (CSCs). El protocolo seguido consistió en:

Una vez se extrajeron y aislaron las células procedentes del tumor, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en buffer de Aldefluor. A continuación, se separaron las células de cada muestra en dos tubos: a uno se le añadió 5 µl del reactivo de Aldefluor activado mientras que al otro se le añadieron el reactivo de Aldefluor y 5 µl de reactivo DEAB (dietilaminobenzaldehído, 15 µM), que neutraliza la reacción de la enzima ALDH. A continuación, se incubaron a 37 °C durante 60 minutos, y posteriormente se colocaron inmediatamente en hielo para detener la reacción y evitar el eflujo del reactivo. Posteriormente, se añadió el anticuerpo H2kD-PE para la exclusión de las células de ratón, y se incubó durante 15 minutos, seguido de una centrifugación a 300xg y durante 5 minutos a 4° C. Tras retirar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 500 µl de PBS-HEPES (2.5%) (Sigma), manteniéndose las muestras en hielo hasta el análisis. Previo al análisis en el citómetro (LSR Fortessa, BD Biosciences), se añadió el reactivo de viabilidad celular Sytox blue (Thermo Fisher Scientific) durante 10 minutos.

A la hora de seleccionar la población en el citómetro, debimos ajustar los parámetros para que la población de células seleccionada fuese la correcta: para la selección de células con el tamaño adecuado y excluir todo aquello que no fuesen singletes, el “*plot*” se ajustó para SSC-A en el eje Y FSC-A para el X, y

FSC-H en el eje Y FSC-A en el eje X, respectivamente. Para la viabilidad, el nuevo “*plot*” mantenía SSC-A en el eje Y, y en el eje X ajustamos el detector para V450; seleccionando aquí aquellas células que eran negativas para “*sytox blue*” (población viable). Debido a que empleamos el anticuerpo H2kD-PE para excluir las células de ratón, de la población anterior, se seleccionó la nueva en un nuevo “*plot*” con SSC-A para el eje Y, y PE para el eje X, siendo negativa para éste. Por último, la selección de la población de células ALDH+ se llevó a cabo con un “*plot*” en el cual el eje Y se ajustase a SSC-A y FITC-A en el X (para la detección del aldefluor). Una vez tuvimos seleccionada la población de células, las ALDH+ fueron aquellas que entraron dentro de un “*gate*” poligonal ajustado al punto en el cual el FITC-A pasó de ser negativo a positivo.

16. Secuenciación de ARN y análisis bioinformático.

La secuenciación de ARN fue llevada a cabo por los laboratorios NeoGenomics, en Houston, Texas. La concentración y calidad del ARN extraído de cada muestra de tejido PDX se analizaron mediante un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer y un bioanalizador Agilent 2100, respectivamente. La preparación de las librerías genéticas se hizo mediante el “Illumina TrueSeq Stranded mRNA Library prep Kit”. Una vez generadas, se cuantificó su concentración gracias al “Invitrogen Quant-iT dsDNA Assay Kit”, mientras que la calidad y el tamaño de la biblioteca génica se determinó con un bioanalizador Agilent 2100. Las librerías se agruparon y secuenciaron gracias a un secuenciador HiSeq con 1%PhiX “*spike-in control*” a 2x101 ciclos. Para cada muestra se generaron alrededor de 2x20 millones de lecturas con una longitud de 100 pares de bases. Los datos en bruto del análisis de la secuenciación de

ARN procedentes de los modelos PDX se depuraron para eliminar los elementos procedentes del material genético de ratón. Esto se consiguió empleando la herramienta BBSplit con el genoma de ratón en formato FASTA como referencia. El resto de las secuencias de ARN se alinearon con el genoma de referencia humano hg19 de UCSC con el paquete STAR (versión 2.4.2). Una vez alineadas las secuencias, se cuantificaron y compararon con el genoma de referencia, obteniendo FPKM (Fragments/Kilobase/Million) mediante CuffLinks (versión 2.2.1). Todos los datos de secuenciación fueron depositados para su uso posterior y se les asignó el número de acceso GSE113362.

17. Análisis estadístico.

17.1. Análisis bioinformático.

Se empleó la base de datos KM plotter (www.kmplot.com/analysis), para la realización de los análisis de Kaplan-Meier en el estudio de genes clave relacionados con supervivencia de pacientes con cáncer de mama (5143 muestras de pacientes en total). Los datos de expresión génica, procedentes de muestras de pacientes libres de recaídas (Relapse-Free Survival, RFS, n=3951), y supervivencia total (Overall Survival, OS, n=1402) se obtuvieron de Gene Expression Omnibus, European Genome-Phenome Archive y The Cancer Genome Atlas (55). Con respecto a las correlaciones entre alteraciones genómicas y transcriptómicas, y su impacto en la supervivencia de pacientes, se empleó OncoPrint y análisis de Kaplan-Meier de datos de 2509 pacientes con cáncer de mama procedentes de la base de datos cBioPortal (55).

17.1.1. Metaanálisis.

Los análisis de datos de sobreexpresión génica relacionados con supervivencia libre de recaídas (RFS) y supervivencia global (OS) en pacientes con cáncer de mama (ER+/-, PR+/-, HER2+/-; y los subtipos basales intrínsecos, luminal A, B y HER2) se llevaron a cabo mediante el método de Kaplan-Meier con la base de datos KM Plotter, calculando el cociente de riesgo con un intervalo de confianza del 95% (el rango del P-valor se calculó en escala logarítmica). La clasificación y separación de los pacientes se realizó al evaluar los porcentajes de expresión, ordenándolos en cuartiles de menor a mayor expresión, generando un límite para el análisis mediante regresión de Cox (56). Al evaluar la OS de todos los casos de cáncer de mama, se estimó que el rango de expresión de la sonda de ATF4 era de 2601 – 13519, considerándose que una expresión ≥ 7321 se asociaba a un peor pronóstico. Con respecto a la RFS, para todos los tipos de cáncer de mama, el rango de expresión de ATF4 fue de 1033 – 25273 (valores ≥ 7025 directamente relacionados con una menor RFS). En los tumores de tipo ER+, con un rango de expresión de 1403 – 17883, la expresión ≥ 6733 se relacionó con una peor RFS. En los casos de ER-, cuyo rango de expresión era de 1592 – 24273, se estableció un valor ≥ 8282 como el límite para la correlación con un mal pronóstico. En pacientes con TNBC, el rango de expresión era de 2601 – 13519, siendo los valores ≥ 8346 aquellos que se relacionaron con una menor RFS.

17.1.2. Análisis de la firma génica.

El efecto de la expresión de la firma de 8 genes sobre la RFS de pacientes con cáncer de mama se evaluó mediante el análisis en KM Plotter, con la opción de clasificación múltiple y computando la media de expresión de cada gen. La supervivencia media de la cohorte de alta expresión se normalizó, en términos porcentuales, frente a la de baja expresión, y se calculó el número de veces que se modifica la supervivencia (*“fold change”*) del siguiente modo: *“fold change”* (%) = supervivencia de la cohorte de alta expresión – 100 (línea base). Se empleó un método de comparaciones múltiples de tipo *“step-up”* para la corrección de los datos (56,57). La eficiencia de la firma génica y el análisis de múltiples genes se evaluó mediante el método de validación cruzada *“leave-one-out”* (LOOCV) (57). Finalmente, los análisis de correlación se realizaron usando la Correlación de Pearson.

17.2. Ensayos funcionales.

Para aquellos ensayos en los que se compararon dos grupos experimentales, los datos obtenidos se analizaron mediante una t de Student, siendo todo P-valor < 0.05 considerado como significativo.

La supervivencia de la cohorte de 35 pacientes se llevó a cabo empleando el método de Kaplan-Meier y el test Log-Rank con el programa SPSS 21.0. Los datos de la intensidad y grado de tinción de las muestras de pacientes se recopilaron y analizaron con una curva ROC (Receiver Operating Characteristic) ajustando el umbral de tinción positiva al mejor resultado.

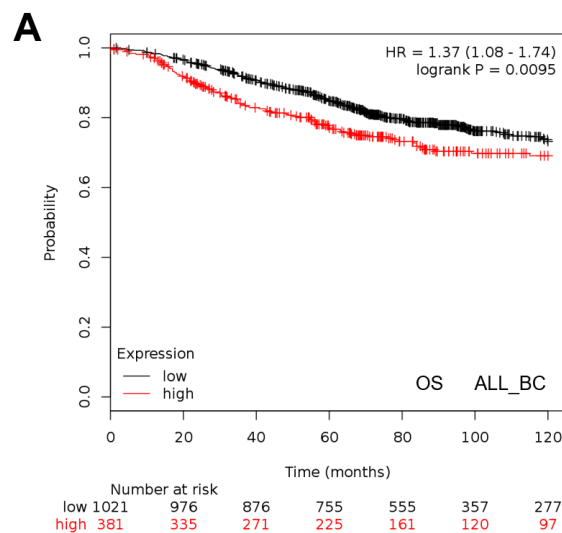
17.3. Análisis de los datos de los modelos PDX.

Los volúmenes tumorales de los modelos PDX se compararon mediante una “*two-way ANOVA*,” y un análisis post-hoc de Bonferroni. La supervivencia media de los ratones tras los tratamientos se evaluó con la prueba Log-Rank (Mantel-Cox), y los intervalos del cociente de riesgo con un 95% de confianza. A cada animal fallecido se le asignó el número 1, y 0 a los supervivientes. Para evaluar la supervivencia, el último día de tratamiento (día 42) se consideró como el día 0 para evaluar la supervivencia. Todo P-valor < 0.05 se consideró significativo.

V. Resultados.

1. La sobreexpresión de ATF4 se correlaciona con un mal pronóstico.

Para determinar la relación entre un peor pronóstico y la expresión de ATF4, se realizaron análisis de Kaplan-Meier en datos de pacientes obtenidos de bases de datos públicas. Observamos que existía una relación directa entre una mayor expresión de ATF4 y un peor pronóstico, tanto si evaluamos la supervivencia total (Overall Survival, OS, n=1402. P=0.0095) (**Figura 5A**), como la supervivencia libre de recaídas (Relapse-Free Survival, RFS, n=3951, P=8.4e-6), en todos los casos de cáncer de mama (ALL_BC), ER+ (n=2061, P=0.0011), ER- (n=801, P=0.0058) y TNBC (n=255, P=0.016) (**Figura 5B**).



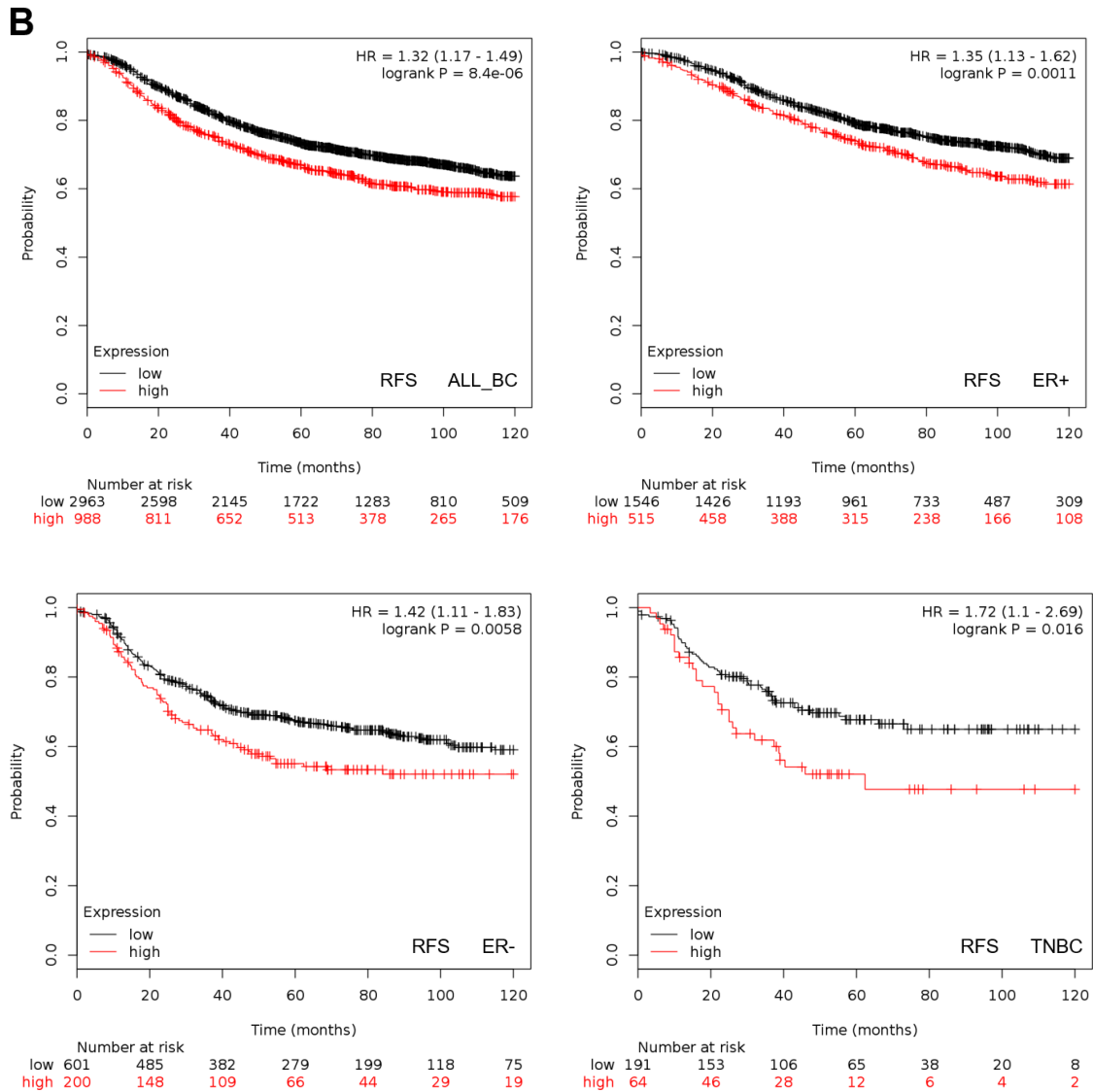


Figura 5. A) Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia total (OS) y **B)** libre de recaídas (RFS) en bases de datos públicas: todos los tipos de cáncer de mama (ALL_BC), receptor de estrógenos positivo (ER+), receptor de estrógenos negativo (ER-) y triple negativo (TNBC).

Estos resultados se validaron en tejido tumoral parafinado procedente de pacientes con TNBC (n=35) del Hospital Universitario de Jaén. Mediante inmunohistoquímica, se evaluó el grado e intensidad de tinción para comprobar la expresión de la proteína ATF4, pudiendo ser negativa, 1+, 2+ o 3+ (**Figura 6**). Tras el análisis, el 66% de las muestras dieron positivo (intensidad de tinción \geq 1+).

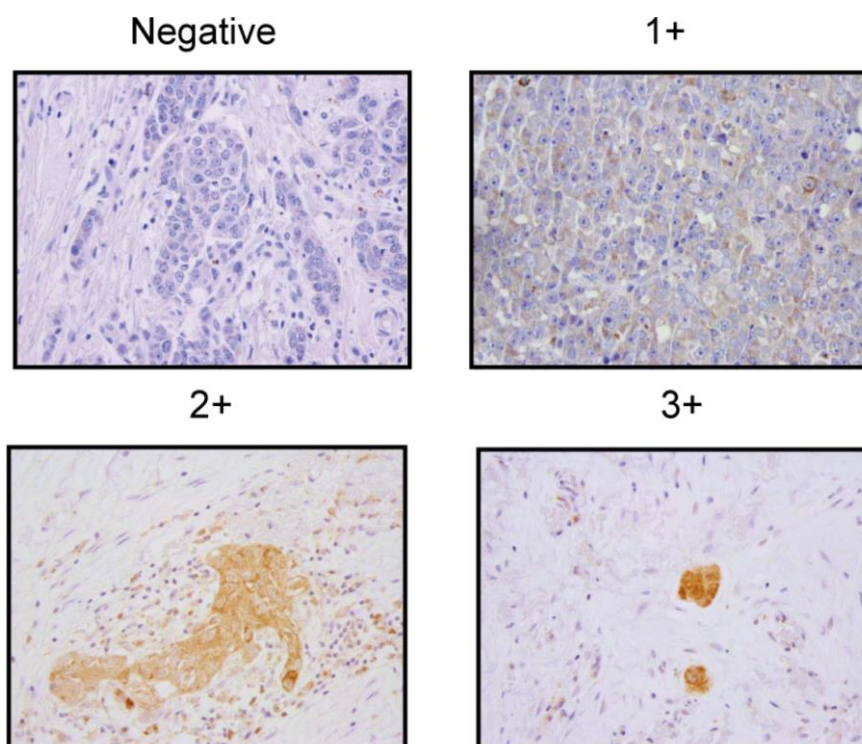


Figura 6. Imágenes representativas de intensidad de tinción negativa, 1+, 2+ y 3+ de ATF4 en tejido tumoral de pacientes con TNBC (objetivo óptico original: 20X).

A continuación, se evaluó la supervivencia global de estas pacientes mediante su correlación con la tinción de ATF4 a través del análisis de Kaplan-Meier. Para delimitar el grado de tinción de este gen a partir del cual se considera como positivo, se realizó un análisis con una curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Determinamos que un valor de tinción ≥ 1 para ATF4 era el idóneo para ser considerado como positivo (1-Especificidad: 0.517. Sensibilidad: 0.833) **(Figura 7A)**. El análisis de la supervivencia confirmó que, a partir de los 24 meses de seguimiento, aquellas pacientes cuyo tejido tumoral mostraba una tinción de ATF4 ≥ 1 presentaban menor supervivencia global desde el diagnóstico (37 meses) que aquellas con tinción negativa (<1) (46 meses) **(Figura 7B)**.

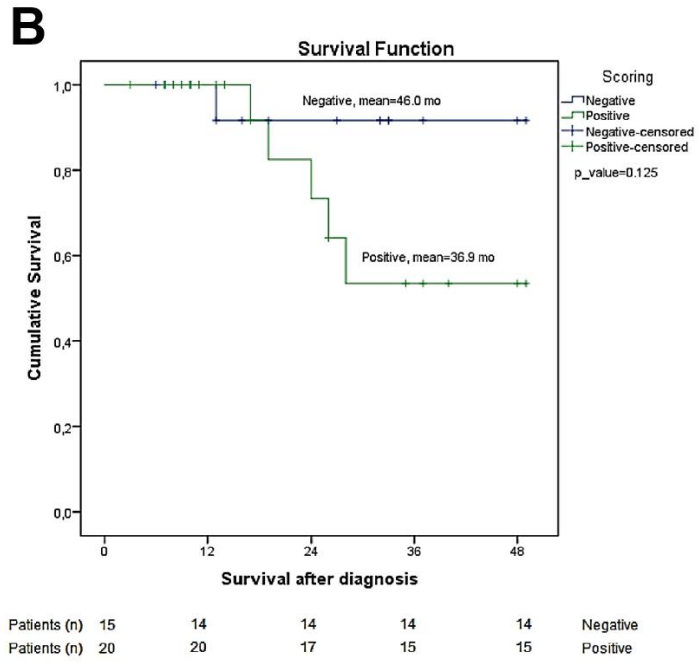
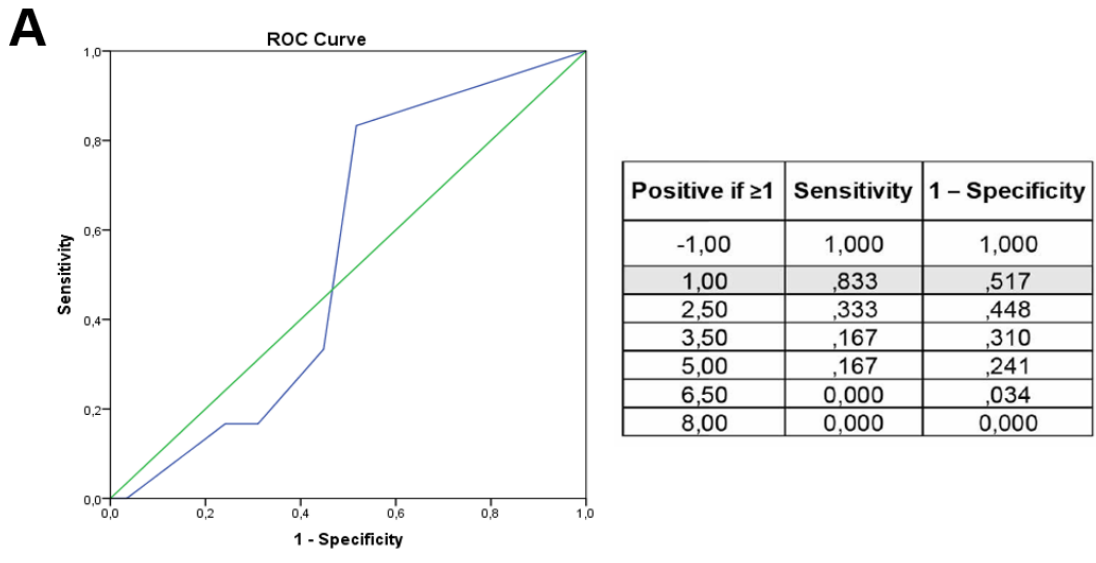


Figura 7. A) Curva de ROC para determinar el valor umbral de tinción de ATF4 que considere un caso como positivo. **B)** Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia tras el diagnóstico.

2. Relación entre ATF4 y la señalización de TGFβ.

2.1. TGFβ1 induce la expresión de ATF4.

En estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, observamos que la estimulación con TGFβ1 de la línea celular normal de epitelio mamario MCF10A generaba un incremento en los niveles de expresión proteica de ATF4 (58). Se sabe de la presencia de ligandos de TGFβ en el microambiente de tumores de TNBC, así como los efectos protumorales que esta ruta de señalización tiene a nivel fenotípico, favoreciendo la agresividad mediada por las CSCs, induciendo el proceso de EMT, invasión y movilidad celular, entre otras funciones (4,13,58–60). Por estas razones, en este estudio quisimos determinar en TNBC si la expresión de ATF4 se ve influenciada por la activación de TGFβ, y si se correlaciona con la agresividad promovida por esta vía de señalización.

Para conocer si la estimulación con TGFβ1 incrementaba la expresión de ATF4 de forma específica, determinamos los niveles de expresión génica y proteica de ATF4 en las líneas celulares de TNBC SUM159PT y BT549 tratadas con el inhibidor de TGFβR1, LY2157299 (galunisertib), en presencia/ausencia del ligando TGFβ1. Nuestros resultados demostraron que, en ambas líneas celulares, los niveles de proteína y ARNm de ATF4 aumentaron significativamente en presencia de TGFβ1, mientras que el tratamiento con LY2157299 presentó unos niveles de expresión notoriamente inferiores. Además, comprobamos que en ausencia de activación de TGFβ, el tratamiento con galunisertib redujo sensiblemente los niveles de ARNm en ambas líneas celulares, lo que se tradujo en una disminuida expresión proteica solo en BT549 **(Figura 8A y B).**

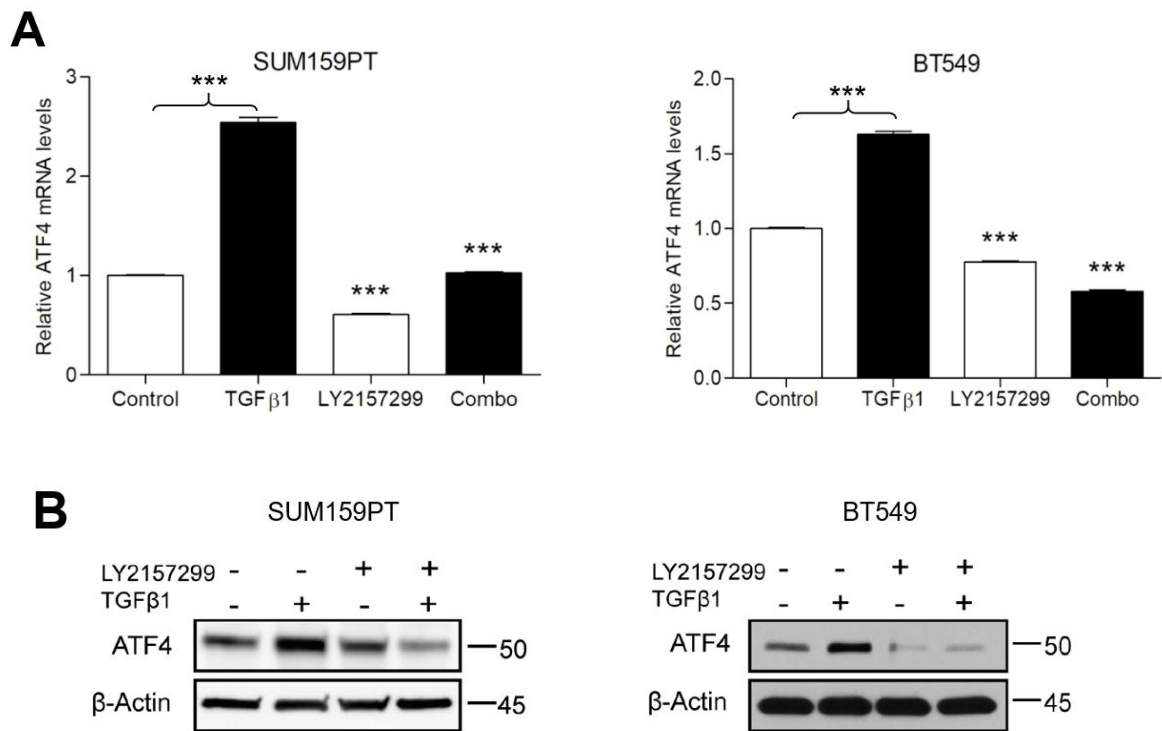


Figura 8. A) Cuantificación de ARN de ATF4 con estimulación de TGFβ1 y con tratamiento de inhibidor LY2157299 (***) P<0.001). **B)** Expresión proteica de ATF4 en presencia o ausencia de TGFβ1 y el inhibidor LY2157299.

Para comparar la magnitud de expresión de ATF4 al estimularse con TGFβ1 con respecto a aquella inducida por estrés, las tres líneas celulares de TNBC (SUM159PT, BT549, MDA-MB-231) se trataron con TGFβ1 y taspigargina (TG), un inductor de estrés del RE, durante 24, 48 y 72 horas. Observamos que la expresión de ATF4 fue similar con ambos tratamientos en las líneas SUM159PT y BT549, mientras que en la línea celular MDA-MB-231 fue menor la inducida por TGFβ1 con respecto a TG (**Figura 9**).

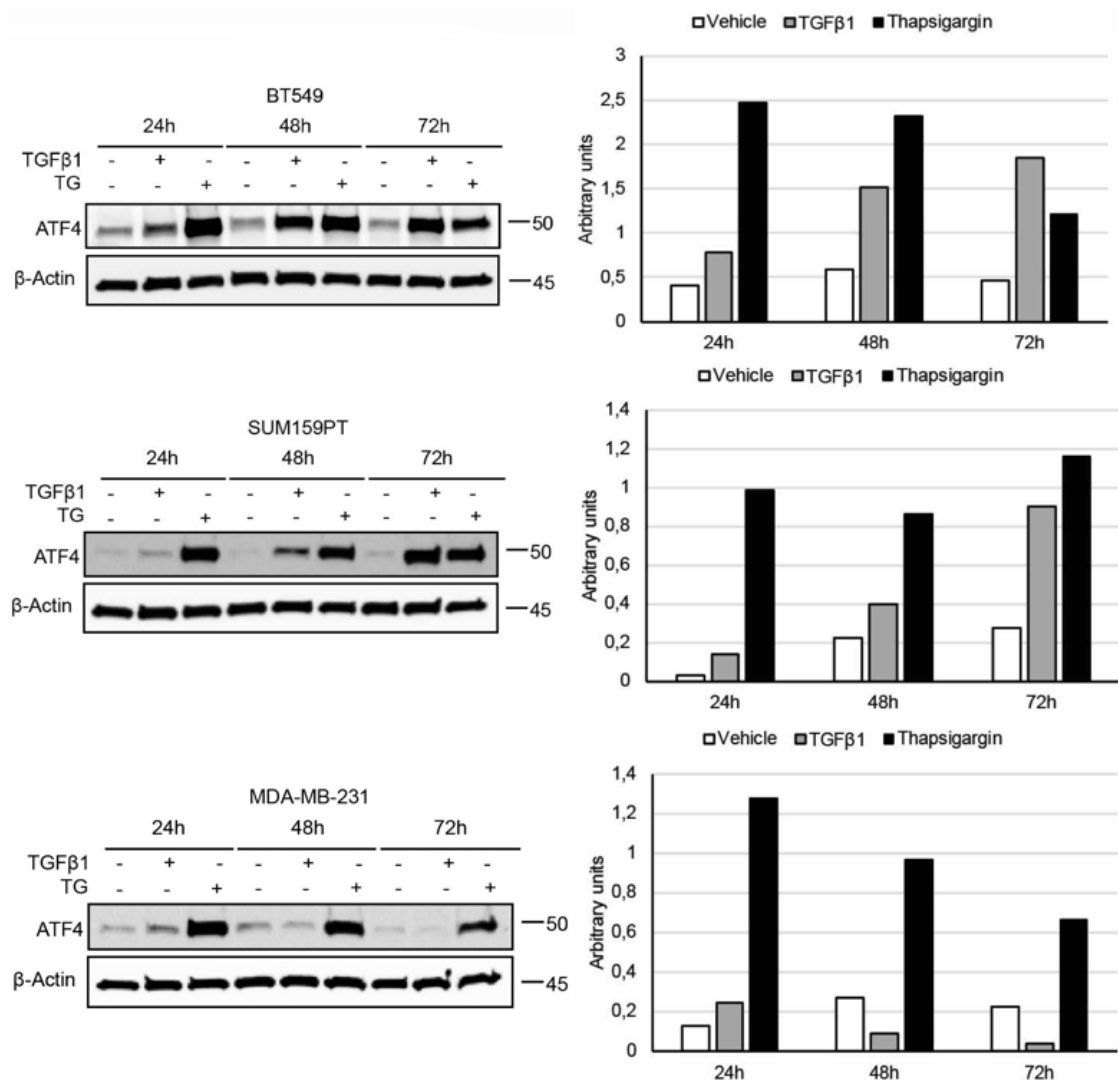


Figura 9. Expresión de ATF4 tras estimular las células con TGFβ1 y tratar con tapsigargina 24, 48 y 72 horas.

2.2. La expresión de ATF4, inducida por TGFβ, depende de SMADs.

Nuestros hallazgos sugieren que ATF4 es una diana aguas abajo de TGFβ. No obstante, la vía de señalización responsable de tal efecto es aún desconocida. Como se ha mostrado anteriormente, la expresión de ATF4 se ve drásticamente reducida bajo tratamiento con galunisertib, conocido inhibidor de la vía de TGFβ mediada por SMAD2/3 y SMAD4 (14). Así pues, para determinar si la expresión de ATF4 depende de la vía canónica de TGFβ, dependiente de SMADs, comprobamos los niveles proteicos de ATF4 tras el silenciado génico

de SMAD2/3 y SMAD4, durante 48 horas, y posterior estimulación con TGFβ1 durante 24 horas adicionales en las células SUM159PT y BT549. De acuerdo con nuestra hipótesis, mediante western blot observamos que la inhibición transitoria eficaz de SMAD2/3 y SMAD4 redujo significativamente la expresión de ATF4 en ambas líneas celulares (**Figura 10**).

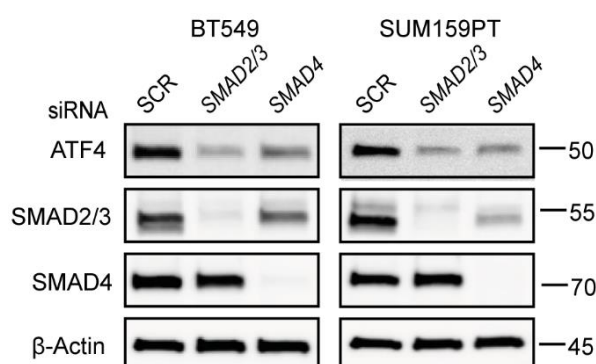


Figura 10. Western blot de ATF4 en células SUM159PT y BT549 transfectadas durante 48 horas con siRNA frente SMAD2/3 y SMAD4, y posterior estimulación con TGFβ1 durante 24 horas. La eficiencia de las transfecciones se determinó mediante la evaluación de la expresión de SMAD2/3 y SMAD4 con anticuerpos específicos.

2.3. SMAD2/3 regula la expresión transcripcional de ATF4 uniéndose a su promotor.

Como hemos observado, SMAD2/3 y SMAD4 median en la expresión de ATF4 bajo la activación de TGFβ. Para determinar si los factores SMAD2/3 promueven esta expresión de forma directa, estudiamos si se unen al promotor de ATF4. Para ello, en primer lugar, se estudió en detalle su secuencia promotora en busca de SMAD Binding Elements (SBEs) y encontramos la presencia de los motivos conservados CAGAC, CAGA, GTCT, GGCGC, GGCCG (61) (**Figura 11**).

```

(-1050 bp)
TTCTTAGGAGAACGCAATCTTCGGACACCAGAAGTTCTCTATGATGCTATTTCTGTGGCAGCCTTGCACTTGAGCCGGATGAAAAAT
TGTAATAAACCCAGGTTGGGGGACAGGACGGCGCGTCTTCCCGGCTCCTTTCCCAGAGTTTAGGAGGAGCCATGCAGACTCAGCCGGC
CTTTGGGGTAGGTGGACAGGCCGGCGCCCCTCTCGAGGCCCTTCAACTCCCGGGGGCAGCAGCCCGTGTCCGCTATGAAT
GGGGCTCTGAAAACTCAGGCTTGGAAACAGGTAACCCCCGGTTTCCGCAGGCCAAAAATCACACCCGCAACCGAAGGACGCGC
AGGCTGGGAGCGGGCGGGGCCACCACTGCGGACCTCCACTGAGGGCGGGGGATCCGACCCGAAGGGCTGGTCCCTGAGGCCAC
TAAGGGGTGCGCTGGGCTAGGCCGCCTGGGGGACAGGAGCCAGCGGATCGTGGCGGGCCAGCAGGGGGGCTGGCTGAGGACTAG
CAGCGACCCGAGACCCCAACCTTCCACGCGGACCCCGGGATCCCTCTCCAGCAGCCGCCATCTAGGGCCCTGAGCCAATAAG
AGCTCGAGATATATGATTACCGGGCTGGGCCAATCACCTTGACGCGCGCTCTTCGCCAGCACCTCGCGCGATAACCTGGCGT
CCTCGGCTTCAATAAAAACTCTTCGCCGGAACGACCTTCCCGCCCACTGCGCTGACACCGGAAGCGAGGCGTGTCTGGG
AGATCACTCCGCGCTCCGGCGGCGAAGGAAAGAACGGACTCTGATCATAGAAGCCTAGTAAAGTAGTACACCTCTCTCCTTTTCGTG
AGGCCATAAGAACAACTCCTTTTCTCGTACAGCTACGCCCTGGGCATAAACGGTTGGGGCGTCAAAGGGAGGGAGGGAAGGGAG
CGGGCGGGAGGAGACGGTACAGTGGTCCGCGGGAAGGATGGTCTGTGCTGCGTCCCATAGAGACGAAGTCTATAAAGGGCCGG
CGGGCGGCCACGGCAGCCATTTCTACTTTGCCCGCCCACAGATGTAGTTTCTCTGCGCGTGTGCGTTTTCCCTCCTCCCGCCCT
CAGGGTCCACGGCCACCATGGCGTATTAGGGGCAGCAGTGCCTGCGGCAGCATTTGGCTTTGCAGCGGGCAGCAGCACCAGGCT
CTGCAGCGGAACCCCGAGCGCTTAAGCCATGGCGTGAGTACCGGGCGGGTCTGTCAGCTGTGCTCCTGGGGCCGGCGCGGGTT
TTGGATTGGTGGGGTGGCGCTGGGGCCAGGGCGGTGCCGCCAAGGGGAAGCGATTAAACGAGCGCCGGGACGCGTGGTCTTTG
CTTGGTGTCCCGAGACGCTCGCGTGCCTGGGATCGGAAAGCGTAGTCGGGTGCCGGACTGCTTCCCGAGGAGCCCTACAGCC
CTCGGACCCGAGCCCGCAAGGGTCCAGGGGTCTTGGCTGTTCGCCACGAAACGTGGCAGGAACCAAGATGGCGGGCGCAGGG
CGGCGGCGCGGGCGTGAGTCAAGGGCGGGCGTGGGCGGGCGCGCCCTGGCCGTATTTGGACGTGGGACGGAGCGCTTTC
CTCTTGGCGGCCGGTGGAAGAATCCCTGGTCTCCGTGAGCGTCCATTTTGTGGAACCTGAGTTGCAAGCAGGGAGGGCAAATAC
AACTGCCCTGTTCGGATTCTTAGATGGCCGATCTAGAGAAGTCCCGCTCATAAGTGAAGGATGAAATTTCTCAGAACAGCTAA
CCTCTAATGGAGTTGGCTTCTGATTCTCATTACAGCTTCTCACGGCATTACAGCAGCAGCGTTGCTGTAACCGACAAGACACCTT
CGAATTAAGCACATTCCTCGATTCCAGCAAAGCACCGAACATGACCGAAATGAGCTTCCTGAGCAGCGAGGTGTGGTGGGGGAC
TTGATGTCCCTTCGACCACTCGGTTTGGGGCTGAAGAAAGCCTAGGTCTCCTTAGATGATTACCTGGAGG (+1000 bp)

```

Figura 11. Secuencia promotora del gen ATF4 humano (desde -1050 a +1000 pares de bases) en la que se muestran los motivos de unión SBE conservados compatibles con SMAD2/3 (CAGAC, CAGA, GTCT, GGCGC, GGCCG).

Posteriormente, analizamos los datos de ChIP-Seq de células BT549 tratadas con TGFβ3 durante 1.5 horas (61). Nuestro análisis mostró una unión específica de SMAD2/3 en la región promotora de ATF4, así como en las de los genes ID1, JUN, CDKN1A, SERPINE1 y MMP2, regulados por la señalización de TGFβ. SERPINE1 y MMP2 fueron considerados como controles positivos de unión, mientras que los genes HBB y HPRT1 se emplearon como controles negativos (**Figura 12A y B**). Esto sugiere que ATF4 podría estar regulado de forma directa por la unión de SMAD2/3 a su promotor.

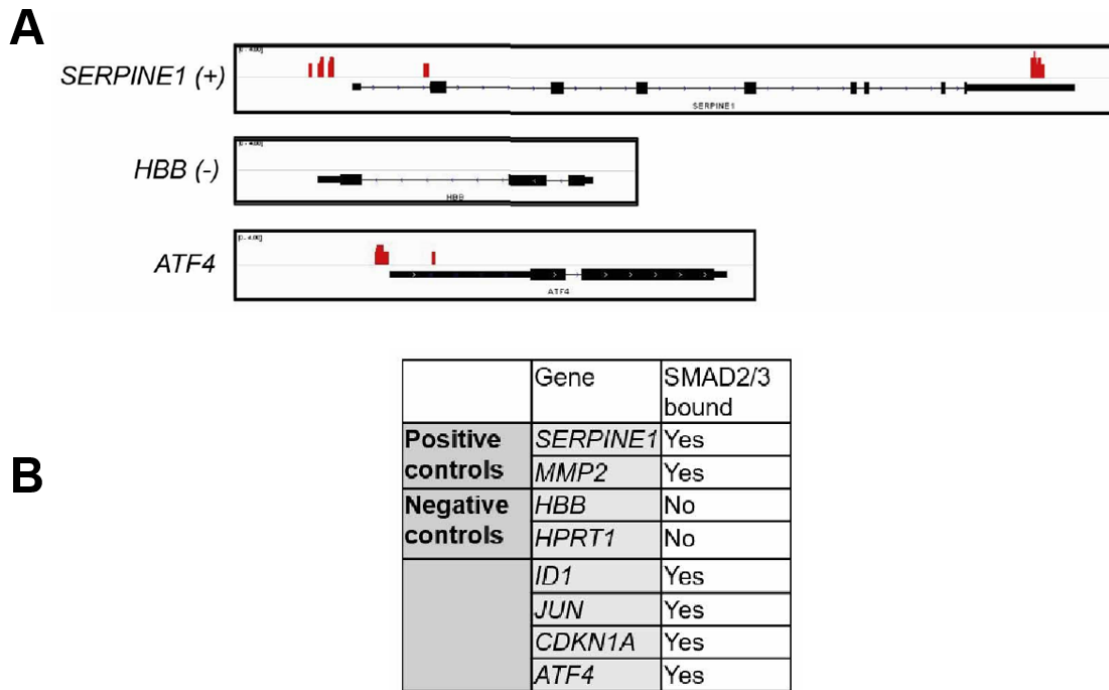


Figura 12. Análisis de los datos de ChIP-Seq en células BT549 estimuladas con TGF β 3 durante 1.5 de la unión de SMAD2/3 a la región promotora de ATF4. **A)** Las regiones promotoras de SERPINE1 y MMP2 fueron empleadas como controles positivos de unión, mientras que aquellas de HBB y HPRT1 se consideraron como controles negativos. **B)** Los genes respondedores a TGF β ID1, JUN y CDKN1A se analizaron como controles positivos adicionales.

Estos resultados fueron verificados mediante ChIP-qPCR en células BT549 estimuladas con TGF β 1 durante 1.5 horas. Usamos SERPINE1 y MMP2 como controles positivos para la unión de SMAD2/3, mientras que LAMB3 y HPRT fueron empleados como controles negativos, y la inmunoglobulina G (IgG) como control de unión inespecífica. Al igual que lo observado en el análisis de los datos procedentes de ChIP-Seq, nuestros resultados confirmaron la unión específica de SMAD2/3 sobre el promotor de ATF4, en niveles comparables a los que se producen en los promotores de SERPINE1 y MMP2 (**Figura 13**).

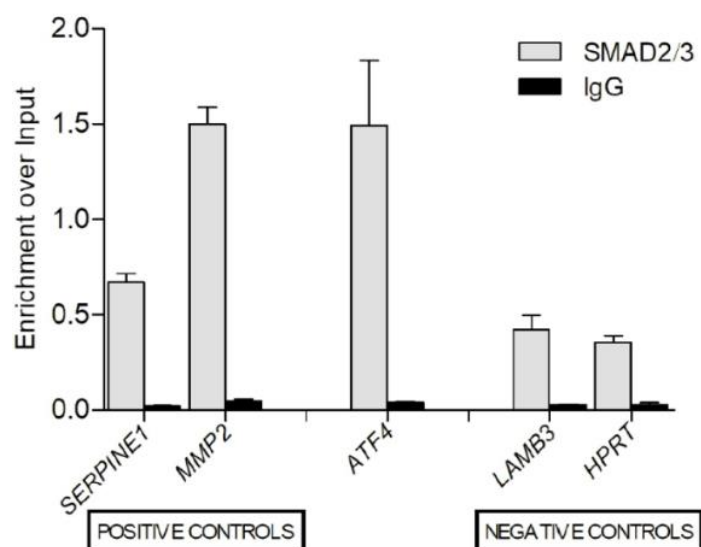


Figura 13. Unión de SMAD2/3 a la región promotora de ATF4 en células BT549 bajo tratamiento con TGFβ1 durante 1.5 horas determinada mediante ChIP-qPCR. Los valores se expresan en relación a la cantidad de ADN inmunoprecipitado con SMAD2/3 cargado para los promotores de los genes SERPINE1, MMP2 (controles positivos), LAMB3, HPRT (controles negativos) y ATF4. La IgG se empleó como control de unión inespecífica.

Por consiguiente, todos estos datos sugieren que la expresión de ATF4 dependiente de TGFβ está regulada transcripcionalmente por la unión de los factores de transcripción SMAD2/3 a su promotor.

2.4. “Feedback” de ATF4 sobre la ruta de TGFβ.

A continuación, y una vez demostrado que existe una relación directa de la ruta TGFβ sobre la expresión de ATF4, investigamos si la expresión de ATF4 se autorregula mediante un mecanismo de retroalimentación positiva. Para lo cual, inhibimos ATF4 e investigamos su impacto sobre la señalización dependiente de SMADs mediante un ensayo reportero de SBE.

Para el silenciado de ATF4 se emplearon dos secuencias de siRNAs distintas: ATF4-siRNA#1 y ATF4-siRNA#2. Para determinar la secuencia más eficaz, las líneas celulares SUM159PT y BT549 se transfectaron de forma transitoria con ambos siRNAs, con y sin activación con TGFβ1, y se determinaron los niveles

de ARNm de ATF4 mediante qPCR. Nuestros resultados demostraron que ambas secuencias reducen de forma muy significativa la expresión de ATF4, tanto en presencia como en ausencia de TGFβ1. Hay que destacar que los niveles de ARNm de ATF4 fueron proporcionalmente menores cuando las células se estimularon con TGFβ1 con respecto al control negativo SCR. Finalmente, quedó demostrado que la secuencia siRNA#2 fue la más eficaz, por lo que determinados ensayos se realizaron sólo con ella (**Figura 14**).

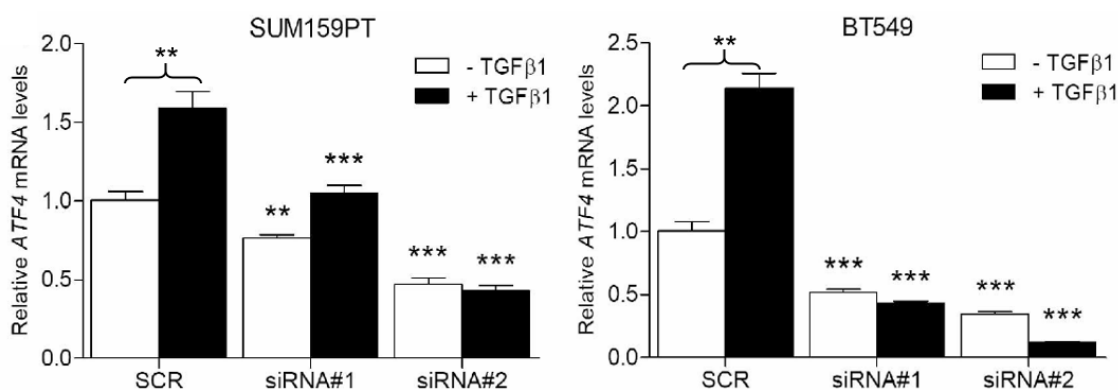


Figura 14. Eficiencia de las dos secuencias siRNA respecto a los niveles de ARN de ATF4 en las líneas celulares SUM159PT y BT549, al ser estimuladas o no, con TGFβ1 durante 24h. ** P>0.01; *** P>0.001.

Para el ensayo reportero de SBE, empleamos la línea celular SBE-HEK293 estimulada, o no, con TGFβ1 durante 24 horas. Nuestros hallazgos demostraron que el silenciado de ATF4 se correlacionaba con una menor luminiscencia relativa, tanto en presencia como ausencia de estimulación con TGFβ1, indicando una reducción en la unión de proteínas SMAD sobre SBE (**Figura 15**).

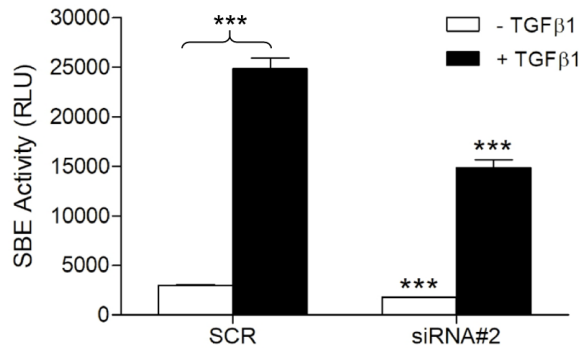


Figura 15. Ensayo reportero SBE en la línea celular SBE-HEK293 tras el silenciado de ATF4 con/sin estimulación de TGFβ1 durante 24 horas. RLU: Relative Light Units, *** P<0.001.

Así mismo, demostramos que el silenciado de ATF4 en las líneas celulares BT549 y SUM159PT, con/sin estimulación con TGFβ1, tuvo como consecuencia una disminución en los niveles de expresión proteica de p-SMAD2/3, SMAD2/3 y SMAD4 (**Figura 16A y B**).

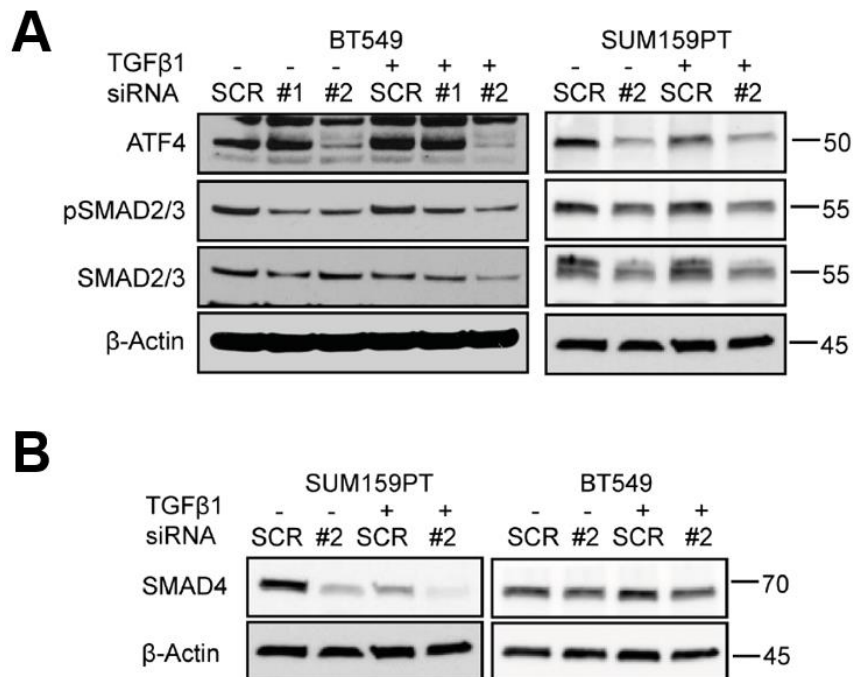


Figura 16. Efecto del silenciado de ATF4 y estimulación con TGFβ1 durante 24 y 72 horas, en **A)** SMAD2/3 y **B)** SMAD4, respectivamente. Se usó ATF4-siRNA#1 y ATF4-siRNA#2 en BT549, y ATF4-siRNA#2 únicamente en SUM159PT.

Esto confirma la existencia de una retroalimentación positiva entre ATF4 y la ruta de señalización de TGF β , de manera que la ausencia del gen puede afectar a los efectos fenotípicos que esta ruta promueva en las células.

2.5. Relevancia pronóstica de la coexpresión de ATF4 y elementos de la ruta de señalización de TGF β en pacientes de cáncer de mama.

Conociendo el papel de TGF β en procesos tumorales (13), y puesto que hemos demostrado que existe una relación cruzada directa entre ATF4 y TGF β , quisimos comprobar cómo influye la coexpresión de ambos elementos en el pronóstico y la supervivencia de pacientes de cáncer de mama empleando la herramienta computacional KM plotter.

Los análisis de Kaplan-Meier para estudiar la supervivencia global mostraron un marcado efecto negativo en aquellas pacientes en cuyo tejido tumoral se sobreexpresaba simultáneamente ATF4 + SMAD2, ATF4 + SMAD3, y ATF4 + SMAD4 (**Figura 17**).

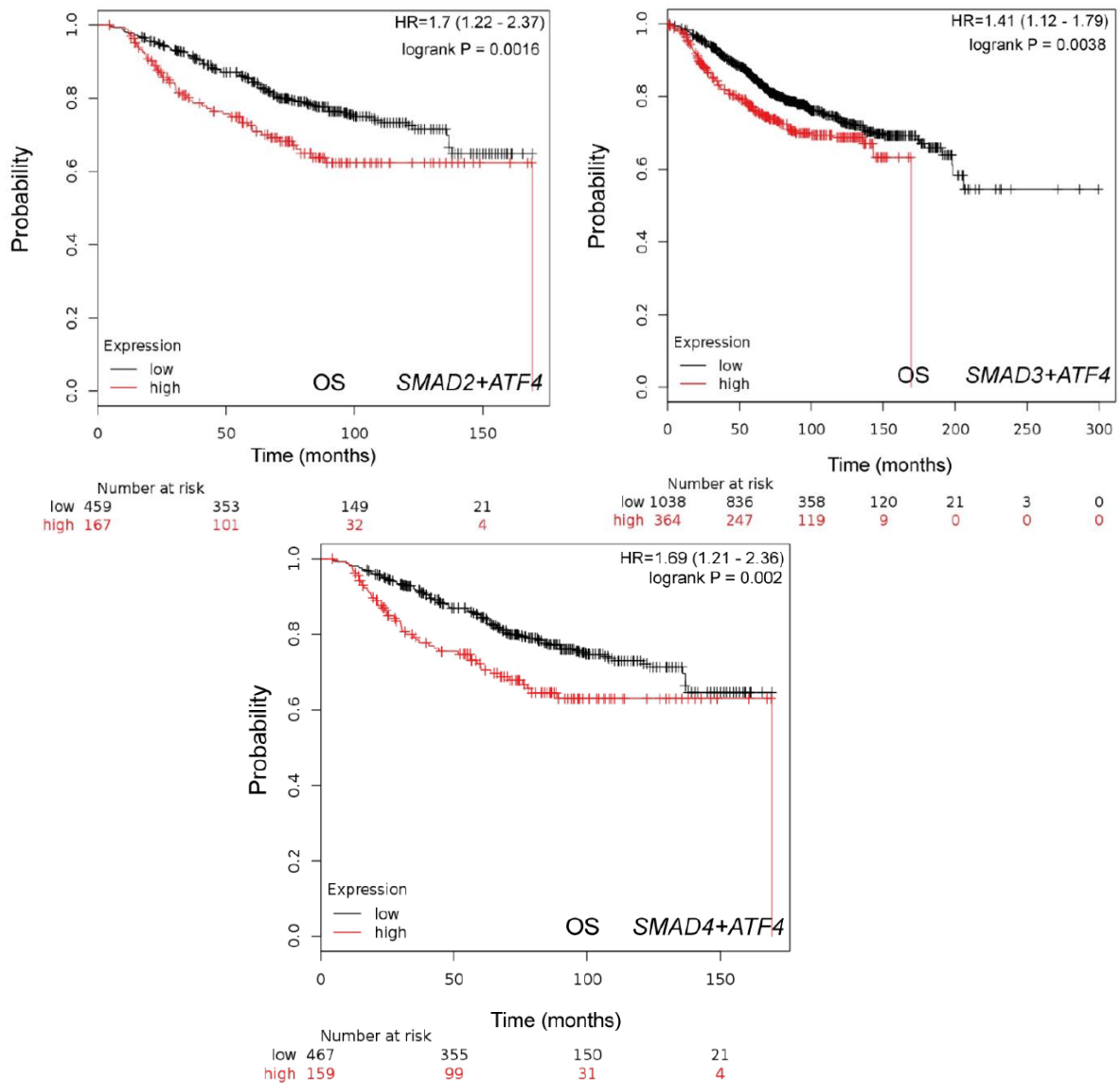


Figura 17. Análisis de Kaplan-Meier para evaluar la supervivencia global (OS) de pacientes con cáncer de mama cuando ATF4 se coexpresa con SMAD2, SMAD3 o SMAD4. HR: Hazard Ratio. *** P<0.001.

Además, analizamos como la magnitud de la supervivencia global o “*survival fold change*” se modifica cuando se expresan diferencialmente distintos elementos de la vía canónica TGFβ/SMAD, en presencia/ausencia de ATF4. Tras determinar la significación estadística, mediante un análisis multivariante, de las tasas de supervivencia global atribuibles a la expresión de cada uno de estos elementos (**Tabla 5**), demostramos que la coexpresión de ATF4+SMAD2, ATF4+SMAD3, ATF4+SMAD4, y ATF4+TGFβR1, se correlacionaba con una

disminución de la supervivencia mayor en comparación con la expresión de cada gen por separado, y la combinación de únicamente aquellos genes relacionados con TGF β (**Figura 18**).

Supervivencia global (OS)	Casos	<i>n</i>	Cohorte baja expresión (meses)	Cohorte alta expresión (meses)	<i>P</i> valor (¥ Rango-Logarítmico)
ATF4	All_BC	1402	110	67	0.0122 ¥
SMAD4	All_BC	626	68	90	0.2709
SMAD2	All_BC	626	85	78	0.2707
SMAD3	All_BC	1402	71	121	0.0103 ¥
TGFBR1	All_BC	626	95	64	0.0367 ¥
SMAD4/2	All_BC	626	121	77	0.2388
SMAD4/3	All_BC	626	70	107	0.0954
SMAD2/3	All_BC	626	70	108	0.0974
SMAD4/2/3	All_BC	626	70	107	0.191
SMAD4 + TGFBR1	All_BC	626	90	70	0.2427
SMAD2 + TGFBR1	All_BC	626	90	64	0.0753
SMAD3 + TGFBR1	All_BC	626	90	64	0.0645
SMAD4/2 + TGFBR1	All_BC	626	90	74	0.3233
SMAD4/3 + TGFBR1	All_BC	626	89	74	0.5581
SMAD2/3 + TGFBR1	All_BC	626	90	66	0.1312
SMAD4/2/3 + TGFBR1	All_BC	626	90	79	0.3343
ATF4 + SMAD4	All_BC	626	100	52	0.002 ¥*†
ATF4 + SMAD2	All_BC	626	107	52	0.0016 ¥*†
ATF4 + SMAD3	All_BC	1402	110	66	0.0038 ¥*†
ATF4 + TGFBR1	All_BC	626	137	64	0.0003 ¥*†

OS: Supervivencia global. **All_BC:** todos los tipos de cáncer de mama. * = Significativo con análisis multivariable. † No cumple con la validación cruzada LOOCV. LOOCV: leave-one-out-cross validation.

Tabla 5. Supervivencia global respecto a las cohortes de baja y alta de expresión de ATF4.

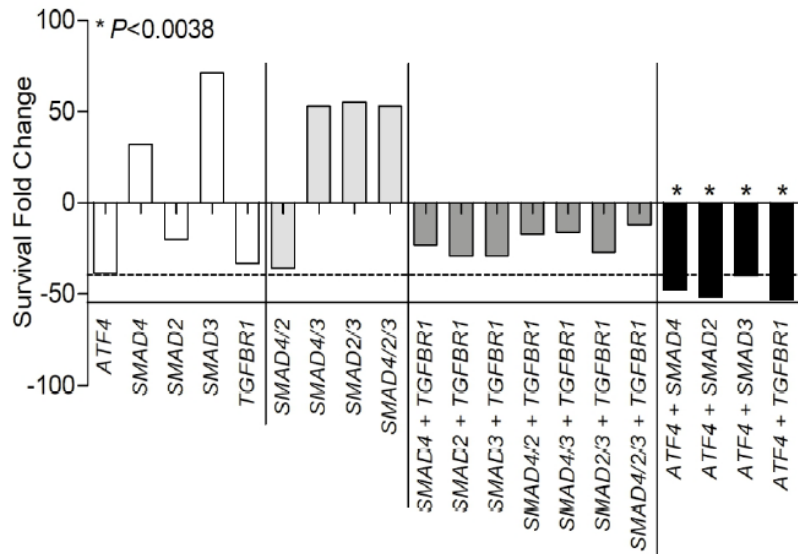


Figura 18. Variaciones en la supervivencia global de pacientes con cáncer de mama cuando ATF4 (n=1402), SMAD2 (n=626), SMAD3 (n=1402), SMAD4 (n=626) and TGFBR1 (n=626) se expresan solos o conjuntamente. “Survival fold change” se evaluó mediante un test de corrección múltiple (* P<0.0038).

De este modo queda demostrado que aquellas pacientes cuyo tejido tumoral expresa tanto ATF4 como miembros de la ruta de TGFβ, presentan un peor pronóstico y una menor tasa de supervivencia global.

3. La inhibición de ATF4 reduce la agresividad de las células de TNBC.

Debido a que TGFβ promueve la agresividad en TNBC de diferentes maneras (4,13,59,60), estudiamos si la inhibición de ATF4, en presencia o ausencia de TGFβ1, afecta a diferentes procesos de progresión tumoral, como son la capacidad migratoria o invasiva de las células, su proliferación y supervivencia, así como la génesis y mantenimiento de las CSCs.

3.1. El silenciado de ATF4 inhibe la migración y capacidad invasiva de las células de TNBC.

El efecto que tiene la inhibición transitoria de ATF4 mediante dos siRNAs sobre la capacidad migratoria de las tres líneas celulares de TNBC, con y sin estimulación de TGF β 1, se estudió mediante el ensayo de curación de herida o “*wound-healing*”. Nuestros resultados demostraron que el índice de migración celular se redujo un 41% en BT549, 50% en SUM159PT y 45% en MDA-MB-231, en presencia de TGF β 1, y en su ausencia, un 42%, 61% y 65% en BT549, SUM159PT y MDA-MB-231, respectivamente (**Figura 19A, B y C**). Como ocurrió anteriormente en otros ensayos, ATF4-siRNA#2 fue el más eficaz a la hora reducir la migración celular.

Con respecto a la invasividad de las células tumorales, el silenciado de ATF4 mediante ATF4-siRNA#2 disminuyó el número de células con capacidad invasiva en un 67%, 50% y 46% en BT549, SUM159PT y MDA-MB-231 respectivamente, en presencia de TGF β 1. Por otra parte, en ausencia de éste, la reducción en el número de células invasivas fue de un 38% en BT549, 23% en SUM159PT, y 54% en MDA-MB-231 (**Figura 20**). Se observó que la presencia o ausencia de suero bovino fetal (FBS) como sustancia quimioatrayente influía de forma notable en el número de células con capacidad invasora en SUM159PT y BT549 cuando fueron tratadas con TGF β 1. En el caso de la línea celular MDA-MB-231, la falta de FBS supuso una reducción en el número de células invasoras, sin importar la presencia o no de TGF β 1.

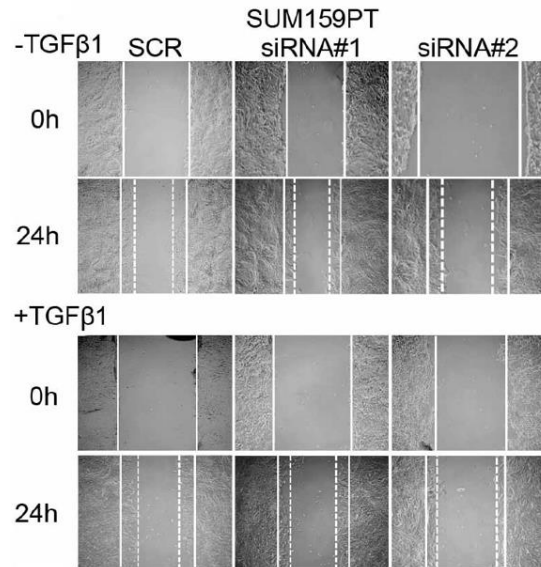
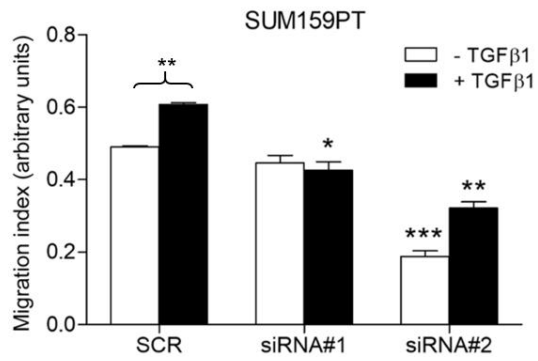
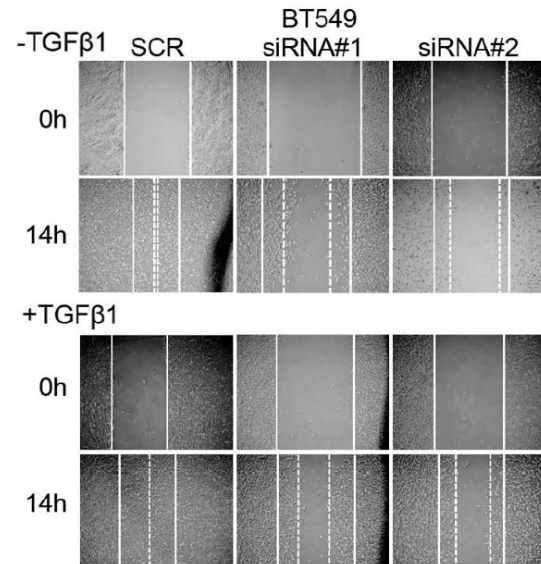
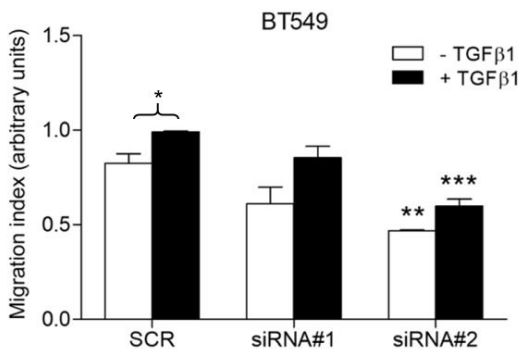
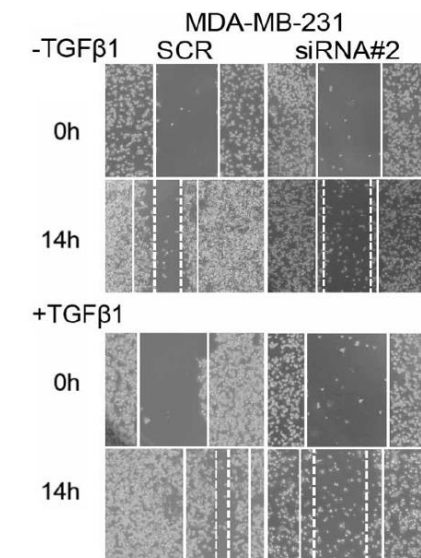
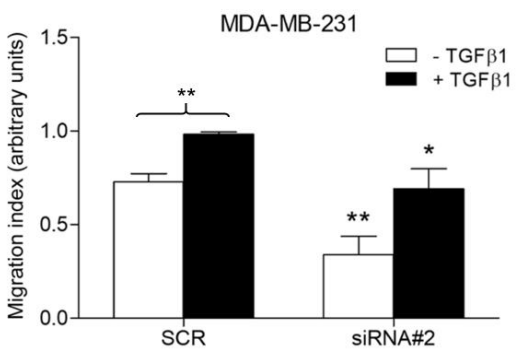
A**B****C**

Figura 19. Índice de migración e imágenes representativas del ensayo de “wound-healing” en las líneas celulares SUM159PT, BT549 y MDA-MB-231. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

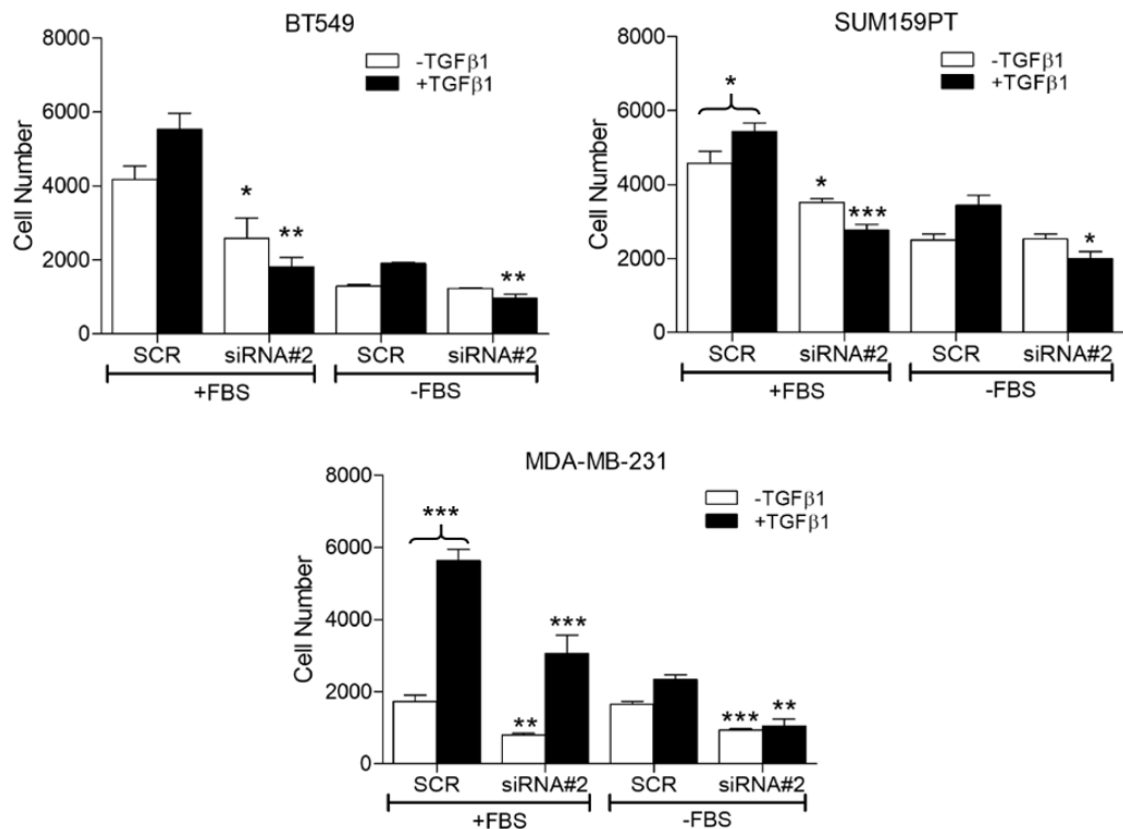


Figura 20. Recuento de número de células con capacidad invasiva en BT549, SUM159PT y MDA-MB-231 tras la inhibición de ATF4, en presencia/ausencia de TGFβ1 (24 horas de estimulación en las dos primeras líneas celulares, 72 horas para la MDA-MB-231).
* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

A la vista de estos resultados, se demuestra que la presencia de ATF4 (inducido por TGFβ1) favorece los procesos de migración e invasión celular en TNBC.

3.2. El bloqueo de ATF4 afecta a la proliferación celular.

Para comprobar si la inhibición de ATF4 tiene un efecto sobre la capacidad proliferativa de las células, se llevó a cabo un ensayo de proliferación celular basado en el uso del reactivo WST-1, y a su vez, se comprobó si la inhibición de ATF4 bloqueaba la expresión de dos marcadores de supervivencia celular: BCL2 y MCL1. Se confirmó que el silenciado de ATF4 tuvo un notable impacto en la proliferación de la línea celular BT549, mientras que en la SUM159PT y MDA-MB-231 no fue tan notorio, aunque si significativo (**Figura 21A**).

Con respecto a la expresión de las proteínas de supervivencia BCL2 y MCL1, tras el silenciado de ATF4, la expresión de ambas se vio reducida en las tres líneas celulares tanto en presencia como ausencia de TGFβ1 (**Figura 21B**).

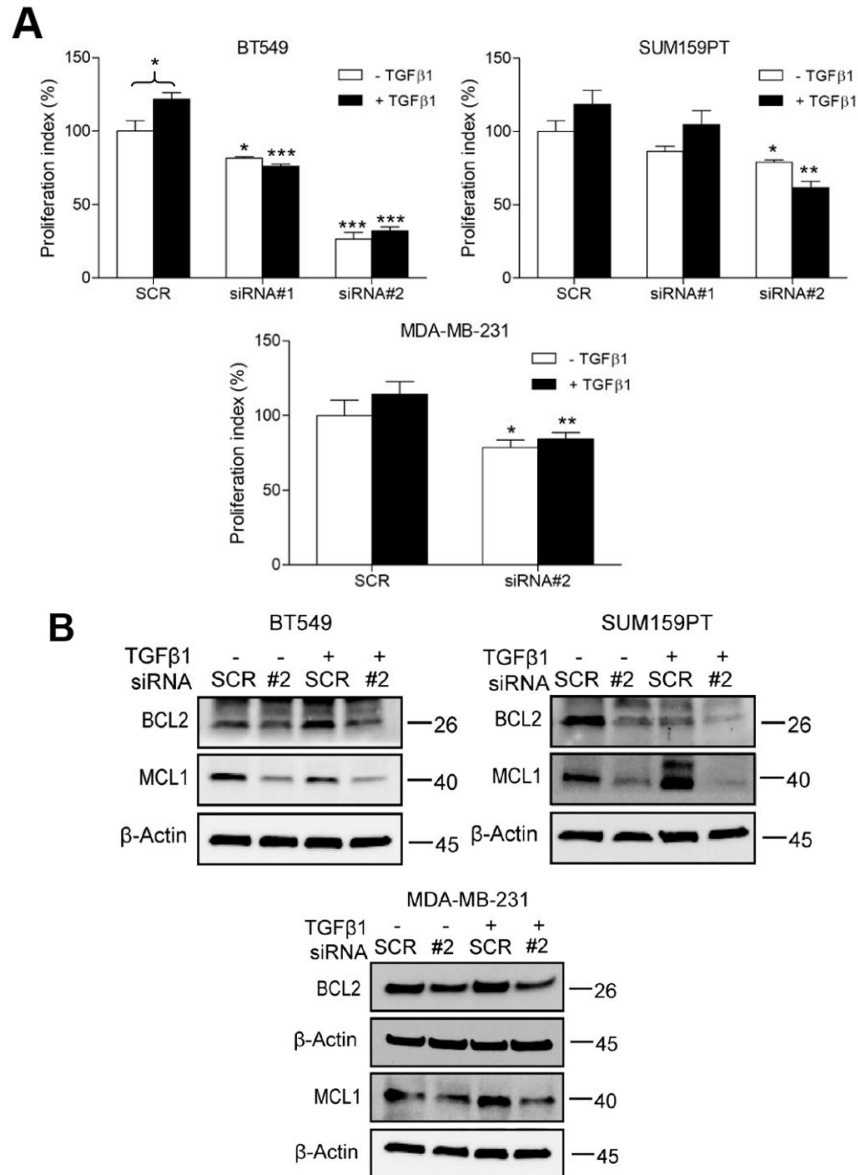


Figura 21. A) Índice de proliferación tras el silenciado de ATF4 y estimulación con TGFβ1 (24 horas en las líneas celulares SUM159PT y BT549, y 72 horas en MDA-MB-231). * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001. **B)** Western blot de los marcadores de proliferación y supervivencia celular, BCL2 y MCL1 tras estimulación de 72 horas con TGFβ1 e inhibición con ATF4-siRNA#2 durante 24 horas.

Aunque el efecto del silenciado de ATF4 no afecta con la misma intensidad a todas ellas, nuestros resultados demuestran que la presencia de ATF4 puede influir en la supervivencia y capacidad proliferativa de las células en TNBC.

3.3. La ausencia de ATF4 produce la inhibición de marcadores e inductores del proceso de EMT.

Uno de los efectos protumorales que ejerce la ruta de TGF β es la de promover el proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT), que se induce por factores de transcripción tales como ZEB1, SNAIL, SLUG, TWIST1, y que puede inducir invasión, metástasis y favorecer la aparición de CSCs, (18).

Al llevar a cabo el silenciado de ATF4, éste tuvo un efecto inhibitorio en la expresión proteica de los factores de transcripción inductores de EMT ZEB1, SNAIL, SLUG y TWIST1, así como del marcador mesenquimal N-cadherina. Esto se observó en todas las líneas celulares cuando se estimulaban con TGF β 1, pero también se producía la inhibición en SNAIL y TWIST en ausencia de éste. Con respecto a la expresión de N-cadherina, sólo se pudo detectar y estudiar la modificación de la expresión de este marcador al silenciar ATF4 en las líneas SUM159PT y BT549, puesto que en MDA-MB-231 no pudo detectarse (**Figura 22**).

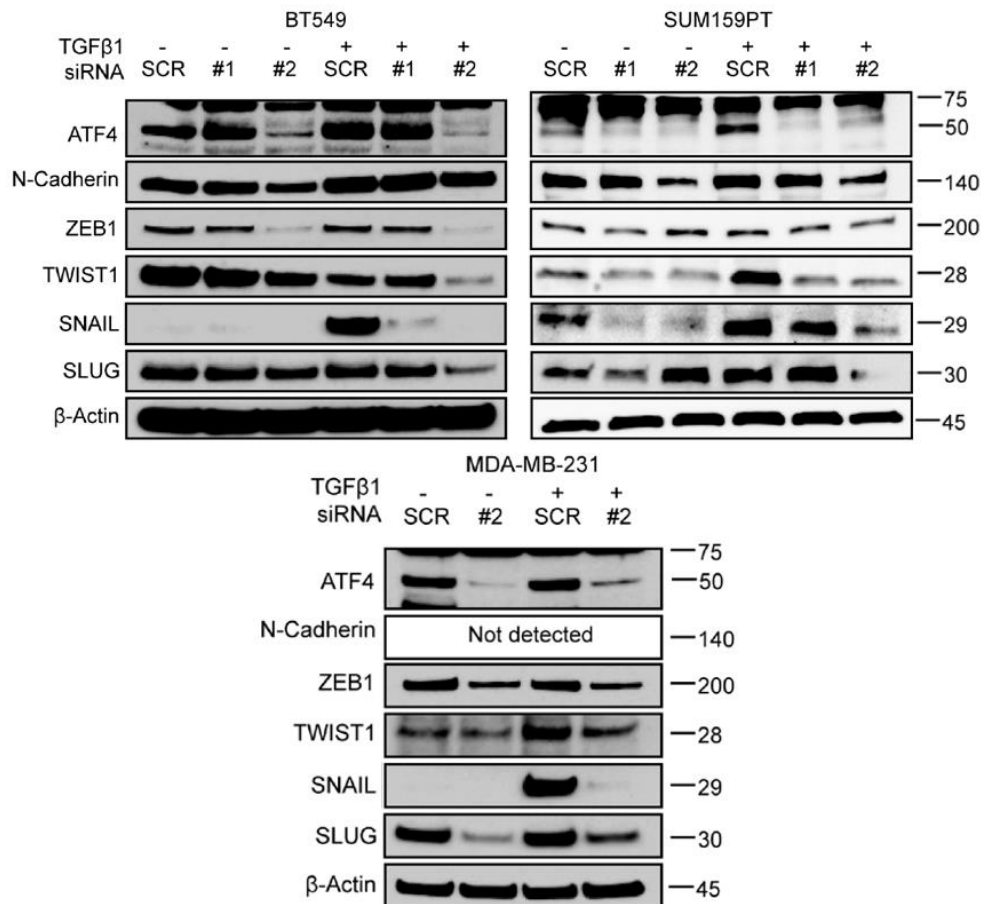


Figura 22. Western blot de los marcadores de EMT SNAIL, SLUG, ZEB1, N-cadherina y TWIST1, tras el silenciamiento de ATF4, con o sin estimulación de TGFβ1 durante 24 horas.

Por consiguiente, los datos procedentes del western blot sugieren que la expresión de ATF4 promueve el proceso de EMT.

3.4. Efecto de la inhibición de ATF4 sobre las CSCs.

La presencia de células madre tumorales (CSCs) es uno de los principales factores que contribuye al desarrollo tumoral, promoviendo procesos metastásicos, que unido a su naturaleza resistente a fármacos, favorece la agresividad y mal pronóstico de los tumores (4).

Debido a la relación descrita anteriormente entre ATF4 y la capacidad migratoria e invasiva de las células, junto con su papel sobre los inductores de

EMT, nos planteamos si este gen podía estar también relacionado con la agresividad derivada de la presencia de CSCs, empleando para ello estudios con mamíferas (o tumoríferas) y expresión (ARNm y proteína) de marcadores de “stemness” o naturaleza de célula madre: NANOG, SOX2, OCT4, NOTCH1, CXCL10 y CD44.

3.4.1. La inhibición de ATF4 reduce la formación de mamíferas.

En primer lugar, se comparó la expresión de ATF4 entre células cultivadas en condiciones de adherencia frente a mamíferas primarias y secundarias. En las tres líneas celulares, los niveles de expresión de ATF4 aumentaron en las primarias con respecto a las células adheridas, y en el caso de las secundarias, la expresión proteica fue incluso mayor que en las primarias (**Figura 23A**). Además, demostramos que el aumento de la expresión de ATF4 en mamíferas primarias de SUM159PT y MDA-MB-231 se mantenía en el tiempo con respecto a sus correspondientes cultivos en adherencia (**Figura 23B**).

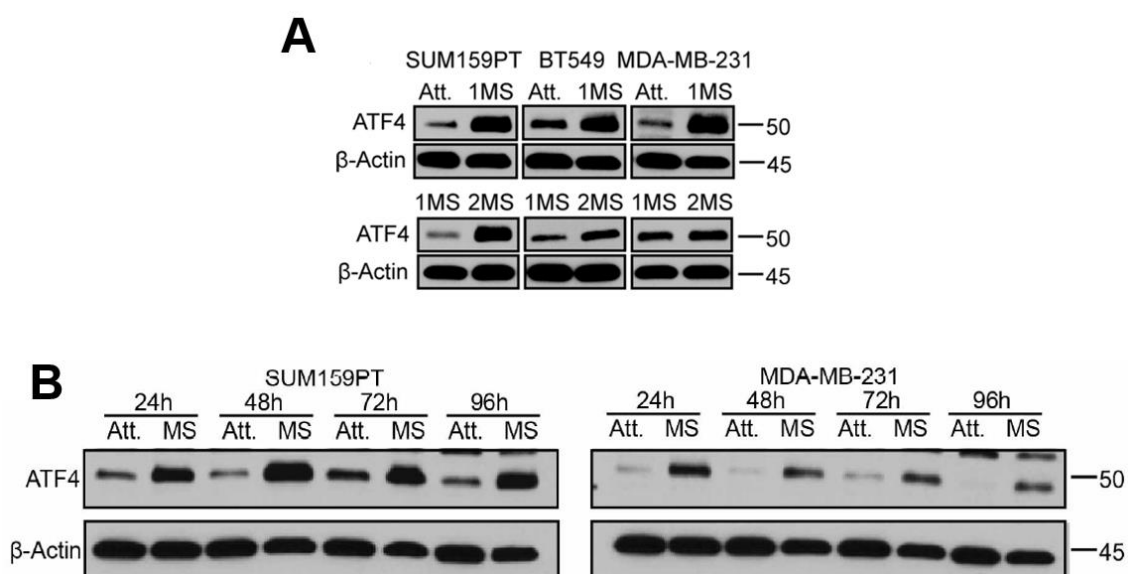


Figura 23. Western blot de ATF4 en mamíferas primarias (1MS) y secundarias (2MS). **A)** Incremento de la expresión de ATF4 en SUM159PT, BT549 y MDA-MB-231, con cada generación de mamíferas respecto a las cultivadas en adherencia (Att.). **B)** Sobreexpresión de

ATF4 en mamosferas primarias de SUM159PT y MDA-MB-231 con respecto al tiempo en comparación con sus cultivos en adherencia.

Posteriormente, evaluamos el porcentaje de eficacia de formación de mamosferas (%MSFE) al bloquear la expresión de ATF4. Observamos que el silenciado de ATF4, tanto en presencia como ausencia de TGF β 1, redujo de forma significativa el %MSFE en las tres líneas celulares de TNBC (**Figura 24**).

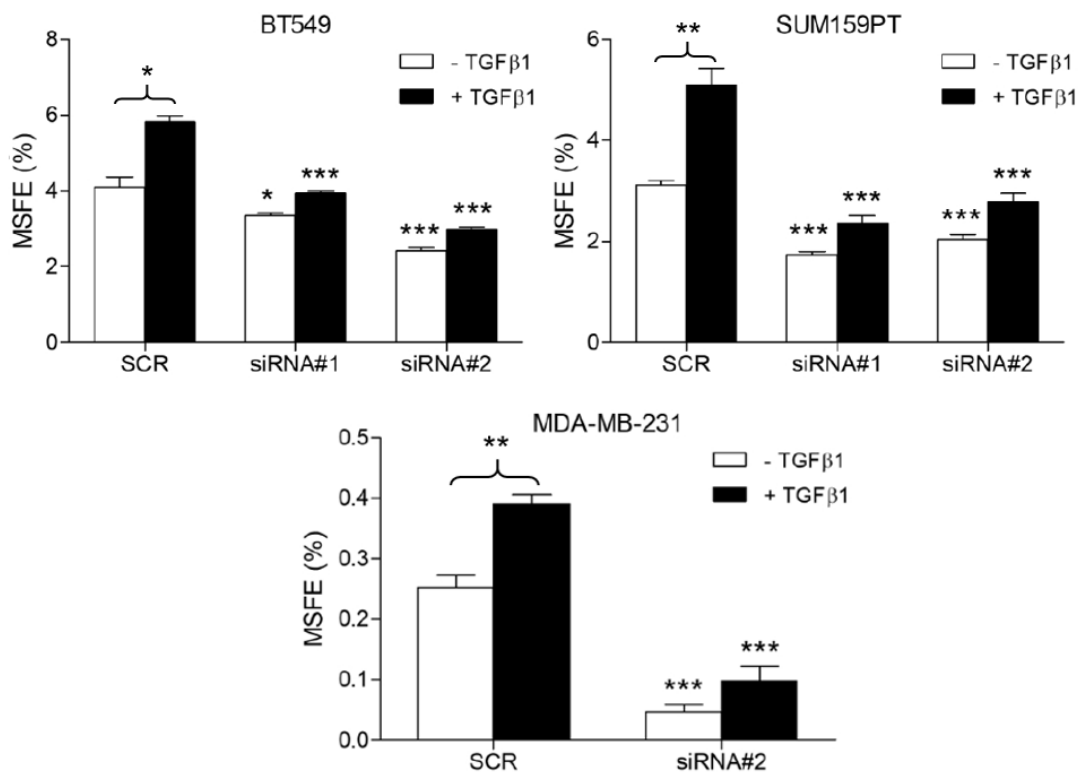


Figura 24. Porcentaje de eficiencia de formación de mamosferas (% MSFE) tras la inhibición de ATF4 y estimulación durante 24 horas con TGF β 1. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

3.4.2. La expresión de ATF4 está vinculada a la de marcadores de “stemness”.

Estudios previos en cultivos en suspensión muestran un incremento en la expresión de ATF4 como consecuencia de la inducción de estrés oxidativo (62). Para determinar si nuestros resultados (**Figura 25**) se debían a este efecto en suspensión o a la modulación de las propiedades “stem” de las células tumorales, medimos la expresión de marcadores de “stemness” tras la inhibición de ATF4 en células adheridas bajo estimulación o no con TGFβ1.

A nivel de expresión de ARNm, la inhibición de ATF4 en las líneas BT549 y SUM159PT mostró una inhibición significativa de NANOG, SOX2, OCT4 y CXCL10 (**Figura 26A**). Del mismo modo, los niveles de proteína también se vieron reducidos, aunque CXCL10 no pudo detectarse. Es interesante señalar que en presencia de TGFβ1, “cleaved” NOTCH1, OCT4, y CD44 se inhibieron de forma consistente en las tres líneas celulares, mientras que en ausencia de TGFβ1, la inhibición de ATF4 mediante los siRNAs específicos, redujeron la expresión de todos los marcadores (**Figura 26B**).

Esto demuestra que, al igual que ocurría con los procesos de migración, invasión y proliferación celular, la presencia de ATF4 favorece la agresividad tumoral en TNBC, favoreciendo la génesis de CSCs y promoviendo la formación de mamosferas a través de la modulación de factores de “stemness”.

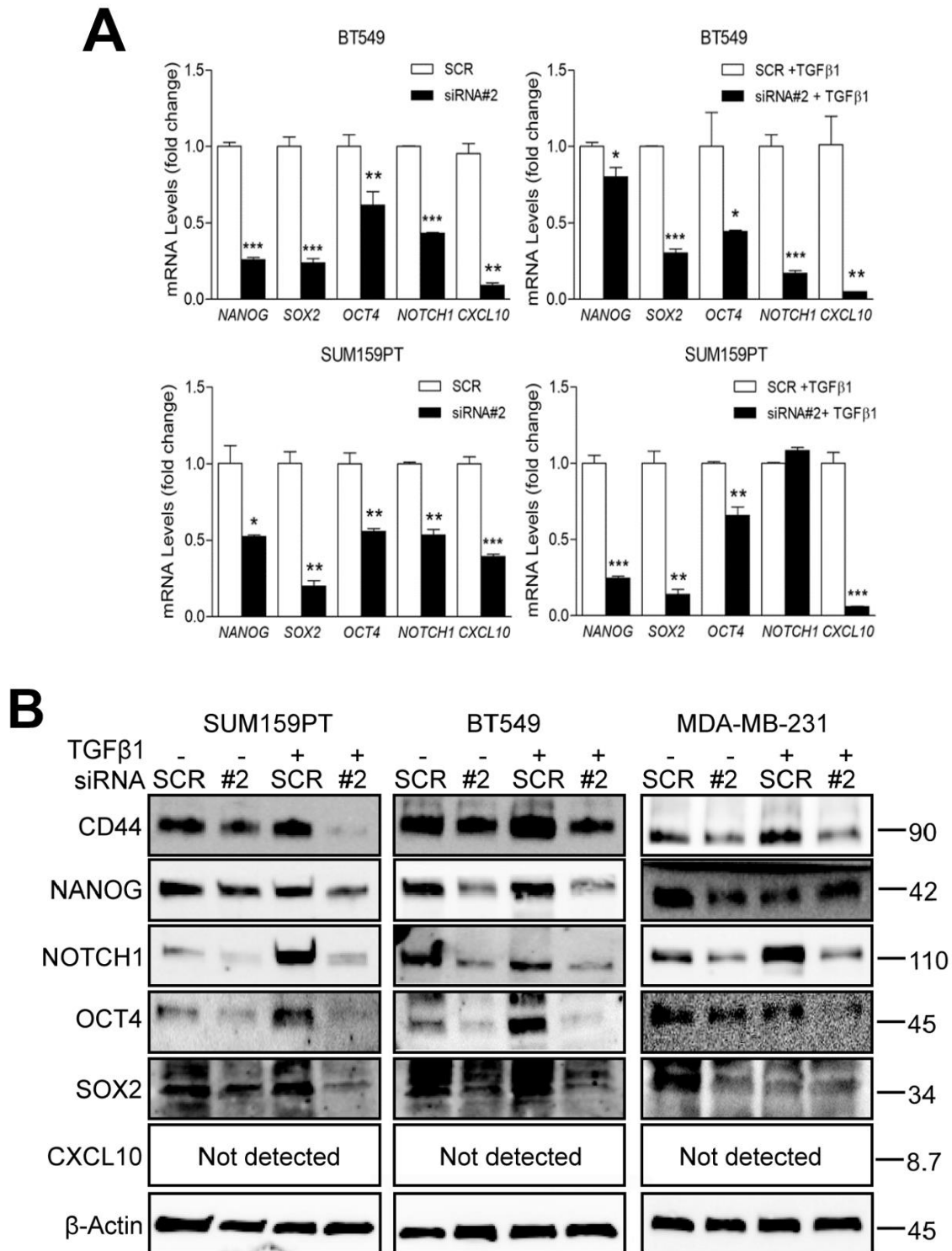


Figura 26. Estudio de los marcadores de “stemness” (NANOG, NOTCH1, OCT4, SOX2 y CXCL10). **A)** Niveles de expresión de ARNm de marcadores de “stemness” en BT549 y SUM159PT, cultivadas en adherencia, al silenciar ATF4 y estimular las células con TGFβ1 durante 72 horas. * P<0.05; ** P>0.01 *** P<0.001. **B)** Western blot de marcadores de “stemness” en BT549, SUM159PT y MDA-MB-231 tras silenciar ATF4 y estimular con TGFβ1 (24 horas en BT549 y MDA-MB-231, y 72 horas en SUM159PT).

4. Estudios *in vivo* en modelos PDX de TNBC.

Para llevar a cabo los experimentos en animales, se seleccionaron los modelos PDX de TNBC BMC-3887 y BCM-4664, cuya expresión de ATF4 es elevada y media, respectivamente, como pudimos comprobar mediante secuenciación de ARNm (**Figura 27A**) e inmunohistoquímica (**Figura 27B**).

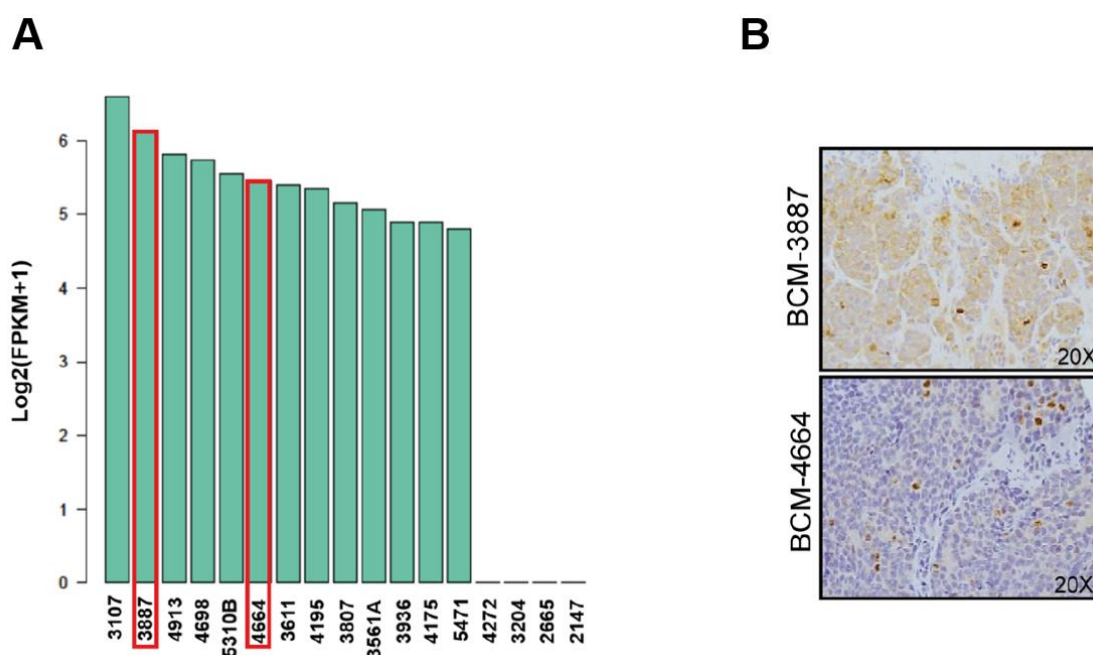


Figura 27. Selección de los modelos PDX BCM-3887 y BCM-4664. **A)** Niveles de ARNm de ATF4 de 20 modelos PDX de TNBC diferentes. **B)** Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica de ATF4 en los modelos de BCM-4664 y BCM-3887 (objetivo óptico original: 20X.)

4.1. La inhibición de ATF4 reduce la aparición de metástasis y el crecimiento tumoral.

Para determinar los efectos del silenciado de ATF4 sobre la generación de metástasis, empleamos un modelo PDX altamente metastásico (3887-LM) en ratones. Tras la resección del tumor primario, los ratones se trataron con ATF4-siRNA#2 y SCR conjugados con liposomas de DOPC dos veces por semana durante 6 semanas. Nuestros resultados demostraron que los animales tratados

con siRNA#2 presentaban menos nódulos metastásicos tanto en pulmones (**Figura 28A**) como en hígado (**Figura 28B**). Las lesiones metastásicas se confirmaron microscópicamente mediante la tinción con Ki67 (**Figura 29A**). Además, observamos que dichos nódulos metastásicos eran positivos en la expresión de ATF4 (**Figura 29B**).

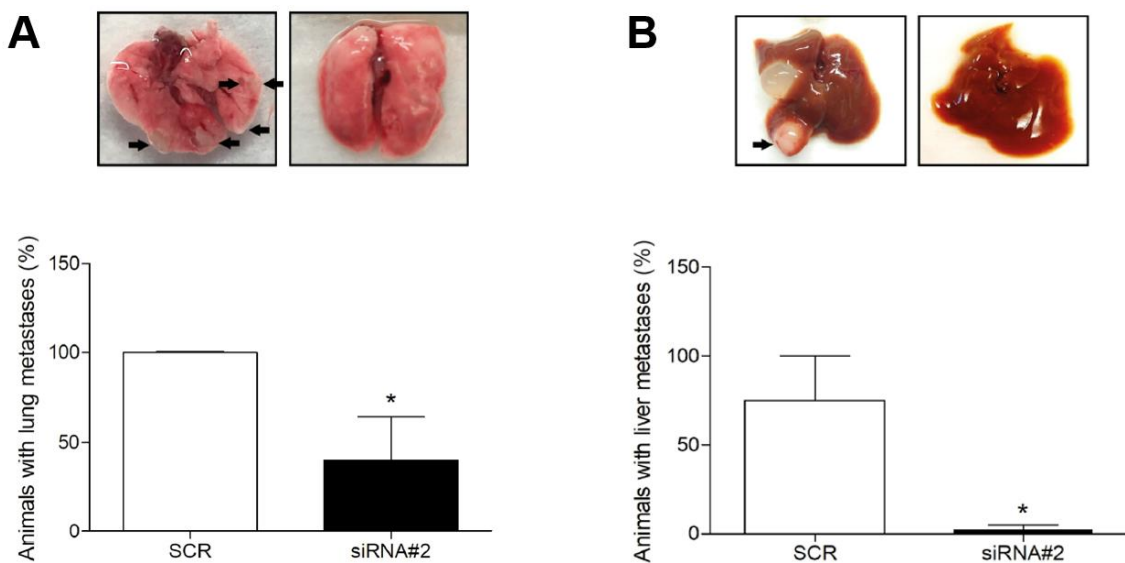


Figura 28. Metástasis en pulmón e hígado en el modelo 3887-LM. **A)** Imágenes representativas y porcentaje de ratones (n=5/grupo) con metástasis en pulmón e **B)** hígado tras el tratamiento con ATF4-siRNA#2 y SCR (control) durante 6 semanas. Las flechas indican la presencia de nódulos metastásicos. * P<0.05.

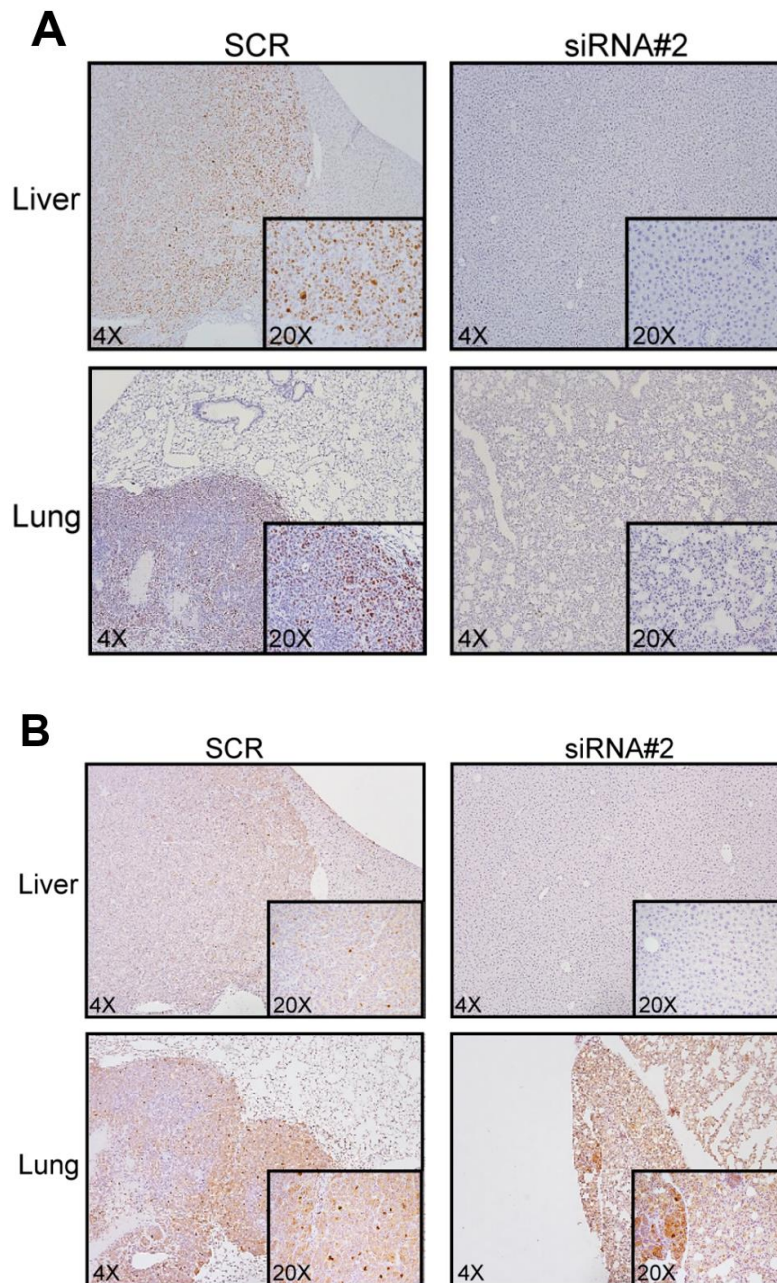


Figura 29. Análisis inmunohistoquímico de las lesiones metastásicas en hígado y pulmones de los animales. **A)** Imágenes de inmunohistoquímica teñidas frente a Ki-67 (objetivos ópticos originales: 4X y 20X). **B)** Imágenes de inmunohistoquímica teñidas frente a ATF4 (objetivos ópticos originales: 4X y 20X).

Para el estudio del crecimiento tumoral, las recaídas y la presencia de poblaciones de CSCs positivas en aldehído deshidrogenasa (ALDH+), se emplearon los dos modelos PDX BCM-3887 y BCM-4664, tratados con ATF4-siRNA#2 y/o docetaxel (20 mg/Kg). Para estudiar las recaídas tras la

quimioterapia, se utilizó el modelo BCM-4664 y coadministramos ATF4-siRNA#2 y docetaxel (33 mg/Kg) dos veces por semana durante 6 semanas.

Nuestros resultados demostraron que el silenciado de ATF4 en los modelos PDX BCM-3887 y BCM-4664, redujo de forma significativa el crecimiento de los tumores, tanto en ausencia de docetaxel como en combinación con este agente quimioterapéutico **(Figura 30A y B)**. En cuanto al estudio de recurrencia en el modelo BCM-4664, los tumores pertenecientes al grupo control SCR+docetaxel (Chemo+SCR) alcanzaron un tamaño mínimo de 124 mm³ a los 24 días, y volvieron a crecer a partir del día 28 (128 mm³), incrementando su tamaño hasta 2.4 veces al día 38, y al final del experimento (día 56) alcanzaron un volumen final de 2083 mm³. Sin embargo, los ratones con tratamiento ATF4-siRNA+docetaxel (Chemo+siRNA#2) presentaban unos tumores de 63 mm³ a los 24 días, comenzaron a crecer al día 28 con 78 mm³, con un incremento de 1.4 veces a día 38, y finalmente al día 56, un volumen de 548 mm³. Además, la media de supervivencia fue de 28 días para los ratones con ATF4-siRNA+docetaxel mientras que en el grupo SCR+docetaxel fue de 15 días **(Figura 30C)**.

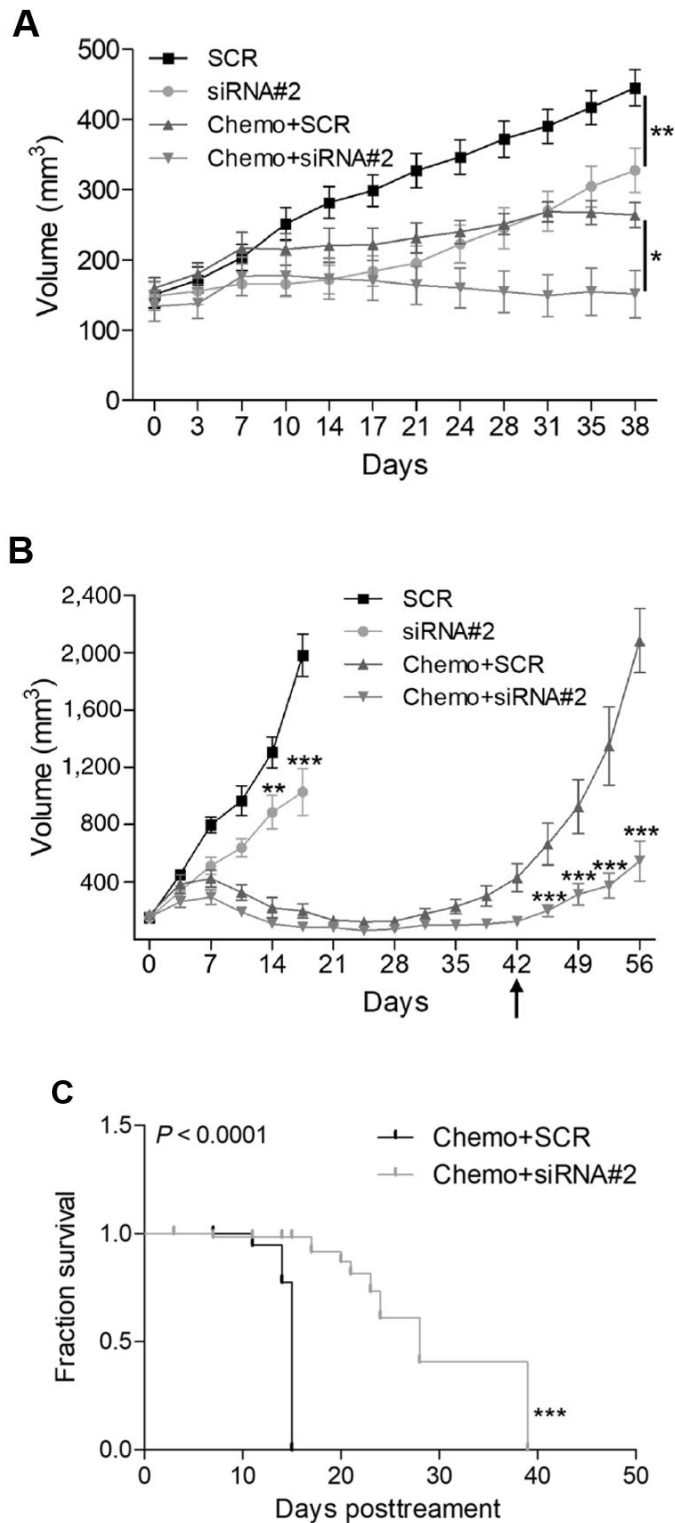


Figura 30. Estudio del crecimiento tumoral en modelos PDX BCM-3887 y BCM-4664. **A)** Evolución del volumen de los tumores BCM-3887 (n=8/grupo) con los diferentes tratamientos: SCR+docetaxel o ATF4-siRNA#2+docetaxel (20 mg/Kg). **B)** Volumen de los tumores BCM-4664 (n=8/grupo) tratados con siRNA#2 y SCR. El cotratamiento de los siRNAs con docetaxel (33 mg /Kg) durante 6 semanas se empleó para el estudio de la recurrencia tumoral. La flecha indica el final del tratamiento. **C)** Supervivencia media de los ratones portadores de tumores BCM-4664 tratados con SCR+docetaxel y ATF4-siRNA#2+docetaxel (33 mg/Kg). * $P < 0.05$; ** $P > 0.01$ *** $P < 0.001$.

Con respecto a la población de células ALDH+, observamos en ambos modelos PDX que el tratamiento de ATF4-siRNA#2 disminuía su número de forma significativa. Además, y como está descrito (63), el número de CSCs ALDH+ sufrió un incremento como consecuencia del tratamiento con docetaxel (Figura 31A y B).

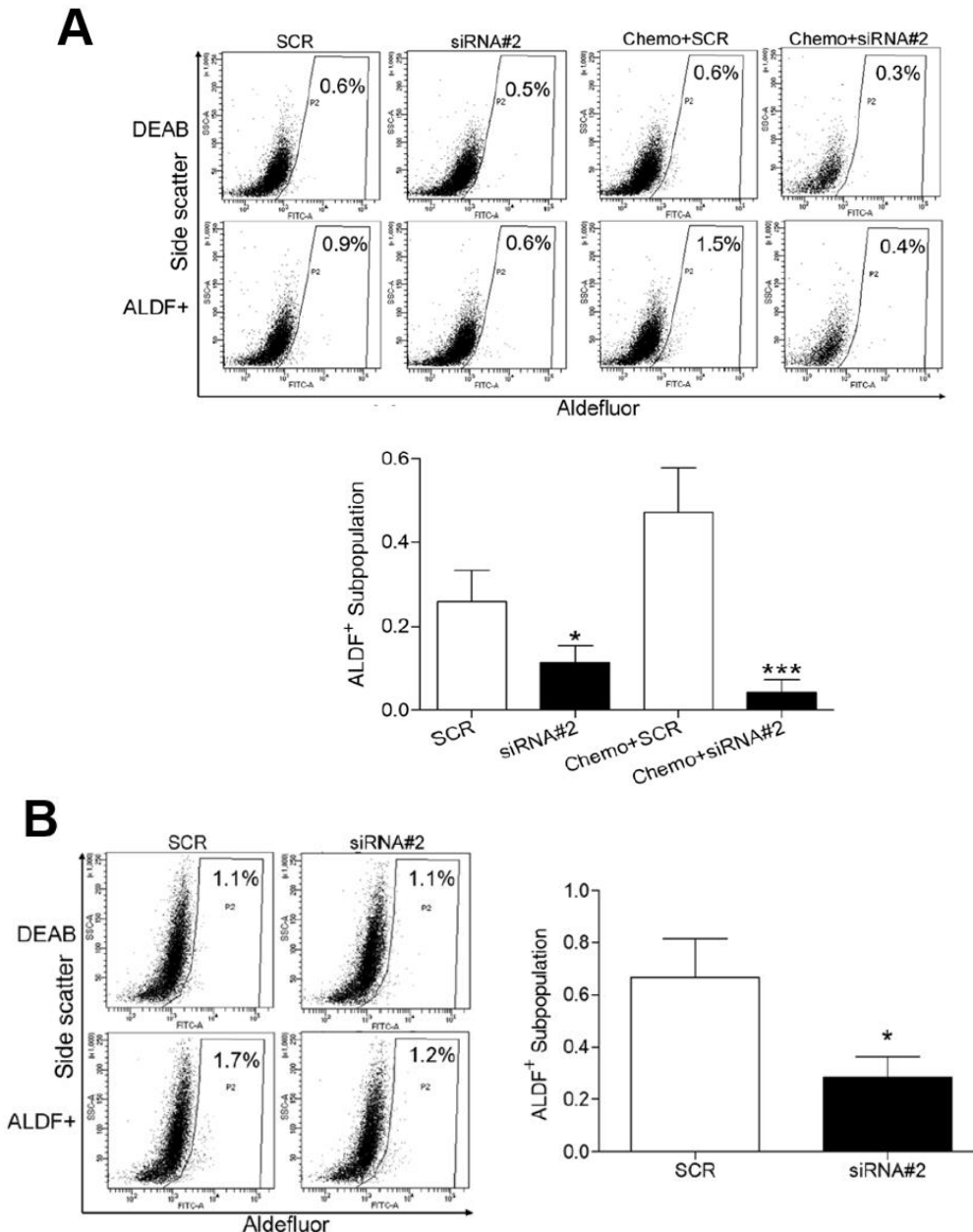


Figura 31. Estudio de las poblaciones celulares ALDH+ en los modelos PDX. **A)** Reducción del número de células ALDH+ del modelo BCM-3887 y **B)** BCM-4664. ALDF+: células positivas en Aldefluor.

En ambos modelos se comprobó que el siRNA redujo la expresión proteica de ATF4 de forma significativa (**Figura 32**).

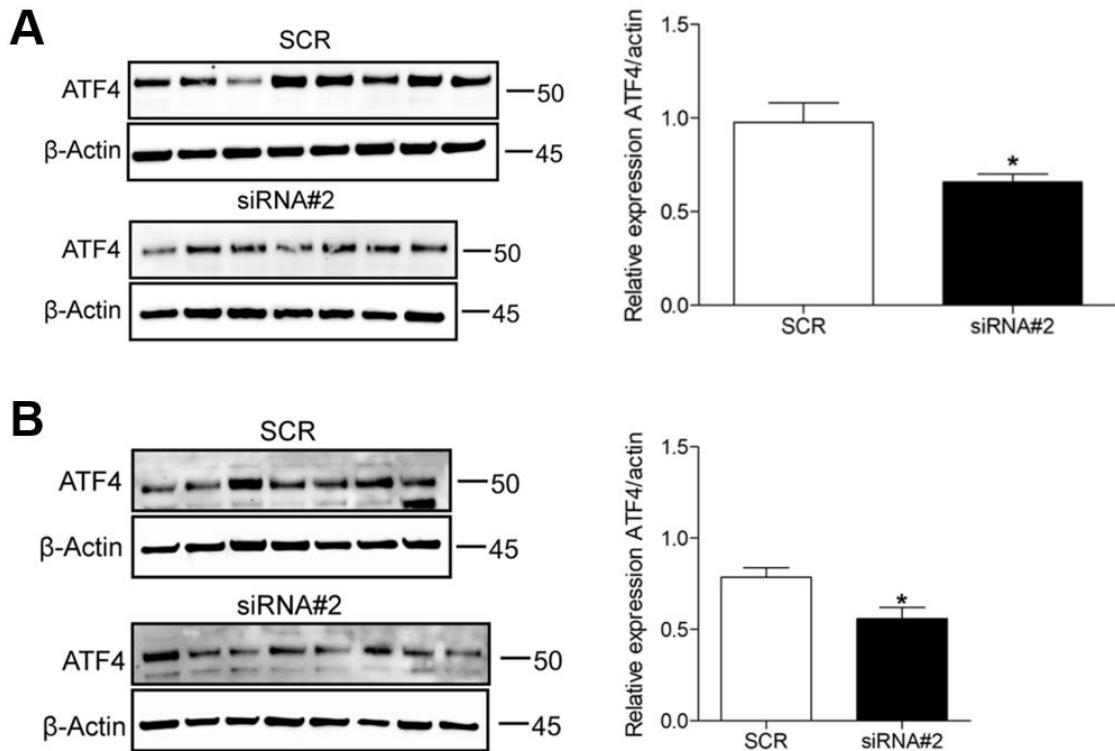


Figura 32. Verificación mediante western blot de que el silenciado mediante ATF4-siRNA#2 fue efectivo en los tratamientos empleados con los modelos PDX. **A)** Expresión de ATF4 en el modelo BCM-3887. **B)** Expresión de ATF4 en el modelo BCM-4664.

Los estudios realizados en modelos PDX de TNBC demuestran que los efectos fenotípicos que describíamos *in vitro* al inhibir ATF4, se mantienen *in vivo*: reduciendo los procesos metastásicos, el crecimiento tumoral, la recurrencia y la población de CSCs.

5. ATF4 es diana de mTORC2 y participa en la regulación de mTOR/RAC1-RHOA independiente al estrés.

5.1. TGF β regula ATF4 independientemente de la respuesta integrada al estrés (ISR).

A la hora de estudiar en profundidad la sobreexpresión de ATF4 mediada por la ruta de señalización de TGF β , quisimos comprobar si ese incremento se debía a una activación previa de la ISR dependiente de TGF β . Para ello se emplearon siRNAs frente a los diferentes elementos que participan en la ISR: PERK, PKR, GCN2, HRI y eIF2 α (EIF2S1), para bloquear la expresión de cada uno en presencia de TGF β 1, y demostrar si su inhibición se correlaciona con una reducción de los niveles de ATF4 de forma consistente en todas las líneas celulares testadas. Observamos que el silenciado de PERK, PKR y GCN2 en la línea SUM159PT, y GCN2 en MDA-MB-231, si inhibían ATF4, indicando que estas rutas son relevantes para su expresión dependiendo de la línea celular. Por otro lado, la inhibición de eIF2 α produjo una acumulación en los niveles proteicos de ATF4, algo llamativo e inesperado ya que todas las rutas de señalización de la ISR convergen en dicho elemento, siendo además el encargado principal de inducir la activación de ATF4, por lo que cabría esperar una reducción en su expresión. Además, el silenciado de PERK, inhibió la expresión de p-eIF2 α solo en las líneas MDA-MB-231 y BT549, y no se correlacionó con una menor expresión de ATF4 (**Figura 33**).

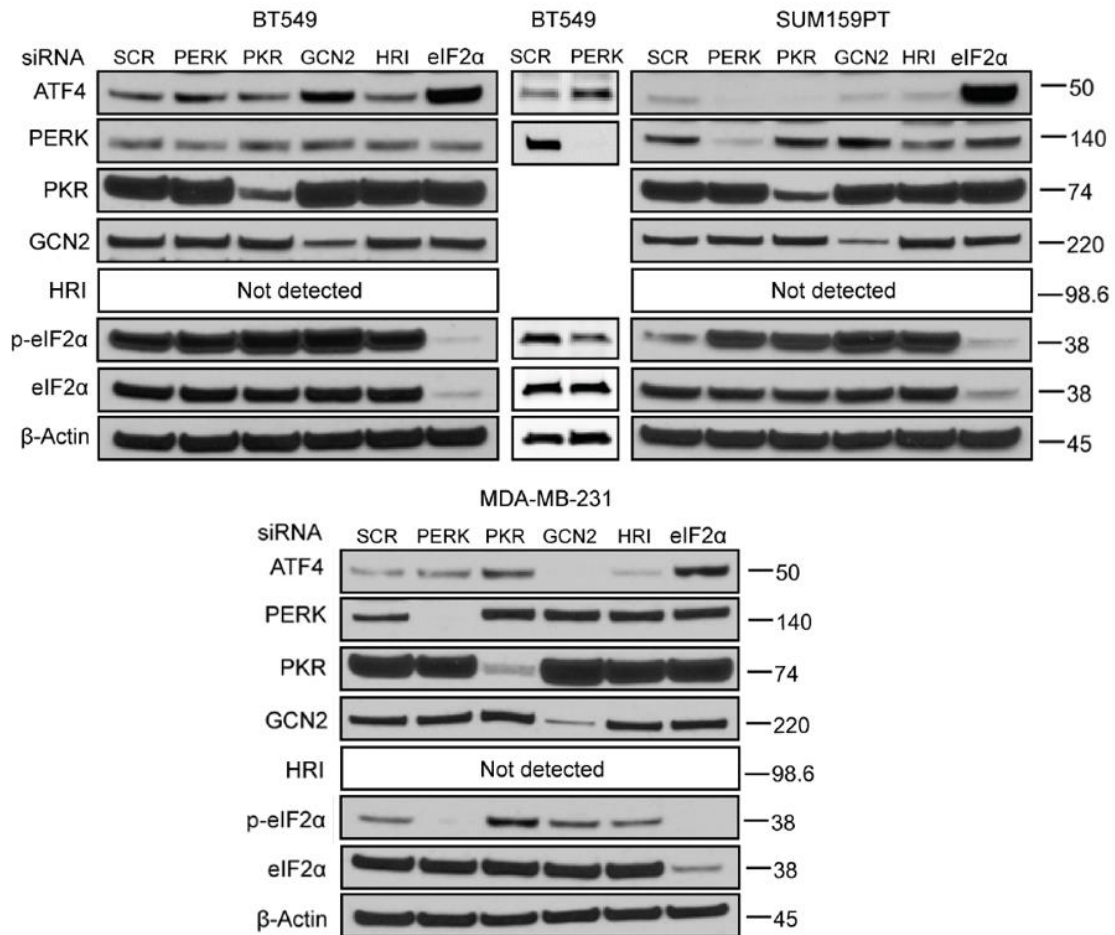


Figura 33. Western blot de ATF4 de las tres líneas de TNBC transfectadas con siRNAs específicos frente a los diferentes mediadores de la ISR y tratadas con TGFβ1 durante 72 horas. Puesto que la inhibición de PERK no fue satisfactoria en las células BT549, los resultados tras un nuevo silenciado de PERK se presentan en el panel adyacente.

En definitiva, estos resultados demuestran que la expresión de ATF4 inducida por TGFβ no depende de la señalización de ISR.

5.2. La regulación proteica de ATF4 podría estar mediada por la ruta no canónica TGFβ/PI3K/mTOR.

Como se ha indicado anteriormente, además de la inducción transcripcional de la expresión, ATF4 está regulado a nivel proteico durante el proceso de traducción (64). En nuestro estudio hemos demostrado que la transcripción de ATF4 está controlada por la vía canónica de TGFβ dependiente de SMADs. Sin

embargo, hasta la fecha, no existen evidencias indicativas de que SMADs modulen la traducción proteica. Por ello, debe existir un mecanismo alternativo dependiente de TGF β , pero independiente de SMADs, que regule ATF4 a nivel de traducción. Por ello investigamos si distintas vías no canónicas de TGF β (MEK/ERK, PI3K, TAK1 y P38-MAPK) están relacionadas con la regulación proteica de ATF4 mediante el empleo de inhibidores farmacológicos en presencia de TGF β 1. En las líneas SUM159PT y BT549 se observó una menor expresión de ATF4 al emplear los inhibidores de PI3K y TAK1, este último de forma notoria en SUM159PT. Aunque la inhibición de MEK1/2 y P38-MAPK redujo la expresión de ATF4 en SUM159PT, esto no se produjo en las células BT549 con respecto al control (**Figura 34**).

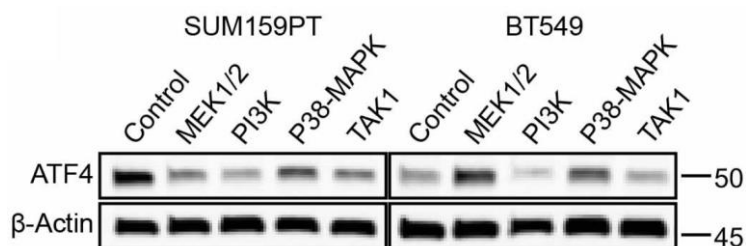


Figura 34. Expresión de ATF4 al realizar el primer screening con inhibidores U0126 (MEK1/2), BKM120 (PI3K), SB203580 (P38-MAPK), (5Z)-7-Oxozeaenol (TAK1), en SUM159PT y BT549 en cotratamiento con TGF β 1 durante 24 horas.

Puesto que la inhibición de PI3K mostró una reducción significativa en la expresión de ATF4 en ambas líneas celulares, investigamos en profundidad en este sentido mediante inhibidores farmacológicos frente diferentes intermediarios “*downstream*” de PI3K (PDK1, AKT, mTOR, GSK3 α/β , RSK1/2 y SGK1/2) bajo estimulación con TGF β 1. Los inhibidores de PI3K y ATF4 (ISRIB) se emplearon como controles positivos de inhibición de ATF4. El western blot reveló que PI3K, mTOR y SGK1/2 actúan como reguladores “*upstream*” de la

expresión de ATF4 en las tres líneas celulares, y no depende ni de AKT ni PDK1 (**Figura 35A**). Además, el uso de un inhibidor de PI3K diferente excluyó que la inhibición de ATF4 sea un efecto “*off target*” dependiente del compuesto empleado (**Figura 35B**).

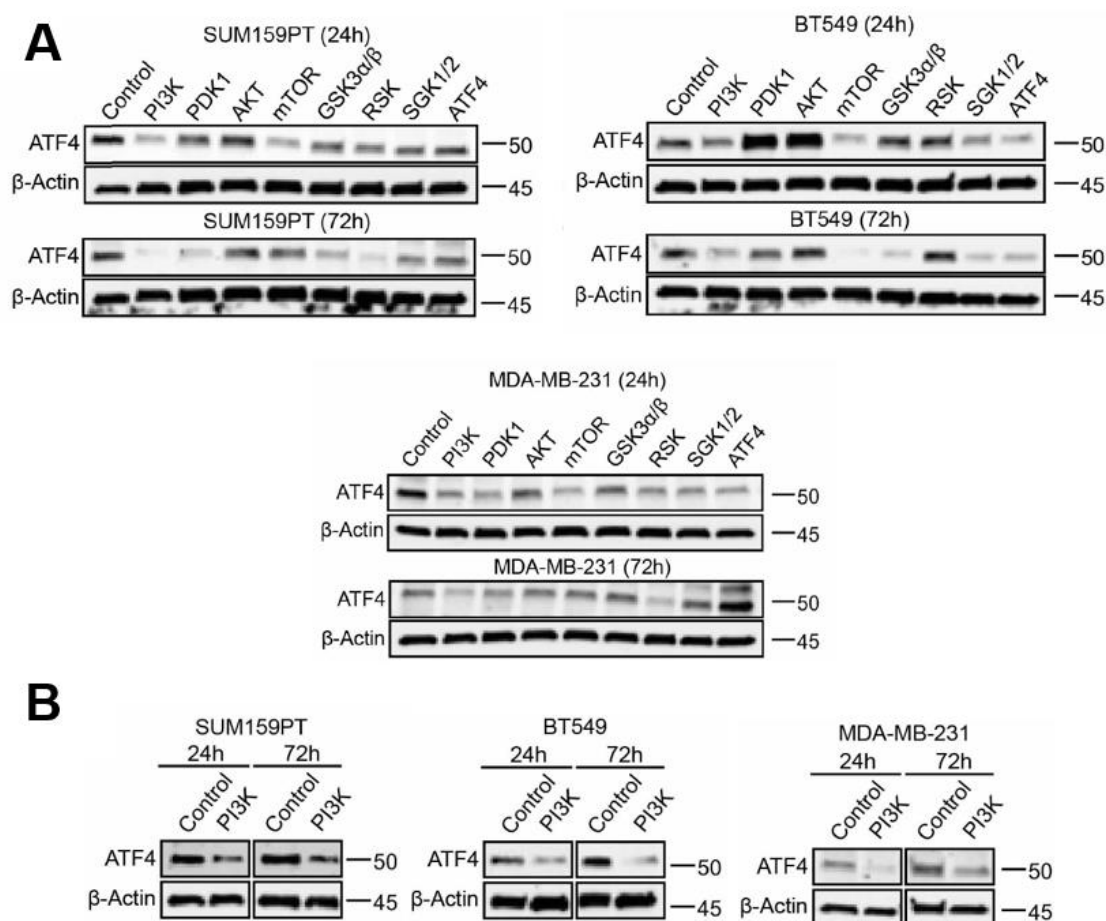


Figura 35. Estudio de los elementos de la ruta no canónica y su efecto sobre ATF4. **A)** Niveles de expresión de ATF4 con los inhibidores BKM120, GSK2334470 (PDK1), GSK690693 (pan-AKT), rapamicina (mTOR), CHIR-99021 (GSK3α/β), BI-D1870 (pan-RSK), GSK650394 (SGK1/2), ISRIB (ATF4 ISR) en las células SUM159PT, BT549 y MDA-MB-231 cotratadas con TGFβ1 durante 24 y 72 horas. **B)** Reducción de la expresión de ATF4 en SUM159PT, BT549 y MDA-MB-231 al realizar un doble tratamiento de LY294002 (inhibidor de PI3K) con TGFβ1 a 24 y 72 horas.

Está demostrado que “*upstream*” de PI3K existe una intercomunicación entre las rutas de TGFβ y RAS en procesos tumorales (65). Para comprobar si la expresión de ATF4 modulada por TGFβ depende de RAS, se empleó en las líneas celulares SUM159PT y BT549 un siRNA específico frente a RAS, con o

sin estimulación de TGFβ1. La expresión de p-AKT se empleó como marcador de inhibición satisfactoria de esta vía de señalización. Los resultados obtenidos demostraron que la inhibición de RAS no afectó a la expresión de ATF4, y al igual que lo hallado anteriormente, no existe dependencia alguna de los niveles de p-AKT (**Figura 36**).

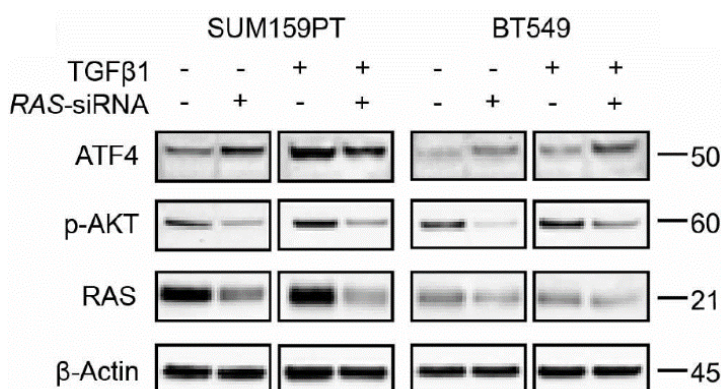


Figura 36. Western blot de ATF4 tras el silenciado de 48 horas de RAS, con y sin estimulación con TGFβ1 durante 72 horas.

Nuestros resultados demostraron que la inhibición de mTOR por la rapamicina reduce de forma significativa la expresión de ATF4 (**Figura 35A**). Puesto que la rapamicina inhibe mTORC1 y mTORC2 dependiendo de la dosis y tiempo de tratamiento, así como la expresión de SGK1 (que a su vez es activado por mTORC2) (66), determinamos si ATF4 está regulado por éstos, bajo la activación de TGFβ, mediante siRNAs específicos frente a mTORC1 y mTORC2 (RPTOR y RICTOR, respectivamente). Nuestros hallazgos mostraron una inhibición de ATF4 que se correlacionaba con el silenciado de RPTOR en las líneas SUM159PT y BT549. Sin embargo, el bloqueo de RICTOR llevó a una disminución de la expresión de ATF4 de manera consistente en las tres líneas celulares investigadas (**Figura 37A**). Estos datos sugieren que tanto mTORC1 como mTORC2 pueden regular la actividad de ATF4, aunque es mTORC2 el

principal conductor de tal efecto independientemente de la línea celular investigada.

Como hemos indicado anteriormente, el tratamiento con inhibidores de PI3K y TAK1 bloqueó de forma significativa la expresión de ATF4 en la línea SUM159PT (**Figura 34**). Sin embargo, encontramos que el silenciado del gen TAK1 no afectó a los niveles de ATF4, lo que sugiere que nuestros resultados previos obtenidos con el inhibidor 7-Oxozeaenol son debidos a un efecto “*off target*” dependientes del compuesto (**Figura 37A**).

Previamente hemos mostrado que la expresión de SNAIL disminuye considerablemente tras el silenciado de ATF4, por lo que lo empleamos como marcador indirecto de la inhibición de ATF4 tras el silenciado de RICTOR y RPTOR. La reducción en la expresión de SNAIL en las líneas celulares de TNBC tras el bloqueo de RICTOR bajo estimulación con TGF β 1 indicó que podía ser como consecuencia de la menor expresión de ATF4 promovida por el siRNA de RICTOR (**Figura 37B**).

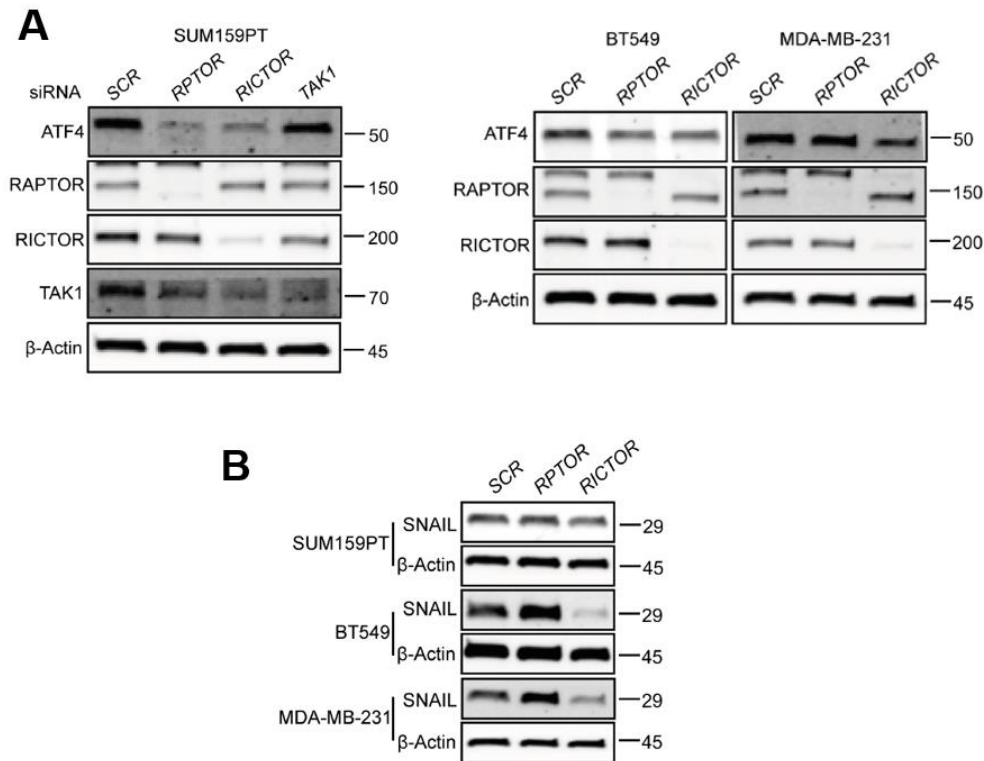


Figura 37. A) Niveles proteicos de ATF4 tras el silenciado de RPTOR y RICTOR (mTORC1 y mTORC2, respectivamente) tratadas con TGFβ1 durante 72 horas (SUM159PT y BT549) o 24 horas (MDA-MB-231). En SUM159PT, se estudió además el efecto del silenciado de TAK-1 mediante un siRNA específico. **B)** Variación en la expresión de SNAIL tras el tratamiento con los siRNAs de RPTOR y RICTOR en las tres líneas celulares de TNBC estimuladas con TGFβ1 durante 24 horas.

Así pues, estos resultados sugieren que la traducción proteica de ATF4 estaría regulada de forma consistente a través de mTORC2 fundamentalmente, mientras que la implicación de mTORC1 parece ser más dependiente de la línea celular investigada.

5.3. ATF4 modula la señalización de mTOR a través de un mecanismo de retroalimentación positiva.

La actividad de la señalización ligada a mTOR está estrechamente regulada a través de diversos circuitos de retroalimentación (66). Por ello, y dado que hemos demostramos que la activación de ATF4 por TGFβ está mediada por mTORC1/2, nos planteamos si dicha activación pudiera estar autorregulada a

través de un mecanismo de retroalimentación. Para conocer la posible existencia de un circuito de señalización de este tipo, primero, en tejido tumoral de una cohorte de 2509 pacientes con cáncer de mama, estudiamos si existía correlación alguna entre la expresión de ATF4 y distintos genes cuyas proteínas están implicadas en la señalización dependiente de mTORC1 y mTORC2. Nuestros resultados mostraron que la expresión de ARNm de ATF4 se relacionaba positivamente con dianas implicadas en la señalización dependiente de mTORC1 (EIF4E, $R=0,463$; RPS6, $R=0.380$) y de mTORC2 (NDRG1, $R=0.213$; RHOA, $R=0.320$; $P<0.001$) (**Figura 38**).

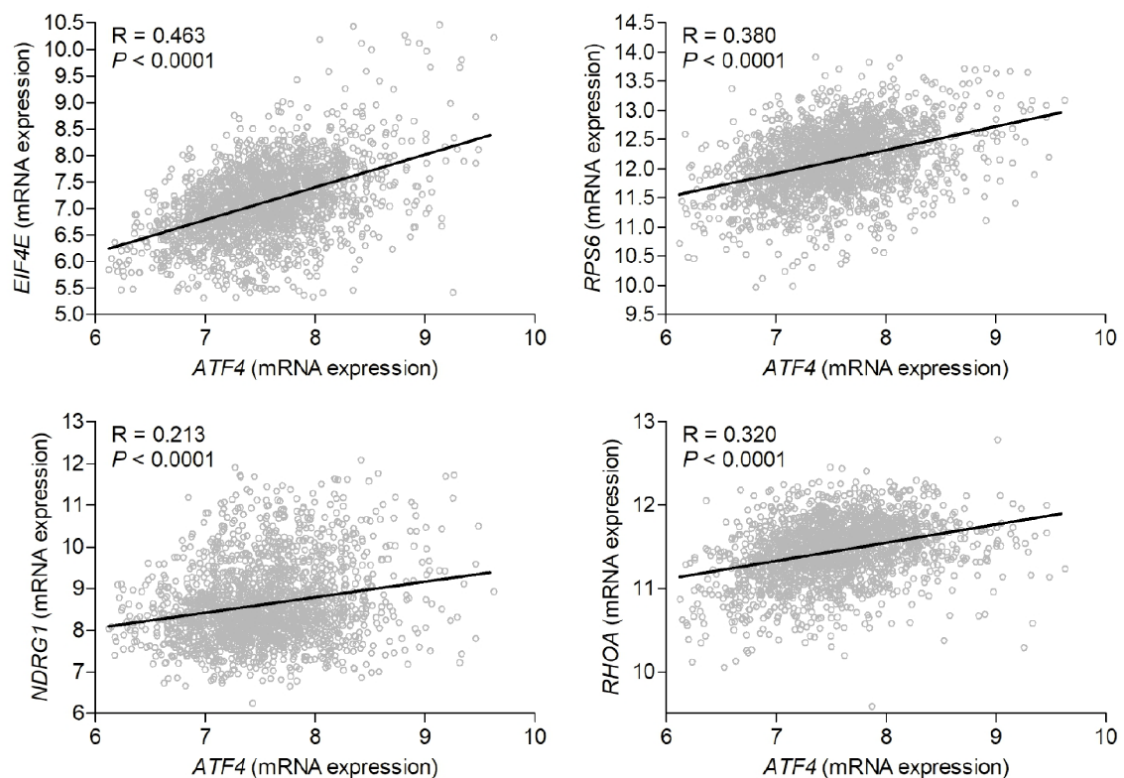
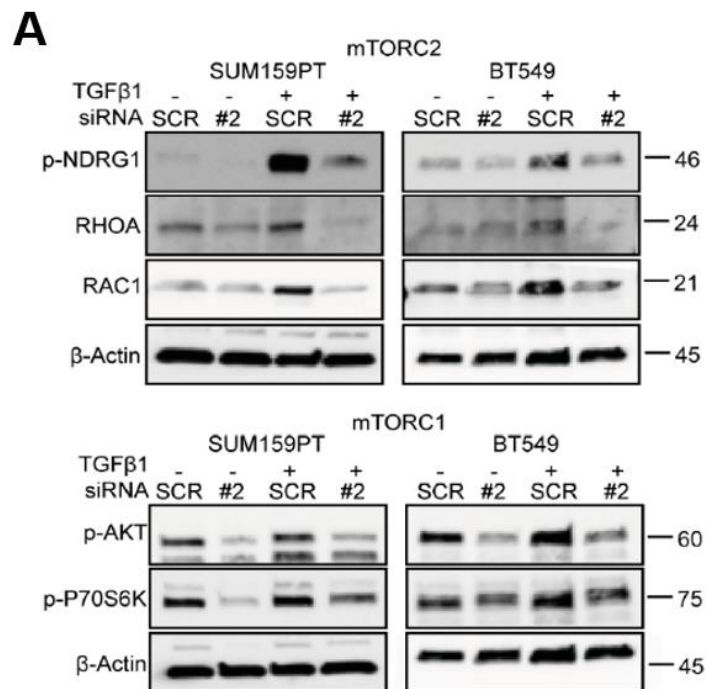


Figura 38. Correlación de Pearson de los niveles de expresión de ARN de ATF4 y los componentes de la ruta de señalización de mTORC1 (EIF4E y RPS6) y de mTORC2 (NDRG1 y RHOA) en una cohorte de 2509 pacientes de cáncer de mama.

A continuación, confirmamos la existencia de este circuito de retroalimentación positiva entre ATF4 y la actividad de mTORC1 y mTORC2 mediante el silenciado de ATF4 bajo estimulación, o no, de TGFβ1. El ensayo de western blot mostró una inhibición en la expresión de las dianas de mTORC2 (p-NDRG1, RHOA, RAC1) y mTORC1 (p-AKT, p-P70S6K) en las células SUM159PT y BT549 (**Figura 39A**). Es interesante señalar que la inhibición de RHOA y RAC1 fue consistente en todas las líneas celulares tras el tratamiento con TGFβ1 (**Figura 39A**), y donde la expresión de RAC1 se mantuvo bloqueada y de forma prolongada en las tres líneas celulares testadas (**Figura 39B**).



B

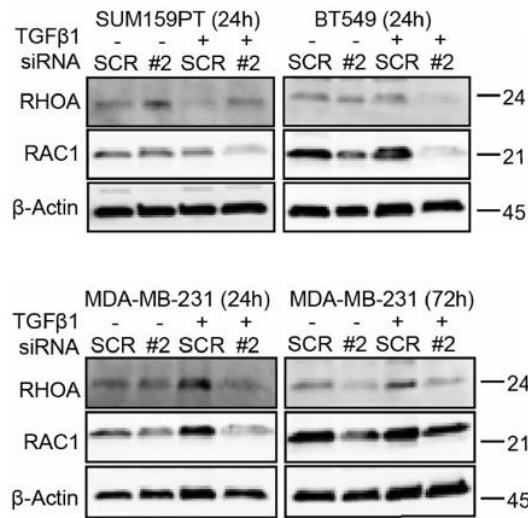


Figura 39. Estudio de la retroalimentación positiva entre ATF4 y la ruta de mTORC1 y mTORC2. **A)** Análisis por western blot de las dianas de mTORC1 y mTORC2 tras la inhibición de ATF4 mediante ATF4-siRNA#2 y estimulación con TGF β 1 durante 72 horas. **B)** Niveles de proteína de RHOA y RAC1 en SUM159PT, BT549 y MDA-MB-231 tras el silenciado de ATF4, con o sin estimulación de TGF β 1 a diferentes tiempos.

Todos estos datos sugieren que ATF4 está involucrado y al mismo tiempo regula las rutas canónicas (SMAD2/3/4) y no canónicas (PI3K/mTORC2/RHOA-RAC1) de TGF β , a través de las cuales puede modular la capacidad de metástasis, la supervivencia, así como el mantenimiento de la naturaleza “stem” de las células tumorales en TNBC (**Figura 40**).

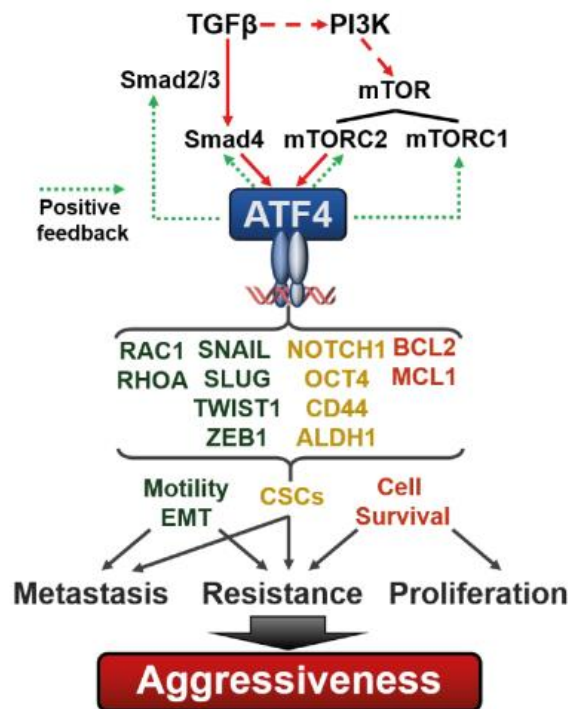


Figura 40. Esquema que plantea los reguladores de ATF4 corriente arriba y abajo, los circuitos de retroalimentación positiva detectados, y sus correspondientes efectos biológicos que modulan la agresividad del TNBC bajo activación de TGFβ que se conservan en las tres líneas celulares investigadas.

6. Diseño de una firma génica basada en el mecanismo descrito para ATF4 con poder pronóstico en pacientes con cáncer de mama.

Para ayudar a mejorar el pronóstico y la toma de decisiones terapéuticas en pacientes con cáncer de mama, empleamos la base de datos KM Plotter para estudiar el impacto de diferentes genes relacionados con las rutas de señalización de TGFβ/SMAD/ATF4 y PI3K/mTOR/ATF4 sobre la RFS de pacientes con cáncer de mama mediante el análisis de multivariables y LOOCV. Como se observa, los análisis de LOOCV mostraron que la menor RFS en pacientes con cáncer de mama ER+ y TNBC era dependiente de la expresión de NDRG1, aunque su impacto sobre RFS no pudo determinarse en pacientes con TNBC (Tabla 6).

Supervivencia libre de recaídas (RFS)	Casos	n	Cohorte baja expresión (meses)	Cohorte alta expresión (meses)	P valor (¥ Rango logarítmico)	FC
Firma génica	All_BC	1764	46	18	1E-16 ¥*	-61
ATF4		3951	55	36	2.7E-5 ¥*	-34
TGFBR1		1764	39	28	0.054	-27
SMAD4		1764	23	44	2.9E-11 ¥*	95
PIK3CA		3951	217	184	2.1E-9 ¥*	-15
RICTOR		1764	25	41	6.1E-9 ¥*	62
RPTOR		1764	27	41	0.0005 ¥*	51
EIF4EBP1		3951	217	163	1E-16 ¥*	-25
NDRG1		3951	217	160	1E-16 ¥*	-26
Firma génica		ER ⁻	347	171	32	4.7E-8 ¥*
ATF4	801		161	126	0.005 ¥*	-22
TGFBR1	801		171	58	0.015 ¥	-66
SMAD4	347		171	63	0.15	-63
PIK3CA	801		30	29	0.1594	-3
RICTOR	347		18	29	0.2407	58
RPTOR	347		171	58	0.0529	-66
EIF4EBP1	801		145	171	0.2061	19
NDRG1	801		171	123	0.0005 ¥*	-28
Firma génica	ER ⁺		762	107	55	0.0006 ¥*†
ATF4		2061	81	56	0.0032 ¥*	-31
TGFBR1		762	59	110	0.0008 ¥*	87
SMAD4		762	61	110	0.0054 ¥	81
PIK3CA		2061	217	229	0.0761	6
RICTOR		762	65	92	0.0514	41
RPTOR		762	111	60	0.0023 ¥*	-46
EIF4EBP1		2061	217	152	4.3E-10 ¥*	-30
†NDRG1		2061	217	184	0.0002 ¥*†	-15
Firma génica		TNBC	161	57	16	1E-5 ¥*†
ATF4	255		36	22	0.0234 ¥	-40
TGFBR1	161		55	29	0.1861	-47
SMAD4	161		26	36	0.2227	39
PIK3CA	255		25	36	0.2273	46
RICTOR	161		18	43	0.0081 ¥*	143
RPTOR	161		57	22	0.0252 ¥	-61
EIF4EBP1	255		36	22	0.035 ¥	-39
†NDRG1	255		NA	NA	0.0001 ¥†	NA

RFS: supervivencia libre de recaídas. **ER:** receptor de estrógenos. **All_BC:** todos los tipos de cáncer de mama. **TNBC:** cáncer de mama triple negativo. **FC:** "fold change". **NA:** no disponible. * = Significativo con análisis multivariable. † No cumple con la validación cruzada.

Tabla 6. Variaciones en el fold change de la supervivencia libre de recaídas al estudiar la relación TGFβ/SMAD/ATF4 y PI3K/mTOR/ATF4.

Gracias a ello, pudimos identificar una firma de 8 genes (ATF4, TGFBR1, SMAD4, PI3KCA, RPTOR, Eif4EBP1, RICTOR y NDRG1) cuya elevada expresión predice un peor pronóstico, relacionado con una menor supervivencia libre de recaídas, en todos los casos de cáncer de mama (All_BC) (donde la variación del “*fold change*” de la RFS descendía hasta 61 veces (n=1764, P<0.005), ER- (descenso de 81 veces, n=347, P<0.005) (**Tabla 6**) (**Figura 41**) y el subtipo intrínseco basal (n=360, P<0.005) (**Tabla 7**).

En el grupo All_BC, esta firma génica predijo una RFS 27 veces más baja que aquella tomando ATF4 como referencia, puesto que solo este gen está ya asociado con una reducción de RFS significativa. En el grupo ER-, nuestra firma multigénica predijo una RFS 53 veces menor que la exhibida por la expresión individual de NDRG1, gen asociado con el mayor descenso significativo en la RFS dentro de este grupo (P<0.005) (**Figura 41**).

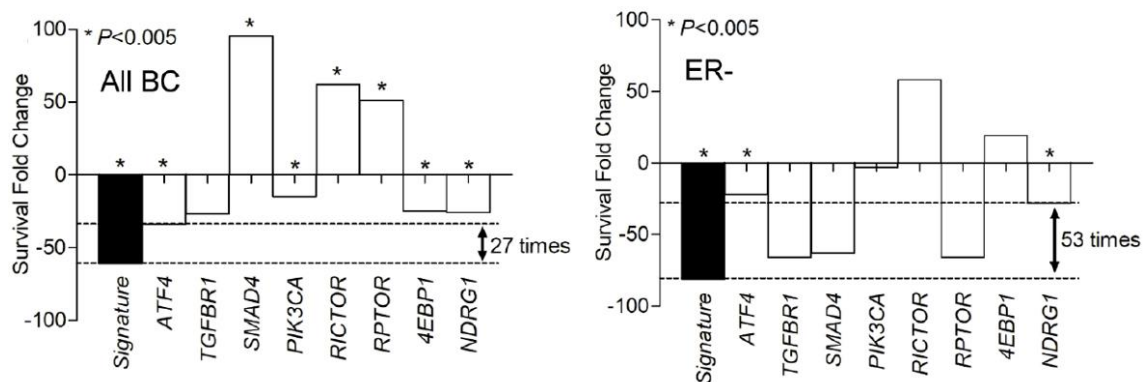


Figura 41. Valor pronóstico de las variaciones del “*fold change*” en la supervivencia libre de recaídas de la firma génica de los 8 genes frente a su expresión individual: todos los tipos de cáncer de mama (All_BC), y receptor de estrógenos negativo (ER-). La variación en el “*fold change*” de la supervivencia se contrastó con un test de corrección múltiple (P>0.005) y validación cruzada “*leave-one-out*”.

Supervivencia libre de recaídas (RFS)	Subtipo (X)	n	Cohorte baja expresión (meses)	Cohorte alta expresión (meses)	P valor (¥ Rango logarítmico)
Firma génica	Basal	360	33	14	1.3E-7 ¥*
ATF4		618	22	17	0.0153 ¥
TGFBR1		360	22	18	0.1436
SMAD4		360	21	16	0.0182 ¥
PIK3CA		618	23	16	0.0041 ¥*
RICTOR		360	15	20	0.0054 ¥*
RPTOR		360	14	19	0.0562
EIF4EBP1		618	24	16	0.1548
NDRG1		618	38	17	1.3E-5 ¥*
Firma génica	Luminal A	841	70	40	0.044 ¥†
ATF4		1933	71	84	0.1394
TGFBR1		841	52	68	0.0111 ¥
SMAD4		841	37	85	3.7E-7 ¥*
PIK3CA		1933	217	185	1.2E-5 ¥*
RICTOR		841	42	68	0.0029 ¥*
RPTOR		841	46	66	0.0507
†EIF4EBP1		1933	214	152	1.8E-10 ¥*†
NDRG1		1933	217	184	0.0005 ¥*
Firma génica	Luminal B	407	41	28	0.0081 ¥*†
ATF4		1149	43	37	0.1003
TGFBR1		407	36	40	0.3899
SMAD4		407	26	41	0.0015 ¥*
PIK3CA		1149	54	37	0.0004 ¥*
RICTOR		407	28	43	0.0002 ¥*
RPTOR		407	106	171	0.0289 ¥
†EIF4EBP1		1149	79	35	2.2E-7 ¥*†
NDRG1		1149	48	36	0.005 ¥*
Firma génica	HER2	156	98	32	0.0718
ATF4		251	23	16	0.013 ¥*
TGFBR1		156	40	123	0.1254
SMAD4		156	15	19	0.1249
PIK3CA		251	15	23	0.2276
RICTOR		156	23	15	0.1506
RPTOR		156	13	18	0.0256 ¥
EIF4EBP1		251	25	18	0.1713
NDRG1		251	15	24	0.0673

RFS: supervivencia libre de recaídas. * = Significativo con análisis multivariable. † No cumple con la validación cruzada. Subtipo según el criterio StGallen (2013).

Tabla 7. Variaciones en el “fold change” de la supervivencia libre de recaídas atendiendo a la firma genética y los genes señal.

El análisis OncoPrint en 2509 pacientes con cáncer de mama mostró que la expresión de los genes que componen la firma se encuentra alterada en 1138, lo que representa un 45% del total de la cohorte. Los porcentajes de alteraciones variaban desde un 4% a un 25% (ATF4, 4%; TGFBR1, 4%; SMAD4, 7%; PIK3CA, 7%; RPTOR, 8%; EIF4EBP1, 16%; RICTOR, 6%; NDRG1, 25%) (Figura 42).

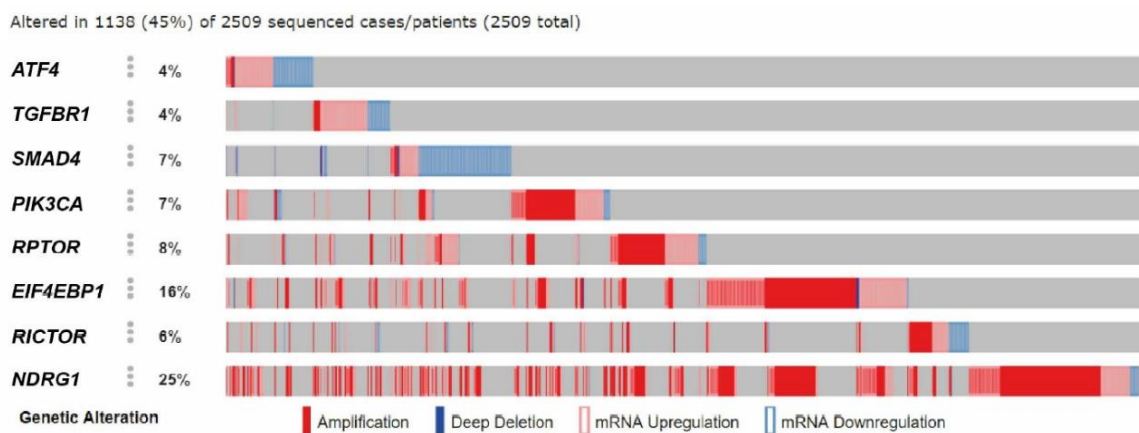


Figura 42. Porcentaje de alteración de los genes (amplificaciones, deleciones severas, alteración de la regulación del ARN mensajero) en los genes ATF4, TGFBR1, SMAD4, PIK3CA, RPTOR, EIF4EBP1, RICTOR y NDRG1 en una cohorte de 2509 pacientes con cáncer de mama (datos procedentes de OncoPrint).

Finalmente, la combinación de los análisis de Kaplan-Meier y LOOCV demostraron que aquellas pacientes con alteraciones en la expresión de estos genes (n=1055) presentaban una menor supervivencia (143 meses) respecto a pacientes que no presentaban alteraciones (n=925, 173 meses, P=0.00005) (Figura 43).

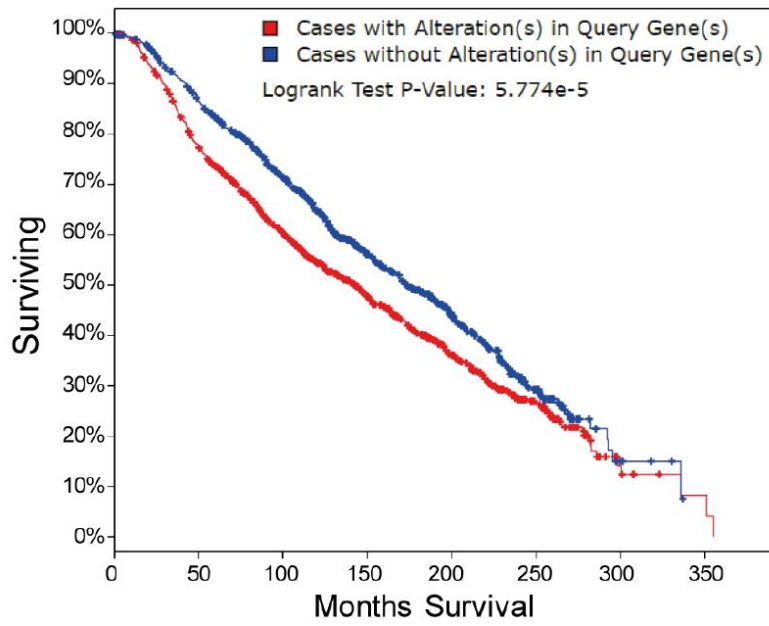


Figura 43. Impacto de la firma génica con los 8 genes sobre la supervivencia libre de recaídas en pacientes con cáncer de mama con alteraciones a nivel de ADN (amplificación y deleciones) y sobre el ARN mensajero (alteración de la regulación) en cada gen uno de esos genes. Cada gen se analizó mediante test de validación cruzada “*leave-one-out*”.

VI. Discusión.

Los estudios más recientes que relacionan ATF4 con el cáncer de mama han propuesto que este gen puede tener un importante papel en la evolución de la patogénesis, así como en su desarrollo. No obstante, hasta la fecha los mecanismos por los que actúa, así como el impacto que tiene su presencia en la supervivencia de los pacientes no resultaban claros.

En este sentido, se ha observado en muestras de pacientes de cáncer de mama, concretamente en carcinomas infiltrantes, unos niveles de p-ATF4 mayores que aquellos expresados en tejido mamario sano, lo cual se asoció con metástasis a ganglios linfáticos (67). Más recientemente, un análisis de expresión génica en tejido tumoral de una cohorte de 90 pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC), reveló unos elevados niveles de expresión de ATF4 (68). Ante dichos antecedentes, en este estudio nos planteamos si ATF4 puede servir como un posible biomarcador de pronóstico, así como diana terapéutica en cáncer de mama triple negativo. Mediante un metaanálisis, empleando datos de expresión génica procedentes de bases de datos públicas, encontramos que la elevada expresión de ARNm de ATF4 en tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama (All_BC), así como en los subtipos ER+, ER- y TNBC, se correlaciona con una menor supervivencia. Estos resultados se validaron en tejido tumoral parafinado de 35 pacientes con TNBC, procedentes del Hospital Universitario de Jaén, en los que pudimos demostrar una tendencia positiva entre la tinción positiva de ATF4 y una menor supervivencia global desde el diagnóstico. Dicho efecto negativo empezó a manifestarse a los 24 meses de seguimiento. Concluimos que el incremento tanto del número de pacientes como del periodo de seguimiento transformaría esta tendencia en significativa.

Se ha descrito que, durante los procesos de invasión tumoral y metástasis, se activan múltiples vías de señalización de forma patológica, favoreciendo la progresión tumoral. Algunas de estas rutas, como NOTCH o TGF β , inducen un cambio en las células tumorales desde un fenotipo epitelial a otro mesenquimal o EMT, gracias a la activación de distintos factores de transcripción como SNAIL, SLUG, TWIST1 y ZEB1 (18). El proceso de EMT inducido por TGF β se asocia a su vez con la génesis de CSCs, que muestran elevadas capacidades de autorrenovación e iniciación tumoral, resistencia a fármacos y apoptosis, modulan su capacidad proliferativa y promueven las recidivas tumorales (14). Estos procesos también se producen en pacientes con TNBC, y es que estos tejidos tumorales poseen perfiles de expresión génica similares a aquellos observados en CSCs y durante el proceso de EMT, como son el incremento de la actividad y expresión de TGF β y mTOR (7), que junto a una elevada expresión de marcadores de CSCs, se correlacionan con un peor pronóstico (48,69,70).

De forma similar a lo observado en osteoblastos y células de adenocarcinoma pancreático (47,71), nuestro grupo ha descrito previamente que el tratamiento de células de mama MCF10A con TGF β 1 origina un incremento en los niveles de expresión proteica de ATF4 (58). Esto sugiere que su expresión podría estar regulada a través de la señalización de TGF β , vía comúnmente sobreactivada en tejido tumoral de pacientes con TNBC y que es necesaria para la progresión tumoral y el proceso de EMT (7,14,59). Al igual que lo observado en células MCF10A, en este estudio demostramos que ATF4 se expresaba en líneas celulares de TNBC tras la estimulación con TGF β 1, y se inhibió bajo tratamiento con un inhibidor específico de TGF β , LY2157299. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis que indica un efecto directo de TGF β sobre la expresión de

ATF4. En este sentido, hemos demostrado que SMAD2/3/4 parece ser el responsable, al menos en parte, de la regulación de la expresión de ATF4, tras la estimulación con TGF β 1. Además, posteriores análisis de datos de ChIP-Seq procedentes de un estudio previo (72), junto a los obtenidos mediante ChIP-qPCR en células BT549 estimuladas con TGF β 1, demostraron por primera vez en la literatura que SMAD2/3 se unen de forma específica al promotor de ATF4, regulando así su transcripción. Nuestros hallazgos son similares a los obtenidos en estudios anteriores en los que se mostró que la expresión de ATF4 depende de SMAD3 en adipocitos de ratón (73), pero no así de SMAD4, como se observó en osteoblastos (74). Como sucede con otros miembros de la familia de factores de transcripción ATF, como ATF3 (75), encontramos que existe un proceso de retroalimentación positiva entre ATF4 y TGF β . Llegamos a esta conclusión porque observamos que si bloqueamos la expresión de ATF4, se reducen los niveles de SMAD2, SMAD3 y SMAD4, lo que origina un descenso en la actividad de la señalización de TGF β determinada mediante un ensayo reportero de SBE. Todo ello sugiere que la vía canónica de TGF β dependiente de SMAD2, SMAD3 y SMAD4 es responsable de la transcripción de ATF4, que a su vez se autorregula a través de un mecanismo de retroalimentación positiva de ATF4 sobre SMAD2/3/4.

La importancia clínica de la interacción mutua entre ATF4 y la vía de TGF β dependiente de SMADs la estudiamos en tejido tumoral de pacientes con TNBC, y confirmamos que la expresión génica combinada de ATF4 con TGFBR1, SMAD2, SMAD4 o SMAD3 resultó en una menor supervivencia global, siendo dependiente de la sobreexpresión de ATF4. En conjunto, estos hallazgos indican que la activación de la nueva vía de señalización TGF β /SMAD2/3/4/ATF4 que

aquí describimos podría estar implicada en la agresividad del TNBC en pacientes. Por esta razón, a continuación, estudiamos el nivel de relevancia de ATF4 inducido por TGF β sobre la agresividad tumoral en modelos *in vitro* e *in vivo* de TNBC.

En nuestro estudio demostramos la implicación de ATF4 sobre la capacidad proliferativa de las células tumorales, ya que su silenciado mediante siRNA reduce la tasa de proliferación en las tres líneas de TNBC testadas, tanto basal como estimulada por TGF β 1. Está demostrado que ATF4 confiere a las células tumorales la habilidad de sobrevivir bajo condiciones nocivas, como el tratamiento quimioterapéutico. Por ejemplo, en células de mieloma múltiple, ATF4 confiere resistencia al tratamiento con bortezomib promoviendo la acumulación de la proteína antiapoptótica MCL1 a través de la inhibición del proteasoma (76), mientras que en células de cáncer gástrico, confiere resistencia a varios fármacos (cisplatino, adriamicina, vincristina y fluorouracilo) a través de diversos mecanismos, incluyendo la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica BCL2 (77). En concordancia con estas publicaciones, en nuestro estudio demostramos que ATF4 está implicado en la regulación de las proteínas antiapoptóticas MCL1 y BCL2, ya que su expresión proteica se ve reducida tras el silenciado de ATF4 tanto a nivel basal como bajo estimulación con TGF β 1. En conjunto, sugerimos que ATF4 podría mediar en la supervivencia y proliferación, tanto constitutiva como inducida por señales del microambiente tumoral como TGF β 1, de las células de TNBC. Además, cabe la posibilidad de que ATF4 promueva la resistencia de las células de TNBC a la quimioterapia, bien por la regulación de BCL2 y MCL1, o bien a través de su “*feedback*” positivo sobre

TGF β 1, que está altamente relacionado con la adquisición de resistencia a tratamientos (14,78), y que será evaluado en futuras investigaciones.

En términos de capacidad metastásica, encontramos que la inhibición de ATF4 tiene mayor relevancia sobre la migración constitutiva de las células tumorales, con una reducción media del 56%, que aquella inducida por la estimulación con TGF β 1, con una disminución media del 45%. Por el contrario, el silenciado de ATF4 resultó ser más importante en la modulación de la capacidad invasiva de las células tumorales bajo estimulación con TGF β 1 que aquella en condiciones basales (reducción media del 54% y 38%, respectivamente). Dichos efectos podrían deberse a la inhibición de determinados factores inductores de EMT (SNAIL, TWIST1, SLUG y ZEB1) tras el silenciado de ATF4.

Como se ha indicado anteriormente, las CSCs están ampliamente relacionadas con la progresión tumoral (quimiorresistencia, metástasis y recaídas) (79). En este estudio hemos demostrado que ATF4 no solo se sobreexpresa en cultivos de mamíferos, y que se incrementa con cada generación, es decir, en cultivos enriquecidos en CSCs, sino que su silenciado reduce de forma significativa la capacidad de formación de esferas tumorales, tanto constitutiva como bajo estimulación con TGF β 1, así como de los marcadores de “stemness” NANOG, CD44, SOX2, OCT4 y CXCL10.

Recientemente se ha postulado que las células tumorales sin propiedades de “stemness” pueden transformarse en CSCs tras experimentar el proceso de EMT, bajo la influencia de señales procedentes del microambiente tumoral tales como TGF β 1, HGF o IL6 (79). Dado que existen evidencias que sugieren la existencia de una cooperación entre CSCs y EMT para producir células

tumorales circulantes (CTCs) que son altamente eficientes para la metástasis (80), no se puede desechar la posibilidad de que, en tumores avanzados, ATF4 se exprese bajo la influencia de la secreción de TGF β 1 por parte del microambiente tumoral. Éste regularía la expresión de proteínas inductoras de EMT, “*stemness*” y proliferación, relacionados con la génesis y mantenimiento de CSCs con un fenotipo proliferativo (ALDH1+), que permitiría la generación de CTCs para la colonización de órganos distantes a través de la aparición y progresión de recaídas metastásicas en pacientes con TNBC. Esto explicaría por qué ATF4 se encuentra sobreexpresado en CTCs de TNBC (81), que además están enriquecidas en genes de pluripotencia regulados por ATF4 como NANOG, OCT3/4 y SOX2 (82), y que están íntimamente relacionadas con la aparición de metástasis y recidivas tumorales (79).

En base a todos estos resultados, realizamos estudios *in vivo* empleando modelos xenógrafos derivados de pacientes (PDX) con TNBC en ratones inmunodeprimidos, para validar si la inhibición de ATF4 como diana terapéutica reduciría el crecimiento tumoral, la aparición de metástasis y recurrencia y, por tanto, se incrementaría la supervivencia de los animales. De acuerdo con ello, nuestros resultados demuestran que la depleción de ATF4 se tradujo en menores tasas de metástasis en pulmones e hígado, reducción del crecimiento tumoral y del número de poblaciones de CSCs ALDH1+, un retraso en la aparición de recidivas, y todo ello asociado a un aumento en la supervivencia de los animales. Hay que destacar que en el modelo BCM-3887, el cual es resistente al taxano docetaxel (53), observamos que el tratamiento combinado de docetaxel con inhibición de ATF4 reduce de forma significativa el crecimiento tumoral con respecto a la monoterapia con el taxano. Esto refuerza la hipótesis aquí

planteada que sugiere que la inhibición de ATF4 podría restablecer la sensibilidad a la quimioterapia, y que podría estar relacionada con la reducción de factores antiapoptóticos (BCL2 y MCL1), generación y mantenimiento de CSCs, y EMT. Estos efectos podrían deberse a la regulación de diversas vías de señalización: aquella de TGF β dependiente de SMADs, así como de otras alternativas, como sugieren los estudios anteriormente indicados y nuestros propios resultados en ausencia de estimulación con TGF β 1, siendo los responsables de la regulación otros factores de crecimiento (45,47,68,77,83,84). No obstante, estas hipótesis serán abordadas en profundidad en estudios futuros.

Como se ha indicado anteriormente, la expresión y activación de ATF4 está regulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional a través de procesos de traducción de proteínas (64). Según nuestros resultados, TGF β regula la expresión de ATF4 vía SMADs, y es muy probable que ésta se circunscriba a la transcripción, ya que no existen evidencias que indiquen que SMADs sean responsables de la traducción de proteínas. Por tanto, deben existir mecanismos alternativos que, inducidos por la activación de la señalización de TGF β , regulen ATF4 a nivel proteico.

La vía canónica por la que ATF4 ejerce su actividad biológica, tanto fisiológica como patológica, y que ha sido objeto de la inmensa mayoría de los estudios, es la respuesta integrada al estrés (ISR). Bajo la influencia de numerosos tipos de estrés (como hipoxia, falta de nutrientes, estrés del RE, entre otras) se activa la ISR, que regula la activación transcripcional y postranscripcional de ATF4, mediada en todos los casos por p-eIF2 α (11). Así, por ejemplo, bajo la batuta de la vía de señalización ISR inducida por PERK y/o GCN2, y mediada por eIF2 α ,

ATF4 es activado para controlar eventos como EMT y metástasis (62,85,86), tumorigénesis (87,88) y quimioresistencia (71,89). Las condiciones experimentales empleadas en nuestro estudio no están diseñadas para generar situaciones de estrés que puedan activar la ISR, por lo que, *a priori*, no cabría esperar que ATF4 sea activado a través de esta vía. No obstante, y puesto que la activación de la señalización de TGF β puede generar estrés oxidativo vía mitocondrial (90), que a su vez induce estrés del RE (91), no se puede excluir que los resultados que aquí observamos se deban a la inducción de ISR. Sin embargo, bajo las condiciones en ausencia de estrés y estimulación con TGF β 1 en células de TNBC, encontramos que la ISR no es la principal vía de expresión de ATF4, aunque determinados inductores como PERK y PKR en células SUM159PT, y GCN2 en MDA-MB-231 parecen tener cierta relevancia sobre la expresión de ATF4, pero sin depender de eIF2 α . Y es que, al contrario de lo ampliamente publicado previamente (62,71,86,87,92), nuestros hallazgos muestran que la expresión de ATF4 inducida por TGF β 1 no dependía de eIF2 α . De hecho, más allá de reducir los niveles de ATF4, el silenciado de eIF2 α estimuló su expresión con respecto al control. Y aún más, demostramos que la inhibición de PERK sólo redujo la fosforilación de eIF2 α en BT549 y MDA-MB-231, y además no hubo inhibición de los niveles de ATF4. Por el contrario, en las células SUM159PT, la inhibición de PERK y PKR se tradujo en un incremento en la fosforilación de eIF2 α y, sin embargo, se observó una reducción significativa de la expresión de ATF4. En conjunto, estos hallazgos demuestran que la expresión de ATF4 estimulada por TGF β es totalmente independiente de la vía canónica de ISR mediada por eIF2 α . Estas conclusiones están apoyadas por estudios previos en los que se observa que determinadas mutaciones en PIK3CA

promueven la activación de ATF4 mediante mecanismos alternativos e independientes de eIF2 α , concretamente a través de PDK1/RSK2, con la finalidad de reprogramar el metabolismo de la glutamina (84).

Por tanto, continuamos investigando qué otros mecanismos, independientes a eIF2 α , son los responsables de regular ATF4 en las tres líneas celulares de TNBC. En este sentido, además de las rutas canónicas dependientes de SMAD, existen otras vías de TGF β , o no canónicas, tales como PI3K, MAPK y TAK1 (13). Mediante el uso de inhibidores farmacológicos frente a PI3K, MAPK y TAK1, demostramos que la expresión de ATF4 en presencia de TGF β 1 está modulada a través de la ruta PI3K de forma consistente entre las líneas celulares testadas. El “*screening*” exhaustivo con inhibidores frente a diferentes miembros y ramificaciones de la señalización dependiente de PI3K, y bajo estimulación con TGF β 1, desveló que la vía de señalización común entre distintas líneas celulares destinada a la regulación de ATF4 estaba constituida por PI3K, mTOR y SGK1/2. De acuerdo con estudios anteriores en cáncer colorrectal (84), la implicación de este circuito sobre la expresión de ATF4 es independiente de la mediación de AKT. La presencia de mutaciones en PIK3CA que presenta la línea SUM159PT (7,93), explica que PDK1/RSK2 sea responsable, al menos en parte, de la regulación de ATF4 observada en esta línea celular.

Como hemos explicado anteriormente, nuestros resultados sugieren que, en presencia de TGF β 1, la vía de señalización que incluye PI3K, mTOR y SGK1/2 regula ATF4 de forma consistente en las distintas líneas celulares ensayadas. Nuestra hipótesis contempla dos fases en la regulación postranscripcional de ATF4 inducido por TGF β 1:

- *Fase 1: mTOR podría mediar la traducción de ATF4 a través de mTORC2.*

Está ampliamente descrito que mTORC1 es el único inductor de ATF4 dependiente de mTOR (74,83). Al contrario de las publicaciones anteriores, nuestros estudios revelan que mTORC2 lidera la regulación de ATF4 tras la estimulación con TGF β 1, mientras que el papel de mTORC1 parece depender del tipo celular, por lo que no se puede afirmar que éste sea el regulador maestro o principal. Esta divergencia entre estudios previos y el nuestro puede deberse a que los tipos celulares investigados son diferentes, no observan el efecto de mTORC2, incluso algunos observan dependencia de la respuesta celular al estrés, y no estudian la inducción de ATF4 bajo estimulación con TGF β . Así pues, estos estudios y el nuestro no son excluyentes, al contrario, sugieren que ATF4 integra funciones y respuestas encaminadas a regular el destino celular bajo la influencia de multitud de señales de estímulo.

mTORC2 actúa como mediador necesario en los procesos de EMT inducidos por TGF β a través de la fosforilación de AKT (Ser473) (46). La capacidad de mTORC2 de fosforilar AKT no solo constituye un circuito de retroalimentación positiva sobre mTORC1 (66), sino que además muestra que mTORC2 suele asociarse a ribosomas para asegurar la estabilidad de nuevas proteínas nacientes como AKT (94).

Está demostrado que mTORC1 modula la expresión transcripcional y regula la traducción de ATF4 de un modo independiente de eIF2 α (95). Por su parte, el papel de mTORC2 como regulador de la transcripción y/o traducción de ATF4, o si facilita su estabilidad mediante modificaciones postraduccionales no está claro. Como hemos indicado arriba, mTORC2 tiene la capacidad de asociarse a ribosomas, lo que incluso constituye un mecanismo alternativo a través del cual

puede activarse (96). Cabe destacar que estudios en cardiomiocitos han revelado que mTORC2 tiene la capacidad de formar un complejo con RPS6, la proteína ribosomal encargada de la traducción de ATF4 independiente de eIF2 α en respuesta a la activación de mTORC1. Esta asociación mTORC2/RPS6 media mecanismos de supervivencia celular en situaciones de ischemia en el caso de cardiomiocitos, y en hepatocarcinoma la alta expresión de RPS6 junto con mTORC2 se ha relacionado con un peor pronóstico (97,98). Este nexo entre mTORC2 y la traducción proteica mediante RPS6 podría constituir el mecanismo a través del cual se regula ATF4, y explicaría, al menos en parte, que sea independiente de AKT, PDK1, RSK2 y las mutaciones de PI3KCA, como hemos observado (**Figura 40**).

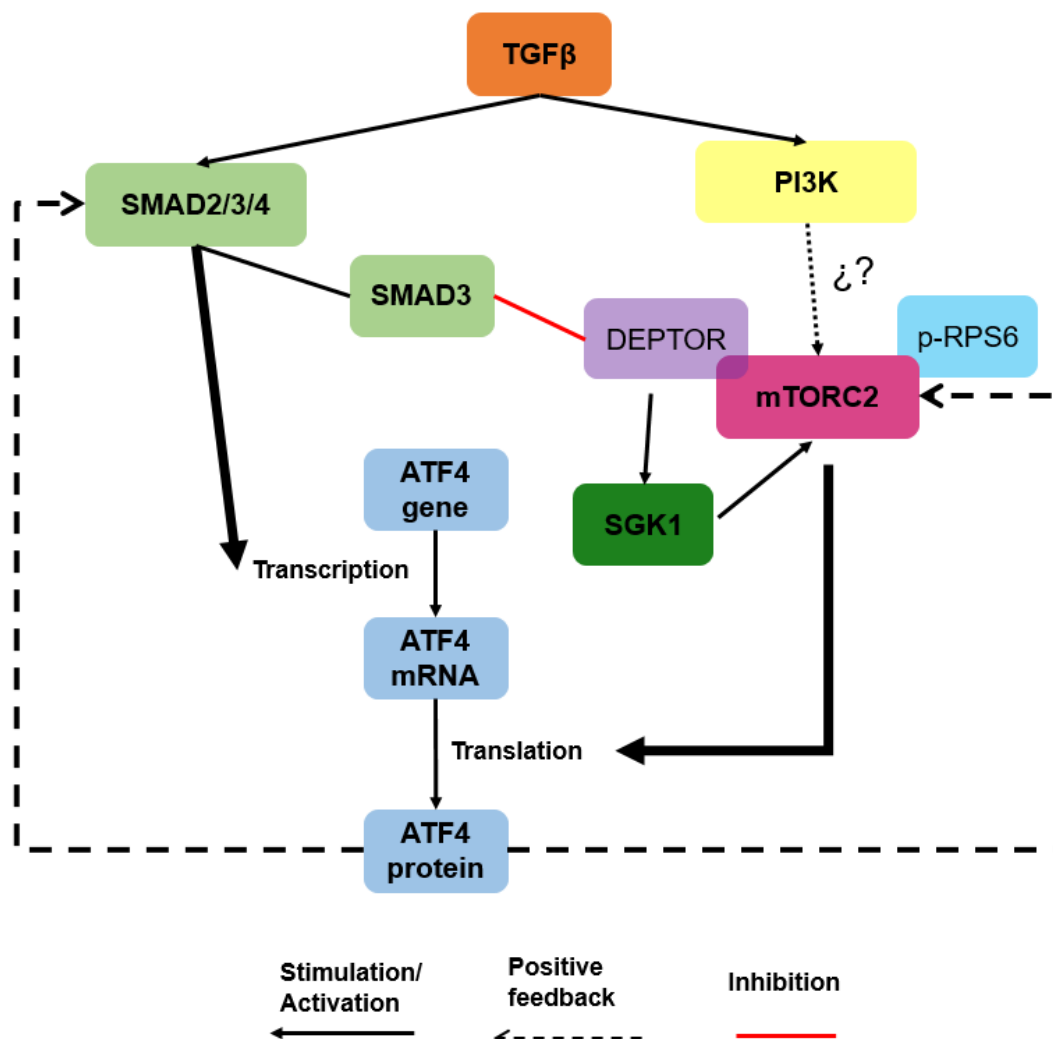


Figura 40. Esquema de la regulación de ATF4 por la ruta de TGF β canónica (SMAD2/3/4) y no canónica (PI3K/mTOR), junto con los mecanismos de retroalimentación positiva que este gen ejerce sobre los diferentes elementos de la misma.

Al igual que sucede en otras situaciones (71,95), y como hemos observado sobre SMAD2/3/4, en este estudio describimos la presencia de un circuito de retroalimentación positiva de ATF4 sobre mTORC1 y mTORC2 bajo activación de TGF β , lo que en su conjunto demuestra que tanto la transcripción como su traducción está estrictamente regulada. Esta retroalimentación positiva sobre mTORC1 podría reforzar la función de ATF4 sobre la supervivencia celular y resistencia a fármacos de las células tumorales a través de la inducción de MCL1 y BCL2 (77,99).

El circuito de retroalimentación positiva de ATF4 sobre mTORC2 se demuestra al observar una reducción de la expresión de sus dianas RAC1, RHOA y NDRG1 tras la inhibición de ATF4, destacando el prolongado bloqueo que se origina en los niveles de RAC1. Si bien RHOA y RAC1 son conocidos mediadores de eventos metastásicos promovidos por mTORC1 y mTORC2 (100), RAC1 además regula la actividad de ambos en respuesta a factores de crecimiento (101), sugiriendo que podría ser responsable de esta regulación dual de ATF4.

En nuestro estudio no es posible establecer la razón por la cual se induce la expresión de ATF4 dependiente de mTOR, ya que ni AKT ni PDK1, mediadores de la señalización iniciada por PI3K, parecen tener relación con ATF4. De hecho, una señal típica activadora de la cascada de señalización de PI3K mediada por TGF β , como es RAS, tampoco se postula como la responsable de la expresión de ATF4. Como hemos indicado anteriormente, mTORC2 actúa como mediador necesario en los procesos de EMT inducidos por TGF β (46), lo que podría

constituir el nexo entre TGF β y mTOR. Sin embargo, esta relación se produce a través de la fosforilación de AKT, por lo que no constituiría la razón más probable que explique nuestros hallazgos. Por lo tanto, debemos asumir la existencia de un mecanismo alternativo en el que TGF β podría transactivar mTOR, que sea independiente de AKT y, en el que probablemente PI3K no es indispensable. Se sabe que la señalización de TGF β /SMAD3 transactiva tanto a mTORC1 como mTORC2 a través de la inhibición de DEPTOR (102,103), ya que su pérdida activa P70S6K, AKT y SGK1, y que median la activación de mTORC1 y mTORC2 (104). Así pues, nuestra hipótesis indica que la vía de TGF β dependiente de SMADs podría, no solo inducir la transcripción de ATF4, sino provocar su traducción tras inhibir DEPTOR, con la consiguiente expresión de SGK1 que activaría mTORC2, regulando así la expresión de ATF4 que mediaría la EMT, motilidad celular, metástasis, pluripotencia y autorrenovación. Adicionalmente, la activación de mTORC2 puede favorecer la retroalimentación positiva sobre AKT, que incrementaría la transcripción y traducción de ATF4 por mTORC1 (**Figura 40**). Dicho circuito podría regularse gracias a los sistemas de feedback de ATF4 sobre mTOR y TGF β , a través de la regulación de SMAD2/3/4 y mTORC1/2-RHOA-RAC1 (100,105).

- *Fase 2: estabilización y persistencia de la proteína ATF4 a través de modificaciones postraduccionales mediadas por SGK1.*

ATF4 posee diversos sitios de fosforilación que facilitan su degradación y persistencia a través de E3 ubiquitina ligasas de la familia F-box como β TrCP o Skp2 (Fbx11) (106–108). El efecto regulador de ligasas tipo F-box como Skp2 sobre ATF4 se ha descrito inicialmente de forma indirecta, es decir, al observar

su sobreexpresión en ausencia de una determinada ligasa (109). De forma similar, se ha descrito que en ausencia de Fbw7 (o Fbxw7), una ligasa tipo F-box como β TrCP y Skp2, que es considerado un supresor tumoral al regular la degradación de oncogenes como MYC o JUN (110,111), y que está asociado a mTOR, su pérdida induce la sobreexpresión de ATF4 en presencia de radiación ionizante y rapamicina, algo que no sucede cuando Fbxw7 está presente. Así pues, esto sugiere que Fbxw7 podría influir en la degradación de ATF4. La relación entre ATF4 y Fbxw7 se ha estudiado solo en un sentido, es decir, que ATF4 inhibe Fbxw7, permitiendo así la estabilización de MYCN (38), sin embargo, si Fbxw7 promueve la degradación directa de ATF4 es desconocido. A pesar de esto, sí se ha descrito que RICTOR, componente imprescindible de mTORC2, se degrada por el proteasoma vía ubiquitinación mediada por Fbxw7 (112), y puesto que nuestros resultados indican que ATF4 se regula principalmente a través de mTORC2, cabría esperar que la degradación de RICTOR mediada por Fbxw7 afecte de forma indirecta a la traducción de ATF4. Junto a esto, es conocido que SGK1 puede promover la estabilidad o inducir la degradación de diversas proteínas como Notch1, GSK3 β , canales de potasio, transportadores de glutamina, así como otras proteínas de membrana a través de la fosforilación (activadora o inhibidora) de E3 ubiquitina ligasas como Nedd4-2 o Fbw7 (113–115). Por tanto, existen suficientes evidencias que permiten establecer una relación plausible entre SGK1 y la estabilidad de ATF4 a través de la modulación de ligasas tipo F-box como Fbxw7, que podría a su vez modular la degradación de ATF4, bien sea de forma directa o indirecta a través de RICTOR. No obstante, tal relación no se ha descrito y no deja de ser una hipótesis, incluso podría ser casual. Sin embargo, debería ser validada en futuros

estudios para avanzar en el descifrado de los mecanismos reguladores de ATF4 y, por ende, de sus efectos fisiológicos y patológicos.

Estudios recientes demuestran que la identificación de patrones que predicen la activación de determinadas vías de señalización, usando firmas génicas y considerando las interacciones proteicas en la cascada de señalización, es una alternativa viable para conseguir un tratamiento personalizado en TNBC (116). En nuestro estudio asumimos esta estrategia y, tras demostrar que ATF4 está relacionado con las rutas de TGF β /SMAD y TGF β /PI3K/mTOR, identificamos una firma compuesta por 8 genes (ATF4, TGFBR1, SMAD4, PIK3CA, RPTOR, EIF4EBP1, RICTOR y NDRG1) que puede pronosticar la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama, específicamente los ER- y aquellos del subtipo intrínseco basal. Además, la expresión de esta firma génica estaba alterada en el 45% de sujetos de una cohorte de 2509 pacientes con cáncer de mama, característica que se correlacionó con menores índices de supervivencia. Por tanto, el empleo de esta firma génica para la estratificación de las pacientes con cáncer de mama, especialmente de aquellos ER-, puede ser una estrategia apropiada no sólo para el diseño de terapias dirigidas efectivas con el objetivo de reducir el tamaño tumoral, aparición de metástasis y riesgo de recidivas, sino también para la identificación de potenciales pacientes sensibles a los tratamientos diseñados.

Son varios los estudios que se han llevado a cabo en los últimos años en los que el uso de firmas génicas permite mejorar el diagnóstico y el tratamiento de diferentes tumores. Uno de los ejemplos más conocidos de firma génica estudiados en cáncer de mama es PAM50, que engloba a 50 genes. Ésta se ha

empleado para clasificar los tumores de mama, intentar predecir el pronóstico y la agresividad tumoral, si presentan resistencia a diferentes fármacos, aplicando así una medicina de precisión para cada paciente, e intentar ofrecer el tratamiento óptimo para cada una de ellas (3,8,117).

Quist *et al.*, (2019), al analizar una cohorte de 1168 pacientes con TNBC, observaron una firma génica de cuatro genes: EXO1, TP53BP2, FOXM1 y RSU1; relacionados con inestabilidad génica, crecimiento celular anómalo/maligno y respuesta frente a tratamientos. La presencia de esta firma génica les permitió clasificar qué pacientes con TNBC podían ser sensibles a agentes quimioterapéuticos de derivados del platino (118). Otro ejemplo de firma génica empleada para evaluar el pronóstico de pacientes de TNBC es el que proponen Alsaleem *et al.*, (2020). Se ha observado que debido a la heterogeneidad celular y la variabilidad en la naturaleza de los tumores de TNBC, un 23% de las pacientes con un diagnóstico precoz están libres de recaídas y metástasis en órganos y tejidos lejanos durante más de 5 años, mientras que aquellas con un diagnóstico de TNBC metastásico fallecen por lo general a los 5 años. Por ello, gracias a las nuevas técnicas de secuenciación masiva (NGS, Next Generation Sequencing), analizaron 333 muestras de pacientes, y observaron que de las múltiples alteraciones génicas que presentaban todos los tumores, la sobreexpresión de ACMS4 y SPDYC están relacionadas con un peor pronóstico. Alsaleem *et al.*, proponen usar esta firma génica para desarrollar test rápidos (al ser únicamente 2 genes, pero fiables) para el pronóstico de las pacientes, y además, proponen en futuros estudios, un ensayo con pacientes en las cuales se corrobore si la baja expresión de ACMS4 puede ser indicativo de no necesitar

tratamientos quimioterapéuticos, sin que ello implique un resultado peor en las pacientes (119).

Actualmente, diferentes equipos de investigación, entre ellos el nuestro, investigan nuevas dianas y terapias dirigidas que puedan emplearse en los diferentes tipos de tumores. En el caso de la relación entre la ISR y el cáncer, se han estudiado y propuesto diferentes estrategias *in vitro* y en modelos animales para bloquear los diferentes intermediarios de esta ruta de señalización, con el objetivo de reducir la agresividad de los tumores mediada por la ISR a través de eIF α /ATF4 (11,120,121).

Y puesto que la expresión de ATF4, ya sea dependiente de la ISR, o de forma independiente (mediada por TGF β) cómo hemos demostrado en este trabajo, influye en la agresividad y tumorigénesis de TNBC, el “*screening*” de nuevos compuestos que tengan como diana este gen puede ser una interesante estrategia que abordar para la lucha contra el TNBC, así como otros tumores en los que ATF4 pueda estar involucrado. Actualmente, no existe ningún fármaco o agente terapéutico en el mercado que tenga como diana específica ATF4, por lo que éste, podría y es, el punto de partida de futuros estudios que nuestro grupo va a llevar a cabo, y conseguir así una traslación a la clínica de todos estos datos y resultados.

VI. Conclusiones.

1.- Queda demostrada y corroborada la relación entre una mayor expresión de ATF4 y un peor pronóstico en las pacientes con cáncer de mama, en especial en TNBC.

2.- Por primera vez hemos demostrado en líneas celulares de TNBC, como la sobreexpresión de ATF4 inducida por TGF β 1 depende de la interacción directa de SMAD2/3 a la región promotora de ATF4, y en contraste con estudios previos, es independiente de la ISR.

3.- La expresión y actividad de ATF4 estimulada por TGF β 1 está principalmente regulada a través de las rutas TGF β /SMAD2/3/4 y TGF β /PI3K/mTORC2-RHOA-RAC1, integrándolas y modulándolas a través de circuitos de “*feedback*” positivos.

4.- ATF4 actúa como intermediario de la progresión tumoral del TNBC regulada por la ruta de TGF β a varios niveles.

5.- La inhibición de ATF4 reduce los procesos de migración, invasión y proliferación en las líneas celulares de TNBC.

6.- El bloqueo de la expresión de ATF4 conlleva la inhibición de marcadores e inductores del proceso de EMT.

7.- La inhibición de ATF4 afecta a la población de CSCs, puesto que se reduce la capacidad de generar mamosferas y disminuye la expresión de marcadores de “*stemness*” en líneas celulares de TNBC.

8.- En modelos animales PDX de TNBC, la inhibición de ATF4 reduce la aparición de metástasis en pulmones e hígado, el crecimiento tumoral y la población de CSCs ALDH+. Al mismo tiempo, bloquear la expresión de ATF4 en combinación con docetaxel tuvo un mejor efecto terapéutico que el tratamiento con el agente quimioterapéutico únicamente, con el consiguiente incremento de la supervivencia de los animales.

9.- Se propone una firma génica compuesta por 8 genes (ATF4, TGFBR1, SMAD4, PIK3CA, RPTOR, EIF4EBP1, RICTOR y NDRG1) con valor pronóstico en pacientes con cáncer de mama, que puede ayudar al diseño de terapias dirigidas combinadas, identificar las pacientes respondedoras, así como predecir y ayudar a superar la resistencia al tratamiento.

10.- En definitiva, todos estos resultados podrían ser útiles en el campo de la medicina personalizada y de precisión, mejorando así la eficacia de los diagnósticos y la toma de decisiones para el tratamiento de las pacientes de cáncer de mama. Este trabajo es el primero en demostrar el potencial de ATF4 como un nuevo biomarcador pronóstico y diana terapéutica frente al cáncer de mama triple negativo.

IX. Bibliografía.

1. <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>
2. Kondov B, Milenkovic Z, Kondov G, Petrushevska G, Basheska N, Bogdanovska-Todorovska M, et al. Presentation of the Molecular Subtypes of Breast Cancer Detected By Immunohistochemistry in Surgically Treated Patients. *Open access Maced J Med Sci.* 2018;6(6):961–7.
3. Cejalvo JM, Pascual T, Fernández-Martínez A, Brasó-Maristany F, Gomis RR, Perou CM, et al. Clinical implications of the non-luminal intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2018;67:63–70.
4. Jitariu A-A, Cîmpean AM, Ribatti D, Raica M. Triple negative breast cancer: the kiss of death. *Oncotarget.* 2017;8(28):46652–62.
5. Hon JDC, Singh B, Sahin A, Du G, Wang J, Wang VY, et al. Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *Am J Cancer Res.* 2016;6(9):1864–72.
6. Lee A, Djamgoz MBA. Triple negative breast cancer: Emerging therapeutic modalities and novel combination therapies. *Cancer Treat Rev.* 2018;62:110–22.
7. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750–67.

8. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada M V., Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. Sapino A, editor. PLoS One. 2016;11(6):e0157368.
9. Pareja F, Geyer FC, Marchiò C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. NPJ Breast Cancer. 2016;2(1):16036.
10. Brooks MD, Burness ML, Wicha MS. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. Cell Stem Cell. 2015;17(3):260–71.
11. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljubic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. EMBO Rep. 2016;17(10):1374–95.
12. Khan MA, Jain VK, Rizwanullah M, Ahmad J, Jain K. PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in triple-negative breast cancer: a review on drug discovery and future challenges. Drug Discov Today. 2019;00(00):1–10.
13. Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFβ: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6(7):506–20.
14. Bholá NE, Balko JM, Dugger TC, Kuba MG, Sánchez V, Sanders M, et al. TGF-β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. J Clin Invest. 2013;123(3):1348–58.
15. Bai X, Ni J, Beretov J, Graham P, Li Y. Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance. Cancer Treat Rev. 2018;69:152–63.
16. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. J Natl Cancer Inst. 2008;100(9):672–9.

17. Li L, Liu CC, Chen X, Xu S, Cortes-Manno SH, Cheng SH. Mechanistic study of bakuchiol-induced anti-breast cancer stem cell and in vivo anti-metastasis effects. *Front Pharmacol.* 2017;8:1–10.
18. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420–8.
19. McFarlane S, Coulter JA, Tibbits P, O’Grady A, McFarlane C, Montgomery N, et al. CD44 increases the efficiency of distant metastasis of breast cancer. *Oncotarget.* 2015;6(13):11465–76.
20. Horimoto Y, Arakawa A, Sasahara N, Tanabe M, Sai S, Himuro T, et al. Combination of cancer stem cell markers CD44 and CD24 is superior to ALDH1 as a prognostic indicator in breast cancer patients with distant metastases. *PLoS One.* 2016;11(10):1–11.
21. Li W, Ma H, Zhang J, Zhu L, Wang C, Yang Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–15.
22. Resetkova E, Reis-Filho JS, Jain RK, Mehta R, Thorat MA, Nakshatri H, et al. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: A story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123(1):97–108.
23. Croker AK, Rodriguez-Torres M, Xia Y, Pardhan S, Leong HS, Lewis JD, et al. Differential functional roles of ALDH1A1 and ALDH1A3 in mediating metastatic behavior and therapy resistance of human breast cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):1–18.
24. Krebsbach PH, Villa-Diaz LG. The Role of Integrin $\alpha 6$ (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells Dev.* 2017;26(15):1090–9.

25. Gómez-Miragaya J, Palafox M, Paré L, Yoldi G, Ferrer I, Vila S, et al. Resistance to Taxanes in Triple-Negative Breast Cancer Associates with the Dynamics of a CD49f+ Tumor-Initiating Population. *Stem Cell Reports*. 2017;8(5):1392–407.
26. Gomez-Miragaya J, González-Suárez E. Tumor-initiating CD49f cells are a hallmark of chemoresistant triple negative breast cancer. *Mol Cell Oncol*. 2017;4(4):e1338208.
27. Wuputra K, Lin C-S, Tsai M-H, Ku C-C, Lin W-H, Yang Y-H, et al. Cancer cell reprogramming to identify the genes competent for generating liver cancer stem cells. *Inflamm Regen*. 2017;37(1):1–7.
28. Friedmann-Morvinski D, Verma IM. Dedifferentiation and reprogramming: Origins of cancer stem cells. *EMBO Rep*. 2014;15(3):244–53.
29. Ameri K, Harris AL. Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(1):14–21.
30. Eleftheriou F, Benson MD, Sowa H, Starbuck M, Liu X, Ron D, et al. ATF4 mediation of NF1 functions in osteoblast reveals a nutritional basis for congenital skeletal dysplasias. *Cell Metab*. 2006;4(6):441–51.
31. St-Arnaud R, Hekmatnejad B. Combinatorial control of ATF4-dependent gene transcription in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1237(1):11–8.
32. Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*. 2007;12(8):3068–92.
33. Schinke T, Karsenty G. Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation and Function. *Princ Bone Biol Two-Volume Set*. 2008;1:109–19.

34. Lian N, Lin T, Liu W, Wang W, Li N, Sun S, et al. Transforming growth factor β suppresses osteoblast differentiation via the vimentin activating transcription factor 4 (ATF4) axis. *J Biol Chem*. 2012;287(43):35975–84.
35. Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I. The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med*. 2016;16(6):533–44.
36. Dorrello N V., Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1- and TRCP-Mediated Degradation of PDCD4 Promotes Protein Translation and Cell Growth. *Science*. 2006;314(5798):467–71.
37. Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(9):5043–8.
38. Xia Y, Ye B, Ding J, Yu Y, Alptekin A, Thangaraju M, et al. Metabolic Reprogramming by MYCN Confers Dependence on the Serine-Glycine-One-Carbon Biosynthetic Pathway. *Cancer Res*. 2019;79(15):3837–50.
39. Nikolaou S, Machesky LM. The stressful tumour environment drives plasticity of cell migration programmes, contributing to metastasis. *J Pathol*. 2020;250(5):612-623.
40. Chen M, Xie S. Therapeutic targeting of cellular stress responses in cancer. *Thorac Cancer*. 2018;9(12):1575–82.
41. Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Cancer*. 2019;18(1):157.

42. Rzymiski T, Milani M, Singleton DC, Harris AL. Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. *Cell Cycle*. 2009;8(23):3838–47.
43. Liu C, Li Z, Wang L, Tong L, He N, Chen Y, et al. Activating Transcription Factor 4 Promotes Angiogenesis of Breast Cancer through Enhanced Macrophage Recruitment. *Biomed Res Int*. 2015;2015:974615.
44. Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, Blanco E, Choi DS, Qian W, et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):25.
45. Zhu H, Chen X, Chen B, Chen B, Song W, Sun D, et al. Activating transcription factor 4 promotes esophageal squamous cell carcinoma invasion and metastasis in mice and is associated with poor prognosis in human patients. *PLoS One*. 2014;9(7):e103882.
46. Lamouille S, Connolly E, Smyth JW, Akhurst RJ, Derynck R. TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *J Cell Sci*. 2012;125:1259–73.
47. Lian N, Lin T, Liu W, Wang W, Li L, Sun S, et al. Transforming growth factor β suppresses osteoblast differentiation via the vimentin activating transcription factor 4 (ATF4) axis. *J Biol Chem*. 2012;287(43):35975–84.
48. Cruz-Lozano M, González-González A, Marchal JA, Muñoz-Muela E, Molina MP, Cara FE, et al. Hydroxytyrosol inhibits cancer stem cells and the metastatic capacity of triple-negative breast cancer cell lines by the simultaneous targeting of epithelial-to-mesenchymal transition, Wnt/ β -catenin and TGF β signaling pathways. *Eur J Nutr*. 2019;58(8):3207–19.

49. Dave B, Granados-Principal S, Zhu R, Benz S, Rabizadeh S, Soon-Shiong P, et al. Targeting RPL39 and MLF2 reduces tumor initiation and metastasis in breast cancer by inhibiting nitric oxide synthase signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(24):8838–43.
50. Cheung KJ, Padmanaban V, Silvestri V, Schipper K, Cohen JD, Fairchild AN, et al. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(7):E854-63.
51. Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, Wold B. Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science*. 2007;316(5830):1497–502.
52. Choi DS, Blanco E, Kim Y-S, Rodriguez AA, Zhao H, Huang TH-M, et al. Chloroquine eliminates cancer stem cells through deregulation of Jak2 and DNMT1. *Stem Cells*. 2014;32(9):2309–23.
53. Zhang X, Claerhout S, Prat A, Dobrolecki LE, Petrovic I, Lai Q, et al. A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res*. 2013;73(15):4885–97.
54. Vivas-Mejia P, Benito JM, Fernandez A, Han H-D, Mangala L, Rodriguez-Aguayo C, et al. c-Jun-NH2-kinase-1 inhibition leads to antitumor activity in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(1):184–94.
55. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401–4.

56. Mihály Z, Kormos M, Lánckzy A, Dank M, Budczies J, Szász MA, et al. A meta-analysis of gene expression-based biomarkers predicting outcome after tamoxifen treatment in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;140(2):219–32.
57. Fjeldbo CS, Julin CH, Lando M, Forsberg MF, Aarnes E-K, Alsner J, et al. Integrative Analysis of DCE-MRI and Gene Expression Profiles in Construction of a Gene Classifier for Assessment of Hypoxia-Related Risk of Chemoradiotherapy Failure in Cervical Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(16):4067–76.
58. Jovanović B, Beeler JS, Pickup MW, Chytil A, Gorska AE, Ashby WJ, et al. Transforming growth factor beta receptor type III is a tumor promoter in mesenchymal-stem like triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014;16(4):R69.
59. Principe DR, Doll JA, Bauer J, Jung B, Munshi HG, Bartholin L, et al. TGF- β : Duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(2):1–16.
60. Martin-Malpartida P, Batet M, Kaczmarek Z, Freier R, Gomes T, Aragón E, et al. Structural basis for genome wide recognition of 5-bp GC motifs by SMAD transcription factors. *Nat Commun.* 2017;8(1):2070.
61. Dey S, Sayers CM, Verginadis II, Lehman SL, Cheng Y, Cerniglia GJ, et al. ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *J Clin Invest.* 2015;125(7):2592–608.
62. Liu L, Yang L, Yan W, Zhai J, Pizzo DP, Chu P, et al. Chemotherapy induces breast cancer stemness in association with dysregulated monocytosis. *Clin Cancer Res.* 2018;24(10):2370–82.

63. Singleton DC, Harris AL. Targeting the ATF4 pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(12):1189–202.
64. Grusch M, Petz M, Metzner T, Oztürk D, Schneller D, Mikulits W. The crosstalk of RAS with the TGF- β family during carcinoma progression and its implications for targeted cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10(8):849–57.
65. Efeyan A, Sabatini DM. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):169–76.
66. Fan C-F, Mao X-Y, Wang E-H. Elevated p-CREB-2 (ser 245) expression is potentially associated with carcinogenesis and development of breast carcinoma. *Mol Med Rep*. 2012;5(2):357–62.
67. van Geldermalsen M, Wang Q, Nagarajah R, Marshall AD, Thoeng A, Gao D, et al. ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2016;35(24):3201–8.
68. Idowu MO, Kmiecik M, Dumur C, Burton RS, Grimes MM, Powers CN, et al. CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Hum Pathol*. 2012;43(3):364–73.
69. Cruz-Lozano M, González-González A, Cara FE, Grana- S. Recent Studies & Advances in Breast Cancer. Chapter 3: Targeted Therapies in Triple Negative Breast Cancer: Current Knowledge and Perspectives. OPEN ACCESS eBooks. 2018;2:1-17.

70. Dekervel J, Bulle A, Windmolders P, Lambrechts D, Van Cutsem E, Verslype C, et al. Acriflavine Inhibits Acquired Drug Resistance by Blocking the Epithelial-to-Mesenchymal Transition and the Unfolded Protein Response. *Transl Oncol.* 2017;10(1):59–69.
71. Sundqvist A, Morikawa M, Ren J, Vasilaki E, Kawasaki N, Kobayashi M, et al. JUNB governs a feed-forward network of TGF β signaling that aggravates breast cancer invasion. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(3):1180–95.
72. Liu Z, Gu H, Gan L, Xu Y, Feng F, Saeed M, et al. Reducing Smad3/ATF4 was essential for Sirt1 inhibiting ER stress-induced apoptosis in mice brown adipose tissue. *Oncotarget.* 2017;8(6):9267–79.
73. Karner CM, Lee S-Y, Long F. Bmp Induces Osteoblast Differentiation through both Smad4 and mTORC1 Signaling. *Mol Cell Biol.* 2017;37(4): e00253-16.
74. Yin X, Wolford CC, Chang Y-S, McConoughey SJ, Ramsey SA, Aderem A, et al. ATF3, an adaptive-response gene, enhances TGF β signaling and cancer-initiating cell features in breast cancer cells. *J Cell Sci.* 2010;123:3558–65.
75. Hu J, Dang N, Menu E, De Bryune E, Xu D, Van Camp B, et al. Activation of ATF4 mediates unwanted Mcl-1 accumulation by proteasome inhibition. *Blood.* 2012;119(3):826–37.
76. Zhu H, Xia L, Zhang Y, Wang H, Xu W, Hu H, et al. Activating transcription factor 4 confers a multidrug resistance phenotype to gastric cancer cells through transactivation of SIRT1 expression. *PLoS One.* 2012;7(2):e31431.

77. Park S-Y, Kim M-J, Park S-A, Kim J-S, Min K-N, Kim D-K, et al. Combinatorial TGF- β attenuation with paclitaxel inhibits the epithelial-to-mesenchymal transition and breast cancer stem-like cells. *Oncotarget*. 2015;6(35):37526–37543.
78. Hernández-Camarero P, Jiménez G, López-Ruiz E, Barungi S, Marchal JA, Perán M. Revisiting the dynamic cancer stem cell model: Importance of tumour edges. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;131:35–45.
79. Charpentier M, Martin S. Interplay of Stem Cell Characteristics, EMT, and Microtentacles in Circulating Breast Tumor Cells. *Cancers (Basel)*. 2013;5(4):1545–65.
80. Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani F, Madden MW, Donaldson MC, et al. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*. 2014;345(6193):216–20.
81. Apostolou P, Toloudi M, Chatziioannou M, Ioannou E, Pappasotiriou I. Cancer Stem Cells Stemness Transcription Factors Expression Correlates with Breast Cancer Disease Stage. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7(6):415–9.
82. Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJH, Asara JM, Manning BD. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*. 2016 Feb 12;351(6274):728–33.
83. Hao Y, Samuels Y, Li Q, Krokowski D, Guan B-J, Wang C, et al. Oncogenic PIK3CA mutations reprogram glutamine metabolism in colorectal cancer. *Nat Commun*. 2016;7:11971.
84. Feng Y-X, Sokol ES, Del Vecchio CA, Sanduja S, Claessen JHL, Proia TA, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2 α and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Discov*. 2014;4(6):702–15.

85. Nagelkerke A, Bussink J, Mujcic H, Wouters BG, Lehmann S, Sweep FCGJ, et al. Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response. *Breast Cancer Res.* 2013;15(1):R2.
86. Bobrovnikova-Marjon E, Grigoriadou C, Pytel D, Zhang F, Ye J, Koumenis C, et al. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene.* 2010;29(27):3881–95.
87. Wu H, Wei L, Fan F, Ji S, Zhang S, Geng J, et al. Integration of Hippo signalling and the unfolded protein response to restrain liver overgrowth and tumorigenesis. *Nat Commun.* 2015;6:6239.
88. Nagasawa I, Kunimasa K, Tsukahara S, Tomida A. BRAF-mutated cells activate GCN2-mediated integrated stress response as a cytoprotective mechanism in response to vemurafenib. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(4):1491–7.
89. Liu RM, Desai LP. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biol.* 2015;6:565–77.
90. Chaurasia M, Gupta S, Das A, Dwarakanath BS, Simonsen A, Sharma K. Radiation induces EIF2AK3/PERK and ERN1/IRE1 mediated pro-survival autophagy. *Autophagy.* 2019;15(8):1391–406.
91. Liu X, Lv Z, Zou J, Liu X, Ma J, Wang J, et al. Afatinib down-regulates MCL-1 expression through the PERK-eIF2 α -ATF4 axis and leads to apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2016;6(8):1708–19.

92. Anderson GR, Wardell SE, Cakir M, Crawford L, Leeds JC, Nussbaum DP, et al. PIK3CA mutations enable targeting of a breast tumor dependency through mTOR-mediated MCL-1 translation. *Sci Transl Med.* 2016;8(369):369ra175.
93. Oh WJ, Wu C, Kim SJ, Facchinetti V, Julien L-A, Finlan M, et al. mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J.* 2010;29(23):3939–51.
94. Park Y, Reyna-Neyra A, Philippe L, Thoreen CC. mTORC1 Balances Cellular Amino Acid Supply with Demand for Protein Synthesis through Post-transcriptional Control of ATF4. *Cell Rep.* 2017;19(6):1083–90.
95. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. Activation of mTORC2 by Association with the Ribosome. *Cell.* 2011;144(5):757–68.
96. Yano T, Ferlito M, Aponte A, et al. Pivotal role of mTORC2 and involvement of ribosomal protein S6 in cardioprotective signaling. *Circ Res.* 2014;114(8):1268-1280.
97. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, et al. Pivotal Role of mTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *YGAST.* 2008;135(6):1972-1983.
98. Pugazhenti S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, et al. Akt/Protein Kinase B Up-regulates Bcl-2 Expression through cAMP-response Element-binding Protein. *J Biol Chem.* 2000;275(15):10761–6.
99. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, et al. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res.* 2011;71(9):3246–56.

100. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, et al. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res.* 2011;71(9):3246–56.
101. Saci A, Cantley LC, Carpenter CL. Rac1 Regulates the Activity of mTORC1 and mTORC2 and Controls Cellular Size. *Mol Cell.* 2011;42(1):50–61.
102. Das F, Ghosh-Choudhury N, Bera A, Dey N, Abboud HE, Kasinath BS, et al. Transforming growth factor β integrates Smad 3 to mechanistic target of rapamycin complexes to arrest dector abundance for glomerular mesangial cell hypertrophy. *J Biol Chem.* 2013;288(11):7756–68.
103. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, et al. DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell.* 2009;137(5):873–86.
104. Yu JSL, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development.* 2016;143(17):3050–60.
105. Lassot I, Ségéral E, Berlioz-Torrent C, Durand H, Groussin L, Hai T, et al. ATF4 Degradation Relies on a Phosphorylation-Dependent Interaction with the SCF β TrCPUbiquitin Ligase. *Mol Cell Biol.* 2001;21(6):2192–202.
106. Frank CL, Ge X, Xie Z, Zhou Y, Tsai L-H. Control of Activating Transcription Factor 4 (ATF4) Persistence by Multisite Phosphorylation Impacts Cell Cycle Progression and Neurogenesis. *J Biol Chem.* 2010;285(43):33324–37.

107. Gong J, Zhou Y, Liu D, Huo J. F-box proteins involved in cancer-associated drug resistance. *Oncol Lett.* 2018;15(6):8891–8900.
108. Lin H-K, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee S-W, Chan C-H, et al. Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature.* 2010;464(7287):374–9.
109. Gao M, Karin M. Regulating the Regulators: Control of Protein Ubiquitination and Ubiquitin-like Modifications by Extracellular Stimuli. *Mol Cell.* 2005;19(5):581–93.
110. Mészáros B, Kumar M, Gibson TJ, Uyar B, Dosztányi Z. Degrons in cancer. *Sci Signal.* 2017;10(470):eaak9982.
111. Koo J, Wu X, Mao Z, Khuri FR, Sun S-Y. Rictor Undergoes Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)-dependent, FBXW7-mediated Ubiquitination and Proteasomal Degradation. *J Biol Chem.* 2015;290(22):14120–9.
112. Mo J-S, Ann E-J, Yoon J-H, Jung J, Choi Y-H, Kim H-Y, et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) controls Notch1 signaling by downregulation of protein stability through Fbw7 ubiquitin ligase. *J Cell Sci.* 2011;124(1):100–12.
113. Failor KL, Desyatnikov Y, Finger LA, Firestone GL. Glucocorticoid-Induced Degradation of Glycogen Synthase Kinase-3 Protein Is Triggered by Serum- and Glucocorticoid-Induced Protein Kinase and Akt Signaling and Controls β -Catenin Dynamics and Tight Junction Formation in Mammary Epithelial Tumor Cells. *Mol Endocrinol.* 2007;21(10):2403–15.
114. Di Cristofano A. SGK1: The Dark Side of PI3K Signaling. In: *Current Topics in Developmental Biology.* 2017;123:49–71.

115. Jhan J-R, Andrechek ER. Effective personalized therapy for breast cancer based on predictions of cell signaling pathway activation from gene expression analysis. *Oncogene*. 2017;36(25):3553–61.
116. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, Dowidar N, Schaper C, Ferree S, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics*. 2015;8:54.
117. Quist J, Mirza H, Cheang MCU, Telli ML, Lord CJ, Tutt ANJ, et al. Association of a four-gene decision tree signature with response to platinum-based chemotherapy in patients with triple negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2017 May 20;35(15):1006–1006.
118. Alsaleem MA, Ball G, Toss MS, Raafat S, Aleskandarany M, Joseph C, et al. A novel prognostic two-gene signature for triple negative breast cancer. *Mod Pathol*. 2020; Online ahead of print.
119. Wortel IMN, van der Meer LT, Kilberg MS, van Leeuwen FN. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(11):794–806.
120. Guo L, Chi Y, Xue J, Ma L, Shao Z, Wu J. Phosphorylated eIF2 α predicts disease-free survival in triple-negative breast cancer patients. *Sci Rep*. 2017;7(1):44674.

