



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**



Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer Universidad de Salamanca

Departamento de Biología Molecular y Celular del Cáncer

Importancia de la ruta de Mek5/Erk5 en cáncer de mama

María Jesús Ortiz Ruiz

2011

Dña. Azucena Esparís Ogando, Doctora en Ciencias Biológicas y D. Atanasio Pandiella Alonso, Investigador Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Importancia de la ruta de Mek5/Erk5 en cáncer de mama” presentada por la licenciada Dña. María Jesús Ortiz Ruiz ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expiden el presente certificado en Salamanca, a 6 de Junio de 2011.

Fdo. Azucena Esparís Ogando

Fdo. Atanasio Pandiella Alonso

Indice

Índice

| | |
|---|----|
| Abreviaturas..... | 9 |
| Introducción..... | 15 |
| 1. La glándula mamaria: estructura y desarrollo..... | 17 |
| 2. El cáncer de mama..... | 17 |
| 2.1 Tumores de mama BENIGNOS y tumores MALIGNOS..... | 18 |
| 2.2 Alteraciones genéticas | 20 |
| 2.3. Clasificación actual del cáncer de mama..... | 22 |
| 2.3.1 Clasificación según el perfil molecular..... | 23 |
| - Luminal A y B | 23 |
| - HER2..... | 24 |
| - Basal-like | 25 |
| - Normal breast-like o no clasificados..... | 26 |
| 2.3.2 Clasificación mediante inmunohistoquímica..... | 26 |
| 3. Receptores tirosina quinasa de la familia ErbB..... | 28 |
| 3.1 Estructura y activación..... | 29 |
| 3.2 Vías de señalización intracelular..... | 30 |
| 4. Vía de señalización de MAPKs..... | 31 |
| 4.1 Generalidades..... | 31 |
| 4.2 Organización de las vías de MAPKs: Módulo de tres quinasas..... | 32 |
| 4.3 Regulación de MAPKs..... | 33 |
| 5. La vía de transducción de señales Erk5..... | 34 |
| 5.1 Identificación de Erk5..... | 34 |
| 5.2. Estructura..... | 35 |
| 5.3 Dominios funcionales..... | 36 |
| 5.4 Cola C-terminal: implicación en la activación y localización subcelular | |

| | |
|--|----|
| de Erk5..... | 37 |
| 5.5 Activación de la vía de Erk5..... | 38 |
| 5.5.1 Proteínas “aguas arriba” de Erk5..... | 38 |
| 5.5.2 Proteínas adaptadoras..... | 41 |
| 5.5.3 Proteínas implicadas en su desactivación..... | 41 |
| 5.5.4 Sustratos..... | 42 |
| 5.5.5 Inhibidores..... | 44 |
| 5.6 Papel fisiológico de Erk5..... | 46 |
| 5.6.1 Erk5 en el desarrollo cardiovascular..... | 46 |
| 5.6.2 Erk5 en proliferación y ciclo celular..... | 46 |
| 5.6.3 Erk5 en otros tejidos y situaciones patológicas..... | 47 |
| 5.7 Erk5 y Cáncer..... | 48 |
| 5.7.1 Erk5 y Cáncer de mama..... | 49 |
| 6. Terapias dirigidas en cáncer de mama..... | 51 |
| 6.1 Terapia Hormonal..... | 51 |
| 6.2 Terapia anti-HER2..... | 52 |
| 6.3 Terapia en cáncer de mama triple negativo..... | 54 |
| | |
| Objetivos..... | 59 |
| | |
| Material y Métodos..... | 63 |
| 1. Reactivos y animales de experimentación | 63 |
| 2. Anticuerpos..... | 65 |
| 3. Construcción de mutantes y vectores de expresión..... | 68 |
| 4. Cultivos celulares..... | 69 |
| 4.1 Condiciones de cultivo..... | 69 |
| 4.2 Preservación de las líneas celulares..... | 70 |
| 5. Transfección de líneas celulares..... | 70 |

| | |
|---|----|
| Índice | 5 |
| 5.1 Transfección con fosfato cálcico (Sambrook 1989)..... | 70 |
| 5.2 Transfección con Lipofectamine TM (Invitrogen)..... | 71 |
| 5.3 Generación de “pools” o clones estables..... | 71 |
| 6. Ensayo de proliferación celular..... | 71 |
| 6.1 Análisis estadístico..... | 72 |
| 7. Preparación de extractos celulares e inmunoprecipitación..... | 72 |
| 8. Electroforesis y Western blot..... | 73 |
| 9. Ensayo de quinasa in Vitro..... | 74 |
| 10. Muestras de pacientes e inmunohistoquímica..... | 75 |
| 10.1 Análisis estadístico..... | 75 |
| 11. Modelos animales..... | 76 |
| 11.1 Tumores de ratones FVB y FVB/neu..... | 76 |
| 11.2 Ratones transgénicos..... | 76 |
| 11.3 Tumores de ratones xenografts..... | 77 |
| 12. Microarrays de ARN..... | 79 |
| 12.1 Extracción de ARN..... | 79 |
| 12.2 Precipitación, lavado y resuspensión del ARN..... | 79 |
| 12.3 Purificación del ARN..... | 79 |
| 12.4 Medida de la concentración y calidad del ARN..... | 80 |
| 12.5 Preparación de las muestras e Hibridación en los Microarrays..... | 80 |
| 12.6 Análisis de datos..... | 81 |
| 13. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)..... | 82 |
| 13.1 Síntesis de ADNc o ADN..... | 82 |
| 13.2 Amplificación de ADNc y visualización de los productos de PCR..... | 82 |
| 13.3 Diseño de los cebadores de PCR | 83 |
| 14. Citometría de flujo..... | 85 |
| 14. 1 Análisis de ciclo celular..... | 85 |

| | |
|--|-----|
| 14.2 Análisis de la muerte celular..... | 85 |
| 15. Fragmentación de ADN..... | 86 |
| 16. Potencial de membrana mitocondrial..... | 87 |
| 17. Fraccionamiento subcelular..... | 88 |
| | |
| Resultados y Discusión..... | 91 |
| 1. Erk5 en cáncer de mama humano..... | 91 |
| 1.1 Características de los pacientes..... | 91 |
| 1.2 Expresión de Erk5 en cáncer de mama humano y localización subcelular | 92 |
| 1.3 Expresión de HER2 y activación de Erk5..... | 95 |
| 1.4 Asociación de la expresión de Erk5 con pronóstico..... | 97 |
| 1.5 Erk5 regula la respuesta a tratamientos anti-HER2..... | 101 |
| 2. Generación de un modelo animal de expresión de Mek5 en su forma constitutivamente activa (Mek5DD) en mama..... | 104 |
| 3. Mecanismo de acción de TG02..... | 107 |
| 3.1 Caracterización del efecto de TG02 sobre la quinasa Erk5..... | 109 |
| 3.2 Efecto de TG02 en cáncer de mama..... | 114 |
| 3.2.1 Expresión a nivel de ARNm de las dianas potenciales de TG02 en cáncer de mama triple negativo..... | 114 |
| 3.2.2 Evaluación de la eficacia y acción de TG02 sobre células de cáncer de mama triple negativo..... | 116 |
| 3.2.3 Efecto sobre ciclo celular y apoptosis..... | 118 |
| 3.3 Análisis del efecto de TG02 en la línea celular MDAMB231..... | 120 |
| 3.3.1 Efecto de TG02 en el ciclo celular..... | 120 |
| 3.3.1.1 Efecto de TG02 en la transición de fases G2/M..... | 122 |
| 3.3.1.2 Efecto de TG02 en la transición de fases G1/S..... | 125 |
| 3.3.2 Efecto de TG02 en daño al ADN y apoptosis..... | 130 |
| 3.3.3 Efecto de TG02 en la expresión génica..... | 132 |
| 3.4. Análisis del efecto de TG02 en la línea celular HCC1187..... | 135 |

| | |
|--|-----|
| Índice | 7 |
| 3.4.1 Efecto de TG02 sobre apoptosis..... | 135 |
| 3.4.2 TG02 induce apoptosis de manera dependiente e independiente de caspasas... | 137 |
| 3.4.3 Efecto de TG02 en la regulación de la transcripción génica..... | 142 |
| 3.4.4 Efecto de TG02 sobre el daño y reparación al ADN..... | 143 |
| 3.5 Combinación farmacológica de TG02 con quimioterapia adyuvante..... | 144 |
| 3.6 Actividad antitumoral <i>in vivo</i> de TG02 como agente único..... | 147 |
| Conclusiones..... | 151 |
| Bibliografía..... | 155 |

Abreviaturas

Abreviaturas

ADN - Acido Desoxirribonucleico
ADNc - Acido Desoxirribonucleico Complementario
AGEs - Advanced Glucation End Products
AML - Acute Myeloid Leukemia (Leucemia mieloide aguda)
ARN - Acido Ribonucleico
ARNm - Acido Ribonucleico Mensajero
ATM - Ataxia Telangiectasia Mutated (Ataxia Telangiectasia mutada)
ATR - Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein (Proteína relacionada con Rad3 y Ataxia Telangiectasia)
Bad - Bcl-2 Antagonist of Cell Death (Antagonista de Bcl-2 de Muerte Celular)
Bax - Bcl-2 Asociated Protein X (Proteína X asociada a Bcl-2)
Bcl2 - B-Cell Lymphoma-2 (Linfoma 2 de Células B)
Bim - Bcl2 Interacting Mediator of Cell Death (Mediador de interacción de Bcl-2 de Muerte Celular)
BMK1 - Big-MAPK 1 (Grande MAPK 1)
BRCA - Breast Cancer Type Susceptibility Protein (Tipo de Proteína Susceptible al Cáncer de Mama)
BrdU - 5-Bromo 2'-Deoxy-Uridine
BRIP - BRCA1-Interacting Protein C-terminal Helicase 1 (Proteína Helicasa 1 C-terminal de Interacción con BRCA1)
Brk/PTK6 - Breast Tumor Kinase/Protein Tyrosine Kinase 6 (Quinasa de Cáncer de Mama/Proteína Tirosina Quinasa 6)
BSA - Bovine Serum Albumine (Albumina Sérica Bovina)
CCND1 - encodes Cyclin D1 (Codifica para Ciclina D1)
CD - Common Docking (Dominio Común de Acoplamiento)
CDIS - Carcinoma Ductal *in situ*
CDK - Cyclin-Dependent Kinase (Quinasa Dependiente de Ciclina)
CHK - Serine/Threonine-Protein Kinase Checkpoint 2 (Proteína quinasa Serina/Treonina Checkpoint 2)
CLIS - Carcinoma Lobular *in situ*
CLEOPATRA - Clinical Evaluation of Pertuzumab and Trastuzumab (Evaluación Clínica de Pertuzumab y Trastuzumab)
Cot - Cancer-Osaka Th thyroid
CREB - Ca²⁺/cAMP Response Element Binding Protein (Proteína de Unión a un Elemento de Respuesta a Ca²⁺/cAMP)
Cx43 - Connexine 43, protein gap junction
c-Fos - protooncogene c-Fos (Protooncogén c-Fos)
c-Myc - cellular Myelocytomatosis (Mielomatosis)
c-Kit/SCFR - protooncogene c-Kit/Stem Cell Growth Factor Receptor (Protooncogén c-Kit/Receptor del Factor de Crecimiento de las Células Madre)
DEPC - Dietilpirocarbonato
DFS - Disease Free Survival (Supervivencia Libre de Enfermedad)
DMEM - Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO - Dimetil Sulfóxido
DN - Dominante-Negativo
dNTP - Deoxynucleotides Triphosphate (Deoxinucleotidostriphato)
DP - Dimerization Partner (Pareja de Dimerización)
DR - Death Receptor (Receptor de Muerte)
DUSP - Dual-Specificity protein Phosphatase (Fosfatasas de Especificidad Dual)
EDTA - EthyleneDiamineTetrActic acid (Acido Etilenodiamino Tetra-Acético)
EGF - Epidermal Growth Factor (Factor de Crecimiento Epidérmico)
EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico)
EMT - Epithelial Mesenchymal Transition (Transición Epitelio-Mesénquima)
ErbB - Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene B (Oncogén Viral de la Leucemia de Eritroblastosis B)
Erk - Extracellular Signal-Regulated Kinases (Quinasas Reguladas por Señales Extracelulares)
Ets-1 - V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 aviar
E2F - Transcription Factor E2F
FACS - Fluorescence-Activated Cell Sorter (Clasificación Celular por Fluorescencia)
FAK - Focal Adhesion Kinase (Quinasa de Adhesión Focal)
FasL - Fas Ligand (Liganda Fas)

FBS - Fetal Bovine Serum (Suero Bovino Fetal)
FDA - Food and Drug Administration (Administración de alimentos y fármacos)
FGF-2 - Fibroblast Growth Factor 2 (Factor de Crecimiento Fibroblástico 2)
FITC - Fluorescein Isothiocyante (Isotiocianato de Fluoresceína)
FLT3 - Fms-Like Tyrosine Kinase 3 (Tirosina Quinasa Similar a Fms-3)
Foxo3a - Forkhead box o3 Transcription Factor (Factor de Transcripción Foxo3a)
Fra1 - Fos-related antigen 1 (Antígeno relacionado con Fos 1)
Gab 1 - Grb2-associated binder 1 (Proteína 1 de Unión Asociada a GRB2)
GAPDH - Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa)
G-CSF - Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Factor Estimulador de Colonias en Granulocitos)
GPCR - G Protein-Coupled Receptors (Receptores acoplados a Proteínas G)
Gp130 - Glucoprotein 130 (Glucoproteína 130)
GSK - Glycogen Synthase Kinase
GST - Glutatión-S-transferasa
HA - Hemaglutinina
HB-EGF - Heparin-Binding Epidermal Growth Factor (Factor de Crecimiento Epidérmico de unión a Heparina)
HBS - HEPES-Buffered Saline (Tampón Salino de HEPES)
HCG - Human Chorionic Gonadotropin (Gonadotropina Coriónica Humana)
HDAC - Histona Deacetylase
HDI - HER2-Dimerization Inhibitor (Inhibidor de la Dimerización de HER2)
HER - Human Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano)
HGFR - Hepatocyte Growth Factor Receptor (Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos)
HRP - Horse Radish Peroxidase (Peroxidasa de Rábano)
HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Células Endoteliales Humanas del Córdon Umbilical)
IAP - Inhibitor of Apoptotic Protein (Proteína Inhibidora de la Apoptosis)
IC - Intervalo de Confianza mediante SSPS
IC - Indice de Combinación obtenido mediante el programa Calcsyn
IGF - Insulin-Growth Factor (Factor de Crecimiento de Insulina)
IGFBP - Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (Proteínas de unión a IGF)
IGF-IR - Insulin-like Growth Factor- I Receptor (Receptor I de IGF)
IL6 - Interleuquina 6
IP - Immunoprecipitación
JAK2 - Janus Kinase 2 (Quinasa Janus 2)
JNK - Jun N-terminal Kinases
Lad - Lack-associated adapter (Adaptador Asociada a Lack)
LIF - Leucemia Inhibitory Factor (Factor Inhibidor de Leucemia)
MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase (Proteína Quinasa Activada por Mitógeno)
MAPKAP - MAPK-Activated Protein (Proteína activada por MAPK)
MAPKK o **MKK** - MAPK Kinase (Quinasa MAPK)
MAPKKK o **MKKK** - MAPK Kinase Kinase (Quinasa Quinasa MAPK)
MEF2 - Myoocyte Enhancer Factor 2 (Factor inductor de miocitos)
MKP - MAP- Kinase Phosphatase (Fosfatasas de las MAPKs)
mAKAP - muscle A-Kinase Anchoring Protein (Proteína de anclaje a la Quinasa Muscular A)
MM - Multiple Myelome (Mieloma Múltiple)
MMLV-RT - Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Transcriptasa Reversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney)
mTOR - mammalian Target Of Rapamycin (Diana de la Rapamicina en Mamíferos)
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 bromuro difeniltetrazolio
MUC4 - Mucin-4 (Mucina 4)
Myc - Myelocytomatosis (Mielomatosis)
NBS1 - Nijmegen Breakage Syndrome Protein 1 Homolog (Proteína homóloga 1 del Síndrome de Rotura de Nijmegen)
NES - Nuclear Export Sequence (Secuencia de Exportación Nuclear)
NFkB - Nuclear Factor-kB Ligand (Ligando del factor nuclear kB)
NGF - Nerve Growth Factor (Factor de Crecimiento Neural)
NLS - Nuclear Localization Signal (Señal de Localización Nuclear)
NLK - Nemo Like Kinase (Quinasa similar a Nemo)

Notch-1 - Neurogenic locus notch homolog protein 1
NRG - Neuregulina
PAGE- Poliacrilamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida)
PALB2 - Partner and Localizer of BRCA2 (Pareja y Localizados de BRCA2)
PARP - Poly-(ADP-ribose) polymerase (Polimerasa poli-ADP-ribosa)
PBI - Phox and Bem 1
PBS - Phosphate Buffered Saline (Tampón Fosfato Salino)
PBST - PBS suplementado con 0,1% de Tritón X-100
PCR - Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PDGF - Platelet-Derived Growth Factor (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas)
PDGFR - Platelet-Derived Growth Factor Receptor (Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas)
PI3K- Phosphatidyl Inositol 3-Kinase (Fosfatidilinositol-3-quinasa)
PKA - Protein Kinase A (Proteína quinasa A)
PML - Promyocytic Leukemia Protein (Proteína de Leucemia Promiolicítica)
PMSF - Phenyl-Methyl Sulphonyl Fluoride (Fenil-metil sulfonilfluoruro)
PMSG - Pregnant Mare Serum Gonadotropin (Suero de Gonadotropina para el embarazo)
PR - Proline Rich (Rico en Prolina)
PS - Phosphatidylserine (Fosfatidilserina)
PTEN - Phosphatase and Tensin Homolog (Fosfatasa Homóloga a la Tensina)
PTP-SL - Protein Phosphatase Tyrosin Step-like (Fosfatasa como Step)
PVDF - Polyvinylidene Fluoride (Fluoruro de Polivinilideno)
pTyr - Phosphotyrosine (Fosfotirosina)
p21 - Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1 (Inhibidor de Quinasa dependiente de Ciclina 1)
p27 - Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B (Inhibidor de Quinasa dependiente de Ciclina 1)
p53 - Tumor Supresor p53 (Supresor Tumoral p53)
p90RSK - Ribosomal Protein S6 Kinase (Proteína Quinasa Ribosomal S6)
RAD50 - DNA Repair Protein RAD50 (Proteína de Reparación del ADN)
Ras - Rat Sarcome (Sarcoma de Rata)
Rb - Retinoblastoma
RC - Regresión Completa
RE - Receptor de Estrógenos
RP - Receptor de Progesterona
RP - Regresión Parcial
RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium
RTK - Receptor Tirosine Kinase (Receptor Tirosina Quinasa)
RT-PCR - Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Transcriptasa Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa)
SAPK - Stress-Activated Protein Kinases (Proteínas Quinasa Activadas por Estrés)
Sap1 - Sodium channel associated protein 1 (Proteína asociada al canal de sodio 1)
SBF - Serum Bovine Fetal (Suero Bovino Fetal)
SCCHN - Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello)
SGK - Serum and Glucocorticoid Inducible Kinase (Quinasa Inducible con Suero y Glucocorticoides)
SRC - Proto-oncogene Tyrosine-protein Kinase Sarcome
SDS - Sodium Dodecyl Sulphate (Dodecil sulfato sódico)
SER - Serum Response Element (Elemento de respuesta a suero)
shARN - short hairpin ARN (ARN de Horquilla Corta)
SH3 - Src homolog 3
SUMO3 - Small Ubiquitin-like Modifier 3 (Modificador 3 como las Ubiquitinas Pequeñas)
STAT- Signal Transducer and Activator of Transcription (Transductor de Señales y Activador de Transcripción)
TBST - Tris-Buffered Saline Twain-20
TE- Buffer Tris-EDTA
TGF- α - Transforming Growth Factor β (Factor de Crecimiento Transformante de tipo α)
TGF- β - Transforming Growth Factor β (Factor de Crecimiento Transformante de tipo β)
TMRE - Tetramethylrhodamine, ethyl ester (Ester etil tetrametilrodamina)
TNBC - Triple Negative Breast Cancer (Cáncer de mama triple negativo)
TYK2 - Tirosine Kinase 2
TYRO 3 - Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3

UV - Ultravioleta

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento vascular endotelial)

VEGFR - Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial)

WNK1 - WNK Lysine Deficient Protein Kinase 1 (Proteína Quinasa 1 Deficiente en Lisina WNK)

WT - Wild Type (Tipo Salvaje)

Introducción

Introducción

1. La glándula mamaria: estructura y desarrollo

La mama es una estructura glandular globular presente tanto en hombres como en mujeres y, mientras en el hombre se encuentra atrofiada y carece de función, en la mujer ha evolucionado como órgano productor y secretor de leche durante la lactancia,

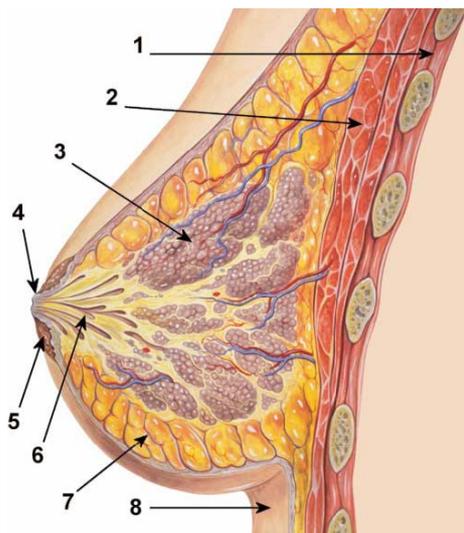


Figura 1. Representación de la estructura de la mama. (1. Caja torácica, 2. Músculo pectoral, 3. Lobulillo, 4. Pezón, 5. Areola, 6. Ducto galactóforo, 7. Tejido adiposo, 8. Piel

asegurando así la conservación de la especie. Está formada por una serie de glándulas mamarias, que producen leche tras el parto, y a las que se les denomina lóbulos y lobulillos. Los lóbulos se encuentran conectados entre sí por unos tubos, ductos galactóforos, que son los que conducen la leche al pezón, durante la lactancia (Figura 1).

A lo largo de la vida de la mujer, la glándula mamaria está sometida a numerosos cambios, algunos relacionados con la edad (crece durante la pubertad y se atrofia después de la menopausia aumentando la proporción de tejido graso y atrofiándose el glandular), otros relacionados con los ciclos menstruales, y por supuesto durante el embarazo y la lactancia. En todos los casos, estas modificaciones cíclicas están provocadas por los cambios en los niveles de las hormonas femeninas -estrógenos y progestágenos- que tienen lugar en todas las etapas de la vida de la mujer.

2. El cáncer de mama

El cáncer no es solo una enfermedad sino un grupo de enfermedades distintas que puede afectar a cualquier tejido del organismo. Se define como un crecimiento anormal de células que tienden a proliferar de forma incontrolada y en algunos casos, su diseminación puede provocar metástasis.

El cáncer de mama se considera una enfermedad compleja causada por la acumulación progresiva de mutaciones en múltiples genes, combinada con la desregulación epigenética de genes críticos y vías de señalización de proteínas (Olopade

et al. 2008). Es una enfermedad heterogénea en su presentación, ya que muestra diferencias notables en términos histológicos, en los diversos subtipos intrínsecos en los que se clasifica, en los patrones de diseminación a zonas distales y en los resultados clínicos del paciente, donde habría que individualizar el tratamiento según cada perfil. Sin embargo hasta hace muy poco tiempo no se había demostrado que existían tipos bien diferenciados de cáncer de mama. Análisis globales de expresión génica utilizando tecnologías de alto rendimiento han ayudado a explicar en gran parte esta heterogeneidad y han proporcionado una importante y nueva clasificación de los pacientes (Prat et al. 2010).

2.1 Tumores de mama BENIGNOS y tumores MALIGNOS

El crecimiento de las células de forma autónoma y desordenada produce la formación de un tumor que puede presentarse en forma de nódulo o masa; en el caso de la mama puede ser palpable (importancia del autoexamen) o ser tan pequeño que se requieren técnicas especiales de diagnóstico.

La mayoría de los tumores que se producen en la mama son benignos. Están relacionados generalmente con factores genéticos y son debidos a formaciones fibroquísticas de la mama. El quiste es una “bolsa de líquido” y la fibrosis es un desarrollo anormal del tejido conjuntivo. La fibrosis no aumenta el riesgo de desarrollar un tumor y no requiere un tratamiento especial. Los síntomas que producen son dolor e inflamación. Este tipo de tumores no se diseminan al resto del organismo ni son peligrosos.

La inmensa mayoría de los tumores mamarios se originan en el tejido glandular, siendo casi siempre adenocarcinomas. Cuando alguna de las células normales del ducto comienza a proliferar de forma descontrolada sin sobrepasar aún la membrana basal, se origina lo que se denomina un **carcinoma ductal *in situ*** (CDIS). Si este crecimiento anormal tiene lugar en los lóbulos se denomina **carcinoma lobular *in situ*** (CLIS). Los **carcinomas *in situ*** son por tanto tumores en etapas muy tempranas de su desarrollo sin capacidad de invadir a su alrededor ni de originar metástasis a distancia. Cuando las células tumorales son capaces de sobrepasar la membrana basal, invadiendo el tejido que rodea a los conductos, denominado estroma, se origina un **carcinoma invasivo o infiltrante** (Figura 2).

A partir de este momento, el tumor crece invadiendo las estructuras vecinas, pero también está en contacto con vasos linfáticos y sanguíneos que le pueden permitir alcanzar zonas distantes a su lugar de origen, provocando la aparición de la metástasis.

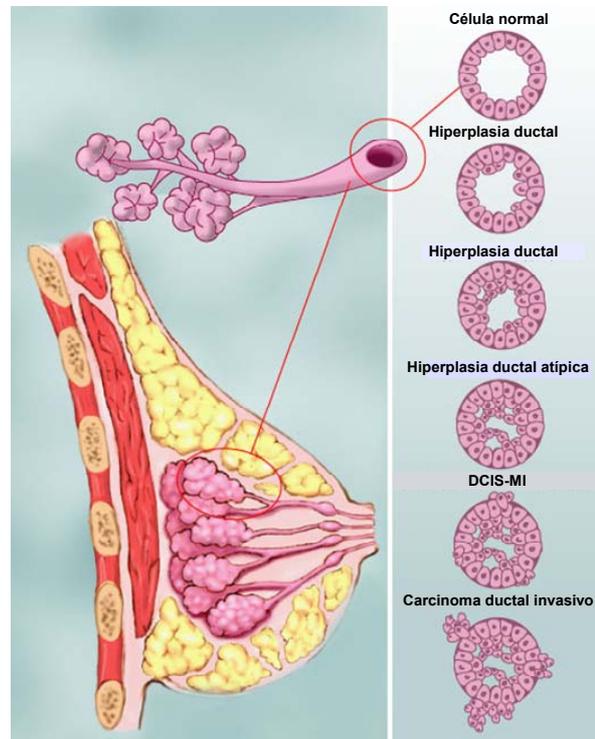


Figura 2. Representación esquemática del modelo de proliferación celular que acompaña la formación de un cáncer metastático, basada en características morfológicas y epidemiológicas.

En la mama, la cercanía y estrecha relación entre los lóbulos y los conductos lácteos y los linfáticos, es determinante en la frecuencia con la que el tumor originado invade o se extiende a los ganglios linfáticos de la región y por tanto, tiene gran importancia en el diagnóstico de la extensión de la enfermedad.

Cuando se alcanzan los vasos linfáticos aparecen metástasis ganglionares, siendo la localización más frecuente la cadena ganglionar axilar, seguida de forma menos habitual por los ganglios supraclaviculares y los de la cadena mamaria interna. Aproximadamente un 40-50% de las mujeres diagnosticadas de un cáncer de mama presentan algún tipo de afectación ganglionar en el momento del diagnóstico.

Finalmente, también pueden producirse metástasis a distancia, aunque es poco habitual en el momento del diagnóstico, excepto en los casos de tumores localmente muy avanzados. Sin embargo, en los años posteriores al diagnóstico y tratamiento del cáncer son más frecuentes las recaídas con presencia de metástasis. El lugar más común donde el cáncer de mama puede producir metástasis a distancia es el esqueleto, seguido

de órganos como el pulmón, el hígado, ganglios linfáticos distantes o cerebro, entre otros. De todos los casos de cáncer de mama, sólo el 7% presentan metástasis de inicio.

2.2 Alteraciones genéticas

Entre un 5% y un 10% de los cánceres de mama son heredados. En general, son mujeres que con frecuencia presentan antecedentes familiares y en múltiples casos suelen ser mujeres jóvenes de una misma familia.

Al tratarse de una mutación germinal la que causa la predisposición al cáncer, se encuentra en todas las células del organismo, por lo que se necesitan muy pocas mutaciones somáticas, en el ámbito de las células ductales de la mama, para que tenga lugar el desarrollo de la neoplasia.

Puede ser heredada tanto de la madre como del padre, estando presente la mutación desde el nacimiento en las portadoras.

La predisposición al cáncer tiene una herencia dominante, con un 50% de riesgo de transmitir los alelos de las mutaciones a los hijos, y por tanto un 50% de riesgo de ser portador de la mutación genética (King et al. 1993).

Gracias al desarrollo de la genética molecular y a su influencia en el ámbito de la Medicina, han sido numerosas las investigaciones realizadas en los últimos años, las cuales han proporcionado una evidencia inequívoca de la presencia de genes que son responsables de la predisposición al cáncer de mama (Weber 1996).

La mayoría de los cambios genéticos encontrados en cáncer de mama se pueden clasificar atendiendo a dos categorías: mutaciones por ganancia de función en proto-oncogenes, los cuales estimulan el crecimiento celular, la división y la supervivencia; y la pérdida de función en genes supresores de tumores que normalmente previenen la parada del ciclo celular y promueven la reparación del ADN y la activación de los *checkpoints* del ciclo. La desregulación epigenética también contribuye a una expresión anormal de estos genes (Cargnello and Roux 2011).

Hasta la fecha, los **oncogenes** desregulados frecuentemente en cáncer de mama son *ErbB2* (Erythroblastic leucemia viral oncogene B 2), también conocido como HER2 ó neu, *PI3KCA* (Phosphatidyl inositol 3-kinase catalytic subunit), *MYC* (Myelocytomatosis) y *CCND1* (encodes cyclin D1). En cuanto a los **genes supresores de tumores**, se han identificado *BRCA1* (Breast cancer type 1 suscetibility protein), *BRCA2* (Breast cancer type 2 suscetibility protein), *p53* (Tumor supresor p53), *PTEN*

(Phosphatase and tensin homolog), *ATM* (Ataxia telangiectasia mutated), *CHK2* (Serine/threonine-protein kinase Checkpoint 2), *NBS1* (Nijmegen breakage syndrome protein 1 homolog), *RAD50* (DNA repair protein RAD50), *PALB2* (Partner and localizer of BRCA2) y *BRIP* (BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1), todos ellos implicados en la regulación de la integridad genómica (Walsh et al. 2007) (Tabla I). Las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* se asocian con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama y ovario. Mutaciones en *p53* y *PTEN* están asociadas con un elevado riesgo de padecer varios tipos de cáncer incluido el de mama. Mutaciones en *ATM*, *CHK2*, *NBS1*, *RAD50*, *PALB2* y *BRIP* incrementan moderadamente el riesgo de cáncer de mama.

Varias **vías de señalización** están desreguladas en cáncer de mama como consecuencia de mutaciones en estos genes, incluyendo vías lipídicas y de proteínas quinasas implicadas en el crecimiento celular y supervivencia, ciclo celular, daño al ADN (Acido desoxirribonucleico) y apoptosis.

Tabla I. Lista de oncogenes y genes supresores de tumores desregulados frecuentemente en cáncer de mama

| Oncogenes |
|--|
| <i>ErbB2</i> (<u>E</u> rythro <u>b</u> lastic leucemia viral oncogene <u>B</u> 2) |
| <i>PI3KCA</i> (<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol <u>3</u> - <u>k</u> inase <u>c</u> atalytic <u>s</u> ubunit) |
| <i>MYC</i> (<u>M</u> yelocytomatosis) |
| <i>CCND1</i> (encodes <u>c</u> yclin <u>D</u> 1) |
| Genes supresores de tumores |
| <i>BRCA1</i> (<u>B</u> reast <u>c</u> ancer type <u>1</u> susceptibility protein) |
| <i>BRCA2</i> (<u>B</u> reast <u>c</u> ancer type <u>2</u> susceptibility protein) |
| <i>p53</i> (<u>T</u> umor supresor <u>p</u> 53) |
| <i>PTEN</i> ((<u>P</u> hosphatase and <u>t</u> ensin homolog) |
| <i>ATM</i> (<u>A</u> taxia <u>t</u> elangiectasia <u>m</u> utated) |
| <i>CHK2</i> (Serine/threonine-protein kinase <u>C</u> heckpoint <u>2</u>) |
| <i>NBS1</i> (<u>N</u> ijmegen <u>b</u> reakage <u>s</u> yndrome protein <u>1</u> homolog) |
| <i>RAD50</i> (DNA repair protein <u>R</u> AD <u>50</u>) |
| <i>PALB2</i> (<u>P</u> artner and <u>l</u> ocalizer of <u>B</u> RCA <u>2</u>) |
| <i>BRIP</i> (<u>B</u> RCA1- <u>i</u> nteracting protein C-terminal helicase 1) |

2.3 Clasificación actual del cáncer de mama

El cáncer de mama representa una de las familias de tumores más frecuentes dentro de la población femenina (Ocana et al. 2008). Aunque recientemente se ha avanzado en la prevención y en el tratamiento de este grupo de patologías, en estadios avanzados esta enfermedad sigue siendo incurable.

A día de hoy aún carecemos de una visión completa de la heterogeneidad biológica de los cánceres de mama con respecto a alteraciones moleculares, sensibilidad al tratamiento y la composición celular. Es por ello que se están realizando grandes esfuerzos en el desarrollo de nuevas técnicas encaminadas a descifrar el retrato molecular de esta enfermedad, permitiendo así la determinación pronóstica del cáncer de mama (Perou et al. 2000; Dai et al. 2005).

El desarrollo de métodos moleculares de análisis se remonta a un cuarto de siglo, cuando la inmunohistoquímica por primera vez permitió separar los tumores de mama en dos clases principales: receptor de estrógenos positivos y negativos. Una década después, la hibridación de ácidos nucleicos *in situ* identificó dos nuevas categorías dependiendo de si el receptor tirosina quinasa HER2 (Human epidermal growth factor receptor-related 2) estaba o no amplificado.

Los receptores hormonales conocidos como receptor de estrógenos (RE) y de progesterona (RP), hacen referencia a un grupo de receptores nucleares que son activados por hormonas como los estrógenos (17 β -estradiol) y progestágenos respectivamente (Elledge et al. 2000). Mientras que uno de los efectos más importantes de los estrógenos es inducir la expresión de receptores de progesterona, por el contrario, los progestágenos tienen un efecto antiestrogénico. La principal función de este tipo de receptores es la de actuar como reguladores de la transcripción génica induciendo la síntesis de ARN y proteínas (Schuchard et al. 1993).

El receptor tirosina quinasa HER2 también conocido como ErbB2 o Neu, es una proteína transmembrana que pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa ErbB (Hynes et al. 2005). Estos receptores ejercen funciones muy importantes en la célula y juegan un papel crucial en la oncogénesis.

2.3.1 Clasificación según el perfil molecular

Gracias al desarrollo de la Genómica, se definió al cáncer de mama como una enfermedad heterogénea formada por distintas entidades caracterizadas a su vez por diferentes perfiles de expresión génica. Mediante el análisis de arrays se han identificado cuatro subtipos principales de cáncer de mama denominados como “subtipos intrínsecos” que incluyen Luminal A y B, HER2, *Basal-like* y *Normal-like* (Perou et al. 2000; Sorlie et al. 2001). Cada subtipo tiene diversas características histopatológicas, moleculares y clínicas, por ello requieren diferentes tratamientos terapéuticos (De Laurentiis et al. 2010) (Tabla II).

Tabla II. Características generales de los cuatro “subtipos intrínsecos” del cáncer de mama.

Figura adaptada de (Rakha et al. 2008)

| Clase | Incidencia | Aspectos importantes |
|------------------------------------|-------------------|--|
| <i>Luminal A</i> | 56-61% | Alta expresión de RE, mejor pronóstico |
| <i>Luminal B</i> | 9-16% | Baja/moderada expresión de RE, Ki67 B>A, genes compartidos con <i>Basal-like</i> y <i>ErbB2</i> , peor pronóstico |
| <i>Basal-like</i> | 8-20% | Expresión de CK5, CK17, c-kit, EGFR, p-caderina, mutaciones p53, mutaciones BRCA1 |
| <i>HER2+</i> | 8-16% | Mutaciones p53, más agresivos, peor pronóstico y no responden a la terapia hormonal |
| <i>Normal-like/No clasificados</i> | 6-10% | Alta expresión de genes implicados en EMT; baja expresión de genes característicos de células luminales; mejor pronóstico que los tumores <i>Basal-like</i> ; responden a la quimioterapia neoadyuvante a dosis más bajas que otros tumores RE negativos |

- Luminal A y B

Los tumores luminales se caracterizan por la expresión de receptores hormonales, que incluyen al receptor de estrógenos y de progesterona.

El subtipo **Luminal A** se caracteriza por tener elevados niveles de expresión del receptor de estrógenos y se asocia relativamente a un mejor pronóstico (Sorlie et al.

2006). Muchos de los genes encontrados en este subtipo, están expresados en el epitelio luminal que bordea los ductos, de ahí su denominación. Su perfil inmunohistoquímico típico es positivo para ambos receptores hormonales y negativo para HER2. Basándonos en el perfil molecular, todos los casos con carcinoma lobular in situ son tumores luminal A (Millikan et al. 2008).

El subtipo **Luminal B** presenta un fenotipo más agresivo y un mayor grado histológico (Perou et al. 2000). Junto a la expresión de ambos receptores hormonales, estrógenos y progesterona, estos tumores también expresan EGFR1 (Epidermal growth factor receptor 1), HER2 y ciclina E1 (Sorlie et al. 2001; Laakso et al. 2006).

- HER2

Los tumores HER2 se caracterizan por la sobreexpresión del receptor tirosina quinasa ErbB2/HER2/neu, descrita por primera vez en carcinoma de mama humano en los años 80 (King et al. 1985; Slamon et al. 1987; van de Vijver et al. 1987) y desde entonces, son múltiples los estudios llevados a cabo para descifrar tanto el mecanismo que la desencadena como su posible inhibición.

La amplificación de este gen se encuentra en un 15-30 % de estos cánceres y se correlaciona con mayor tamaño del tumor, mayor índice de proliferación, aneuploidía, pérdida de receptores de estrógenos, grado histológico más agresivo, mayor incidencia de metástasis en los ganglios regionales y presencia de estadios más avanzados al diagnóstico (Slamon et al. 1987; Ross et al. 1998; Paik et al. 2000).

Dentro de este subtipo HER2 también podemos encontrar tumores que expresen conjuntamente el receptor de estrógenos o el receptor para el factor de crecimiento (EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)) (Chivukula et al. 2008), aunque la mayoría de ellos no expresa p53 y la expresión de citoqueratinas CK8/CK18 es heterogénea y moderada.

El subtipo HER2 también se ha relacionado con resistencia a diversos agentes quimioterápicos y hormonales. Además, los análisis multivariantes apoyan que su expresión es independiente del resto de factores pronóstico en la supervivencia de pacientes con ganglios positivos para HER2.

A pesar de que tradicionalmente se ha asociado la activación de HER2 a la sobreexpresión de este receptor, se han identificado distintas formas oncogénicas generadas por pérdidas, inserciones o mutaciones puntuales en su secuencia.

Es posible encontrar la sobreexpresión de HER2 en todos los estadios del cáncer de mama de este subtipo, pero no se ha encontrado en lesiones benignas de la mama, lo que sugiere que el gen no se amplifica antes de un verdadero estado maligno (Allred et al. 1992).

Se han publicado estudios donde su sobreexpresión se mantiene en lesiones metastásicas, sugiriendo una activación continuada de HER2 (Lacroix et al. 1989; Niehans et al. 1993). De hecho, algún trabajo sugiere que la prevalencia de sobreexpresión de HER2 en lesiones metastásicas a distancia es mucho mayor del 30% presente en las lesiones localizadas en la mama, sugiriendo una selección positiva de las clonas celulares que sobreexpresan este receptor (Braun et al. 2001).

- *Basal-like*

La denominación de carcinoma *Basal-like* se debe a que las células neoplásicas de este tipo de tumor expresan genes que normalmente se expresan en células mioepiteliales o normales-basales de la mama (Lakhani et al. 2001; Jones et al. 2004; Gusterson et al. 2005), incluyendo citoqueratinas basales de alto peso molecular (CK5, CK6, CK14 y CK17), vimentina, p-caderina, alfa-beta-cristalina, fascina y caveolinas (Reis-Filho et al. 2008).

Representan el 15% de todos los cánceres de mama, con una mayor frecuencia en mujeres premenopáusicas (Carey et al. 2006), y se caracterizan principalmente por la pérdida de expresión de los receptores hormonales y HER2 y por la expresión de citoqueratinas CK5/CK6 y EGFR (Rakha et al. 2007). Este subtipo tiene mayor incidencia en pacientes jóvenes y presenta una elevada tasa de mutaciones en *p53* en más del 85% de los casos y es muy común en portadores de la mutación en el gen *BRCA1*.

Morfológicamente se caracterizan por un alto grado histológico, alto índice mitótico, la presencia de zonas necróticas, bordes presionados e infiltraciones linfocíticas visibles.

Presenta un comportamiento clínico más agresivo y un patrón de diseminación metastásica hematogénica con una peculiar inclinación a desarrollar depósitos metastásicos en cerebro y pulmón (Rakha et al. 2008).

- *Normal breast-like* o no clasificados

El subtipo *Normal breast-like* son tumores que se asemejan al subtipo *Basal-like* en el perfil molecular aunque tienen un ligero mejor pronóstico, y no responden a la terapia neoadyuvante.

El tipo “no clasificado” es negativo para 5 marcadores: receptor de estrógenos, receptor de progesterona, HER2, citoqueratina CK5 y EGFR. Estos tumores son muy parecidos a los *Basal-like* en cuanto a su perfil inmunohistoquímico, la respuesta al tratamiento y la supervivencia.

Como los estudios de genómica evolucionan, es de esperar la aparición de otras subclasificaciones de los tumores de mama en base a las nuevas entidades moleculares. Un ejemplo a destacar, es un nuevo subtipo intrínseco de cáncer de mama, conocido como *Claudin-low* que ha sido recientemente identificado en tumores humanos, en tumores de ratón (Herschkowitz et al. 2007) y en un amplio panel de líneas celulares de cáncer de mama (Prat and Perou 2010). Está caracterizado principalmente por la pérdida de expresión de los receptores hormonales y HER2 y por presentar propiedades biológicas similares a las células madre mamarias y a las células iniciadores de tumores o TICs (Prat and Perou 2010).

2.3.2 Clasificación mediante inmunohistoquímica

Como los análisis de arrays son poco prácticos y muy costosos, el método rutinario utilizado para la clasificación de los cánceres de mama en la clínica es el análisis por inmunohistoquímica de ER, PR y HER2. Utilizando este simple análisis se consigue identificar los tres subtipos principales del cáncer de mama, que se corresponden con los “subtipos intrínsecos” Luminal A y B y HER2. El resto de tumores se han clasificado en un único grupo que se caracteriza por la pérdida de expresión o mínima expresión de ER y PR y por la pérdida de sobreexpresión de HER2, de ahí que se les haya denominado como tumores de cáncer de mama triple negativo (TNBC (Triple negative breast cancer)) (Figura 3).

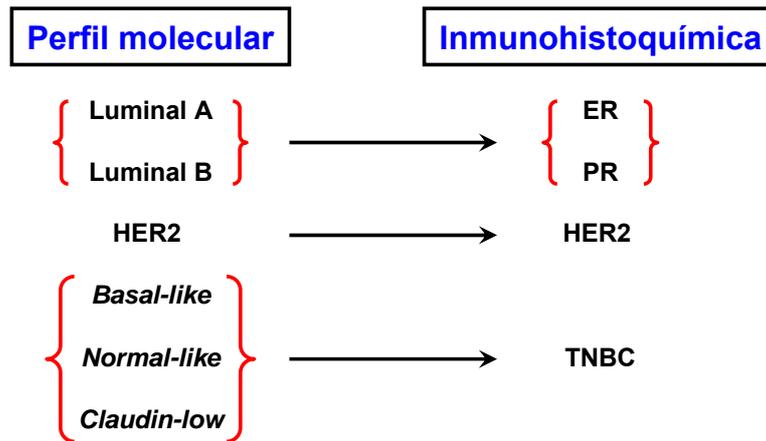


Figura 3. Esquema representativo de los subtipos principales de cáncer de mama clasificados según el perfil molecular y según inmunohistoquímica. Las flechas indican qué grupos clasificados según el perfil molecular se corresponden con los clasificados por inmunohistoquímica.

Mediante inmunohistoquímica se ha visto que los TNBC se asocian con elevada expresión de marcadores proliferativos como Ki67, así como otros marcadores que favorecen el crecimiento tumoral, que incluyen *p53* mutado, ciclina E, EGFR, vimentina, p-caderina y mutaciones en *BRCA1* (Pal et al. 2011). Además, los TNBC se caracterizan por ser más agresivos que los ER, PR y HER2 y presentan menor supervivencia. La mayoría son carcinomas ductales de alto grado histológico con características semejantes a tumores metastásicos y medulares.

Los TNBC por tanto, están formados por un heterogéneo subgrupo de tumores que incluyen pero no se limitan a los “subtipos intrínsecos” *Basal-like*, *Normal-like* y *Claudin-low*. Aunque hay que remarcar que no todos los *Basal-like* son TNBC ya que un pequeño porcentaje presentan expresión de receptores hormonales (Figura 4).

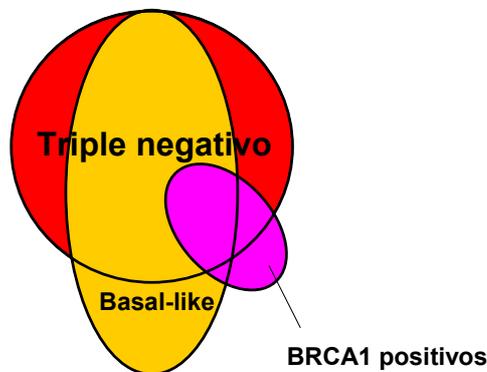


Figura 4. Representación esquemática del solapamiento entre los tumores triple negativo (TNBC), *Basal-like* y tumores con mutaciones en *BRCA1*. Figura adaptada de (Pal et al. 2011).

Aunque seguirán apareciendo cambios en los sistemas de clasificación, la realidad es que los estudios actuales todavía carecen de la posibilidad para formular un sistema de clasificación sencillo, práctico y fácilmente aplicable para el análisis de expresión génica que pueda abarcar de una forma concisa y completa todas las facetas divergentes del cáncer de mama (Bhargava et al. 2009).

3. Receptores tirosina quinasa de la familia ErbB

Los receptores tirosina quinasa son una subclase de receptores para factores de crecimiento con una actividad quinasa intrínseca controlada por ligando. Estos receptores regulan diversas funciones en la célula normal y tienen un papel crucial en la oncogénesis (Gschwind et al. 2004).

La familia de receptores ErbB está formada por cuatro miembros denominados EGFR, ErbB1 (Erythroblastic leukemia viral oncogene B 1) o HER1 (Human epidermal growth factor receptor 1); ErbB2, HER2 o Neu; ErbB3 (Erythroblastic leukemia viral oncogene B 3) o HER3 (Human epidermal growth factor receptor 3) y ErbB4 (Erythroblastic leukemia viral oncogene B 4) o HER4 (Human epidermal growth factor receptor 4). Se definen como la subclase I de receptores tirosina quinasa, cuya denominación se ha basado en su homología con el producto del gen viral de eritroblastoma (*v-erb-B*) (Downward et al. 1984).

El primero en ser descubierto fue el factor de crecimiento epidérmico o EGFR (Sato et al. 1983), que tras su aislamiento y caracterización (Ullrich et al. 1984), se relacionó con la tumorigénesis tras comprobar que el oncogén aviar *v-erb-B* implicado en el desarrollo de sarcomas (Yamamoto et al. 1983), era en realidad una forma truncada del EGFR (Downward et al. 1984). Un año después, se describió la secuencia de un RTK (Receptor tirosine kinase) que presentaba una gran homología al EGFR, denominado HER2 (Coussens et al. 1985). Paralelamente se comprobó su amplificación en tumores mamarios y su homología con el receptor *v-erb-B* (King et al. 1985) que junto a la determinación de su localización cromosómica coincidente con la del oncogén *Neu*, demostraron su indiscutible papel en cáncer (Schechter et al. 1984).

Posteriormente se describieron los otros dos miembros de la familia conocidos como ErbB3 o HER3 (Kraus et al. 1989) y ErbB4 o HER4 (Plowman et al. 1993), ambos también implicados en tumorigénesis.

3.1 Estructura y activación

Los receptores ErbB son glicoproteínas de membrana que presentan una región extracelular de unión a ligando, una región lipofílica transmembrana y una larga cola citoplasmática que contiene el dominio tirosina quinasa (Hynes and Lane 2005) (Figura 5), con numerosos residuos de tirosina susceptibles de ser fosforilados y que intervienen en la transducción de la señal (Lombardo et al. 1995), además de otros residuos de serina y treonina que intervienen en procesos de regulación negativa y endocitosis (Thien et al. 2001). Tras la porción transmembrana se encuentra un dominio juxtamembranal con capacidad reguladora que modula la dimerización, internalización, ordenamiento dentro de la membrana, etc. (Kil et al. 2000; He et al. 2002).

Esta descripción general de la estructura de los receptores ErbB es válida para los cuatro miembros, aunque hay que tener en cuenta dos excepciones importantes. Por un lado, el receptor HER3 no presenta actividad quinasa intrínseca en su lóbulo C-terminal (Guy et al. 1994). Y por otro lado, no se ha descrito ningún ligando conocido capaz de unirse con alta afinidad al ectodominio del receptor HER2 (Citri et al. 2003). Esto significa que ambos receptores, tanto HER2 como HER3, no pueden actuar de forma autónoma, sino que necesitan asociarse entre ellos o a otros receptores que suplan sus carencias para poder transducir señales.

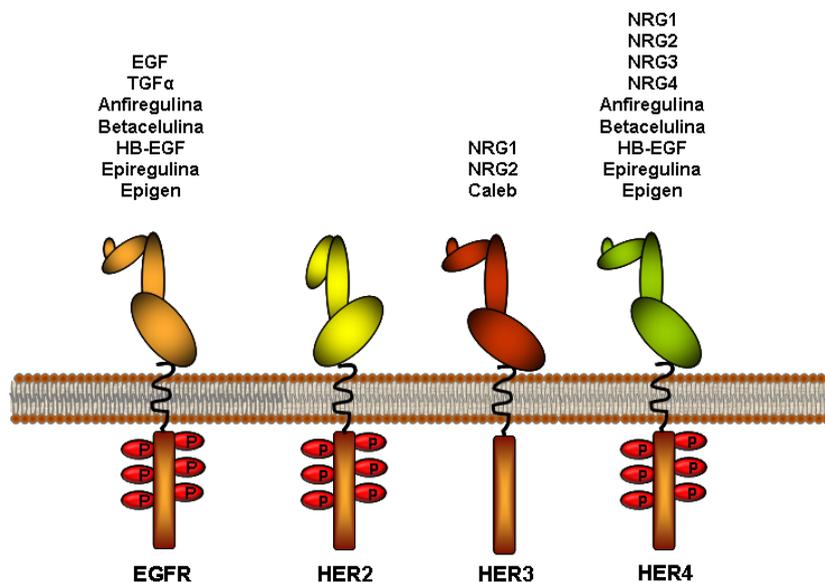


Figura 5. Representación esquemática de los cuatro receptores ErbB descritos en mamíferos y sus ligandos conocidos.

Los receptores de la familia ErbB son activados por dimerización, que puede ser entre dos receptores idénticos (homodimerización) o entre diferentes miembros de la misma familia (heterodimerización) a través de un mecanismo que requiere la unión del ligando (factor de crecimiento) o la sobreexpresión del receptor.

La activación a través de ligando es llevada a cabo por una familia de ligandos conocida como familia del EGF (Epidermal growth factor) (Hynes and Lane 2005). Estos ligandos activan al receptor tras unirse a su dominio extracelular, produciendo un cambio conformacional seguido de la consecuente homo o heterodimerización y posterior fosforilación de los residuos de tirosina, produciéndose secundariamente la transfosforilación de los receptores y la subsiguiente activación de segundos mensajeros intracelulares (Massagué et al. 1993).

Los ligandos de la familia del EGF pueden dividirse en 3 grupos

- EGF, TGF α (Transforming growth factor- α) y anfiregulina, los cuales se unen específicamente a EGFR.

- Betacelulina, HB-EGF (Heparin-binding EGF), epiregulina y epigen, que muestran afinidad dual por EGFR y HER4.

- Neuregulinas: NRG1 (Neuiregulin-1) y NRG2 (Neuiregulin-2), con capacidad de unión a HER3 y HER4; NRG3 (Neuiregulin-3) y NRG4 (Neuiregulin-4), con capacidad de unión a HER4; y Caleb con afinidad exclusiva para HER3 (Figura 5).

Ninguno de estos ligandos es capaz de unirse a HER2 aunque se ha descrito que MUC4 (Mucin-4), un miembro de la familia de las mucinas, actúa como modulador intramembrana de la actividad de HER2 (Ramsauer et al. 2003).

3.2 Vías de señalización intracelular

La activación de los ErbBs estimula muchas vías de señalización intracelular, pero a pesar de la similitud en las moléculas reclutadas para su activación y de la propia similitud entre ellos, los diferentes ErbBs modulan preferentemente ciertas vías de señalización, debido principalmente a su habilidad individual por unirse a proteínas efectoras específicas.

Las dos vías principales activadas por los ErbBs son:

- La vía de PI3K/AKT (Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT).

- Las proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAPK (Mitogen activated protein kinase) (Yarden et al. 2001; Schlessinger 2004).

Otras vías importantes relacionadas con la señalización por ErbBs son:

- Las proteínas STAT (Signal transducer and activator of transcription) (Grandis et al. 2000; Yu et al. 2004), las cuales se han asociado con la activación de EGFR en cáncer.
- La tirosina quinasa Src (Sarcome), cuya actividad se ve incrementada a través de la señalización por EGFR o HER2 (Ishizawar et al. 2004).
- mTOR (Mammalian target of rapamycin), una serina/treonina quinasa activada “aguas abajo” en la vía de PI3K/AKT y otros reguladores del crecimiento (Bjornsti et al. 2004).

4. Vía de señalización de MAPKs

4.1 Generalidades

Una de las vías de señalización intracelular mejor caracterizada es la vía de las proteína quinasas activadas por mitógenos o MAPKs. Las MAPKs son una familia de proteínas únicas en eucariotas cuya función y regulación se ha conservado evolutivamente desde organismos unicelulares como las levaduras, hasta organismos más complejos como el hombre (Widmann et al. 1999).

Las MAPKs constituyen una familia de serina/treonina quinasas que juegan un papel esencial en la transducción de señales, modulando la transcripción de genes en el núcleo en respuesta a cambios en la superficie celular (Turjanski et al. 2007).

Entre los estímulos que activan estas vías se encuentran los factores de crecimiento como EGF o PDGF (Platelet-derived growth factor) que actúan a través de receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (Howe et al. 1992; Lange-Carter et al. 1993), péptidos vasoactivos que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G (como angiotensina II o endotelina-1), factores de crecimiento que actúan a través de receptores serina/treonina quinasa como TGFβ (Transforming growth factor-β) y también por la inducción de estrés celular (choque osmótico, choque térmico, radiaciones ionizantes e isquemia).

La activación de las distintas vías de MAPKs controla una multitud de procesos biológicos, tales como la embriogénesis, proliferación, progresión del ciclo celular, diferenciación, migración y apoptosis (Herskowitz 1995; Pearson et al. 2001).

En humanos, la superfamilia de MAPKs está compuesta por 4 principales familias (Figura 6), que incluyen Erk1 (Extracellular signal-regulated kinase-1) y Erk2

(Extracelular signal-regulated kinase-2), las quinasas c-Jun conocidas como JNK1 (c-Jun amino-terminal kinase-1), JNK2 (c-Jun amino-terminal kinase-2) y JNK3 (c-Jun amino-terminal kinase-3), las p38s (p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ), y Erk5 (Extracelular signal-regulated kinase-5). Adicionalmente, existen otras MAPKs denominadas atípicas que incluyen a Erk3/4 (Extracelular signal-regulated kinase-3/4), Erk7/8 (Extracelular signal-regulated kinase-7/8) y NLK (Nemo-like kinase) (Cargnello and Roux 2011).

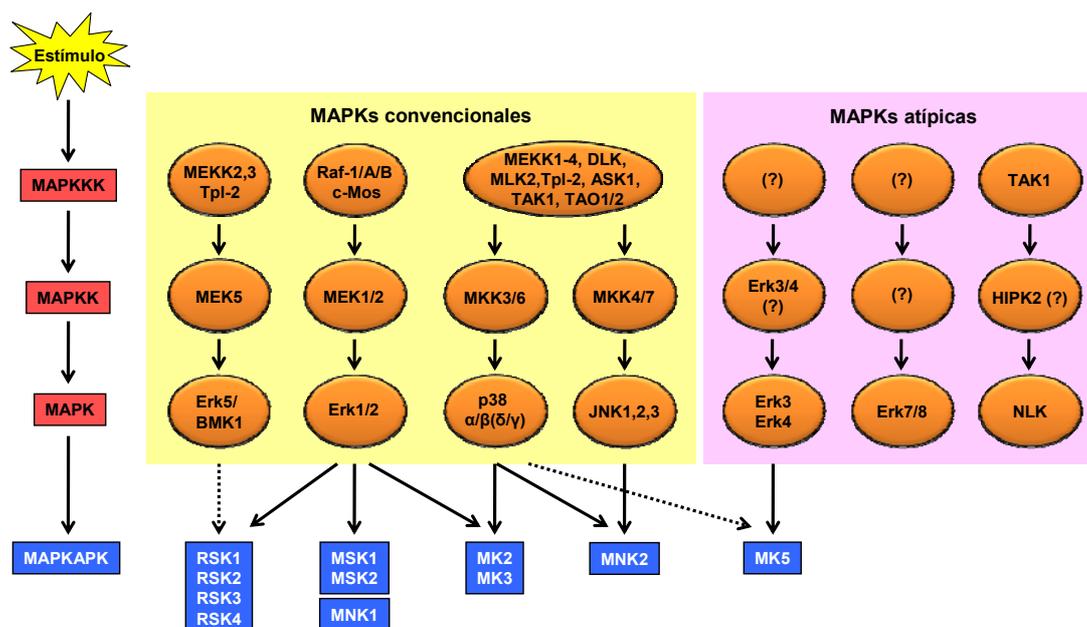


Figura 6. Cascadas de señalización de MAPKs. Las flechas representan la estimulación directa de unas proteínas a otras. Figura adaptada de Cargnello et al. 2011.

4.2 Organización de las vías de MAPKs: Módulo de tres quinasas

Las vías de MAPKs están formadas por módulos de tres proteína quinasas que se fosforilan secuencialmente (Figura 6). Las MAPKs son fosforiladas y activadas por las MAPKKs (MAPK kinases) mediante una doble fosforilación en residuos treonina y tirosina dentro del motivo conservado TXY (Thr-X-Tyr, donde X puede corresponder a cualquier aminoácido) del asa de activación (Canagarajah et al. 1997; Schaeffer et al. 1999). Por ello las MAPKKs (también denominadas MKKs, MEKs o MAP2Ks) actúan como quinasas de especificidad dual. Las MAPKKs a su vez son fosforiladas y activadas por serina/treonina quinasas denominadas MAPKKKs (MAPKK kinases)

(también denominadas MKKKs, MEKKs o MAP3Ks). En la activación de las MAPKKs intervienen proteínas G monoméricas como Ras (Rat Sarcome) y otras quinasas específicas.

La fosforilación de las MAPKs es revertida por la acción de fosfatasas específicas, modulándose así la respuesta de cada vía (Haneda et al. 1999; Pearson et al. 2001; Pouyssegur et al. 2002). Este módulo de señalización se ha conservado a través de la evolución desde plantas, hongos, nemátodos, insectos hasta mamíferos (Widmann et al. 1999).

4.3 Regulación de MAPKs

Como se ha comentado anteriormente, cada MAPK es activada por una MAPKK específica, sin embargo cada MAPKK puede ser activada por varias MAPKKKs aumentando la complejidad de la señalización. Aún así, existe una considerable especificidad en la activación y función de las MAPKs en respuesta a múltiples estímulos. Esta especificidad y eficiencia en su activación se debe a la existencia en su secuencia de dominios específicos para su acoplamiento y por determinadas proteínas de andamiaje (Biondi et al. 2003; Morrison et al. 2003).

Las MAPKs utilizan un dominio de acoplamiento común denominado CD (Common docking) para las interacciones específicas con sus activadores (MAPKKs), sus sustratos (MAPKAPKs (MAPK-activated protein kinases)) y sus inactivadores (MKPs (MAP kinase phosphatases)) (Tanoue et al. 2000) (Figura 7). Este dominio se compone de un cluster de aminoácidos cargados negativamente, localizado en la cola C-terminal de las MAPKs en su secuencia primaria. Este cluster de cargas negativas complementa un cluster de cargas positivas presente en las moléculas activadoras, inactivadoras y sustratos de las MAPKs. Las MAPKs poseen también un dominio importante para el acoplamiento específico de las MAPKAPKs, denominado ED (Glu-Asp), que se encuentra localizado cerca del dominio CD (Tanoue et al. 2001). Además, regiones hidrofóbicas de las MAPKs también son importantes para estas interacciones (Xu et al. 2001; Zhou et al. 2001; Chang et al. 2002; Seidel et al. 2002). Todos estos sitios de interacción se localizan fuera del dominio catalítico y determinan la especificidad de las moléculas que interactúan con ellas.

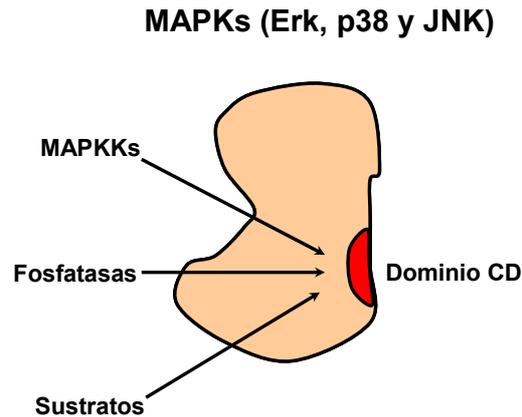


Figura 7. Representación esquemática del dominio CD de las MAPKs. La MAPKKs, las fosfatasas y los sustratos de cada una se unen a este dominio. Figura adaptada de Tanoue et al. 2000.

Las proteínas de andamiaje (scaffolding proteins) interaccionan con varios componentes de las cascadas de las MAPKs, uniendo específicamente cada enzima con su sustrato para lograr la transducción de señales en respuesta a estímulos específicos (Morrison and Davis 2003).

A través de estos mecanismos moleculares desarrollados por las MAPKs para mantener la integridad de la ruta frente a estímulos concretos y dar respuestas correctas frente a esos estímulos, no solo se regula la eficiencia y la especificidad de la cascada, sino que también el orden y la integridad de la señalización.

5. La vía de transducción de señales Erk5

5.1 Identificación de Erk5

Erk5 fue identificada por dos grupos de investigación independientes en 1995. Zhou y colaboradores (Zhou et al. 1995) aislaron en primer lugar el ADNc de Mek5 (MAPK/Erk kinase 5) mediante PCR con cebadores degenerados, que codificaba una proteína de 444 aminoácidos. Se recurrió a un ensayo de doble híbrido en levadura para identificar componentes que interaccionaran específicamente con Mek5, dando como resultado el descubrimiento de una proteína de aproximadamente 815 aminoácidos, el doble de tamaño de las conocidas Erks, y a la que se denominó Erk5 (Zhou et al. 1995).

En un estudio en paralelo, Lee y colaboradores (Lee et al. 1995) mediante PCR con cebadores degenerados llevaron a cabo una criba sobre una librería de cADN de placenta humana y aislaron una nueva MAPK, que debido a su gran tamaño en comparación con Erk1 y Erk2, denominaron BMK1 (Big-MAPK1). Al igual que las

Erks, BMK1 presentaba en su secuencia los sitios de fosforilación en treonina y tirosina requeridos para la activación de las MAPKs, pero también una larga cola C-terminal única. Estos datos sugerían que BMK1 podría ser un nuevo miembro de la familia de las MAPKs, pero a diferencia de las ya conocidas, podría controlar otros eventos de señalización diferentes en base a su estructura única (Lee et al. 1995).

En vertebrados, Erk5 está expresado en una amplia variedad de tejidos, como corazón, cerebro, placenta, músculo esquelético, pulmón y riñón (Lee et al. 1995; Zhou et al. 1995). También se ha encontrado ampliamente expresado en un gran número de diferentes líneas celulares, aunque la distribución subcelular que presenta puede ser difusa o concentrada en determinados compartimentos subcelulares (Buschbeck et al. 2005; Borges et al. 2007). En base a estos datos se podría decir que Erk5 más que desempeñar funciones específicas en células altamente especializadas, intervendría en la regulación de diversas funciones biológicas, que dependerían del contexto celular (Buschbeck and Ullrich 2005).

5.2 Estructura

El gen humano de Erk5 (también llamado *MAPK7*) está presente en el cromosoma 17p11.2 y contiene 5,79 Kb. Tiene un marco abierto de lectura de 2445 pares de bases que codifica una proteína de 816 aminoácidos, que se corresponde con un peso molecular de 98 KDa. Este mayor tamaño, el doble incluso que otras MAPKs, es debido a su cola C-terminal característica de 396 aminoácidos.

A nivel transcripcional, el gen de Erk5 de ratón está codificado por 6 exones y 5 intrones. Se han identificado tres variantes de splicing, llamadas a, b y c, producto del procesamiento alternativo de los intrones 1 y/o 2. Las secuencias de las proteínas que se generan de estos cADNs son idénticas entre sí excepto en su región N-terminal, de tal manera que Erk5b y Erk5c carecen de los primeros 69 y 139 aminoácidos respectivamente, al compararlos con Erk5a. En extracto de embrión de ratón se observó que Erk5a era la isoforma más abundante, seguida de Erk5c y Erk5b. Las variantes b y c que son catalíticamente inactivas, actúan como quinasas dominante negativas inhibiendo la actividad catalítica de la isoforma a, aunque el significado fisiológico de ambas no está completamente comprendido (Yan et al. 2001).

La introducción prematura de un codón de parada por fallo en el *splicing* del intrón 4 genera otra variante de *splicing*, Erk5-T, que codifica una proteína truncada en

la cola C-terminal a la que le falta la secuencia de localización nuclear y la región rica en prolina, y que por tanto es incapaz de traslocarse al núcleo (McCaw et al. 2005).

5.3 Dominios funcionales

Erk5 comparte un 66% de homología en su secuencia con Erk1/2 dentro del dominio quinasa, el cual contiene el motivo TEY de fosforilación en el bucle de activación (Zhou et al. 1995). La región N-terminal de Erk5 es importante para la orientación citoplasmática (aminoácidos 1-77), la interacción con Mek5 (aminoácidos 78-139) y la oligomerización (aminoácidos 140-406) (Kasler et al. 2000; Yan et al. 2001).

El dominio C-terminal contiene una señal de localización nuclear denominada NLS (Nuclear localization signal) (aminoácidos 505-539), una señal de exportación nuclear denominada NES (Nuclear exportation signal) (aminoácidos 771-816) y dos dominios ricos en prolina (aminoácidos 434-465 y 578-701) que sirven como sitios de unión para proteínas que contienen el dominio SH3 (Src-homology 3) (Zhou et al. 1995; Yan et al. 2001). La región C-terminal también contiene el dominio de interacción con MEF2 (Mycocyte enhancer factor-2) (aminoácidos 440-501) y un dominio de activación transcripcional (aminoácidos 664-789) que regula la actividad del factor de transcripción MEF2 (Kasler et al. 2000) (Figura 8).

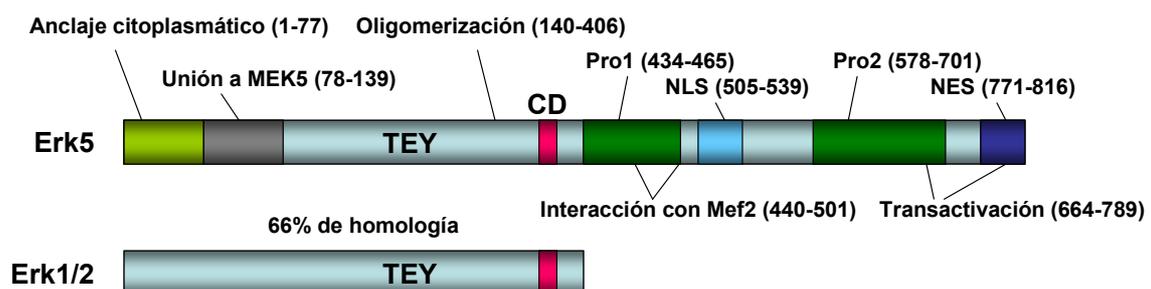


Figura 8. Representación esquemática de los diferentes dominios funcionales de Erk5 y homología con Erk1/2.

5.4 Cola C-terminal: implicación en la activación y localización subcelular de Erk5

La forma truncada de la cola C-terminal de Erk5 da lugar a un incremento de su actividad quinasa, revelando que dicha cola tiene una función autoinhibitoria (Buschbeck and Ullrich 2005). Por ello se ha propuesto un modelo en el que la cola C-terminal enmascara el dominio CD, impidiendo la interacción de Erk5 con sus sustratos.

La localización subcelular de Erk5 se da tanto en compartimentos nucleares como citoplasmáticos, dependiendo del tipo celular (Buschbeck and Ullrich 2005; Borges et al. 2007). A lo largo de los años se ha ido dilucidando el posible mecanismo por el cual Erk5 adoptaría una u otra localización basándose en su forma inactiva o activa. De tal manera que en condiciones basales (forma inactiva de la quinasa), los dominios N-terminal y C-terminal interaccionan entre sí, manteniendo a la molécula en un estado plegado y localizada en el citoplasma. Hasta la fecha, la fosforilación en la cola C-terminal de Erk5 se asocia a un proceso de autofosforilación, tras la activación de Erk5 en el motivo TEY por Mek5 (Mody et al. 2003; Morimoto et al. 2007). En estudios *in vitro*, Mek5 activa a Erk5 fosforilándola en el dominio TEY, tras lo cual Erk5 se autofosforila en los residuos Thr²⁸, Ser⁴²¹, Ser⁴³³, Ser⁴⁹⁶, Ser⁷³¹ y Thr⁷³³ (Mody et al. 2003). Otros autores han descrito que tras los estímulos necesarios para su activación a través de Mek5, Erk5 se autofosforila *in vivo* en su cola C-terminal en la Thr⁷²³ y en una región que contiene tres serinas (Ser⁷⁶⁰, Ser⁷⁶⁴ y Ser⁷⁶⁶) (Morimoto et al. 2007). Esto induciría un cambio conformacional que conllevaría a la separación de ambos dominios, quedando expuesto el dominio quinasa y el NLS y promoviendo su traslocación nuclear (Kondoh et al. 2006).

Aún así, estas teorías siguen sin explicar la ambigüedad en su localización en múltiples líneas celulares en estado basal (Buschbeck and Ullrich 2005; Kondoh et al. 2006; Borges et al. 2007). Erk5 también se trasloca del núcleo al citoplasma a través de su NES (Borges et al. 2007). Las últimas publicaciones han mostrado que tanto la localización nuclear de Erk5 como su translocación del citoplasma hacia el núcleo, son independientes de la fosforilación en el dominio TEY. En líneas celulares con activación constitutiva de HER2, Erk5 puede residir en el núcleo independientemente de su estado de fosforilación (Borges et al. 2007), a diferencia de lo que ocurre con la quinasa Erk1/2 con la que comparte mayor grado de homología, la cual se trasloca al núcleo tras activación por factores de crecimiento (Ebisuya et al. 2005).

Recientes estudios han descrito que Erk5 se fosforila en mitosis de manera independientemente de Mek5, en los residuos Thr⁷³², Ser⁷⁰⁶, Ser⁷⁵³ and Ser⁷⁷³ localizados dentro del subdominio implicado en la localización subcelular de Erk5 (Diaz-Rodriguez et al. 2010). Los estudios moleculares sugieren que la fosforilación de estos sitios podría participar en el tránsito entre el citoplasma y el núcleo, además de regular su actividad transcripcional (Diaz-Rodriguez and Pandiella 2010). Otro grupo independiente identificó cinco sitios de fosforilación en mitosis Ser⁵⁶⁷, Ser⁷²⁰, Ser⁷³¹, Thr⁷³³ y Ser⁸⁰³, dos de ellos (Ser⁵⁶⁷ y Ser⁸⁰³) desconocidos hasta entonces, y a los que también se les atribuye un papel en la regulación del tránsito citoplasma-núcleo de Erk5 (Inesta-Vaquera et al. 2010).

5.5 Activación de la vía de Erk5

Erk5 se identificó originalmente como una MAPK activada por estrés, tanto osmótico como oxidativo (Abe et al. 1996). Estudios posteriores han revelado que también se activa por suero (Kato et al. 1997) y factores de crecimiento como EGF (Kato et al. 1998), FGF-2 (Fibroblast growth factor-2) (Kesavan et al. 2004) y VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Hayashi et al. 2004) y por las citoquinas como el LIF (Leukemia inhibitory factor) (Nicol et al. 2001) y la IL-6 (Interleukin-6) (Carvajal-Vergara et al. 2005). Erk5 también es activado por una serie de condiciones fisiológicas y patológicas, como la tensión tangencial de un fluido (Yan et al. 1999), la hipoxia (Sohn et al. 2002) y la isquemia (Takeishi et al. 1999) (Figura 11).

5.5.1 Proteínas “aguas arriba” de Erk5

Como ya comentamos previamente, la activación de una MAPK consiste en la activación secuencial de un módulo de tres quinasas, MAPKKK/MAPKK/MAPK (Widmann et al. 1999).

La única MAPKK conocida hasta la fecha que activa a Erk5 mediante fosforilación específica en la secuencia TEY es Mek5 (Figura 10). Como se ha demostrado, esta unión puede darse *in vitro* (Zhou et al. 1995) o *in vivo* por expresión de una forma mutante constitutivamente activa de Mek5 (Kato et al. 1997). Mek5 fosforila a Erk5 en la Thr²¹⁸/Tyr²²⁰ dando lugar a un aumento de la actividad catalítica de Erk5 (English et al. 1995). Preferentemente, Mek5 fosforila a Erk5 en la Thr²¹⁸, y se cree que esto podría inducir un cambio conformacional que facilitaría la posterior fosforilación de la Tyr²²⁰, permitiendo así una actividad catalítica completa (Mody et al.

2003). Una vez que Erk5 está activa, es capaz de autofosforilarse y de fosforilar a Mek5 también (Mody et al. 2003). Un estudio reciente ha identificado una serie de residuos en la cola C-terminal de Erk5 que se autofosforilan, provocando un aumento en la actividad transcripcional de esta MAPK (Morimoto et al. 2007).

El ADNc de Mek5 codifica una proteína de unos 444 aminoácidos, compartiendo alrededor de un 40% de homología con otras MAPKKs conocidas (English et al. 1995; Zhou et al. 1995). Mek5 humana presenta dos variantes por splicing alternativo de su ARNm, las isoformas α y β , de 50 y 40 KDa, respectivamente (English et al. 1995).

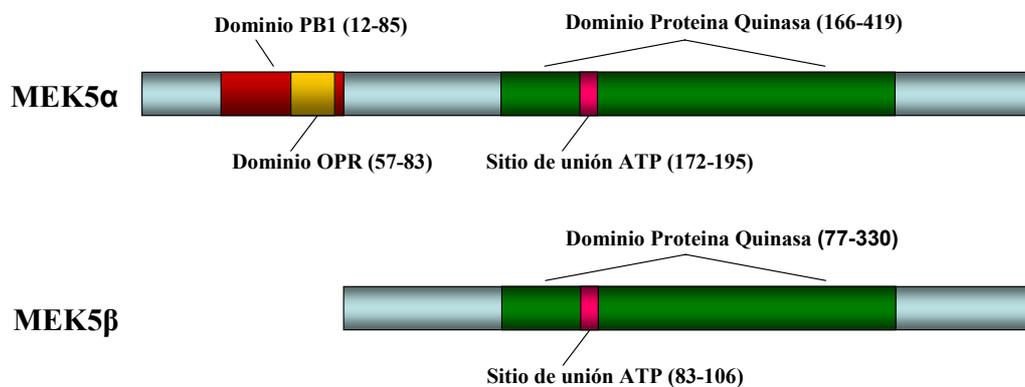


Figura 9. Representación esquemática de los diferentes dominios funcionales de Mek5 α y Mek5 β .

Mek5 β se expresa de manera ubicua en todos los tejidos estudiados, presentando principalmente una localización citosólica en las células. En cambio Mek5 α muestra una distribución tisular más restringida. La expresión de Mek5 β es mayor que Mek5 α en tejidos altamente diferenciados, mientras que la expresión de Mek5 α es mayor en cerebro y tejidos mitóticamente activos tales como el hígado (English et al. 1995; Cameron et al. 2004). La forma completa de Mek5 corresponde con la isoforma Mek5 α y posee 89 aminoácidos más que Mek5 β en el extremo N-terminal, aunque la diferencia funcional entre ambas aún no está bien definida. Mek5 α es activada tras fosforilarse en los residuos Ser³¹¹ y Thr³¹⁵, que en Mek5 β corresponden a los residuos Ser²²² y Thr²²⁶. Para poder caracterizar la vía de señalización que configura el módulo Mek5-Erk5, se ha recurrido a la generación de mutantes constitutivamente activos, mediante la mutación de ambos residuos a ácido aspártico obteniendo la forma mutada

Mek5DD, o la generación de dominantes negativos mutando ambos residuos a alanina obteniendo la forma mutada Mek5AA.

En el año 2001 Nicol y colaboradores (Nicol et al. 2001) utilizando un transgén Mek5 β demostraron la activación de Erk5 *in vitro* e *in vivo*. La activación *in vivo* promovió hipertrofia cardíaca excéntrica progresando posteriormente a una miocardiopatía dilatada y muerte súbita (Nicol et al. 2001). Más tarde, otros grupos mostraron como la doble mutación del sitio de fosforilación en Mek5 α a ácido aspártico activa a Erk5, pero los mismos sitios mutados en la isoforma Mek5 β no la activan, además de impedir su translocación nuclear (Cameron et al. 2004). Por otra parte, Mek5 β inhibe la activación de Erk5 tras estimulación con EGF mientras que el mutante Mek5 α DD induce la actividad transcripcional de MEF2. Mek5 α y Mek5 β individualmente coimmunoprecipitan con Erk5, pero la presencia de Mek5 β impide la asociación de Mek5 α con Erk5 sugiriendo que Mek5 β actuaría como dominante negativo en la activación de Erk5. Parece que el splicing alternativo de Mek5 α y Mek5 β podría jugar un papel crítico en la activación de Erk5 (Cameron et al. 2004).

MEKK2 y MEKK3 son las MAPKKKs implicadas en la activación de Mek5 (English et al. 1995; Chao et al. 1999; Sun et al. 2001) (Figura 10). Se ha descrito que Mek5 contiene un dominio PB1 (Phox-Bem1p) que media la interacción con estas quinasas (Nakamura et al. 2003) y que el bloqueo del complejo MEKK2/Mek5 dependiente de este dominio PB1 evita la activación de Erk5 (Nakamura and Johnson 2003). Mek5 β carece de este dominio PB1 y por ello se la ha identificado como una variante dominante negativa que puede suprimir la señalización de Erk5 (Cameron et al. 2004).

Tras todas estas observaciones se identificó un nuevo dominio de anclaje situado en el extremo N-terminal de Mek5 α , distinto del motivo consenso identificado en otras MAPKKs y muy importante para la organización específica de los componentes de la vía de señalización de Erk5 (Seyfried et al. 2005). De hecho, MEKK2 y Erk5 compiten por este mismo sitio de unión a Mek5, de manera que se cree que Mek5 y MEKK2 formarían un complejo en el que tras fosforilarse Mek5, ésta se disociaría quedando libre para interactuar con su sustrato Erk5 (Wang and Tournier 2006). También se demostró que WNK1 (WNK lysine deficient protein kinase 1) se situaba por encima de MEKK2/3 en la vía de Erk5 (Xu et al. 2004).

5.5.2 Proteínas adaptadoras

El mecanismo(s) molecular(es) a través del cual se activa la cascada de señalización de Erk5 no está totalmente dilucidado. Parece que la cascada puede ser activada por más de un mecanismo dependiente de los estímulos extracelulares. Entre ellos, se ha descrito que la actividad de Ras inducida por los receptores tirosina-quinasa está implicada en la activación de Erk5 (Kamakura et al. 1999). Se demostró, el papel esencial de Src en la activación de Erk5 mediada por estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno *in vitro* (Abe et al. 1997; Suzaki et al. 2002) y más tarde, se vio que la actividad quinasa de Src era necesaria para la activación de Erk5 en respuesta a EGF y que la expresión de MEKK2 dependía de Src para activar Erk5, tras producirse la asociación de MEKK2 con Lad (Lack-associated adapter) (Sun et al. 2001; Sun et al. 2003).

Gab1 (Grb2-associated binder-1) es otra proteína adaptadora implicada en mediar la activación de Erk5 en cardiomiocitos, en respuesta a LIF a través del complejo Gp130 (Glycoprotein 130) (Nakaoka et al. 2003).

La proteína mAKAP (muscle A-kinase anchoring protein) de anclaje a PKA (Protein kinase A), contribuye a la transducción de señales hipertróficas vía Erk5 en cardiomiocitos (Dodge-Kafka et al. 2005) (Figura 10).

5.5.3 Proteínas implicadas en su desactivación

La desfosforilación de las MAPKs en el motivo TXY es llevado a cabo por una subfamilia de fosfatasas denominada MKPs, pertenecientes a la familia de fosfatasas de doble especificidad DUSPs (Dual-specificity protein phosphatases), permitiendo su inactivación (Dickinson et al. 2006). Actualmente, no se ha identificado la DUSP que desfosforila a Erk5.

Sin embargo, se sabe que Erk5 es desfosforilada por la fosfotirosina fosfatasa específica PTP-SL (Protein phosphatase tyrosin Step-like), que interactúa con Erk5 e impide su translocación al núcleo (Buschbeck et al. 2002).

Erk5 también está regulada por modificaciones post-transduccionales. Recientemente se ha visto que está regulada por sumoilación por SUMO3 (Small ubiquitin-like modifier 3) en los residuos Lys⁶ y Lys²² después del tratamiento con H₂O₂ y AGEs (Advanced glucation end products) en células endoteliales humanas del cordón umbilical o HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells). Esta sumoilación está mediada por Ubc9 (SUMO E2 conjugasa) y PIAS1 (E3 ligasa) (Woo et al. 2008). La

regulación por sumoilación de Erk5 es dependiente de su unión a Mek5, pero independiente de su actividad quinasa (Shishido et al. 2008). La sumoilación inhibe la actividad transcripcional de Erk5 pero no su actividad quinasa (Woo et al. 2008).

5.5.4 Sustratos

Para poder comprender mejor las distintas funciones de la cascada de señalización de una MAPK es importante identificar sus efectores. En el caso de Erk5, los sustratos mejor caracterizados son los factores de transcripción de la familia MEF2. Existen cuatro isoformas de MEF2 codificadas en cromosomas diferentes, MEF2A, MEF2B, MEF2C y MEF2D, de las cuales solo tres de ellas, MEF2A, C y D, han sido identificadas como sustratos de Erk5 (Kato et al. 2000). La fosforilación de MEF2C por Erk5 se ha involucrado en la regulación de la expresión de otros factores de transcripción tales como c-Jun, implicado en la progresión del ciclo celular (Kato et al. 1997).

Más tarde se comprobó el requerimiento selectivo de Erk5 para la regulación de c-Jun tras estimulación con EGF, pero no con radiación UV (Ultravioleta) (Kayahara et al. 2005). Por otra parte, MEF2D es un sustrato específico de la vía de Erk5, en cambio MEF2A y C están controlados tanto por la vía de p38 como por la de Erk5 (Pearson et al. 2001). Como ya se mencionó anteriormente, la cola C-terminal de Erk5 posee una región de interacción con MEF2, así como un dominio de activación transcripcional fundamental para la coactivación de MEF2 (Kasler et al. 2000). La importancia de esta región se puso de manifiesto tras llevar a cabo un mutante de la cola C-terminal de Erk5, el cual aun poseyendo intactas sus propiedades de proteína quinasa, era incapaz de estimular la actividad de MEF2 (Yan et al. 2001). Al mismo tiempo, se ha descrito que los factores MEF2 median la acción antiapoptótica de Erk5 en neuronas corticales primarias (Liu et al. 2003).

Otros sustratos de Erk5 son los factores de transcripción c-Myc (cellular-Myelocytomatosis) y Sap1 (Sodium channel associated protein 1) (English et al. 1998; Kamakura et al. 1999). El efecto de la fosforilación de c-Myc por Erk5 aún es desconocido, en cambio la fosforilación de Sap1 activa la transcripción celular a través de un SER (Serum response element) que debe ser el responsable del aumento de expresión de c-Fos (Kamakura et al. 1999; Terasawa et al. 2003).

La señalización por Erk5 a través de Mek5, también estimula la actividad transcripcional de *c-Fos* y *Fra1* (Fos-related antigen 1) por un mecanismo que implica

una quinasa situada más abajo en la vía y que podría ser la quinasa p90RSK (Ribosomal Protein S6 Kinase) (Terasawa et al. 2003). Posteriormente, se demostró que Erk5 se une y activa directamente a p90RSK. Su larga cola C-terminal no fue requerida en esta activación, aunque los dominios CD de Erk5 y D (Docking) de p90RSK si fueron importantes en esta asociación (Ranganathan et al. 2006). Entre otros factores de transcripción de Erk5 también se incluyen CREB (Calcium/cAMP response element binding protein) y Ets-1 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)) (Watson et al. 2001; Dwivedi et al. 2002). Alguno de los sustratos de Erk5 también son regulados por Erk1/2, lo que refleja la redundancia en los sustratos de MAPKs (Nishimoto et al. 2006).

A parte de su papel en proliferación, Erk5 también está involucrado en supervivencia celular. Erk5 protege las células endoteliales de la apoptosis inducida por estrés mecánico mediante fosforilación de Bad (Bcl2/Bcl-XL antagonist causing cell death) en la Ser¹³⁶ y Ser¹¹² secuestrándolo de la mitocondria (Pi et al. 2004).

En fibroblastos, Erk5 promueve la supervivencia mediante la activación de AKT que fosforila e inactiva al factor de transcripción Foxo3a (Forkhead box O3) implicado en la transcripción de FasL (Fas Ligand). Así disminuye la transcripción de FasL y en consecuencia la señalización de los receptores de muerte (DR (Death receptor)) (Wang et al. 2006).

Otro de los sustratos conocidos de Erk5 es la quinasa SGK (Serum and glucocorticoid inducible kinase). Erk5 media la fosforilación en la Ser⁷⁸ necesaria para la activación de SGK, y esto promueve la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento (Hayashi et al. 2001). Erk5 también se une y fosforila a la proteína Cx43 (Connexin 43, protein gap junction) en la Ser²⁵⁵ tanto *in vitro* como *in vivo* (Cameron et al. 2003).

Otra proteína que interacciona con Erk5 *in vitro* es Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) de la familia Bcl-2 (B-cell lymphoma-2). Bim se encuentra en la mitocondria durante la mitosis, y cuando se desfosforila interacciona con Bax (Bcl-2-associated protein X) induciendo la activación de las caspasas. Durante la mitosis, Bim coimmunoprecipita con Erk5, lo que sugiere que Erk5 podría ser un factor de supervivencia durante este proceso (Girio et al. 2007).

Además se ha visto que Erk5 forma complejo con Brk/PTK6 (Breast tumor kinase/protein tyrosine kinase 6) y que esto podría bloquear la migración celular que

desencadena en último término la progresión del tumor y la metástasis en respuesta a la señalización de Met/HGFR (Hepatocyte growth factor receptor) (Castro et al. 2010).

Muy recientemente se ha visto que Erk5 interacciona con PML (Promyocytic leukemia protein) e inhibe su función como supresor tumoral (Yang et al. 2010) (Figura 10).

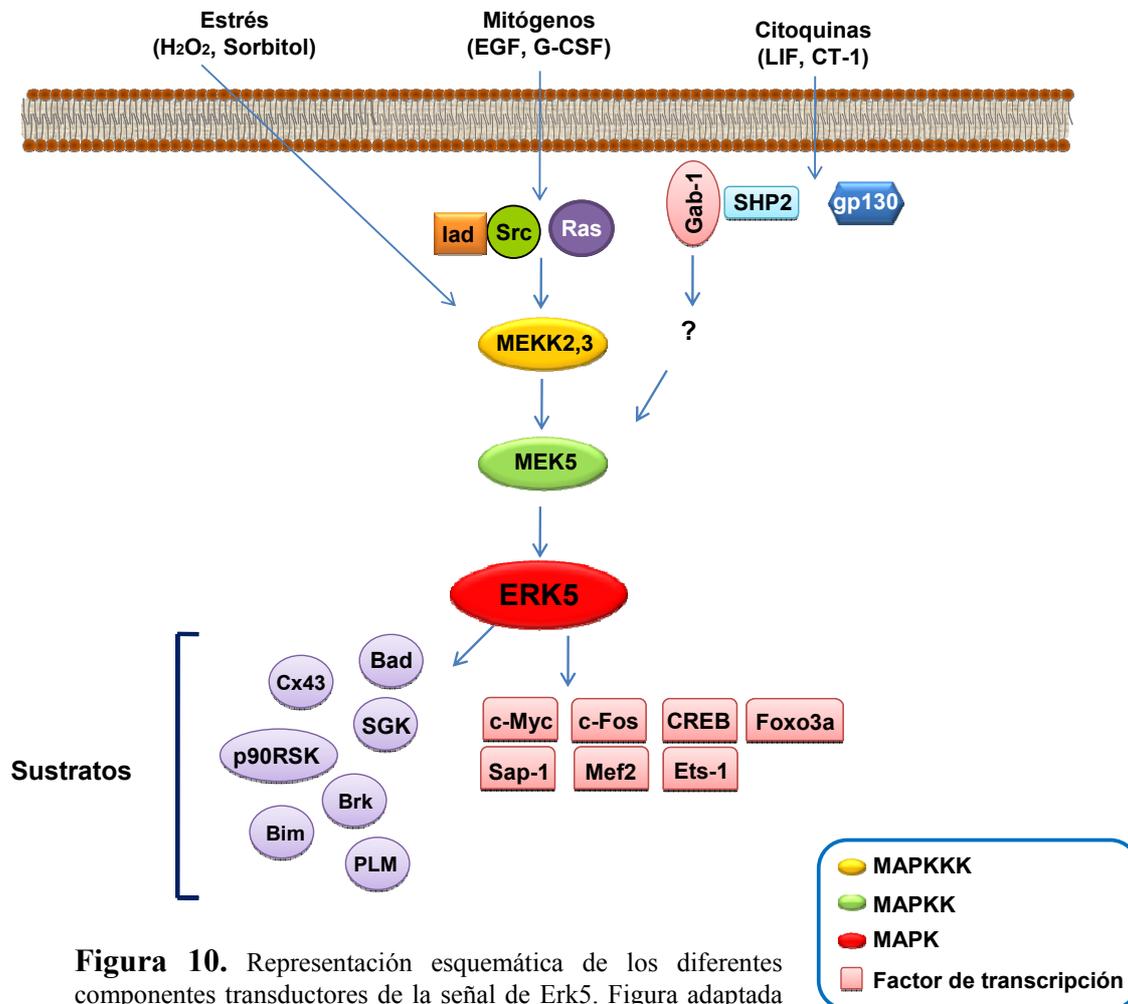


Figura 10. Representación esquemática de los diferentes componentes transductores de la señal de Erk5. Figura adaptada de Wang et al. 2006.

5.5.5 Inhibidores

Mek5 presenta una elevada homología con Mek1 (MAPK/Erk kinase 1), la quinasa responsable de la fosforilación y activación de Erk1/2. Esta semejanza entre sus estructuras se traduce en su susceptibilidad frente a los mismos inhibidores, de tal manera que se ha descrito que los inhibidores clásicos y teóricamente específicos de Mek1, U0126, PD98059 y PD184352 también inhiben a Mek5, aunque son necesarias concentraciones mucho mayores de inhibidor (Mody et al. 2001). Por tanto, los resultados obtenidos con estos inhibidores deberían ser reevaluados utilizando agentes

bloqueantes más específicos para estas dos vías, empleando dominantes negativos de Mek1 o Erk2 (para la vía de Erk1/2) o dominantes negativos de Mek5 o Erk5 (para la vía de Erk5).

En los últimos años se han identificado otros compuestos más potentes en su inhibición, pero dirigidos para ambas vías, tal es el caso del PD0325901 (Bain et al. 2007).

En 2008 se identificaron los primeros inhibidores específicos de la vía de Mek5/Erk5, BIX02188 y BIX02189 (Tatake et al. 2008). Estos compuestos inhiben la actividad catalítica de Mek5 de una forma dosis dependiente con una IC_{50} de 4,3 y 1,5 nM respectivamente. En células Hela estimuladas con sorbitol estos inhibidores previenen la activación de Erk5 sin afectar a la fosforilación de Erk1/2 (Tatake et al. 2008).

En el año 2010 se han identificado varios inhibidores basados en benzimidazoles que impiden la fosforilación de Erk5 por Mek5 (Flaherty et al. 2010).

Yang y colaboradores (Yang et al. 2010) han desarrollado un inhibidor de la actividad catalítica de Erk5 denominado XMD8-92. La inhibición de Erk5 bloqueó la proliferación de células tumorales *in vitro* y también impidió el crecimiento tumoral *in vivo* en el 95% de los casos, demostrando su eficacia y su tolerabilidad en el tratamiento de animales (Yang et al. 2010) (Figura 11).

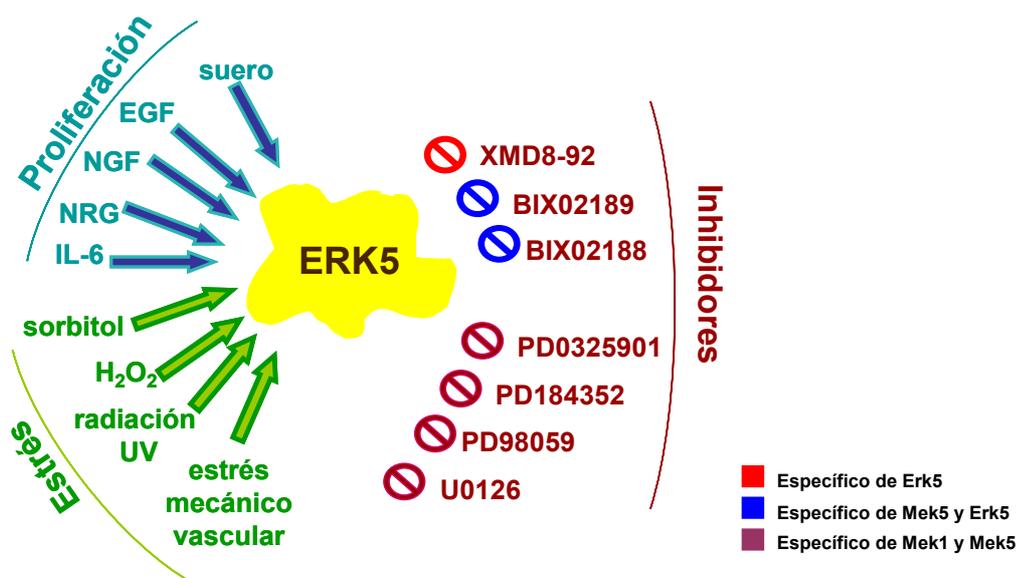


Figura 11. Representación esquemática de los diferentes estímulos e inhibidores que activan la vía de señalización de Erk5.

5.6 Papel fisiológico de Erk5

5.6.1 Erk5 en el desarrollo cardiovascular

Para abordar el papel fisiológico de la señalización de Erk5, los investigadores han utilizado la ablación de genes específicos de esta vía en ratones (Hayashi et al. 2004). Los embriones de ratón deficientes en Erk5 mueren aproximadamente a día 10,5 de gestación (E10.5) debido a defectos cardiovasculares y fallo en la angiogénesis (Regan et al. 2002; Sohn et al. 2002; Yan et al. 2003).

En un intento por determinar el defecto primario en la ablación del gen de Erk5, los investigadores han generado ratones knock-out de Erk5 condicionales en tejidos específicos. Los embriones en los que Erk5 fue específicamente eliminado de la célula endotelial mostraron defectos cardiovasculares y letalidad sobre el día 10 de gestación (E10.0), similar a los ratones knock-out de Erk5 convencionales (Hayashi et al. 2004). En cambio, el ratón knock-out de Erk5 en cardiomiocitos se desarrolló normalmente (Hayashi et al. 2004) lo que confirmó que el desarrollo anormal del corazón en los embriones *Erk5*^{-/-} global es consecuencia del fallo en la vasculogénesis y la angiogénesis. Estos datos sugieren que aunque el knock-out de Erk5 global afecta al desarrollo cardiovascular, el defecto inicial ocurre en el endotelio, indicando que Erk5 es crítica en las funciones de la célula endotelial.

También quedó demostrado que Erk5 es necesaria para mantener la integridad vascular en el ratón adulto, ya que la ablación inducida de *Erk5* en estos ratones es letal dentro de las 2-4 primeras semanas de la inducción del transgén. Un examen fisiológico reveló defectos en los vasos sanguíneos y hemorragias en múltiples órganos (Hayashi et al. 2004).

Anomalías fenotípicas similares se observaron en los ratones que carecen de *Mek5* (Wang et al. 2005) y *MEKK3* (Yang et al. 2000), lo que apoya la teoría de que la señalización de Erk5 es crítica para la vasculogénesis y la angiogénesis.

5.6.2 Erk5 en proliferación y ciclo celular

Tras descubrirse que el suero inducía fuertemente la transcripción génica de c-Jun a través de la activación transcripcional de MEF2C promovida por Erk5, se consideró por primera vez que la vía de Erk5 estaba implicada en la regulación de la proliferación celular (Wang and Tournier 2006). Datos consistentes con este estudio, mostraron que la estimulación celular con mitógenos como el EGF o el G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor), transmite sus señales promotoras del

crecimiento a través de la vía de señalización de Erk5 (Kato et al. 1998) y que la sobreexpresión de mutantes inactivos de Erk5 bloquea tanto la proliferación celular como la entrada de las células a fase S del ciclo celular tras dicho estímulo (Kato et al. 1998). No obstante, la falta de Erk5 podría ser compensada por otras quinasas, ya que fibroblastos *Erk5*^{-/-} y *Mek5*^{-/-} progresan a través de la fase S y su proliferación celular es comparable a los fibroblastos WT (Wild type) (Wang and Tournier 2006). Estos datos sugieren que la vía de Erk5 a través de mitógenos puede ser importante en la regulación de la proliferación de ciertos tipos celulares pero no aclaran cuál es el mecanismo molecular implicado en este proceso. Se ha propuesto que quizá este mecanismo implique la activación de la proteína quinasa SGK íntimamente relacionada con la progresión G1/S del ciclo celular (Buse et al. 1999), ya que la fosforilación de SGK por Erk5 en respuesta a factores de crecimiento es necesaria para que se promueva la entrada en fase S del ciclo celular (Hayashi et al. 2001).

Erk5 también regula la activación transcripcional del gen de la ciclina D1, un *checkpoint* clave en la proliferación celular y cuya desregulación está frecuentemente asociada con la transformación neoplásica. En diversas líneas celulares de cáncer de mama se ha demostrado que Erk5, junto a Erk1/2, regula la activación transcripcional del gen de la ciclina D1, promoviendo la proliferación celular (Mulloy et al. 2003).

También se ha descrito el posible papel de Erk5 en la regulación de la progresión del ciclo celular a través del control de la transición G2/M (Cude et al. 2007). Cude y colaboradores (Cude et al. 2007) mostraron que cuando Erk5 o Mek5DD están sobreexpresadas, el índice mitótico se incrementa y este efecto está mediado por la vía de señalización de NFκB (Nuclear factor κB).

Otros han mostrado que Erk5 está fosforilado en mitosis en comparación con la fase G1/S y que Erk5 activo se une a BIM inactivándolo, lo que sugiere la implicación de Erk5 en la supervivencia de las células mitóticas (Girio et al. 2007). Los últimos estudios publicados han demostrado que Erk5 está fosforilado en mitosis en residuos diferentes al motivo TEY a través de una vía independiente de Mek5 y que puede estar regulada por CDK1 (Cyclin-de

pendent kinase 1) (Diaz-Rodriguez and Pandiella 2010; Inesta-Vaquera et al. 2010).

5.6.3 Erk5 en otros tejidos y situaciones patológicas

En la hipertrofia cardíaca: Existen informes que indican que la vía de Erk5 es crítica en la hipertrofia inducida por cardiotrofina-1, LIF o hipoxia (Nakaoka et al.

2003; Takahashi et al. 2005; Chen et al. 2007); sin embargo, un estudio mostró que Mek5 α constitutivamente activa (Mek5 α DD), no fue capaz de inducir hipertrofia en ratones transgénicos, aunque si les confirió una mayor resistencia frente al daño por isquemia/ reperusión (Cameron et al. 2004).

En el sistema inmunitario: Se ha implicado la actividad de Erk5 en la regulación de la apoptosis de células T en el sistema inmunitario (Sohn et al. 2008), si bien Erk5 parece no ser necesaria para el desarrollo y proliferación de las células T en nódulos linfáticos y timo (Ananieva et al. 2008).

En el sistema nervioso: Durante el desarrollo embrionario del cerebro de rata, la expresión de Erk5 es elevada, decreciendo hasta niveles indetectables tras el día postnatal 49 (Cavanaugh 2004; Liu et al. 2006). Aun así, el knock-out de Erk5 específico de cerebro muestra un desarrollo normal, aunque el global presenta retardos en el crecimiento de la cabeza (Wang and Tournier 2006). Otros estudios han sugerido un posible papel de Erk5 en la supervivencia neuronal mediada por neurotrofinas (Cavanaugh 2004). Datos muy recientes han demostrado por primera vez la evidencia genética de que la MAPK Erk5 regula la supervivencia neuronal. El incremento en la muerte celular de las neuronas asociado con la pérdida de Erk5, indujo una elevada expresión de miembros de la familia Bcl-2 como Bad o Bim. Además, parece que la expresión de Erk5 regula negativamente la transcripción génica de Bad y Bim a través de CREB y Foxo3a (Finegan et al. 2009).

5.7 Erk5 y Cáncer

La carcinogénesis es un proceso por el cual los mecanismos de control genético de las células, protooncogenes y genes supresores de tumores, son modificados dando lugar a una población de células proliferativamente incontroladas (Hayashi and Lee 2004). En la literatura, son varios los oncogenes descritos implicados en la activación de la vía de señalización de Erk5, entre los que podemos citar formas mutantes de Ras, Cot (Cancer Osaka throid) o Src (Wang and Tournier 2006).

Erk5 también se ha implicado en el proceso de angiogénesis asociado al desarrollo tumoral, ya que es requerida *in vivo*, en el proceso de neovascularización inducido por VEGF o FGF a través de un mecanismo que requiere la fosforilación de la proteína p90RSK (Hayashi et al. 2005).

La desregulación de la vía de Erk5 se ha asociado con diferentes propiedades representativas de los cánceres humanos, tales como un mayor potencial metastásico en

cáncer de próstata o carcinoma de células escamosas orales (Dudderidge et al. 2007; Sticht et al. 2008), quimioresistencia en cáncer de mama, mayor proliferación celular tanto en cáncer de próstata como de mama (Mehta et al. 2003; Song et al. 2004) o la potenciación del crecimiento celular y resistencia a la apoptosis en mieloma múltiple (Carvajal-Vergara et al. 2005).

5.7.1 Erk5 y Cáncer de mama

En el año 2002, Weldon y colaboradores (Weldon et al. 2002) demostraron que células quimioresistentes de cáncer de mama presentaban un incremento de más de 20 veces de cambio en el ARNm de Mek5 en comparación con la misma línea celular WT. Tras bloquear la vía de Erk5 con una forma dominante negativa de esta quinasa se revirtió la quimioresistencia y se incrementó la muerte celular tras el tratamiento. Estos datos sugieren que la vía de Erk5 podría transmitir señales antiapoptóticas confiriendo quimioresistencia a las células de cáncer de mama (Weldon et al. 2002).

En cáncer de mama, la activación de Erk5 inducida por EGF parece ser esencial tanto en la estimulación de la proliferación de células epiteliales normales (Kato et al. 1998) como de células tumorales de mama (Kato et al. 1998; Esparís-Ogando et al. 2002).

Esparís-Ogando y colaboradores (Esparís-Ogando et al. 2002) colocaron a la vía de Erk5 como intermediario en la transducción de señales desencadenada tras la activación de receptores ErbB (Esparís-Ogando et al. 2002). Sus estudios demostraron que la activación de los receptores ErbB a través de la neuregulina, uno de los ligandos conocidos de la familia del EGF, provoca la activación de Erk5 (Esparís-Ogando et al. 2002). Además, Erk5 se encuentra constitutivamente activo en líneas celulares derivadas de carcinomas mamarios en las cuales HER2 también se encuentra constitutivamente activo, ya sea por sobreexpresión del receptor o por activación a través de ligando (Esparís-Ogando et al. 2002). De hecho, la reducción de la actividad de Erk5 utilizando formas dominantes negativas en estas líneas, bloqueó parcialmente la proliferación (Esparís-Ogando et al. 2002).

La activación transcripcional del gen de la ciclina D1 constituye un evento temprano en la transformación neoplásica, siendo un punto clave en el proceso de proliferación celular (Mulloy et al. 2003). El 20% de los carcinomas de mama primarios presentan amplificación del gen de la ciclina D1 (Dickson et al. 1995) y en torno al 50% sobreexpresión de la proteína (Bartkova et al. 1994; McIntosh et al. 1995). La

activación transcripcional del gen de la ciclina D1 está regulada por Erk5 de manera similar a la activación inducida por Erk1/2 (Mulloy et al. 2003). La expresión de una forma de Erk5 sin actividad quinasa disminuyó la síntesis de ciclina D1 tras inducción por suero (Mulloy et al. 2003) y el tratamiento de las células con el inhibidor PD184352 de la vía de Erk1/2 indujo un bloqueo en el aumento de los niveles de ciclina D1 sin afectar a la activación de Erk5 (Squires et al. 2002). Estos datos sugieren que la regulación de la ciclina D1 podría ser compartida por ambas vías de transducción de señales y que la vía de Erk5 podría ser una nueva diana terapéutica para aquellos cánceres que presenten desregulación de la ciclina D1 (Hayashi and Lee 2004).

La activación constitutiva de Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3) se ha detectado frecuentemente en líneas celulares de cáncer de mama y no en células epiteliales de mama normal (Song et al. 2004). Un análisis de microarrays en células inmortalizadas de mama normal sobreexpresoras de Stat3, presentaron un incremento de más de 22 veces de cambio en el ARNm de Mek5 en comparación con la misma línea celular WT, datos que se corroboraron mediante Western blot. Además, en la línea celular MDAMB435 que presenta elevados niveles de Stat3 y Mek5, la interferencia de Stat3 provocó una reducción de los niveles proteicos de Mek5 (Song et al. 2004). Estudios realizados en tumores de mama invasivos, demostraron que cerca del 35% de los casos presentaba fosforilación de Stat3, mayor número de metástasis en los nódulos linfáticos regionales y aumento de la expresión del receptor de progesterona. Estos niveles de fosforilación se asociaron al aumento de expresión de diversas proteínas entre las que se encontraba Mek5 (Hsieh et al. 2005). Estos datos sugieren que Mek5 podría ser regulado por Stat3 y que además tendría un papel esencial en la tumorigénesis mediada por este oncogén.

Otros estudios han demostrado que la sobreexpresión de Mek5 *in vitro* en células de cáncer de mama, promueve un fenotipo con mayor resistencia a TNF α asociado a cambios en diversas proteínas. Y que además, estas células presentan un fenotipo EMT (Ephitelial-mesenchymal transition) que se revertió tras interferir Erk5 (Zhou et al. 2008).

Recientemente se ha involucrado la vía de Erk5 con la adhesión y la motilidad celular mediada por integrinas, a través de la activación de FAK (Focal adhesión kinase) en líneas de cáncer de mama y próstata, lo que sugiere que Erk5 podría promover la metástasis en cáncer, independientemente del origen (Sawhney et al. 2009). Además se ha identificado a Erk5 junto con Brk como efectores “aguas abajo” en la señalización de

Met importantes en la migración celular. Una inhibición de la actividad quinasa de Erk5 o de la formación del complejo Erk5/Brk podría bloquear la migración celular que desencadena en último término la progresión del tumor y la metástasis (Castro and Lange 2010).

6. Terapias dirigidas en cáncer de mama

La información acumulada en los últimos años acerca de qué proteínas y vías de señalización están implicadas en procesos tumorales, ha promovido el desarrollo de un gran número de agentes terapéuticos específicos para bloquear el efecto de dichas moléculas (Ocana et al. 2011).

En base a la heterogeneidad del cáncer de mama y a la necesidad de individualizar el tratamiento según el perfil molecular de cada paciente, son múltiples las posibles terapias dirigidas o terapias citotóxicas que pueden ser administradas en relación a su clasificación molecular (Prat and Perou 2010).

6.1 Terapia Hormonal

Hace más de 100 años, se descubrió que el cáncer de mama era una enfermedad hormonosensible, de ahí que el primer tratamiento dirigido contra una diana específica fuese la terapia anti-hormonal (receptores de estrógenos) (Beatson 1896). El Tamoxifeno ha sido el tratamiento endocrino adyuvante estándar durante muchos años en mujeres con cáncer de mama receptor de estrógenos positivo (EBCTG 2005). Sin embargo, las recidivas se siguen produciendo en muchas mujeres que desarrollan resistencia a este fármaco, por ello han surgido nuevos agentes endocrinos tales como los inhibidores de la aromatasa (Lin et al. 2008), que han demostrado su superioridad tanto en la enfermedad metastásica como en la adyuvancia (Smith et al. 2003). Mientras que el Tamoxifeno actúa bloqueando la actividad de los receptores hormonales, los inhibidores de aromatasa reducen los niveles de la hormona 17β -estradiol o estrógenos.

La familia de receptores ErbB se ha implicado en la resistencia a Tamoxifeno. Existen diversos estudios que demuestran que tumores ER y HER2 positivos responden mejor a terapias basadas en la inhibición de estrógenos como los inhibidores de la aromatasa (Ellis et al. 2001; Smith and Dowsett 2003). De hecho, en estos tumores el tratamiento con Tamoxifeno presenta una actividad agonista estimulando el crecimiento tumoral.

Recientes estudios han implicado otras vías de señalización en la resistencia a Tamoxifeno, como la vía de PI3K/AKT y NFκB. Inhibidores de ambas vías han revertido la resistencia a Tamoxifeno sugiriendo que pacientes con resistencia a este fármaco se pueden beneficiar de este tipo de terapias (Campbell et al. 2001; deGraffenried et al. 2004).

Otro mecanismo de resistencia a Tamoxifeno es la pérdida de expresión de receptores hormonales o mutaciones en sus genes que dan lugar a la expresión de receptores con un fenotipo no funcional (Ocana et al. 2006).

6.2 Terapia anti-HER2

Tras descubrirse en los años 80 que el 20-30 % de los tumores de mama sobreexpresan HER2 y que esta sobreexpresión estaba asociada a peor pronóstico y menor supervivencia (Slamon et al. 1987; Slamon et al. 1989), el desarrollo de fármacos que bloqueasen su acción no se hizo esperar. De ahí que pocos años después, apareciese el Trastuzumab (Hudziak et al. 1989), un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular de la proteína HER2, que aumentó la supervivencia de pacientes con enfermedad localizada y metastásica al ser administrado en combinación con quimioterapia (Piccart-Gebhart et al. 2005; Romond et al. 2005). Los taxanos son los agentes quimioterapéuticos que presentan mas sinergismo con Trastuzumab, entre ellos Docetaxel y Paclitaxel (Colombo et al. 2010). Pero cerca de la mitad de las pacientes con enfermedad metastásica HER2 positivo no responden a las terapias actuales y de las que responden la mayoría muestra progresión de la enfermedad tras un año de tratamiento.

La resistencia a Trastuzumab se ha relacionado con diversos mecanismos como la presencia de formas truncadas de HER2, la formación de heterodímeros con otros receptores tirosina quinasa como EGFR o IGF-IR (Insulin-like growth factor-I receptor), la inactivación de PTEN, la expresión de MUC4 o el aumento de expresión de Notch-1 (Neurogenic locus notch homolog protein 1).

En el año 2007, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó el uso de Lapatinib como una nueva alternativa terapéutica para aquellos pacientes con cáncer de mama avanzado o metastásico cuyos tumores sobreexpresan HER2. El Lapatinib es un inhibidor dual de la actividad tirosina quinasa de los receptores EGFR y HER2 que, a diferencia de Trastuzumab, puede bloquear la señalización a través de receptores HER2

que han perdido o han mutado sus dominios extracelulares y no presenta resistencia cruzada con él. El Lapatinib en combinación con Capecitabina, está indicado para el tratamiento de pacientes cuyo tumor ha progresado tras un tratamiento previo con antraciclinas, taxanos y Trastuzumab en enfermedad metastásica (Geyer et al. 2006). Actualmente, son muchos los inhibidores tirosina quinasa que están siendo estudiados en este tipo de patología, tal es el caso de Neratinib, un inhibidor dual de EGFR y HER2 que ha mostrado una potente actividad en pacientes resistentes al Trastuzumab (Burstein et al. 2010).

En el año 2008, Esparís y colaboradores (Esparís-Ogando et al. 2008) demostraron que antagonistas de IGF-IR como NVP-AEW541 presentan un efecto sinérgico con Trastuzumab en células de cáncer de mama sobreexpresoras de HER2, sugiriendo un posible tratamiento para aquellos pacientes que presentan resistencia a Trastuzumab debida a la formación de heterodímeros HER2/IGF-IR (Esparís-Ogando et al. 2008).

Otro agente innovador inhibidor de la dimerización de HER2 es Pertuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido a HER2 que previene la heterodimerización con otros receptores de la familia ErbB. Un estudio reciente reveló que el sitio de unión de Pertuzumab a HER2 es diferente al de Trastuzumab, sugiriendo diferentes mecanismos de acción (Nahta et al. 2004). Actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico de fase III denominado CLEOPATRA (Clinical Evaluation of Pertuzumab and Trastuzumab) que en caso de dar resultados positivos, supondría una nueva terapia para los pacientes HER2 metastásicos.

Los receptores de la familia ErbB, IGR-IR y ER/PR implicados en cáncer de mama activan la vía de señalización de PI3K/AKT. Datos recientes demuestran que AKT promueve la supervivencia del cáncer de mama e induce resistencia a quimioterapia, Trastuzumab y Tamoxifeno, lo que sugiere el uso de terapias dirigidas hacia otras posibles vías de activación en este tipo de pacientes refractarios (Neshat et al. 2001). Tal es el caso de la Rapamicina, un inhibidor específico de la quinasa mTOR, miembro “aguas abajo” de la vía de PI3K, cuyo papel es crítico en la supervivencia celular.

Otros métodos utilizados se basan en incrementar el potencial de los anticuerpos dirigidos contra HER2 combinándolos con antígenos de una amplia variedad de efectores, como la toxina DM-1, la cual ha demostrado una fuerte afinidad por HER2. En estos casos habría que deliberar la dosis que muestre mayor penetrancia en el tumor

respecto a Trastuzumab y que no induzca una fuerte respuesta inmunitaria que limitaría el uso de estas nuevas terapias.

Los últimos estudios publicados, demuestran que las proteínas quinasa de la familia de Src representan otro de los posibles mecanismos de resistencia a Trastuzumab, sugiriendo que la inhibición específica de estas proteínas puede favorecer a este tipo de pacientes (Muthuswamy 2011). Seoane y col. (Seoane et al. 2010) han demostrado que Dasatinib, un inhibidor mutiquinasa de la familia de Src en combinación con Trastuzumab tiene un efecto sinérgico sobre la proliferación de células sobreexpresoras de HER2 tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, mostró un fuerte efecto inhibitorio sobre la activación de HER2 y de otras proteínas implicadas en la respuesta a daño al ADN, causando daño al ADN de doble cadena, parada del ciclo celular y apoptosis independiente de caspasas. Actualmente, se está llevando a cabo un ensayo clínico con Trastuzumab en combinación con Dasatinib que en caso de mostrar resultados positivos supondrá un gran avance en la terapia dirigida a pacientes refractarias a Trastuzumab.

6.3 Terapia en cáncer de mama triple negativo

En la actualidad, para el resto de pacientes de cáncer de mama clasificados en el subgrupo triple negativo (TNBC) la quimioterapia es la única opción, ya que no responden ni a terapias hormonales ni a Trastuzumab. Existen al menos dos subgrupos distintos de TNBC respecto a la quimioterapia, los que presentan sensibilidad y los que no, por ello se están haciendo grandes esfuerzos en encontrar biomarcadores que permitan distinguir entre ambos subgrupos, como es el caso del gen *BRCA1*.

Como se comentó previamente los TNBC/Basal-like comúnmente presentan mutaciones en el gen *BRCA1*. *BRCA1* juega un papel muy importante en la vía de reparación de ADN de doble cadena por recombinación homóloga, en la cual mutaciones de este gen determinan la pérdida de sus funciones. Las PARPs (Poly-ADP-ribose) polymerase) son una superfamilia de proteínas encargadas de la poli-ADP-ribosilación, donde PARP-1, uno de los miembros de esta familia, es esencial para la reparación del ADN de cadena simple. Un daño persistente en el ADN de cadena simple que no sea reparado correctamente puede inducir a largo plazo un daño de doble cadena. Ya que los mecanismos de reparación del daño en el ADN son complementarios, inhibidores de PARP-1 pueden inducir letalidad en células deficientes

en otras vías de reparación, tales como la de BRCA-1, en combinación con agentes inductores de daño al ADN de cadena simple. Desde el año 2003 son múltiples los ensayos clínicos que se están llevando a cabo con inhibidores de PARP tales como BSI-201 y Olaparib en combinación con agentes inductores de daño al ADN de cadena simple (De Laurentiis et al. 2010).

Los inhibidores específicos de EGFR como agente único no han tenido mucho éxito en cáncer de mama, pero pueden aumentar el efecto de la quimioterapia en TNBC, basándonos en los resultados del perfil de expresión génica donde los Basal-like muestran en más del 60% de los casos expresión de EGFR (Kang et al. 2008). Actualmente están en marcha diversos ensayos clínicos que combinan la quimioterapia con inhibidores de EGFR como Cetuximab, Erlotinib y Gefitinib.

Los pacientes con cáncer de mama triple negativo presentan en muchos de los casos elevada expresión de VEGF, ligando del receptor VEGFR (Vascular endotelial growth factor receptor), implicado en el proceso de angiogénesis. En el año 2008, la FDA aprobó el uso de Bevacizumab más Paclitaxel como terapia de primera línea en pacientes con cáncer de mama triple negativo metastásico (Cobleigh et al. 2003). Como Bevacizumab se une a la forma soluble de VEGF en el compartimento extracelular, se han propiciado los ensayos con otros agentes inhibitorios de la actividad tirosina quinasa del VEGFR como Sunitinib.

Estudios preclínicos muy recientes han revelado otros agentes prometedores en TNBC como es el Dasatinib, el cual ha demostrado inhibir selectivamente la proliferación de líneas celulares humanas del tipo Basal-like (Finn et al. 2007).

En la Tabla III se muestran los ensayos clínicos que se están desarrollando actualmente en cáncer de mama triple negativo.

Tabla III. Ensayos clínicos actuales en TNBC

| Agente | Mecanismo | Fase | Tipo | Combinación con otros agentes |
|----------------------------|----------------------------------|-------------|---------------------|--------------------------------------|
| <i>Iniparib (BSI-201)</i> | <i>Inhibidor de PARP</i> | <i>III</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Gemcitabina/Carboplatino</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Gemcitabina/Carboplatino</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Neoadyuvante</i> | <i>Gemcitabina/Carboplatino</i> |
| <i>Veliparib (ABT-888)</i> | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Temozolomida</i> |
| | | <i>I</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Cisplatino/Vinorelbina</i> |
| <i>Olaparib (AZD2281)</i> | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Paclitaxel</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Neoadyuvante</i> | <i>Ninguno</i> |
| <i>PF-01367338</i> | | <i>II</i> | <i>Neoadyuvante</i> | <i>Cisplatino</i> |
| <i>Bevacizumab</i> | <i>Ab monoclonal VEGF</i> | <i>III</i> | <i>Adyuvante</i> | <i>Ninguno</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Nab-Paclitaxel</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Paclitaxel/Carboplatino</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Paclitaxel/Capecitabina</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Docetaxel/Carboplatino</i> |
| <i>Cetuximab</i> | <i>Ab monoclonal EGFR</i> | <i>II</i> | <i>Neoadyuvante</i> | <i>Docetaxel</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Cisplatino</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Ixabepilona</i> |
| <i>Panitumumab</i> | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Paclitaxel/Carboplatino</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Gemcitabina/Carboplatino</i> |
| <i>Erlotinib</i> | <i>Inhibidor quinasa EGFR</i> | <i>II</i> | <i>Neoadyuvante</i> | <i>Ninguno</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Neoadyuvante</i> | <i>Quimioterapia</i> |
| <i>Dasatinib</i> | <i>Inhibidor quinasa Src/Abl</i> | <i>II</i> | <i>Adyuvante</i> | <i>Ninguno</i> |
| <i>Sunitinib</i> | <i>Inhibidor multiquinasa</i> | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Ninguno</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Paclitaxel/Carboplatino</i> |
| <i>Everolimus</i> | <i>Inhibidor mTOR</i> | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Ninguno</i> |
| | | <i>II</i> | <i>Metastásico</i> | <i>Cisplatino/Paclitaxel</i> |

Haciendo referencia al apartado que describe la implicación de Erk5 en cáncer, concretamente en cáncer de mama, y dado que son múltiples los estudios que relacionan su activación con la proliferación celular y con quimioresistencia, es objeto de esta tesis el estudio de Erk5 como una posible diana terapéutica para este tipo de tumores.

Objetivos

Algunos tipos de tumores sólidos, como el cáncer de mama y de ovario, se acompañan frecuentemente de un aumento de la función de receptores HER2, y de una activación constitutiva de las vías de señalización que estos receptores utilizan para transmitir sus señales mitogénicas. Estudios previos de nuestro grupo han descrito en modelos in vitro que la vía de la MAPK Erk5 actúa en la transducción de señales mitogénicas tras estimulación de receptores HER. Además HER2 activado de manera constitutiva causa asimismo activación constitutiva de Erk5. Por otra parte, en líneas celulares de cáncer de mama la expresión de una forma de Erk5 que no puede activarse restringe la proliferación celular.

Objetivos

Debido a estos precedentes, el **objetivo principal** de este trabajo se centró en **determinar la importancia de la vía de Erk5 en cáncer de mama.**

Para ello nos propusimos:

1. Analizar la expresión y activación de Erk5 en biopsias procedentes de tejido tumoral mamario humano y evaluar si correlaciona con el pronóstico de las neoplasias analizadas en lo que respecta a tratamiento, progresión de la enfermedad y supervivencia global.
2. Definir si la vía de Erk5 se encuentra basalmente activa en animales en los cuales se estimule de manera constitutiva al receptor HER2.
3. Averiguar si la activación selectiva de la vía de Erk5, independientemente de HER2, provoca la aparición de tumores mamarios.
4. Analizar el efecto de TG02, un inhibidor multiquinasa, en cáncer de mama.

Material y Métodos

1. Reactivos y animales de experimentación

Los medios de cultivo, antibióticos (penicilina/estreptomicina), geneticina (G418), tripsina-EDTA y suero bovino fetal (SBF) fueron adquiridos a Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). La puromicina empleada para la selección de clones estables es distribuida por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Los reactivos utilizados para las transfecciones celulares fueron Lipofectamine™ de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). Para los cultivos celulares se utilizó material de plástico de Becton Dickinson (San Diego, CA).

La proteína A-Sefarosa™, la GammaBind™ G Sefarosa™, la Glutación-Sefarosa, la Sefarosa CL-4B y el Sefadex G-25 fueron distribuidos por GE Healthcare (Uppsala, Suecia). El Glutación reducido y la Estreptavidina inmovilizada en Sefarosa CL-4B son comercializadas por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Para los análisis *in vivo* se utilizaron ratones modelo FVB parental y FVB/N-Tg (MMTVneu) 202 MuI/J Straits (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) y ratones desnudos (*nu/nu*, Harlan, Piedmont Research Center) que fueron manipulados por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (código: PAE/SA/001) siguiendo la legalidad Europea y de acuerdo con la normativa internacional y nacional establecida por la Directiva 86/609/CEE que se desarrolla en la Ley 3/2007.

Para el análisis inmunohistoquímico de HER2 se utilizó el kit Dako Herceptest (Dakocytomation, Carpinteria, CA).

Los fármacos utilizados en los experimentos *in vitro* e *in vivo* fueron Trastuzumab (Herceptin) (Roche), Lapatinib (LC Labs), Taxotere (Sigma-Aldrich), Vinorelbina (Navelbine (Pierre Fabre)), Doxorubicina (Sigma-Aldrich), Cisplatino (Ferrer Fama) y TG02-citrato (Tragara Pharmaceuticals).

El plásmido pCEFL-Mek5 fue cedido por el Dr. J. Silvio Gutkind (National Institutes of Health/NIDCR Bethesda MD, U.S.A). El vector de expresión pSuper.neo-GFP fue de OligoEngine, el vector pCEFL-Flag fue cedido por el Dr. Pedro Lazo (Centro de Investigación del Cáncer, IBMCC) y el vector pMSG fue cedido por el Dr. Joaquín Arribas (Hospital Val d'Hebrón, Barcelona).

Los enzimas de restricción y los tampones empleados en las digestiones de ADN, los dNTPs y la ligasa T4 de ADN junto con su tampón fueron distribuidos por Fermentas Life Sciences (Burlington, Canadá). La fosfatasa alcalina y su tampón fueron

de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). El enzima M-MLV-Transcriptasa inversa y los oligonucleótidos utilizados en las diferentes PCR son de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). El *RNasin RNase Inhibitor* fue suministrado por Promega (Madison, Wisconsin). El enzima ADN polimerasa y su tampón de reacción fueron de Biotools (B&M Labs, Madrid). Los oligonucleótidos utilizados en las diferentes PCRs fueron de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA).

El kit *QuikChange II Site Directed Mutagénesis* fue de Stratagene (Las Rozas, Madrid).

Las membranas de PVDF Immobilon fueron compradas a Millipore Corporation (Billerica, MA) y las películas de autorradiografía a Fuji Photo Film (*Fujifurumu Kabushiki-kaisha*).

Para la extracción de ARN se utilizó el reactivo Trizol® (Invitrogen), para su purificación se utilizó el kit comercial *Purelink TM RNA mini* (Invitrogen) y para valorar su calidad se utilizó el kit RNA 6000 Nano LabChip Agilent (Palo Alto, CA, EEUU).

El procedimiento de hibridación en los ensayos de microarrays utilizó el kit *One Cycle cDNA Synthesis* (Affymetrix, Santa Clara, CA, EEUU).

El resto de reactivos generales utilizados en este trabajo fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), Roche Applied Science (Mannheim, Alemania) o Merck (Darmstadt, Alemania).

2. Anticuerpos

En la Tabla IV se detallan los anticuerpos primarios empleados en este trabajo, así como la casa comercial que los suministroo.

Tabla IV. Anticuerpos primarios utilizados en este trabajo

| Anticuerpo | Especie | Casa comercial |
|---|----------------------------|---|
| <i>Anti-Erk5 C-terminal</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>Producido en el laboratorio</i> <small>(Esparis-Ogando et al. 2002)</small> |
| <i>Anti-fosfo-Erk5^{TEY}</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>Producido en el laboratorio</i> <small>(Esparis-Ogando et al. 2002)</small> |
| <i>Anti-fosfo-Erk5^{Thr732}</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>Producido en el laboratorio</i> <small>(Diaz-Rodriguez et al. 2010)</small> |
| <i>Anti-c-neu-(Ab3)(HER2)</i> | <i>Ratón (monoclonal)</i> | <i>Oncogene</i> |
| <i>Anti-fosfo-ErbB2 (pHER2)</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>Upstate</i> |
| <i>Anti-HA</i> | <i>Ratón (monoclonal)</i> | <i>Roche</i> |
| <i>Anti-Calnexina</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>Stressgen</i> |
| <i>Anti-GAPDH</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>Santa Cruz Biotechnology</i> |
| <i>Anti-pan-citoqueratinas</i> | <i>Ratón (monoclonal)</i> | <i>DakoCytomation</i> |
| <i>Anti-FLAG</i> | <i>Ratón (monoclonal)</i> | <i>Sigma</i> |
| <i>Anti-MEK5</i> | <i>Ratón (monoclonal)</i> | <i>BD Transduction Laboratories</i> |
| <i>Anti-Parp 1</i> | <i>Ratón (monoclonal)</i> | <i>Santa Cruz Biotechnology</i> |
| <i>Anti-Caspasa 8</i> | <i>Ratón (monoclonal)</i> | <i>BD Transduction Laboratories</i> |
| <i>Anti-Caspasa 9</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>Cell Signalling</i> |
| <i>Anti-Caspasa 3</i> | <i>Ratón (monoclonal)</i> | <i>BD Transduction Laboratories</i> |
| <i>Anti-Caspasa 3 procesada</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>BD Transduction Laboratories</i> |
| <i>Anti-Caspasa 7</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>Cell Signalling</i> |
| <i>Anti-Ciclina A</i> | <i>Ratón (monoclonal)</i> | <i>BD Transduction Laboratories</i> |
| <i>Anti-Ciclina E</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>Santa Cruz Biotechnology</i> |
| <i>Anti-p27</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>Santa Cruz Biotechnology</i> |
| <i>Anti-fosfo-Histona-H3</i> | <i>Conejo (policlonal)</i> | <i>Upstate</i> |
| <i>Anti-Tubulina</i> | <i>Ratón (monoclonal)</i> | <i>Oncogene</i> |

| Anticuerpo | Especie | Casa comercial |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Anti-CDK1 | Ratón (monoclonal) | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti- fosfo-CDK1 ^{Tyr15} | Conejo (polyclonal) | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-Wee | Conejo (polyclonal) | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-fosfo-Rb ^{Ser780} | Conejo (polyclonal) | Cell Signalling |
| Anti-CDK7 | Conejo (polyclonal) | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-CDK9 | Conejo (polyclonal) | Cell Signalling |
| Anti-fosfo-Rpb1 ^{Ser25} | Conejo (polyclonal) | Cell Signalling |
| Anti-fosfo-Chk2 ^{Tyr68} | Conejo (policlonal) | Cell Signalling |
| Anti-fosfo-Chk1 ^{Ser296} | Conejo (policlonal) | Cell Signalling |
| Anti-fosfo-H2AX ^{Ser139} | Conejo (policlonal) | Cell Signalling |
| Anti-XIAP | Ratón (monoclonal) | BD Transduction Laboratories |
| Anti-clAP1 | Ratón (monoclonal) | BD Transduction Laboratories |
| Anti-clAP2 | Ratón (monoclonal) | BD Transduction Laboratories |
| Anti-MCL1 | Conejo (polyclonal) | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-Bcl2 | Conejo (polyclonal) | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-Bclx | Ratón (monoclonal) | BD Transduction Laboratories |
| Anti-Bid (2d1-3) | Rata (monoclonal) | Producido en Australia |
| Anti-Citocromo C | Ratón (monoclonal) | BD Transduction Laboratories |
| Anti-AIF | Ratón (monoclonal) | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-EndoG | Conejo (policlonal) | AbD Serotec |
| Anti-SMAC/Diablo | Ratón (monoclonal) | BD Transduction Laboratories |
| Anti-Erk1/2 | Conejo (policlonal) | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-CoxIV | Conejo (policlonal) | Cell Signalling |

En la Tabla V se detallan los anticuerpos secundarios empleados en este trabajo, así como la casa comercial que los suministró.

Tabla V. Anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo

| Especie reconocida | Molécula conjugada | Antígeno | Casa comercial |
|---------------------------|---------------------------|-----------------|------------------------|
| Conejo | HRP | IgG (H+L) | Bio-Rad |
| Conejo | HRP | IgG (L) | Jackson Immunoresearch |
| Ratón | HRP | IgG (H+L) | Bio-Rad |
| Rata | HRP | IgG (H+L) | GE Healthcare |

H: cadena pesada de la inmunoglobulina

L: cadena ligera de la inmunoglobulina

En la Tabla VI se detallan los anticuerpos anti-Erk5 producidos por nuestro laboratorio y utilizados en este trabajo, así como las secuencias peptídicas de Erk5 contra las que generamos antisueros, y la casa comercial donde se adquirieron dichas secuencias.

Tabla VI. Anticuerpos anti-Erk5 utilizados en este trabajo

| Antisero | Secuencia Peptídica | Casa comercial |
|---|---|-----------------------|
| <i>Anti-Erk5 C-terminal</i> | NH ₂ -Cys-Glu-Ser-Leu-Gln-Arg-Glu-Ile-Gln-Trp-Asp-Ser-Pro-Met-Leu-COOH | Chiron Technologies |
| <i>Anti-fosfo-Erk5^{TEY}</i> | NH ₂ -Cys-His-Gln-Tyr-Phe-Met- p Thr-Glu- p Tyr-Val-Ala-Thr-Arg-Trp-COOH | Isogen Bioscience |
| <i>Anti-fosfo-Erk5^{Thr732}</i> | NH ₂ -Cys-Pro-Pro-Val-Phe-Ser-Gly- p Thr-Pro-Lys-Gly-Ser-Gly-Ala-COOH | Thermo Scientific |

Los antisueros anti-Erk5 C-terminal, anti-fosfo-Erk5^{TEY} y anti-fosfo-Erk5^{Thr732} se obtuvieron de conejos inmunizados con los péptidos citados anteriormente y se han purificado, a partir del suero, mediante cromatografía de afinidad, utilizando para ello columnas de sefarosa unida al péptido contra el cual se había generado el anticuerpo.

En la Figura 12 se esquematiza la molécula de Erk5 señalando las regiones reconocidas por los anticuerpos anti-Erk5 que hemos utilizado en este trabajo.

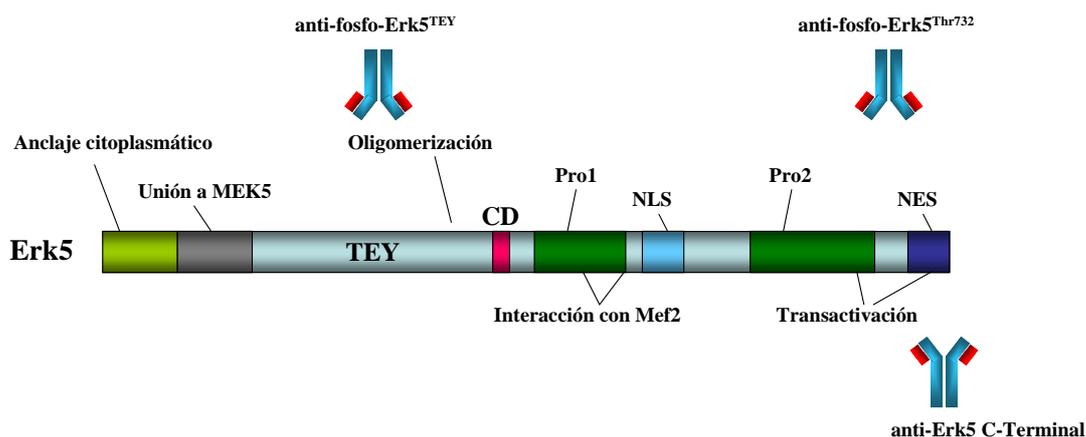


Figura 12. Esquema de la molécula de Erk5 donde se detallan las regiones contra las cuales se ha generado los anticuerpos producidos en el laboratorio.

3. Construcción de mutantes y vectores de expresión

Para la obtención de células BT474-pCEFL-HA-Erk5^{AEF} hemos utilizado el plásmido pCEFL-HA-Erk5^{AEF} generado previamente en nuestro laboratorio (Esparis-Ogando et al. 2002).

Para los estudios de ARN de interferencia (ARNi) en células BT474 se han insertado secuencias de ADN, cuyo transcrito origina *short hairpin* ARNs (shRNAs). La interferencia de ARN del tipo *short hairpin* permite conseguir un bloqueo estable de la expresión del gen diana. En el caso de Erk5, la secuencia diana capaz de originar un silenciamiento efectivo de la proteína fue subclonada en el vector de expresión pSuper.neo-GFP. A continuación se detalla dicha secuencia:

- sentido: 5' **AGAT CTC** CAG CTG CCC TGC TCA AGT CTT TCA AGA GAA GAC TTG AGC AGG GCA GCT TTT TTG GAA A^{3'} (incluye un sitio **BglII**)
- antisentido: 5' **AAGC TTT** TCC AAA AAA GCT GCC CTG CTC AAG TCT TCT CTT GAA AGA CTT GAG CAG GGC AGC TGG G^{3'} (incluye un sitio **HindIII**)

Para la generación del ratón transgénico llevamos a cabo la construcción del plásmido pMSG-Flag-Mek5DD. A partir del plásmido pCEFL-Mek5 se generó la forma constitutivamente activa de Mek5DD. Para ello la secuencia de Mek5 fue amplificada mediante PCR empleando oligonucleótidos detallados a continuación, y subclonada en el vector pCEFL-Flag.

- sentido: 5' AAA **GGA TCC** ATG CTG TGG CTA GCC C^{3'} (incluye un sitio **BamHI**)
- antisentido: 5' AAT **CTC GAG** TCA CGG GGG CCC CT^{3'} (incluye un sitio **XhoI**)

Seguidamente se realizó mutagénesis dirigida de los sitios de fosforilación correspondientes a la Ser³¹¹ y Thr³¹⁵ a ácido aspártico utilizando el kit *QuikChange II Site-Directed Mutagénesis*.

A continuación se amplificó la secuencia Flag-Mek5DD mediante PCR con los oligonucleótidos abajo detallados y se subclonó en el vector de expresión pMSG.

- sentido: 5' **CCC GGG** ATG GAC TAC AAG GAC^{3'} (incluye un sitio **SmaI**)
- antisentido: 5' **CTC GAG** TCA CGG GGG CCC CTG^{3'} (incluye un sitio **XhoI**)

Todas las construcciones se verificaron mediante secuenciación a través del Servicio de Genómica de nuestro centro.

4. Cultivos celulares

Las líneas celulares empleadas, así como el origen del cual proceden, se detallan en la tabla VII:

Tabla VII. Líneas celulares utilizadas en este trabajo

| <i>Línea celular</i> | <i>Especie</i> | <i>Origen</i> | <i>Medio de cultivo</i> |
|----------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| <i>BT474</i> | <i>Homo sapiens (humano)</i> | <i>Carcinoma de mama</i> | <i>DMEM 10% FBS</i> |
| <i>HBL100</i> | <i>Homo sapiens (humano)</i> | <i>Carcinoma de mama</i> | <i>DMEM 10% FBS</i> |
| <i>MDAMB231</i> | <i>Homo sapiens (humano)</i> | <i>Carcinoma de mama</i> | <i>DMEM 10% FBS</i> |
| <i>MDAMB435</i> | <i>Homo sapiens (humano)</i> | <i>Carcinoma de mama</i> | <i>DMEM 10% FBS</i> |
| <i>HCC1187</i> | <i>Homo sapiens (humano)</i> | <i>Carcinoma de mama</i> | <i>RPMI 10% FBS</i> |
| <i>HCC1937</i> | <i>Homo sapiens (humano)</i> | <i>Carcinoma de mama</i> | <i>RPMI 10% FBS</i> |
| <i>HCC3153</i> | <i>Homo sapiens (humano)</i> | <i>Carcinoma de mama</i> | <i>RPMI 10% FBS</i> |
| <i>HCC70</i> | <i>Homo sapiens (humano)</i> | <i>Carcinoma de mama</i> | <i>RPMI 10% FBS</i> |
| <i>HS-578T</i> | <i>Homo sapiens (humano)</i> | <i>Carcinoma de mama</i> | <i>DMEM 10% FBS</i> |
| <i>BT549</i> | <i>Homo sapiens (humano)</i> | <i>Carcinoma de mama</i> | <i>RPMI 10% FBS</i> |
| <i>Hela</i> | <i>Homo sapiens (humano)</i> | <i>Carcinoma de cérvix</i> | <i>DMEM 5% FBS</i> |

4.1 Condiciones de cultivo

Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) conteniendo elevada concentración de glucosa (4,5 g/l), L-Glutamina 4 mM y L-Piruvato 5 mM o en medio RPMI 1640 con L-glutamina 4 mM. El medio fue suplementado con Penicilina y Estreptomicina (100 U/ml y 100 µg/ml respectivamente) y con un 5% -10% de suero bovino fetal (SBF) según el tipo celular, como se detalla en la Tabla VII.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en un incubador a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂- 95% de O₂ y fueron cultivadas en condiciones de esterilidad.

Para subcultivar las células, éstas se lavaron con PBS estéril (KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄, 7,98 mM) y se incubaron con una solución 0,25% de tripsina y 0,38 g/l de EDTA durante 5 minutos que se neutralizó con medio de cultivo fresco. La suspensión celular se transfirió a nuevas placas de cultivo, realizando la dilución adecuada para cada línea celular.

4.2 Preservación de las líneas celulares

Las células fueron congeladas a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Para congelarlas, una vez tripsinizadas se centrifugaron a 1.200 rpm durante 3 minutos y se resuspendieron en 1 ml de medio de congelación frío (DMEM o RPMI, según el tipo celular, suplementado con 10% de SBF y 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido)). Los crioviales se mantuvieron a -80 °C durante 24 horas y, posteriormente, se almacenaron en nitrógeno líquido.

5. Transfección de líneas celulares

La expresión del mutante de Erk5 en su forma dominante negativa (Erk5^{AEF}) en la línea celular BT474 se consiguió por transfección con fosfato cálcico (Sambrook 1989).

La expresión del vector que contiene la secuencia de interferencia de Erk5 (shErk5) en la línea celular BT474, así como la expresión de la secuencia de Mek5 en su forma constitutivamente activa (Mek5DD) en la línea celular Hela se consiguió por transfección con LipofectamineTM (Invitrogen).

5.1 Transfección con fosfato cálcico (Sambrook 1989)

Las células se sembraron a una concentración de 10.000 – 20.000 células/cm² en placas de 100 mm. Al día siguiente se mezclaron 10 µg del plásmido diluidos en TE 0,1x pH 8.0 (EDTA 0,1 mM, Tris-HCl 1 mM, pH 8.0) hasta un volumen de 500 µl con un volumen equivalente de tampón HBS 2x (NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, glucosa 12 mM, HEPES 50 mM, pH 7.05) y con 62 µl de CaCl₂ 2 M añadidos gota a gota a la vez que se burbujeaba con una pipeta Pasteur durante 20-30 segundos. Trascorridos 30 minutos se añadió esta mezcla a las células a las que se les había retirado el medio de cultivo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregó a las placas medio de cultivo completo. Seis horas más tarde se realizó un choque osmótico para aumentar la eficiencia de la técnica incubando las células transfectadas con una solución de glicerol 10% en medio de cultivo durante tres minutos. Las placas fueron lavadas dos veces con tampón PBS estéril antes de añadir el medio de cultivo fresco correspondiente a cada línea celular.

5.2 Transfección con Lipofectamine™ (Invitrogen)

Se siguió el protocolo recomendado por Invitrogen Life Technologies. Las células se sembraron en placas de 60 mm en medio de cultivo DMEM sin suero y sin antibióticos de manera que, en el momento de la transfección, la confluencia fuera del 80-90%. Se mezclaron 6 µg del ADNc diluido en 300 µl de medio de cultivo sin suero y sin antibióticos, con 36 µl de Lipofectamine™ diluida en otros 300 µl del mismo medio. Tras incubar la mezcla 30 minutos a temperatura ambiente se añadió a las placas de células que contenían 2,4 ml de medio de cultivo. Seis horas más tarde se reemplazó el medio de la transfección por medio de cultivo completo.

5.3 Generación de “pools” y clones estables

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se dividieron con el objeto de seleccionar “pools” o clones estables, utilizando el antibiótico Geneticina (G418) a una concentración activa de 500 µg/ml, o puromicina (2-3 µg/ml, según el tipo celular) dependiendo del gen de resistencia codificado por el vector de expresión. Tras el proceso de selección se comprobó la expresión de la proteína de interés en los distintos clones. En los experimentos realizados con células que expresaban de forma transitoria la proteína de interés, éstas fueron procesadas 48 horas después de la transfección.

6. Ensayo de proliferación celular

Para analizar la proliferación de los cultivos celulares se utilizó el ensayo de incorporación de MTT (Mosmann 1983). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Las células se sembraron en placas multipocillo de 24 unidades a una densidad de 10.000 ó 20.000 células por pocillo (dependiendo del tipo celular). Transcurridas 24 horas se midió la incorporación de MTT que se consideró el punto cero de cada experimento. La estimación de la proliferación celular se realizó midiendo de nuevo la incorporación de MTT a diferentes tiempos de cultivo.

Para medir la capacidad reductora de las mitocondrias, se reemplazó el medio en el que se encontraban las células por medio fresco que contenía 500 µg/ml de MTT y se incubaron las placas a 37 °C durante dos horas. El formazán generado en ese tiempo se solubilizó en 500 µl de DMSO, tras retirar el medio conteniendo MTT de las placas de cultivo, y se midió la absorbancia a $\lambda = 570$ nm en un lector automático de placas (Tekan Ultra^{Evolution}).

Para determinar la efectividad de la sal TG02-citrato sobre viabilidad celular *in vitro* se prepararon las suspensiones de TG02-citrato a las dosis de 10 mM, 1 mM y 100 µM en DMSO. La sal TG02-citrato y las alícuotas preparadas fueron almacenadas a 4 °C.

6.1 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación celular se representan como la media \pm desviación estándar de cuadruplicados de, al menos, dos experimentos independientes. La significación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) aplicando posteriormente el test de Bonferroni que permite comparar las muestras por pares, teniendo en cuenta que se realizan múltiples comparaciones. Para ello se usó el paquete estadístico SPSS Data Analysis Program, version 13.0 (SPSS, INC., Chicago, IL).

7. Preparación de extractos celulares e inmunoprecipitación

Las células fueron lavadas dos veces con PBS y posteriormente incubadas durante 10 minutos con tampón de lisis (NaCl 140 mM, EDTA 10 mM, 10% glicerina, 1% Nonidet P-40, Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, PMSF 1 mM, Pepstatina 1 µM, Aprotinina 1 µg/ml, Leupeptina 1 µg/ml, Ortovanadato Sódico 1 mM (Cabrera et al. 1996)). Tras recoger los extractos celulares en tubos de 1,5 ml, se centrifugaron durante 10 minutos a 4 °C y 12.000 rpm. Para muestras de tumores humanos y de ratón, éstos fueron lavados con PBS frío y homogeneizados (con un homogeneizador Dounce) en el mismo tampón de lisis que para las células pero con una concentración 10x de proteasas y con β -Glicerofosfato 25 mM y Fluoruro Sódico 10 mM. Este homogeneizado fue centrifugado a 10.000 xg durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente, los sobrenadantes

se transfirieron a nuevos tubos. Tanto el PBS como el tampón de lisis se mantuvieron en frío y todo el proceso se llevó a cabo en hielo.

Los extractos proteicos celulares se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford 1976).

La detección de las proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Western blot, bien directamente en extracto, mezclando la cantidad necesaria con tampón de carga (SDS 4 %, azul de bromofenol 0,05 %, glicerina 20 % y β -mercaptoetanol 2 % en Tris-HCl 100 mM, pH 6.8) o en caso de que fuese necesario enriquecer la muestra en dicha proteína, mediante inmunoprecipitación empleando el anticuerpo correspondiente y 60 μ l de proteína A Sefarosa o GammaBind G Sefarosa (en función del tipo de inmunoglobulina del anticuerpo). Esta mezcla se mantuvo en agitación a 4 °C durante al menos 2 horas. A posteriori se lavaron los complejos inmunes por tres veces con 1 ml de tampón de lisis frío y cada muestra se resuspendió en 35 μ l de tampón de carga. Seguidamente se calentaron durante 5 minutos a 100 °C y finalmente, fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

8. Electroforesis y Western blot

Para llevar a cabo la separación de las proteínas se empleó la técnica de electroforesis a través de una matriz porosa, en nuestro caso en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli 1970) y con tampón de carrera (Tris 20 mM, Glicina 192 mM y SDS 1%). Este tipo de electroforesis obedece a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa. Las proteínas se cargan al unirse con el detergente SDS que incorpora cargas negativas de una manera dependiente de la masa molecular de la proteína. Una vez hervidas las muestras, éstas fueron cargadas en el gel y la electroforesis se realizó en cubetas Mini-PROTEAN®3 (BioRad) o en cubetas grandes de tipo *Sturdier* a un determinado voltaje. Al aplicar un campo eléctrico, las proteínas comienzan a moverse a través de la malla del gel, de manera que las pequeñas al tener menor masa molecular se moverán con mayor velocidad y las más grandes de manera inversa. Una vez finalizada la electroforesis las proteínas se inmovilizaron en una membrana de PVDF usando un sistema de transferencia húmeda a 500 mA en solución amortiguadora (Tris 20 mM pH 8.3, Glicina 192 mM). El tiempo de transferencia se fijó en función del porcentaje de poliacrilamida del gel oscilando entre 70 y 180 minutos.

A continuación las membranas se bloquearon durante al menos una hora con 1% de BSA en TBS-T (NaCl 140 mM, 0,05% Tween, Tris 10 mM pH 7.5) y se incubaron con el anticuerpo correspondiente disuelto en tampón TBS-T. El tiempo de incubación del anticuerpo primario fue de al menos 2 horas. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 7 minutos cada vez y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a Peroxidasa de Rábano (HRP) durante media hora. Tras realizar de nuevo tres lavados con TBS-T, las bandas se visualizaron por radiografía con un sistema de detección basado en la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno y potenciado con p-iodofenol (Ausubel et al. 1987; Cabrera et al. 1996). Para ello se incubaron durante 1 minuto en tampón de revelado (luminol 0,08%, p-iodofenol 0,02%, Tris-HCl 0,1 M pH 9.3) al que previamente se le añadió H_2O_2 0,44 mM.

La cuantificación de las bandas obtenidas por Western blot correspondientes a Erk5, pErk5, HER2, pHER2 y pan-citoqueratinas se llevó a cabo con el programa NIH Image 1.61.

9. Ensayo de quinasa *in vitro*

Extractos de células HeLa, estimuladas o no con EGF (10 nM/15 min), se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal y 60 μ l de proteína A sefarosa. Después de incubar los inmunoprecipitados durante 2 horas a 4 °C en agitación, los complejos inmunes fueron recuperados mediante corta centrifugación (5-10 segundos) y lavados tres veces con 1 ml de tampón de lisis suplementado con inhibidores de fosfatasa y dos veces con tampón quinasa (HEPES 20 mM, pH 7.6, $MgCl_2$ 20 mM, β -glicerofosfato 25 mM). A continuación, los inmunocomplejos fueron incubados con concentraciones crecientes de TG02 durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadió a cada muestra ATP y ortovanato sódico a una concentración final de 100 μ M y 1 mM respectivamente, y se incubaron durante 30 minutos a 30 °C. Transcurrido este tiempo, la reacción se paró con tampón de carga. Posteriormente, analizamos mediante Western blot la expresión de Erk5 con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal.

10. Muestras de pacientes e inmunohistoquímica

Se analizaron un total de 84 tumores de mama obtenidos del departamento de Patología del Hospital Universitario de Salamanca, procedentes de pacientes diagnosticadas durante el periodo 1999-2005. Todas las pacientes proporcionaron un informe de consentimiento por escrito para la recogida de las muestras y su subsecuente análisis.

El procedimiento fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital de Salamanca.

HER2 fue analizado usando el kit Dako Herceptest. La expresión de Erk5 fue analizada usando el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal (residuos 781-805) purificado por afinidad. Este anticuerpo detecta específicamente Erk5 en inmunohistoquímica. Este hecho fue corroborado con la tinción negativa de Erk5 tras preincubar el anticuerpo con el péptido contra el cual se había generado. Para los estudios clinicopatológicos, las muestras congeladas humanas fueron inspeccionadas previamente mediante el ensayo de tinción con hematoxilina-eosina (tinción azul/púrpura (núcleos) y rosa (citoplasma)), cuyo marcaje corresponde al contenido epitelial del tumor. Los niveles de expresión de Erk5 fueron evaluados únicamente en las células tumorales epiteliales.

El análisis cuantitativo se basó en el porcentaje de células marcadas y en la intensidad de la tinción, definiéndose de la siguiente manera: 0, tinción no apreciable en las células (0<10%); 1, intensidad de tinción débil (10% al 30%); 2, intensidad de tinción intermedia (30% al 60%), y 3, fuerte intensidad de tinción (> 60%). Las células normales de mama se tiñeron con una intensidad de 1. Los tumores se consideraron positivos (alto Erk5) cuando su tinción correspondía a valores de 2 ó 3, mientras que se consideraron negativos los que daban valores de 0 o 1.

10.1 Análisis estadístico

El análisis estadístico de las muestras de paciente fue llevado a cabo usando el programa de análisis de datos SPSS Data Analysis Program, version 13.0 (SPSS, INC., Chicago, IL). La asociación entre dos variables dicotómicas fue determinada usando el chi-square test y el test exacto de Fisher de dos colas.

El test de correlación no-paramétrico de Spearman fue usado para calcular el significado estadístico de las variables continuas. El test de Mann-Whitney U fue usado para comparar variables continuas con variables dicotómicas u ordinarias. La

supervivencia libre de enfermedad (DFS (Disease-free survival)) fue calculada desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha de recurrencia o muerte. Los pacientes que estaban libres de enfermedad a la fecha del último seguimiento fueron eliminados del estudio. El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier fue realizado por DFS. Diferencias en DFS acordes con la expresión de Erk5 fueron comparadas usando el test de Log-rank. El análisis multivariante usando el modelo de Cox de riesgos proporcionales fue llevado a cabo para definir los factores pronóstico independientes para DFS. Todos los tests estadísticos fueron llevados a cabo con un nivel significativo de dos colas de $p=0.05$.

11. Modelos animales

11.1 Tumores de ratones FVB y FVB/neu

Para los análisis *in vivo* en ratón, se han utilizado los modelos FVB parental y el FVB/N-Tg (MMTVneu) 202 MuI/J Straits. Estos ratones fueron manipulados por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (código: PAE/SA/001) siguiendo la legalidad Europea y normas institucionales (86/609/CEE). El crecimiento tumoral fue evaluado después de un período de 6 meses tras el nacimiento y las muestras del tumor fueron obtenidas después de sacrificar a los animales e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido.

Para los estudios bioquímicos, las muestras tumorales de ratón fueron inspeccionadas previamente mediante el ensayo de tinción con hematoxilina-eosina, cuyo marcaje corresponde al contenido epitelial del tumor.

11.2 Ratones transgénicos

Para la generación del ratón transgénico de la forma constitutivamente activa de Mek5 (Mek5DD) dirigida específicamente al tejido mamario murino, se utilizó el plásmido pMSG-Flag-Mek5DD que contiene el promotor MMTV. Tras la digestión con la enzima Hind III se obtuvo el constructo MMTV-Flag-Mek5DD que fue cedido al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Allí se disolvió en buffer de microinyección de ADN (Embryomax injection buffer, Specialty Media) a concentración de 5 ng/ μ l y posteriormente se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. La cepa donadora de óvulos fecundados de ratón utilizada fue la cepa FVB, ya que ésta responde muy bien al protocolo de ovulación y es el fondo genético elegido por excelencia para el estudio de los tumores de mama. Para la consecución del máximo número de

óvulos fecundados se administraron 5 unidades internacionales de PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin) y HCG (Human chorionic gonadotropin) (Sigma) en un intervalo de 48 horas respectivamente. Inmediatamente, estas hembras fueron puestas en cruce con ratones machos de la misma estirpe y a las 12 horas fueron sacrificadas aquéllas que fueron cubiertas por el macho (visualización del tapón vaginal). De estas hembras se extrajeron los embriones en fase de una célula mediante lavado con medio M2 (Sigma-Aldrich) y posterior disgregación con la enzima hialuronidasa (Sigma). Los embriones obtenidos se microinyectaron con el ADN desnudo generado en el laboratorio y se recuperaron en medio KSOM + aa (Embriomax Chemicon) durante 12 horas a 37 °C y en condiciones de humedad y 5% CO₂. Aquellos embriones que evolucionaron favorablemente a estadio de dos células se reimplantaron en hembras pseudogestantes de la estirpe CD1, donde llevaron a término el resto de la gestación. Todos los animales se mantuvieron en condiciones de SPF (instalaciones libres de patógenos) en el Animalario OMG de la Universidad de Salamanca, en Racks ventilados y aislados. Una vez que nacieron las camadas y transcurridos 20 días, los animales se destetaron de las madres y fueron separados por sexos. A cada ratón nacido se le cortó un pequeño trozo de colita (no superior de 3 mm como sugiere la legislación actual) en condiciones de mínimo dolor. De cada colita se extrajo el ADN genómico del ratón con el fin de conocer qué ratones de los nacidos son o no transgénicos fundadores de la futura línea. La extracción del ADN genómico se realizó incubando las mismas con tampón fornace, SDS, EDTA y Proteinasa K durante una noche en baño a 55 °C. Posteriormente se llevó a cabo una extracción clásico fenol-cloroformo. Cada ADN se testó para detectar la presencia del transgén mediante PCR.

11.3 Tumores de ratones xenografts

Se utilizaron ratones desnudos (*nu/nu*, Harlan) con 9-10 semanas de edad, y pesos comprendidos en el rango de 18.9-26.9 g.

Como modelo celular se utilizó la línea del subtipo triple negativo de cáncer de mama, MDAMB231. Células MDAMB231 en crecimiento de fase exponencial, fueron recogidas y resuspendidas en PBS a una concentración de 2.5×10^7 células/ml. Cada ratón fue inyectado subcutáneamente en el flanco derecho con 5×10^6 células (0.2 ml de la suspensión celular) y los tumores se monitorizaron hasta alcanzar un tamaño comprendido entre 80-120 mm³. Treinta y tres días más tarde, tiempo que denominamos

como Día 1 (D1) del estudio, los ratones fueron divididos en 3 grupos (10 ratones por grupo). El rango del volumen del tumor individual entre los 10 ratones fue de 75-144 mm³ y la media del volumen del tumor por grupo fue de 102-105 mm³. El tamaño del tumor en mm³ fue calculado a través de la fórmula, $\text{Volumen}_{\text{Tumor}} = a^2 \times L / 2$, donde a es el ancho del tumor y L es el largo del tumor.

Tragara Pharmaceuticals nos proporcionó la sal TG02-citrato en polvo. Cada semana, se prepararon las suspensiones de TG02-citrato a las dosis de 4.692 mg/ml (3 mg/ml TG02 puro) y 9.384 mg/ml (6 mg/ml TG02 puro) en 0.5% metil-celulosa (0.1% Tween® 80 en agua desionizada). La sal TG02-citrato y las alícuotas preparadas semanalmente fueron almacenadas a 4 °C.

En el D1, los 3 grupos de ratones fueron tratados de la siguiente manera: Grupo 1, tratados con el vehículo (0.5% metil-celulosa (0.1% Tween® 80 en agua desionizada)), Grupo 2, tratados con TG02-citrato a 46.92 mg/Kg diariamente y Grupo 3, tratados con TG02-citrato a 93.84 mg/Kg dos veces por semana. Todos fueron tratados oralmente mediante canulación gástrica.

El volumen del tumor de cada ratón se midió dos veces por semana y cuando alcanzó un tamaño de 1500 mm³, el animal fue sacrificado aunque el estudio no hubiese concluido.

El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% ICT) se definió como la diferencia entre el volumen medio del tumor del Grupo 1 ($\text{VMT}_{\text{Control}}$) y el volumen medio del tumor del grupo tratado ($\text{MTV}_{\text{Tratado}}$), expresado en porcentaje respecto al $\text{VMT}_{\text{Control}}$.

$$\% \text{ ICT} = (\text{VMT}_{\text{Control}} - \text{VMT}_{\text{Tratados}}) \times 100 / \text{VMT}_{\text{Control}}$$

En este ensayo, se ha considerado que un agente es potencial y terapéuticamente activo cuando su % ICT fuese mayor de un 50%.

La eficacia del tratamiento también fue analizada en base a una respuesta de regresión del tumor, definiendo una respuesta de regresión parcial (RP) cuando el volumen del tumor fuese del 50% o menos de su volumen a D1 durante tres medidas consecutivas en el curso del estudio ($\geq 13.5 \text{ mm}^3$) y respuesta de regresión completa, (RC) cuando el volumen fue $< 13.5 \text{ mm}^3$ durante tres medidas consecutivas en el curso del estudio.

12. Microarrays de ARN

Se analizó el perfil de expresión génica de la línea celular del subtipo triple negativo de cáncer de mama MDAMB231 tras el tratamiento con TG02 100 nM.

12.1 Extracción de ARN

Una vez alcanzado un grado de confluencia celular del 80-90%, las placas de cultivo de células se lavaron con PBS frío. Se añadió 1ml de Trizol® por placa de 100 mm y con la ayuda de un raspador se levantaron las células que fueron recogidas en tubos eppendorf de 2 ml. Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Después se añadieron 200 µl de cloroformo (Merck) y tras agitar vigorosamente durante 15 segundos en vortex se volvieron a incubar a temperatura ambiente durante 2-3 minutos, tras los cuales se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación se formaron tres fases, una inferior de color rojo fenol/cloroformo (proteínas), una interfase sólida de color blanco (ADN) y una superior acuosa (ARN).

12.2 Precipitación, lavado y resuspensión del ARN

La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se precipitó el ARN añadiendo 500 µl de alcohol isopropílico (Merck). La mezcla se agitó y se dejó incubar a 4 °C durante 10 minutos. A continuación se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet añadiendo 1ml de etanol 75% (Merck). Tras agitar bien la mezcla, se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, se dejó secar el pellet parcialmente, ya que un secado completo disminuye su solubilidad. Finalmente se resuspendió el ARN en 100 µl de agua DEPC y se mantuvo 10 minutos a una temperatura entre 55-60 °C para favorecer su solubilización.

12.3 Purificación del ARN

La purificación se llevó a cabo utilizando el kit comercial *Purelink™ RNA Mini* (Invitrogen) siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

12.4 Medida de la concentración y calidad del ARN

La evaluación de la integridad y calidad del ARN fue un paso fundamental, previo al análisis de la expresión génica. Lo primero fue hacer una medida de concentración del ARN empleando el sistema de *Agilent 2100 Bioanalyzer* y al mismo tiempo se valoró la calidad del ARN, con el kit *RNA 6000 Nano LabChip* con el que se pueden medir hasta 12 muestras (1 μl por cada una) en un rango de concentración entre 25 y 250 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Para cada muestra el bioanalizador calculó automáticamente la relación entre las áreas de las bandas ribosomales 28S y 18S, que idealmente debe estar entre 1,8 y 2,1, siendo este parámetro utilizado como indicador de la calidad de la muestra. Un ratio distinto al mencionado indicó degradación parcial de la muestra o contaminación de la misma pudiendo llegar a desaparecer las bandas si el ARN estaba degradado totalmente. Los picos más diferenciados y de mayor tamaño se corresponden con las fracciones ribosómicas 18S y 28S. La línea entre 28S y la fracción 18S ha de ser prácticamente recta y los picos pequeños corresponden a pequeñas moléculas de ARN (Figura 13).

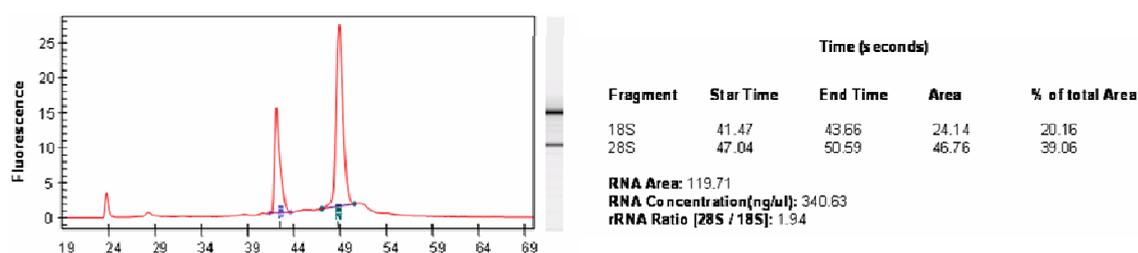


Figura 13. Ejemplo de cuantificación de ARN y determinación de su calidad.

12.5 Preparación de las muestras e hibridación en los Microarrays

Se partió de 3 μg de ARN total para la preparación de todas las muestras. Se utilizó el kit *One Cycle cDNA Synthesis* de Affymetrix.

En la Figura 14 se encuentran esquematizados, de modo resumido, los principales procedimientos que anteceden a la obtención de los datos en los microarrays.

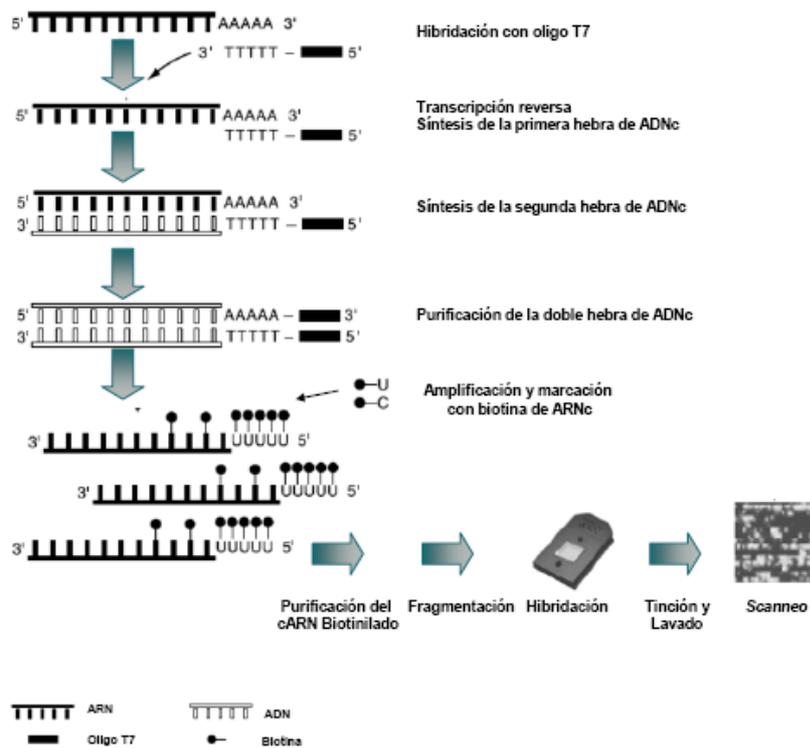


Figura 14. Representación esquemática del procedimiento empleado en el marcaje del ARN para el análisis de la expresión génica con el GeneChip-HuGene-1_0-st-v1.r4. Se parte de 3 µg del ARN total extraído de las muestras a analizar. La secuencia del T7-oligo(dT) primer fue la siguiente: 5' - GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)24 - 3'.

12.6 Análisis de datos

El modelo de array empleado fue el Affymetrix HG-1.0 ST-v1.r4. Los *arrays* fueron escaneados usando el *Gene Array Scanner* de Affymetrix y verificados mediante el programa *DNA-Chip Analyzer* (DChip) también de Affymetrix. Todos los experimentos se llevaron a cabo con triplicados biológicos de cada una de las muestras.

Los datos obtenidos por el servicio de Genómica son proporcionados en formato DTT, por ello es necesario el programa *Data Transfer Tool* (Affymetrix) que los convierte a formato CEL y DCP legibles por el software *DNA-Chip Analyzer* utilizado para los análisis comparativos. De todos los genes obtenidos se seleccionaron solo aquellos cuyo fold change fuese mayor a 2 y cuya media de expresión entre los triplicados de cada muestra fuese superior a 100.

Para estudiar las principales vías de señalización en las que estos genes están implicados utilizamos el software *IPA de Ingenuity® Systems*.

13. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para genotipar los ratones transgénicos Mek5DD hemos utilizado la técnica de PCR estándar utilizando oligos específicos para MMTV y *Mek5DD*, y como control de carga se usó el gen *GAPDH*.

La expresión de ARNm de las distintas dianas de TG02 en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo se realizó mediante RT-PCR.

13. 1 Síntesis de ADNc

La retrotranscripción es un método enzimático que utiliza oligonucleótidos como cebadores para sintetizar moléculas de ADN monocatenario de secuencia complementaria a la de los ARNs presentes en la muestra. Los oligonucleótidos pueden ser hexámeros de secuencia aleatoria (RHP) u oligodT, un primer de poli T (timidina) que se une a la cola de poliA (adenina) del ARN mensajero para retrotranscribir de forma específica el mismo. Los RHP sin embargo, amplifican además del ARN mensajero, el ARN ribosómico por lo tanto el proceso es menos específico.

Se ha utilizado el sistema de retrotranscripción de Invitrogen, enzima transcriptasa Reversa MMLV-RT (200 u/μl).

Se partió de 2 μg de ARN por cada muestra para generar 2 μg de ADNc. La mezcla utilizada para cada reacción incluía 1 μl de dNTPs (10 mM), 1 μl de oligo dT (1 μg/μl), 1 μl de MMLV-RT (transcriptasa reversa a 200 u/μl), 4 μl de su Buffer 5x, 1 μl de RNAsin inhibitor (RNasin® RNase Inhibitor a 40 u/μl) y agua DEPC hasta completar un volumen final de reacción de 20 μl.

Se sintetizó el ADNc bajo las siguientes condiciones:

- 10 minutos a 42 °C
- 1 hora a 37 °C

13.2 Amplificación de ADNc o ADN y visualización de los productos de PCR

La mezcla utilizada para cada reacción incluía, 0,5 μl de cebador sentido (20 pmol/ μl) y 0,5 μl de cebador anti-sentido (20 pmol/ μl), 22,75 μl de PCR Supermix (contiene Mg⁺², dNTPs y Taq ADN polimerasa) (Invitrogen), 1 μl de ADNc o ADN

(ajustado a una concentración de 500 ng/ μ l) y agua-DEPC hasta un volumen final de 25 μ l.

Adicionalmente, para cada gen analizado se incluyó un control negativo que contiene la mezcla anterior con los cebadores del gen en cuestión pero sin ADNc o ADN.

La reacción tuvo lugar en un termociclador normal (Perkin Elmer) con un programa denominado pseudo-real que imita las condiciones establecidas en la PCR en tiempo real pero sin la fase de *melting* y que constó de las siguientes etapas:

- **Desnaturalización inicial:** 94 °C durante 5 minutos.
- **Reacción cíclica:** 40 ciclos de anillamiento/extensión de 94 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto.
- **Paso final:** 72 °C durante 7 minutos.

Una vez concluida la reacción las muestras se almacenaron a 4 °C.

Para visualizar los productos de PCR, las muestras amplificadas se corrieron en un gel de agarosa al 2%, diluida en tampón TAE 1x (Tris 2 M, EDTA 0,05 M) con 2 μ g/ml de bromuro de etidio. Cada muestra se mezcló con 2,5 μ l de tampón de carga. Como marcador de pesos moleculares utilizamos una escalera de 1.000 pares de bases (Promega). La obtención de la fotografía del gel de agarosa se hizo en un transiluminador GELDoc 2000 (Biorad).

13.3 Diseño de los cebadores de PCR

A través de bases de datos públicas tales como *Ensembl* (www.ensembl.org), la de UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) o *Swiss Prot*, se buscó el gen o proteína para el cual queríamos diseñar los cebadores. Se usó como secuencia de referencia la secuencia del ARNm del gen sin intrones. Los cebadores se diseñaron usando el programa de bioinformática *primer3* (MIT, Cambridge, MT, EEUU).

Para verificar la idoneidad de los cebadores sintetizados se llevó a cabo una PCR a partir del ADNc o ADN en un termociclador y posteriormente se visualizaron los resultados en un gel de agarosa cargando en los pocillos todo el contenido de la reacción (25 μ l). El resultado en los casos positivos fue de una única banda. En caso de no observar banda o de detección de un bandeo propio de una unión inespecífica de los cebadores al ADN se diseñaron nuevos cebadores tal y como se ha descrito. En la Tabla VIII se representan las secuencias de los cebadores (primers) utilizados en este trabajo.

Tabla VIII. Secuencia de los primers utilizados

| Oligos | Secuencia |
|-------------------------------|-----------------------|
| <i>MMTV sentido (h)</i> | CCCCTTTTCGTGAAAGACTCG |
| <i>MMTV antisentido (h)</i> | CCCCTCCTTGGTATGGAAAA |
| <i>MEK5DD sentido (h)</i> | GGTGAATGACATAGCCAAGGA |
| <i>MEK5DD antisentido (h)</i> | ATTGAACTGCACGATGAACG |
| <i>Gapdh sentido (r)</i> | AACTTTGGCATTGTGGAAGG |
| <i>Gapdh antisentido (r)</i> | GGATGCAGGGATGATGTTCT |
| <i>CDK1 sentido (h)</i> | CTGGGGTCAGCTCGTACTC |
| <i>CDK1 antisentido (h)</i> | AGTGCCCAAAGCTCTGAAAA |
| <i>CDK2 sentido (h)</i> | ATTCATGGATGCCTCTGCTC |
| <i>CDK2 antisentido (h)</i> | CAGGGACTCCAAAAGCTCTG |
| <i>CDK7 sentido (h)</i> | ACCGTTTACAAGGCCAGAGA |
| <i>CDK7 antisentido (h)</i> | GGCTTTGATGTGTGATGGTG |
| <i>CDK9 sentido (h)</i> | ATACGAGAAGCTCGCCAAGA |
| <i>CDK9 antisentido (h)</i> | TAAGCAGCATCTGCATCACC |
| <i>FLT3 sentido (h)</i> | CCATCTTGGACCTGGAAGAA |
| <i>FLT3 antisentido (h)</i> | AAGATGTGCCAAGGGAATTG |
| <i>JAK2 sentido (h)</i> | GAGCCTATCGGCATGGAATA |
| <i>JAK2 antisentido (h)</i> | TCACCTGAAGGACCACTTCC |
| <i>TYRO3 sentido (h)</i> | CGGTAGAAGGTGTGCCATTT |
| <i>TYRO3 antisentido (h)</i> | GCAGTGCTTGAAGGTGAACA |
| <i>TYK2 sentido (h)</i> | TGCTCAGGGTCAGATGACAG |
| <i>TYK2 antisentido (h)</i> | CCTCTGTCTCCCAGCAGTTC |
| <i>p38δ sentido (h)</i> | TCTACCTGGTGATGCCCTTC |
| <i>p38δ antisentido (h)</i> | CTTTCAGGATCTGGGTCAGC |
| <i>ERK5 sentido (h)</i> | CACGTGCGCTACTTCCTGTA |
| <i>ERK5 antisentido (h)</i> | CCCACAGACCAGAGGTCAAT |
| <i>GAPDH sentido (h)</i> | TGCACCACCAACTGCTTAGC |
| <i>GAPDH antisentido (h)</i> | GGCATGGACTGTGGTCATGAG |

h: humano
r: ratón

14. Citometría de flujo

14. 1 Análisis de ciclo celular

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante marcaje de las células con IP (ioduro de propidio), que tras intercalarse en la doble cadena de ADN, nos permite cuantificar su contenido utilizando la técnica de citometría de flujo (FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter)).

Para ello se tripsinizaron las células, se recogieron en un tubo de 1,5 ml y se realizaron dos lavados con PBS centrifugando a 2.000 rpm durante 5 minutos cada vez. Se fijaron y permeabilizaron las células resuspendiéndolas en 1 ml de etanol 70% (preenfriado a -20 °C) y manteniéndolas en agitación a 4 °C durante dos horas. Tras otros dos lavados con PBS frío las células se resuspendieron en 1 ml de PBS suplementado con 15 µg/ml de IP y 750 µg/ml de RNAsa A. Se incubaron 1 hora en agitación a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Tras la incubación se procedió al análisis en un citómetro de flujo *FACSort* (Becton Dickinson) mediante el programa *CellQuest* (Becton Dickinson) pasando al menos 20.000 células por muestra a una velocidad no superior a 400-500 cel/seg para evitar la aparición de dobletes. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el software *Paint-a-Gate* (Becton Dickinson).

14.2 Análisis de la muerte celular

Durante el proceso de apoptosis o muerte celular programada se dan lugar una serie de cambios en la superficie celular, tales como la pérdida de asimetría en los fosfolípidos de la membrana, que altera la carga e hidrofobicidad de la misma. La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos, dependiente de Ca^{+2} , que se une con gran afinidad a los residuos de fosfatidilserina (PS) de la membrana celular. En una célula normal, estos residuos están en la cara interna de la membrana y son inaccesibles para la Anexina V, a menos que se permeabilice la membrana. En la fase inicial de la apoptosis los residuos de PS quedan expuestos en la cara externa de la membrana, este proceso es irreversible y la célula termina muriendo por apoptosis. Cuando la célula se encuentra en una fase más avanzada de apoptosis, la membrana celular se permeabiliza, y el IP es capaz de marcar el ADN del núcleo. Este marcaje adicional nos permite diferenciar entre las células en apoptosis tardía y las células necróticas. En la figura 15 se muestran las distintas poblaciones en base al marcaje de Anexina V-FITC y IP.

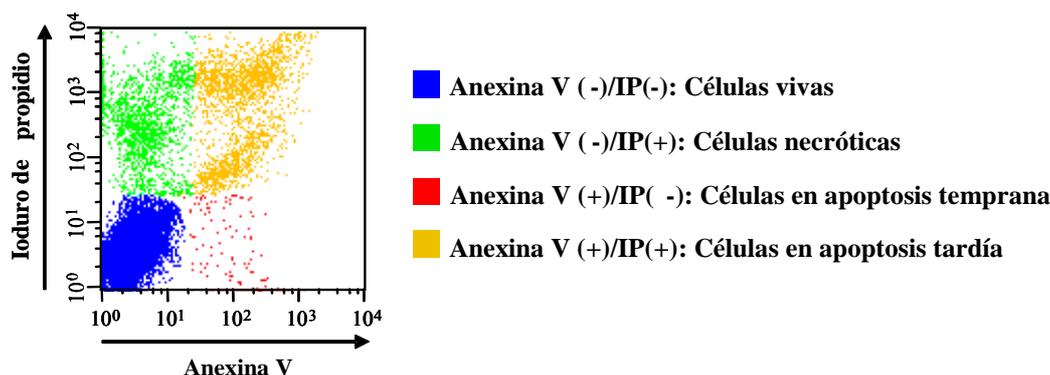


Figura 15. Esquema de la distribución celular de acuerdo al marcaje con Annexina V-FITC y IP.

El análisis se llevó a cabo marcando las células con IP y Annexina V-FITC (Fluorescein Isothiocyanate). Tras los diferentes tratamientos se tripsinizaron las células y se recogieron en 1 ml de PBS/Ca⁺²Mg⁺², centrifugando 4 minutos a 4.000 rpm. Se hicieron dos lavados más con PBS/Ca⁺²Mg⁺². Por último se lavaron las células con *Binding Buffer* (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂). Tras centrifugar una última vez, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los “pellet” celulares en 100 µl de *Binding Buffer* suplementado con 5 µl de Annexin V-FITC y 10 µl de IP. Se incubaron en oscuridad durante 15 minutos tras los cuales se añadieron 400 µl más de *Binding Buffer*. El análisis se realizó en el citómetro de flujo *FACSort* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU) mediante el programa *CellQuest* (Becton Dickinson) pasando al menos 20.000 células a una velocidad de no más de 500-800 cel/segundo. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el software *Paint-a-Gate* (Becton Dickinson).

15. Fragmentación de ADN

La apoptosis se caracteriza bioquímicamente por la rotura del ADN genómico en pequeños fragmentos de unos 180 pares de bases (pb). Se trata de un proceso bastante temprano (anterior a la desintegración de la membrana), irreversible y generalizado, que conduce a la muerte celular. El estudio cualitativo de este fenómeno se realiza al extraer el ADN de las células y observar el característico patrón del ADN fragmentado, tras hacer una electroforesis en gel de agarosa.

Tras llevar a cabo los diferentes tratamientos, se recogieron 2x10⁶ células y se lavaron dos veces con PBS. Tras añadir el tampón de lisis (Tris-HCl 5mM, pH 7.4, EDTA 20 mM, 0.5% Tritón X-100) se incubaron durante 20 minutos en hielo. Tras

centrifugar a 13.000 xg a 4 °C durante 30 minutos, se recogió el sobrenadante que contiene el ADN. A continuación se llevó a cabo una extracción fenol-cloroformo-isoamialcohol (25:24:1) y se procedió a precipitar el ADN con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 7, y 2 volúmenes de etanol, durante 30 minutos en hielo. Tras centrifugar a 13.000 xg a 4 °C durante 10 minutos se obtuvo un “pellet” de color blanco correspondiente al ADN de las células. Seguidamente se lavó dicho “pellet” con etanol al 70% y se dejó secar. Más tarde se resuspendió el “pellet” en 50 µl de TE (Tampón Tris-HCl EDTA). Antes de analizar las muestras en gel de agarosa, se incubaron con ARNasa A (20 µg/ml) durante 30 minutos a 37 °C.

16. Potencial de membrana mitocondrial

La disfunción mitocondrial dentro del proceso apoptótico está frecuentemente asociada con la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial (PMM), que ocurre durante las primeras fases de la apoptosis. Una técnica que nos permite medir alteraciones en la membrana es el marcaje con TMRE (Tetrametilrodamina, etil ester), que es un fluorocromo catiónico que se acumula en la mitocondria. La disminución del PMM se asocia con la disminución de la captación de TMRE.

Tras los diferentes tratamientos las células se lavaron y tripsinizaron, resuspendiéndolas en su medio en un volumen de 10 ml. Tras contar el número de células por ml, se recogieron 500.000 células y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 3 minutos. A continuación se lavaron con PBS y se volvieron a centrifugar. Finalmente se resuspendieron en 1 ml de PBS y se incubaron con TMRE 500 nM durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad. Pasado este tiempo se lavaron de nuevo con PBS para quitar el exceso del reactivo y se volvieron a resuspender en 1 ml de PBS.

El análisis se realizó en el citómetro de flujo *FACSort* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU) mediante el programa *CellQuest* (Becton Dickinson) pasando al menos 20.000 células a una velocidad de no más de 500-800 cel/segundo. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el software *Paint-a-Gate* (Becton Dickinson) y el programa *CellQuest* (Becton Dickinson).

17. Fraccionamiento subcelular

Las células se cultivaron en placas de 100 mm hasta que alcanzaron una confluencia del 90% aproximadamente. En ese momento se lavaron con PBS y se tripsinizaron, recogiénolas en tubos de 15 ml. Tras centrifugación a 1.200 rpm durante 3 minutos, se contaron para ver el número de células por ml. A continuación, las células se permeabilizaron durante 5 minutos en hielo, resuspendiendo 3×10^7 células por ml de tampón de extracción citosólica (Sacarosa 250 mM, KCl 70 mM, NaCl 137 mM, NaH_2PO_4 4.3 mM, KH_2PO_4 1.4 mM, pH 7.2) conteniendo 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de digitonina e inhibidores de proteasas y fosfatasas (1 μM Pepstatina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptina, 1 mM PMSF, 1 mM Ortovanadato Sódico). Tras confirmar la permeabilización de la membrana celular tras tinción con 0.2% de solución Trypan Blue, las células se centrifugaron a 1.000 xg durante 5 minutos. A continuación, se recogió el sobrenadante (fracción citosólica) y el “pellet” restante se solubilizó en el mismo volumen de tampón de extracción mitocondrial (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40) suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasas. Tras centrifugar a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante que corresponde a la fracción mitocondrial.

Se utilizaron 30 μl de cada fracción para la detección de proteínas mitocondriales y citosólicas mediante Western blot.

Resultados y Discusión

1. Erk5 en cáncer de mama humano

Estudios previos de nuestro grupo (Esparís-Ogando et al. 2002) y de otros grupos (Kato et al. 1998) han indicado que la ruta de Erk5 participa en la proliferación de células de cáncer de mama. Además, nuestros datos indican que Erk5 se encuentra constitutivamente activo en células sobreexpresoras de HER2. Estos precedentes aumentaron nuestro interés en profundizar en el análisis de esta vía de señalización realizando un estudio patológico/bioquímico en biopsias procedentes de tejido tumoral mamario humano.

1.1 Características de los pacientes

La expresión de Erk5 se analizó en 84 tumores primarios de cáncer de mama procedentes de pacientes diagnosticados en el período 1999-2005 en el Hospital Universitario de Salamanca. Las muestras fueron recogidas por el departamento de Patología del mismo hospital con la previa revisión y autorización del estudio por parte del Comité de Bioética Institucional y bajo las Normativas Española y de la Unión Europea (RD 1201/05 y 86/609/CEE, respectivamente).

En la Tabla XIX se resumen las características clínico/patológicas de los pacientes:

Tabla XIX. Características clínico/patológicas de las pacientes

| | | |
|--|-----------------|-------------------------------------|
| <i>Edad del paciente (n=81)</i> | | <i>Mediana 58 (rango 31-89)</i> |
| <i>Grado (n=77)</i> | 1-2 | 32 |
| | 3 | 45 |
| <i>Diámetro del tumor (mm) (n=72)</i> | | <i>Mediana 26.5 (rango 8-75 mm)</i> |
| <i>Receptor de estrógenos (n=84)</i> | <i>Positivo</i> | 52 |
| | <i>Negativo</i> | 32 |
| <i>Receptor de progesterona (n=84)</i> | <i>Positivo</i> | 49 |
| | <i>Negativo</i> | 35 |
| <i>HER2 FISH (n=84)</i> | <i>Positivo</i> | 24 |
| | <i>Negativo</i> | 60 |
| <i>Nódulos linfáticos (n=77)</i> | <i>Positivo</i> | 51 |
| | <i>Negativo</i> | 26 |

1.2 Expresión de Erk5 en cáncer de mama humano y localización subcelular

La expresión de Erk5 fue analizada mediante inmunohistoquímica en muestras en parafina procedentes de 84 tumores primarios de cáncer de mama. Para estos análisis hemos usado un anticuerpo desarrollado y purificado en nuestro laboratorio anti-Erk5 que reconoce la cola C-terminal de la molécula (residuos 781-805) (Esparís-Ogando et al. 2002).

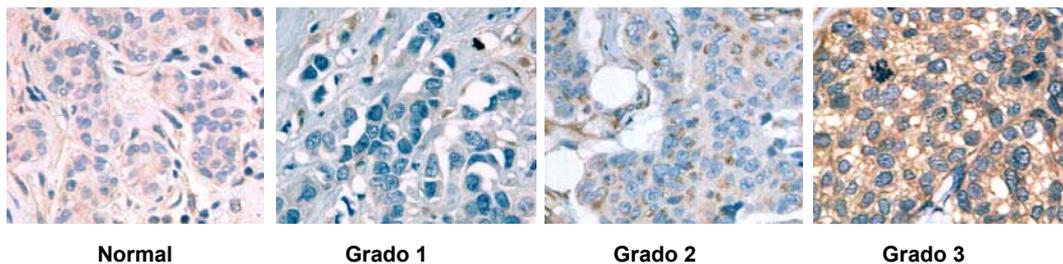


Figura 16. La expresión de Erk5 fue analizada por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal y se definió una escala cuantitativa de 0 a 3 basada en el porcentaje de células teñidas y en la intensidad de la tinción.

Basándonos en el porcentaje de células teñidas y la intensidad de la tinción, realizamos un análisis definido en el apartado de material y métodos siguiendo una escala de 0 a 3, considerando 0 a una tinción celular no apreciable (< 10%); 1, débil intensidad de tinción (entre 10% y 30%); 2, intensidad de tinción intermedia (30% a 60%); y 3, fuerte intensidad de tinción (> 60%). El epitelio normal presentó una intensidad de 1 (Figura 16).

En base a esta escala y usando una distribución de dos niveles (bajo/alto) (Figura 17A y 17B) en la que los valores iguales o superiores a 2 fueron considerados positivos, observamos altos niveles de Erk5 en las células epiteliales del tumor de 17 pacientes de los 84 analizados (20%).

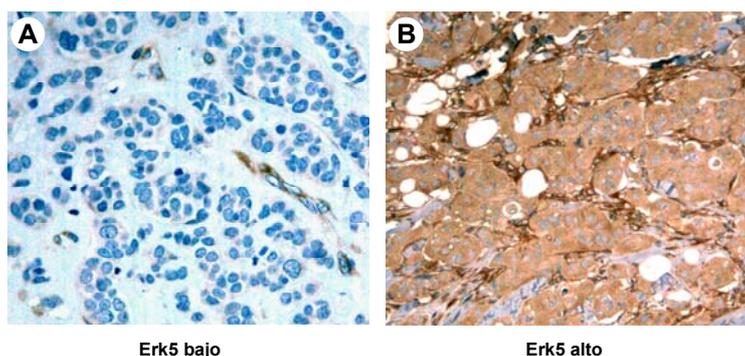


Figura 17. Niveles de expresión de Erk5 obtenidos por marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal. El panel A muestra una baja expresión de Erk5 y el panel B muestra una alta expresión de Erk5 (Aumento 200x).

Atendiendo a su distribución subcelular, se observaron dos tipos de tinción: una difusa distribuida homogéneamente por todo el citoplasma y otra caracterizada por una acumulación perinuclear (Figura 18A y 18B).

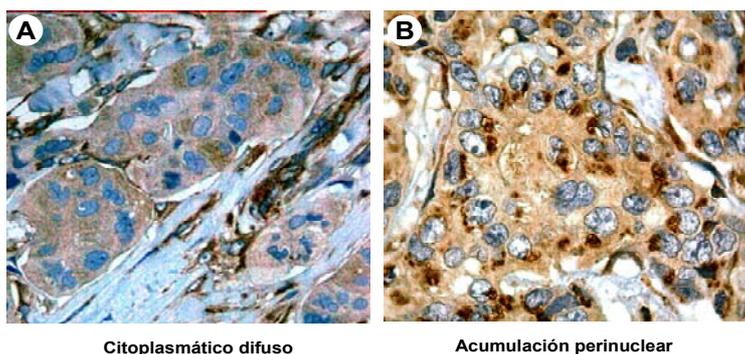


Figura 18. Distribución subcelular de Erk5 obtenida por marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal. El panel A muestra una distribución citoplasmática difusa y el panel B muestra una acumulación perinuclear (Aumento 1000x).

Además, el marcaje de Erk5 también se observó en el estroma y en la mayoría de las células endoteliales de los vasos sanguíneos del tumor, indicando quizá un posible papel de Erk5 en neoangiogénesis.

El análisis patológico indicó por tanto, que Erk5 estaba sobreexpresado en el 20% de los pacientes con cáncer de mama y que la distribución subcelular era claramente citoplasmática, aunque también fue observada en tejido estromal y en los vasos sanguíneos del tumor. Basándonos en el supuesto papel que tiene Erk5 en neoangiogénesis (Hayashi et al. 2004; Hayashi et al. 2005) y dado que las células epiteliales de los vasos sanguíneos de muchos de los tumores que forman parte de

nuestro estudio, tienen elevada expresión de Erk5, se podría hipotetizar una función para esta quinasa implicándola directamente en la neovascularización del tumor y favoreciendo de esta manera su diseminación. Así la elevada expresión de Erk5 podría relacionarse con tumorigenicidad y metástasis, y por ello habría que considerarla como una diana potencial en el tratamiento del cáncer de mama.

Aparte de la expresión de Erk5 hemos analizado también su estado de activación. El mecanismo de activación de Erk5, al igual que otras MAPKs, conlleva la fosforilación de Erk5 en el microdominio TEY presente en su asa de activación (Figura 19) (Lee et al. 1995).

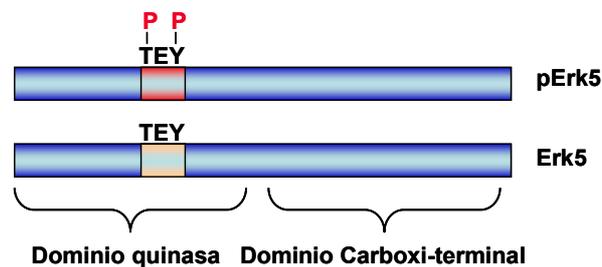


Figura 19. Esquema representativo de los dominios funcionales de Erk5. Se representa la región donde el microdominio TEY es dualmente fosforilado.

Debido a la carencia de anticuerpos específicos que detecten únicamente la forma activa de Erk5, el estado de su activación se llevó a cabo mediante Western blot. Esta activación puede detectarse usando un anticuerpo que únicamente reconozca la banda fosforilada correspondiente al motivo TEY (anti-pErk5^{TEY}), o usando el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal que reconoce tanto a Erk5 como a pErk5. pErk5 migra en un gel de electroforesis más lentamente que Erk5, pudiendo diferenciar ambas formas en base a su diferente movilidad. Como primer paso usamos dos muestras de pacientes para caracterizar la reacción de estos anticuerpos en material derivado de tejido humano, y usamos como control la línea celular BT474 que expresa ambas formas de Erk5. Como se puede apreciar en la figura 20, el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal reconoció en el tumor BT49 ambas formas de manera específica, puesto que cuando la misma muestra se inmunoprecipitó en presencia de un exceso de péptido contra el cual fue generado el anticuerpo, ambas bandas desaparecieron. Por otra parte, el anticuerpo anti-pErk5^{TEY} reconoció únicamente la banda superior en la muestra tumoral BT1080, indicando que esta banda corresponde a pErk5^{TEY}.

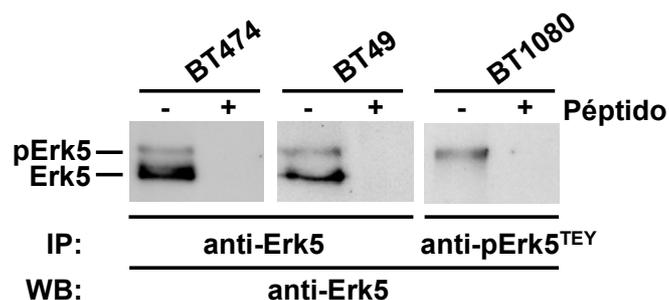


Figura 20. Caracterización de los anticuerpos anti-Erk5 y anti-fosfo-Erk5^{TEY} en tejido mamario humano. Extractos celulares de la línea celular BT474 y de la muestra de tejido mamario BT49 fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal en presencia y ausencia del péptido contra el cual fue generado el anticuerpo y mediante Western blot se analizó la expresión de Erk5 con el mismo anticuerpo. Extractos de la muestra BT1080 fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-pErk5^{TEY} en presencia y ausencia del péptido contra el cual fue generado el anticuerpo y mediante Western blot se analizó la expresión de Erk5 con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal.

El siguiente paso fue analizar la activación de Erk5 en muestras de pacientes de las que disponíamos de suficiente tejido tumoral (n= 23). Se incluye una muestra de tejido mamario normal (BT1893) como control de expresión de Erk5 en tejido no tumoral, y la línea celular BT474 en la que Erk5 se encuentra constitutivamente activo (Esparís-Ogando et al. 2002). En un número considerable de las muestras analizadas, el anticuerpo detectó una banda de migración retardada correspondiente a pErk5 (Figura 21). Esto parece indicarnos que la activación de Erk5 es frecuente en cáncer de mama.

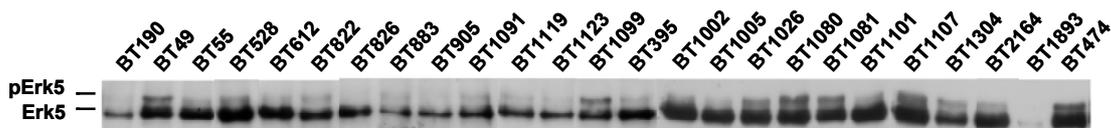


Figura 21. Expresión de Erk5 en pacientes. Extractos procedentes de pacientes con cáncer de mama de los que disponíamos de suficiente material, fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal y mediante Western blot se analizó la expresión de Erk5 con el mismo anticuerpo. El carril BT1893 corresponde al tejido mamario normal, y el carril BT474 corresponde a la línea celular sobreexpresora de HER2 en la que Erk5 está fosforilado de manera basal.

1.3 Expresión de HER2 y activación de Erk5

Basándonos en los estudios realizados en modelos celulares de cáncer de mama, que demuestran que la activación de Erk5 puede ser desencadenada por la activación de los receptores HER2 (Esparís-Ogando et al. 2002), analizamos si esta relación también existe *in vivo*. Para ello usamos un modelo animal de cáncer de mama (FVB/neu),

donde la sobreexpresión de HER2 provoca tumorigénesis de la glándula mamaria (Oshima et al. 2004). Estos ratones generaron tumores entre los 6 y los 8 meses a partir de la fecha de nacimiento. Durante ese período hemos seguido la evolución de las mamas, y cuando la masa tumoral alcanzó un tamaño considerable (mayor de 1 cm.), hemos extraído el tumor y lo hemos procesado para analizar la expresión, grado de activación de Erk5 y expresión de HER2 mediante Western blot (Figura 22).

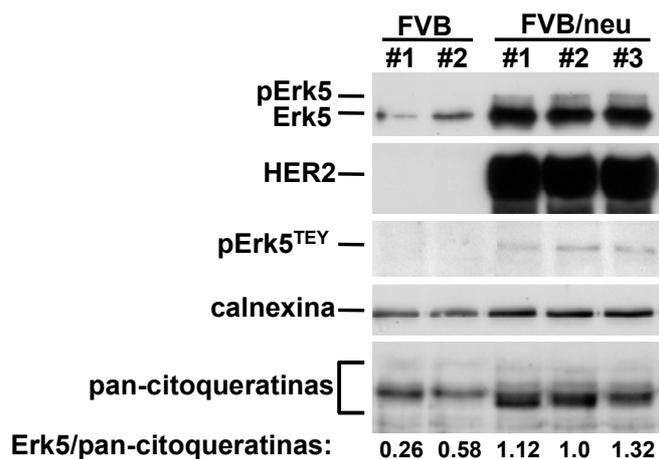


Figura 22. Expresión de Erk5, pErk5^{TEY} y HER2 en ratones FVB y FVB/neu de cáncer de mama. La expresión de Erk5 y pErk5^{TEY} se analizó mediante inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-Erk5 C-terminal y anti-pErk5^{TEY} respectivamente y posterior Western blot con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal. La expresión de HER2 se analizó mediante inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-HER2 y posterior Western blot con el mismo anticuerpo. Como control de carga hemos utilizado la calnexina y como control de célula epitelial un anticuerpo anti-pan-citoqueratinas. La relación de Erk5 y pan-citoqueratinas reveló la mayor expresión de Erk5 en el tejido tumoral respecto al normal.

Los tumores procedentes de la cepa FVB/neu (sobreexpresores de HER2) mostraron altos niveles de expresión de Erk5, pErk5^{TEY} y HER2 en comparación con el tejido de mama normal procedente de la cepa FVB (control). Para comprobar la mayor expresión de Erk5 en el tejido tumoral respecto al normal, calculamos la relación entre las citoqueratinas y Erk5, cuantificando la intensidad de las bandas correspondientes a cada proteína. Los resultados mostraron valores 2-3 veces mayores en el tejido tumoral respecto al normal, sugiriendo que en las células epiteliales de estos tumores Erk5 se encuentra sobreexpresado (Figura 22). Estos datos indican que para este modelo animal, niveles elevados de HER2 pueden provocar el aumento de expresión de Erk5 y favorecer su activación.

Los análisis inmunohistoquímicos de expresión de Erk5 y HER2 en las muestras de pacientes, indicaron cierta tendencia a una correlación positiva entre el alto nivel de expresión de Erk5 y sobreexpresión de HER2 ($p=0.074$).

Analizando bioquímicamente la expresión de HER2 (Figura 23), existen tumores con sobreexpresión de HER2 en los que Erk5 se encuentra fosforilado (por ejemplo, BT49), pero también existen otros donde se expresa pErk5 y no hay sobreexpresión de HER2 (por ejemplo, BT1304).

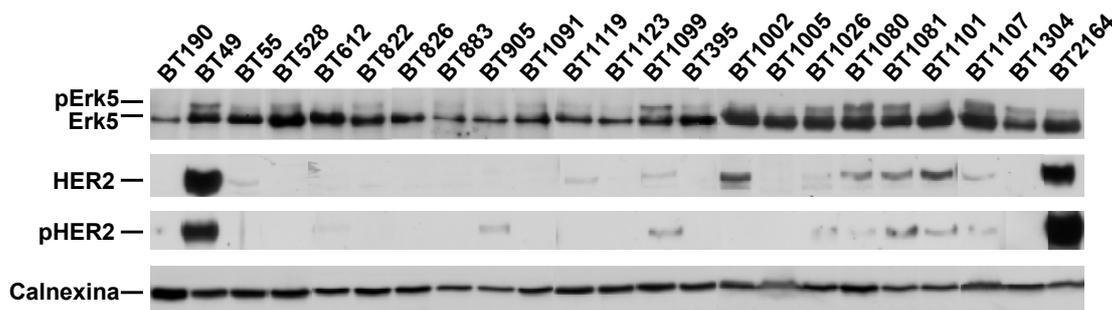


Figura 23. Relación entre la expresión de HER2 y Erk5 en pacientes. La expresión de Erk5 y HER2 se analizó mediante inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-Erk5 C-terminal y anti-HER2 respectivamente y posterior Western blot con los mismo anticuerpos. Como control de carga hemos utilizado la calnexina. Se observa pacientes donde existe una relación entre HER2 y pErk5 pero también existen otros donde no se da dicha relación.

Existen varias evidencias que nos indican que la activación de Erk5 es consecuencia de la sobreexpresión de HER2, pero esto también podría ocurrir a través de otros mecanismos. Apoyando el vínculo entre HER2 y pErk5 estaría el modelo de ratón FVB/neu, en el que la sobreexpresión de HER2 va acompañada de la expresión de pErk5 y además, el hecho de que la mayoría de las muestras de paciente donde observamos sobreexpresión de HER2 también tienen expresión de pErk5. Sin embargo, en otras muestras de paciente la expresión de pErk5 no va acompañada por sobreexpresión de HER2, lo cual es muy interesante, ya que indicaría que los niveles de pErk5/Erk5 pueden estar regulados además por otros mecanismos independientes de sobreexpresión de HER2.

1.4 Asociación de la expresión de Erk5 con pronóstico

Revisamos las características clínicas de los 84 pacientes analizados para ver si alguna de ellas tales como edad, grado histológico y tamaño del tumor, expresión de receptores hormonales y nódulos linfáticos axilares correlacionaban con la expresión de

Erk5 observada por inmunohistoquímica. No observamos correlación alguna con estos parámetros, a excepción del receptor de estrógenos, con el que parecía existir una correlación positiva ($p= 0.024$) (Tabla X).

Tabla X. Asociación entre las variables clinico-patológicas y la expresión de Erk5

| <i>Variables clinicopatológicas</i> | <i>p</i> |
|-------------------------------------|----------------|
| <i>Edad</i> | <i>0.156*</i> |
| <i>Grado del tumor</i> | <i>0.608*</i> |
| <i>Tamaño del tumor</i> | <i>0.201*</i> |
| <i>Receptor de Estrógenos</i> | <i>0.145#</i> |
| <i>Receptor de Progesterona</i> | <i>0.024#†</i> |
| <i>Nodos linfáticos axilares</i> | <i>0.078#</i> |

*Mann-Whitney U test.
#Fisher's exact test.
†Statistically significant.

Para examinar si Erk5 se asociaba con un fenotipo más agresivo, estudiamos el pronóstico de estos pacientes con respecto a los niveles de Erk5. En aquellos pacientes que mostraron alta expresión de Erk5 ($n=17$), la supervivencia libre de enfermedad fue menor que para aquellos que presentaban baja expresión ($n=67$) (prueba de log-rank 10.20, $p=0.0014$) (Figura 24).

| | Riesgo | Recaída | Media en meses | |
|-----------|---------------|----------------|-----------------------|----------------------|
| Erk5 bajo | 67 | 29 | 34.33 | 95% IC (18.52-50.14) |
| Erk5 alto | 17 | 15 | 14.13 | 95% IC (3.78-24.48) |

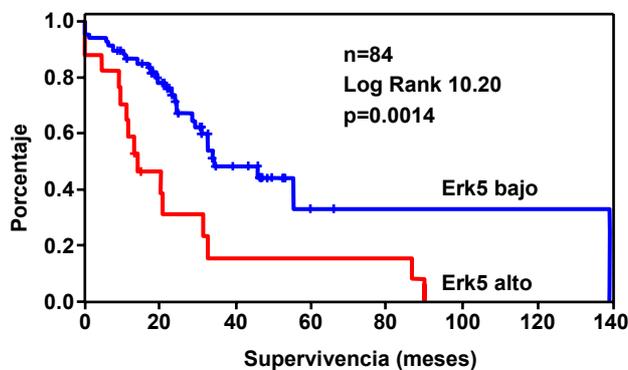


Figura 24. Relación entre la expresión de Erk5 y la supervivencia libre de enfermedad representada mediante una curva Kaplan-Meier en 84 pacientes de cancer de mama.

El tiempo medio de supervivencia libre de enfermedad fue de 34.33 meses (IC 95%: 18,52-50,14) para las pacientes con bajos niveles de Erk5 en comparación con 14,13 meses (IC 95%: 3.78-24.48) para aquéllas con altos niveles.

Para estudiar variables que pudieran estar relacionadas con pronóstico, un análisis univariante nos reveló que solamente los receptores de estrógenos, estado de HER2 por FISH y Erk5 fueron factores pronóstico (Tabla XI).

Tabla XI. Asociación de Erk5 con la supervivencia libre de enfermedad en 84 pacientes de cáncer de mama usando el Modelo Hazards proporcional univariante (Análisis de Cox)

| | Riesgo | | |
|--|-----------------|---------------|----------|
| | relativo | 95% IC | p |
| <i>Baja expresión de Erk5 vs. Alta</i> | 2.786 | (1.389-5.587) | 0.004 |
| <i>Amplificación de HER2 por FISH vs. no amplificación</i> | 1.935 | (1.011-3.704) | 0.046 |
| <i>Tamaño del tumor < 3 vs. >3 cm</i> | 2.035 | (0.967-4.280) | 0.061 |
| <i>Nódulos linfáticos axilares positivos vs. negativos</i> | 1.821 | (0.721-4.600) | 0.205 |
| <i>Grado del tumor 1-2 vs. 3</i> | 1.663 | (0.765-3.618) | 0.199 |
| <i>Receptor de estrógenos positivo vs. negativo</i> | 0.421 | (0.214-0.832) | 0.013 |
| <i>Receptor de progesterona positivo vs. negativo</i> | 0.580 | (0.285-1.180) | 0.133 |
| <i>Edad < 60 vs. >60 años</i> | 0.627 | (0.309-1.274) | 0.197 |

Un análisis multivariante usando el modelo de regresión de Cox reveló a Erk5 como un factor pronóstico independiente (Tabla XII).

Tabla XII. Factores pronósticos en 84 pacientes de cáncer de mama usando el modelo de selección de Backward de Regresión de Cox

| | Riesgo | | |
|--|-----------------|---------------|----------|
| | relativo | 95% IC | p |
| <i>Baja expresión de Erk5 vs. Alta</i> | 3.799 | (1.488-9.703) | 0.005 |
| <i>Amplificación de HER2 por FISH vs. no amplificación</i> | 1.364 | (0.371-5.009) | 0.640 |
| <i>Tamaño del tumor < 3 vs. >3 cm</i> | 2.141 | (0.727-6.304) | 0.167 |
| <i>Nódulos linfáticos axilares positivos vs. negativos</i> | 1.131 | (0.275-4.651) | 0.865 |
| <i>Grado del tumor 1-2 vs. 3</i> | 0.620 | (0.155-2.480) | 0.499 |
| <i>Receptor de estrógenos positivo vs. negativo</i> | 0.460 | (0.120-1.177) | 0.259 |
| <i>Receptor de progesterona positivo vs. negativo</i> | 1.894 | (0.486-7.379) | 0.358 |
| <i>Edad < 60 vs. >60 años</i> | 0.650 | (0.192-1.907) | 0.391 |

La influencia de Erk5 en la supervivencia libre de enfermedad quedó demostrada fehacientemente cuando los pacientes HER2 positivos (n=24) fueron analizados separadamente de los HER2 negativos (Figura 25). Como muestra la curva de Kaplan-Meier, de nuevo los pacientes con tumores positivos para Erk5 tienen una supervivencia libre de enfermedad (DFS) menor en comparación con los negativos.

| | Riesgo | Recaída | Media en meses | 95% IC |
|-----------|--------|---------|----------------|---------------|
| Erk5 bajo | 16 | 12 | 28 | (15.53-41.40) |
| Erk5 alto | 8 | 8 | 9.70 | (6.58-12.95) |

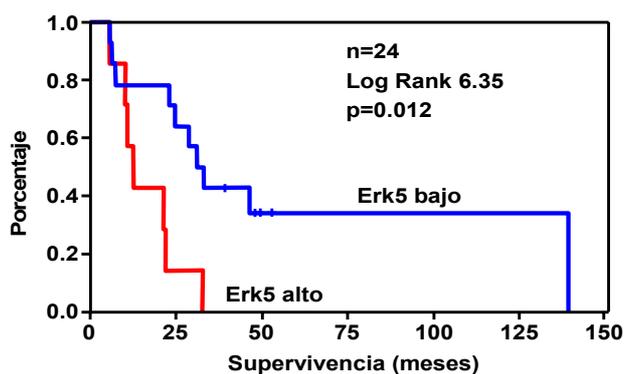


Figura 25. Relación entre la expresión de Erk5 y la supervivencia libre de enfermedad representada mediante una curva Kaplan-Meier en 24 pacientes HER2 positivos.

El vínculo entre los niveles de expresión de Erk5 y la supervivencia de los pacientes es un hallazgo clínico relevante. Así, pacientes con mayor expresión de Erk5 recaerían antes que los que tienen baja expresión. Estadísticamente, la expresión de esta proteína fue un factor independiente de otros factores pronóstico como se demostró con el análisis multivariante. El carácter predictivo de la mayor expresión de Erk5 con la recaída de la enfermedad, también quedó demostrado tras seleccionar el grupo de pacientes con sobreexpresión de HER2. Estos hallazgos sugieren que Erk5 podría ser un nuevo biomarcador asociado con un peor pronóstico en cáncer de mama, y representa una potencial diana terapéutica.

1.5 Erk5 regula la respuesta a tratamientos anti-HER2

Este impacto negativo de sobreexpresión de Erk5 en el pronóstico de las pacientes nos llevó a analizar si la expresión de pErk5/Erk5 podría estar interfiriendo en la respuesta a los tratamientos usados actualmente en clínica en cáncer de mama ya que los datos obtenidos con el modelo transgénico de HER2 junto con el análisis en las muestras de las pacientes indicaron una relación existente entre niveles de HER2 y niveles pErk5/Erk5, por ello investigamos si los tratamientos con agentes anti-HER2 mostraban un efecto sobre la expresión o actividad de Erk5. Como modelo usamos la línea BT474 de cáncer de mama que tiene sobreexpresión de HER2 y altos niveles de expresión de pErk5/Erk5. Las células fueron tratadas con Lapatinib (una molécula inhibidora de la actividad tirosina quinasa del receptor) y Trastuzumab (un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular del receptor y que ha demostrado su eficacia clínica). Lapatinib inhibió drásticamente la fosforilación en tirosina de HER2 así como la fosforilación de Erk5. Sin embargo, Trastuzumab tuvo un mínimo efecto sobre pErk5, incluso realizando un análisis cuantitativo no se apreciaron resultados llamativos. El análisis cuantitativo del ratio pHER2/HER2 indicó que Trastuzumab tuvo también un efecto muy débil en la activación de HER2 (Figura 26).

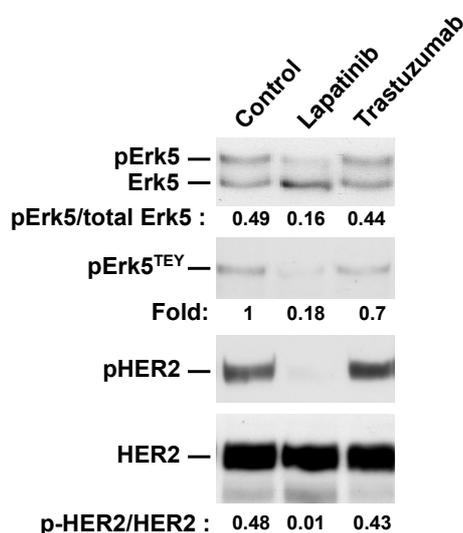


Figura 26. Efecto de Lapatinib y Trastuzumab sobre Erk5, pErk5^{TEY} y pHER2 en células sobreexpresoras de HER2. Células BT474 fueron tratadas con Lapatinib (100 nM) y Trastuzumab (10nM) durante 24 horas. La expresión de Erk5 y pErk5^{TEY} se analizó mediante inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-Erk5 C-terminal y anti-pErk5^{TEY} respectivamente y posterior Western blot con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal. La expresión de pHER2 y HER2 se analizó mediante inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-pHER2 y anti-HER2 y posterior Western blot con el anticuerpo anti-HER2. Se analizó cuantitativamente el ratio pErk5/Erk5 total y pHER2/HER2 total en cada una de las muestras.

En paralelo, los ensayos de proliferación celular realizados indicaron que Lapatinib disminuyó la proliferación de las células BT474 con mayor eficacia que Trastuzumab (Figura 27).

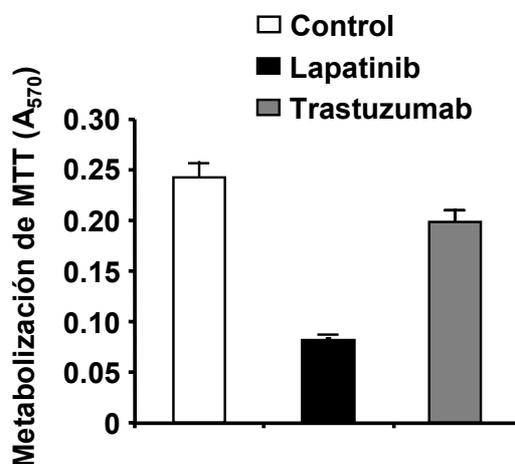


Figura 27. Efecto de Lapatinib (100 nM) y Trastuzumab (10 nM) en la metabolización de MTT en células BT474. El resultado se muestra como la media \pm la desviación estándar de un cuadruplicado que se repitió al menos dos veces.

Debido a la resistencia parcial de las células BT474 al tratamiento con Trastuzumab investigamos si una disminución de Erk5 facilitarían la acción de este fármaco. Para ello usamos dos estrategias diferentes: disminuyendo la función de Erk5 con una forma dominante negativa y disminuyendo los niveles de Erk5 mediante la tecnología de ARN de interferencia (ARNi). La forma dominante negativa de Erk5 (Erk5^{AEF}) es una forma inactiva de Erk5 en el dominio TEY, que actúa compitiendo con la forma endógena impidiendo su activación y la forma interferida de Erk5 mediante *short hairpin* es una forma que bloquea la expresión del gen diana (*Erk5*), consiguiendo un silenciamiento de la proteína en cuestión.

Transfectamos células BT474 con el vector pCEFL-HA-Erk5^{AEF} y con el vector pSuper-shErk5. Tras 3 días de tratamiento con Trastuzumab el porcentaje de inhibición de la proliferación celular en la línea BT474 transfectadas con el vector vacío pCEFL fue de $18,2 \pm 7,4$ (media \pm DS) mientras que las transfectadas con el vector pCEFL-HA-Erk5^{AEF} fue de $30,9 \pm 2,5$ (Figura 28). En las células BT474 transfectadas con el vector vacío pSuper usado para la estrategia de ARNi, el porcentaje de inhibición fue del $15,2 \pm 6,2$, mientras que las células transfectadas con el vector pSuper-shErk5, el porcentaje fue del $27,7 \pm 6,3$ (Figura 28). Tras comparar los resultados obtenidos por cada

estrategia, observamos que tanto la disminución de la expresión como de la actividad de Erk5 facilitarían la acción antitumoral del Trastuzumab.

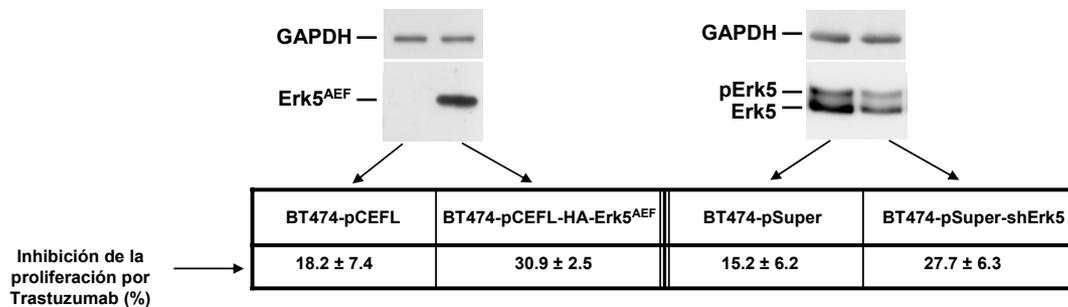


Figura 28. Efecto de Trastuzumab en la proliferación de células BT474 expresoras de Erk5^{AEF} y shErk5. Células transfectadas con ambos vectores fueron tratadas con Trastuzumab (10nM) y se midió su proliferación mediante la metabolización de MTT. Se analizó la expresión de Erk5 en las células Erk5^{AEF} y shErk5 mediante inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal y posterior Western blot con los anticuerpos anti-HA y anti-Erk5 C-terminal respectivamente. Como control de carga se utilizó la proteína citoplasmática GAPDH.

Los datos obtenidos en el tratamiento de células BT474 con Lapatinib apoyarían las conclusiones previas donde demostramos que pErk5 podría estar activado por otras rutas independientes de HER2, ya que, aunque inhibió completamente la fosforilación de HER2, los niveles de pErk5 sólo se inhibieron parcialmente. Además, ya se ha descrito, como otros receptores de membrana tales como el receptor IL-6 (Carvajal-Vergara et al. 2005) o quinasas citosólicas como Src (Abe et al. 1997) activan a Erk5.

Por otro lado, el hecho de que la reducción de la activación o expresión de Erk5 *in vitro* favorezca la acción de Trastuzumab indica que considerar a Erk5 como diana terapéutica podría favorecer la acción de las terapias anti-HER2 y podría ayudar a revertir la resistencia a fármacos.

2. Generación de un modelo animal de expresión de Mek5 en su forma constitutivamente activa (Mek5DD) en mama

Nuestros resultados indican que Erk5 puede tener un papel importante en cáncer de mama ya que pacientes con altos niveles de esta proteína tienen peor pronóstico y menor supervivencia libre de enfermedad. Además, Erk5 parece ser un factor pronóstico independiente y como hemos dicho en el apartado anterior, la reducción de sus niveles de expresión o de su activación favorece la acción de terapias anti-HER2 tales como Trastuzumab. Por ello, planteamos un estudio *in vivo* de la importancia de la vía de Mek5/Erk5 en cáncer de mama con un modelo animal de expresión constitutiva de Erk5. Con este modelo hemos pretendido analizar si la activación exclusiva de la ruta de Erk5 independientemente de HER2 provoca tumorigénesis mamaria. Como no se han descrito formas mutantes hiperactivas de Erk5, la activación de esta ruta se basó en la creación de una forma constitutivamente activa de Mek5 (Mek5DD) que es la quinasa activadora de Erk5. En la literatura ya existen datos con un transgen de Mek5, pero su expresión se ha dirigido exclusivamente al músculo cardíaco (Nicol et al. 2001). En primer lugar, hemos creado esta forma Mek5DD mediante mutagénesis dirigida de la Ser³¹¹ y la Thr³¹⁵ a ácido aspártico a partir del vector pCEFL-Flag-Mek5DD. A continuación hemos amplificado mediante PCR la secuencia Flag-Mek5DD y la hemos subclonado en el vector de expresión pMSG inducible con dexametasona que contiene una secuencia MMTV que la dirige específicamente a mama (Figura 29). El epítipo Flag en el extremo N-terminal de Mek5DD nos servirá para poder identificar Mek5DD en estudios bioquímicos con anticuerpos anti-Flag, y así poder diferenciarlo del Mek5 endógeno.

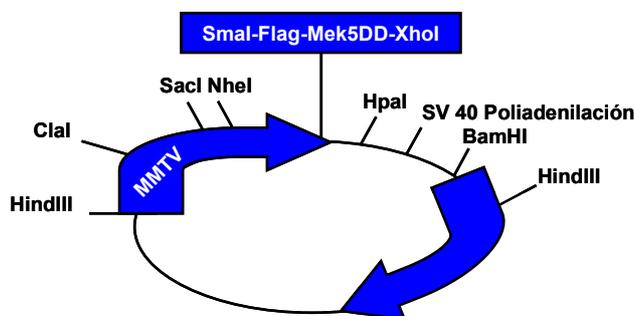


Figura 29. Representación esquemática del vector de expresión pMSG-Flag-Mek5DD.

Para contrastar la construcción del vector pMSG-Flag-Mek5DD se llevó a cabo su secuenciación a través del servicio de Genómica de nuestro centro utilizando oligos específicos para MMTV, Flag y Mek5DD.

Antes de generar el modelo animal, comprobamos *in vitro* su funcionalidad. Para ello transfectamos células HeLa con dicho plásmido y 48 horas más tarde, se añadió dexametasona 0.1 μ M para inducir la expresión de Mek5DD. Pasadas otras 48 horas, analizamos mediante Western blot la expresión de Mek5DD y la consecuente activación de Erk5. Como se observa en la figura 30, únicamente el carril correspondiente al plásmido pMSG-Flag-Mek5DD + dexametasona mostró expresión de Mek5 y provocó la activación de Erk5. Este resultado indicó el correcto funcionamiento del plásmido y por ello, lo consideramos válido para proceder a la generación del modelo animal.

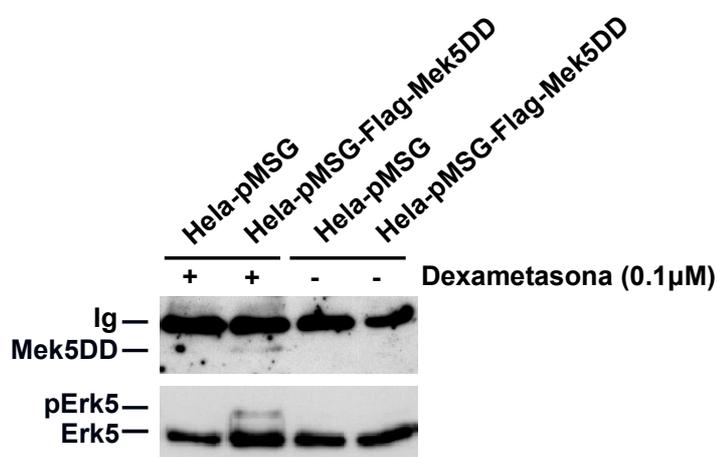


Figura 30. Comprobación *in vitro* de la activación de Erk5 tras inducción con dexametasona del vector pMSG-Flag-Mek5DD en células HeLa. Los extractos celulares de cada muestra se inmunoprecipitaron paralelamente con los anticuerpos anti-Mek5 y anti-Erk5 C-terminal y mediante Western blot se analizó la expresión de Mek5DD y Erk5 con los anticuerpos anti-Flag y anti-Erk5 C-terminal respectivamente.

Para la generación del ratón transgénico Mek5DD utilizamos el Servicio de Generación de Animales Modificados Genéticamente de la Universidad de Salamanca.

Una vez llevada a cabo la digestión del vector pMSG-Flag-Mek5DD con la enzima Hind III (Fig 29) se obtuvo la secuencia MMTV-Flag-Mek5DD que fue cedida al Servicio citado anteriormente. El ADN plasmídico linealizado se ha microinyectado en oocitos obtenidos de hembras superovuladas de la cepa FVB. El protocolo llevado a cabo para la generación del ratón se incluye en la sección de Material y Métodos. De una primera inyección se obtuvo una camada de 7 neonatos, y otros 7 también resultaron de una segunda inyección. Tras genotipado por PCR, de los 14 neonatos uno fue positivo para el transgén. Ya que es conveniente partir, al menos, de dos fundadores, se han

vuelto a hacer nuevas inyecciones. Fueron necesarias 9 sesiones de microinyección para obtener tres líneas fundadoras (A, B y C). De ellas, solo el fundador de la línea A que resultó ser macho (σ) y de la línea B que fue hembra (φ) fueron capaces de transmitir el transgén a la descendencia. El fundador de la línea C que resultó ser una hembra (φ), no fue capaz de transmitirlo a la descendencia (figura 31).

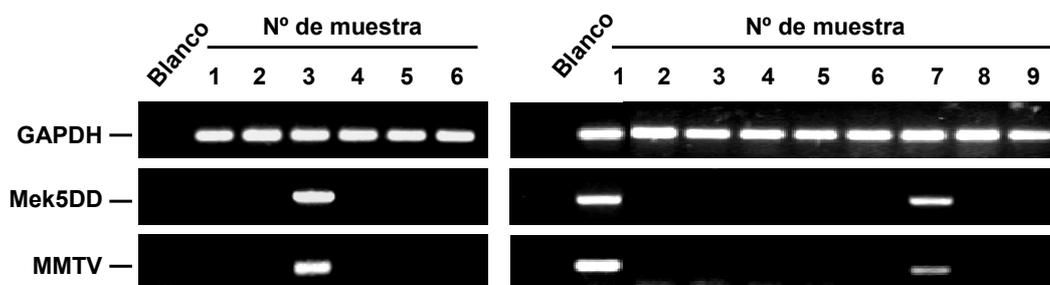


Figura 31. Se aisló el ADN genómico de las colitas de cada neonato y se analizó mediante PCR con oligos específicos para Mek5DD, MMTV y GAPDH la existencia de posibles fundadores. En el panel izquierdo, el carril 3 corresponde al fundador de la línea A (σ) y en derecho, los carriles 1 y 7 corresponden a los fundadores de las líneas B (φ) y C respectivamente (φ).

Disponemos por tanto de dos líneas diferentes: la línea A y la línea B (figura 31). Ambas líneas han sido propagadas para obtener un número suficiente de animales positivos para el transgén para realizar el estudio. De la línea A disponemos actualmente de 20 hembras positivas y 6 machos, mientras que de la línea B necesitamos aumentar el número de descendientes positivos ya que por el momento solo hay 13 hembras y 4 machos.

Con los animales hasta ahora disponibles, estamos observando la glándula mamaria periódicamente en espera de aparición de tumor. Por el momento, hemos detectado tumores en la cavidad abdominal de una hembra de la línea A, pero tras el análisis bioquímico de éstos no hemos observado expresión de Mek5DD ni activación constitutiva de Erk5. Pensamos que este pudiera ser un caso aislado que nada tenga que ver con el transgén. Una observación que queremos resaltar es que aproximadamente el 25% de las hembras positivas para el transgén mueren alrededor de los cuatro meses de vida, sin que se pueda predecir su muerte, puesto que las observaciones realizadas bisemanalmente indican una apariencia normal del animal, indistinguible de los animales de la misma camada negativos para el transgén. Estamos analizando la histología de la glándula mamaria para ver si revela algún dato patológico. Las líneas y B permanecen en constante cruce para la obtención de descendencia. Este objetivo está por tanto todavía en curso y a la espera de nuevos resultados.

3. Mecanismo de acción de TG02

Los inhibidores dirigidos contra quinasas específicas, han encontrado múltiples aplicaciones en el entorno oncológico debido a que poseen la capacidad de dirigirse a vías de señalización clave para muchos tipos de cáncer. En muchos casos, inhibidores quinasa de amplio espectro han dado mejores resultados clínicos que los más selectivos porque bloquean más de una ruta crítica para el crecimiento del tumor. Nosotros describimos el perfil farmacológico de TG02, un inhibidor multiquinasa desarrollado por la farmacéutica Tragara (San Diego), que combina la inhibición de quinasas clave en la etiología de diversas leucemias y tumores sólidos con la inhibición de CDKs (Cyclin-dependent kinases) implicadas en ciclo celular y en la regulación transcripcional.

En la Tabla XIII se muestra una lista de las quinasas más relevantes inhibidas por TG02, así como el potencial inhibitorio para cada una de ellas obtenido mediante ensayos de quinasa in vitro (el valor de la IC₅₀ indica la concentración a la que el fármaco inhibe el 50% del crecimiento celular).

TG02 mostró ser un potente inhibidor de varias CDKs, como CDK1, CDK2, CDK7 y CDK9, de algunas quinasas implicadas en tumores hematológicos como TYK2 (Tyrosine kinase 2), FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) o JAK2 (Janus kinase 2) y de otras quinasas como Erk5, p38δ o TYRO3 (Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3) implicadas en tumores sólidos.

Tabla XIII. Representación de las quinasas más relevantes inhibidas por TG02 en tumores sólidos y hematológicos con IC₅₀ < 60 nM

| Quinasa | IC ₅₀ (nM) | Familia | Función | Enfermedades |
|---------|-----------------------|---------|----------------------------|------------------|
| CDK1 | 9 | CDK | Control del ciclo celular | Varias, como ej: |
| CDK2 | 5 | CDK | | Leucemias agudas |
| CDK7 | 37 | CDK | Regulación transcripcional | Tumores sólidos |
| CDK9 | 3 | CDK | | Mieloma |
| JAK2 | 19 | JAK | Transducción de señales | Leucemias agudas |
| TYK2 | 14 | JAK | | |
| FLT3 | 19 | RTK | Señalización mitogénica y | AML |
| TYRO3 | 36 | RTK | supervivencia | Melanoma |
| ERK5 | 43 | MAPK | | MM, TNBC |
| p38δ | 56 | MAPK | Diferenciación | SCCHN |

Otras quinasas inhibidas por TG02 con $IC_{50} \leq 100$ nM fueron CDK3, CDK5, CDK6, Fms/CSF1R (Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor), Lck y Fyn (miembros de la familia de la proteína quinasa Src). TG02 se ha testado aproximadamente contra 80 quinasas diferentes, de las cuales parecen no verse afectadas CDK4, c-Kit, VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2), PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor), IGF-1R, AKT, EGFR, Mek1 y Src.

En la figura 32 se representa esquemáticamente las principales CDKs inhibidas por TG02, así como los fármacos más actuales dirigidos para cada una de ellas.

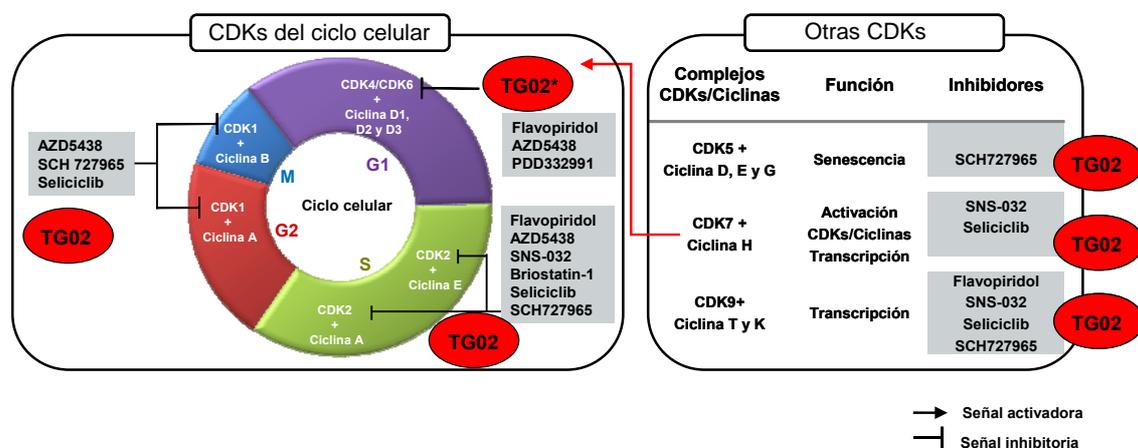


Figura 32. Esquema representativo de las CDKs inhibidas por TG02 implicadas o no implicadas en ciclo celular. *La inhibición de CDK7(CDK implicada en la activación de las CDKs del ciclo celular) puede indirectamente disminuir la actividad de CDK4 y CDK6 (Francis Burrows 2010).

Las CDKs juegan un papel importante en el control del ciclo celular y la regulación de proteínas. Se ha observado, que en el proceso tumoral existen alteraciones fundamentales en el control genético de la división celular que dan como resultado una proliferación celular incontrolada. Además, existe un vínculo muy importante entre la regulación del ciclo celular y la apoptosis, pues una desregulación del ciclo supone uno de los estímulos más potentes para inducirla. Existen estudios en los que la desregulación de algunos componentes de la maquinaria del ciclo celular, como por ejemplo pRb (fosto-Retinoblastoma), E2F (Transcription factor E2F), p21 (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1), p27 (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B), ciclina D1 o CDK1, influyen en el proceso apoptótico (Grant et al. 2003). Además, alteraciones de alguno de los reguladores del ciclo celular como por ejemplo CDKs, ciclinas, enzimas activadoras de CDKs, inhibidores de CDKs, sustratos de CDKs y proteínas de los puntos de control, se han encontrado prácticamente en todos los cánceres humanos (Sherr 2000).

La evidencia de que las CDKs, sus reguladores y sus sustratos son diana de alteraciones genéticas en diferentes tipos de cánceres humanos ha estimulado a los investigadores en la búsqueda de inhibidores químicos de CDKs como una buena opción terapéutica. Entre ellos cabe destacar los análogos de purinas, como la roscovitina y los derivados de flavonoides como el flavopiridol. Ambos fármacos han mostrado inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis (Garrett et al. 1999; McClue et al. 2002).

Erk5, como ya comentamos previamente, es una MAPK implicada en el control de la proliferación y muerte celular, así como en tumorigénesis (Wang et al. 2006), cuya activación parece ser esencial para la estimulación de la proliferación de células tumorales de mama (Kato et al. 1998; Esparís-Ogando et al. 2002).

En este trabajo hemos expuesto como la inhibición de Erk5 representaría una buena opción terapéutica tras demostrar que los pacientes con altos niveles de expresión de Erk5 tienen peor pronóstico. Además, hemos definido su papel como factor pronóstico independiente y hemos visto como la reducción de sus niveles de expresión o de su activación favorece la acción de terapias anti-HER2 tales como Trastuzumab.

Ya que de todos los casos de cáncer de mama que se diagnostican anualmente en España, a pesar de la cirugía y la terapia adyuvante estándar como la quimioterapia, hormonoterapia o terapias dirigidas, se calcula que el 25% de las mujeres con cáncer de mama tendrán una recaída en un futuro próximo (5-10 años), consideramos de gran interés la inhibición en paralelo de otras vías de señalización implicadas en este tipo de tumores con nuevos fármacos dirigidos.

Es por ello que hemos realizado un estudio con el fármaco TG02, un inhibidor multiquinasa de amplio espectro que incluye a Erk5 como una de las dianas con mayor potencial inhibitorio en cáncer de mama *in vitro* ($IC_{50}= 43$ nM) (Tabla XIII) además de otras tan importantes en tumores sólidos como las CDKs.

3.1 Caracterización del efecto de TG02 sobre la quinasa Erk5

En primer lugar, analizamos si TG02 inhibe la actividad de Erk5 y paralelamente otras proteínas implicadas en su activación u otras vías que compartan sus mismos estímulos.

Dentro del dominio quinasa de Erk5, se encuentra el motivo TEY susceptible de fosforilación (Zhou et al. 1995). Hasta la fecha, la única MAPKK conocida que activa a Erk5 mediante fosforilación específica en este dominio es Mek5, dando lugar a un aumento de su actividad catalítica (English et al. 1995). Una vez que Erk5 está activa, es capaz de autofosforilarse y de activar a sus sustratos.

Para llevar a cabo el estudio, hemos utilizado la línea celular Hela basándonos en que Erk5 es activado en el dominio TEY tras estimulación con factores de crecimiento (EGF).

Realizamos un experimento con diferentes dosis de TG02 durante 2 horas y posteriormente estimulamos las células con EGF 10 μ M durante 15 minutos, con la finalidad de activar la vía de Erk5 y ver si el fármaco afecta a su activación en el dominio TEY. Además, analizamos en paralelo si TG02 era capaz de inhibir la activación del receptor EGFR o si podría afectar a otras vías activadas en respuesta a EGF como la vía de Erk1/2.

Como se observa en la figura 33A, TG02 no inhibió la fosforilación del dominio TEY, indicando indirectamente que Mek5, su quinasa activadora no se ve afectada. En cuanto al receptor EGFR o la vía de Erk1/2, no observamos ningún efecto inhibitorio sobre su activación. Sin embargo TG02 a dosis altas provocó un cambio en la movilidad de Erk5 indicando que probablemente son otros los residuos de su molécula los que se ven afectados. Para analizar si este cambio de movilidad era tiempo dependiente, repetimos el experimento a una dosis baja (100 nM) y a una dosis alta (1 μ M) hasta 24 horas de tratamiento. Como se observa en la figura 33B, únicamente la dosis de TG02 1 μ M fue dependiente del tiempo, no observando efecto alguno a la dosis de 100 nM. Además, parece que TG02 1 μ M ejerce un fuerte efecto inhibitorio sobre la fosforilación de Erk5 a tiempos muy cortos (30 minutos) ya que hubo cambio en la movilidad de Erk5. Sin embargo, a medida que aumentó el tiempo de exposición al fármaco el efecto de TG02 sobre la desfosforilación de Erk5 parece disminuir, como queda reflejado por la aparición de bandas de peso molecular intermedio entre la banda correspondiente a células control sin estimular y estimuladas con EGF.

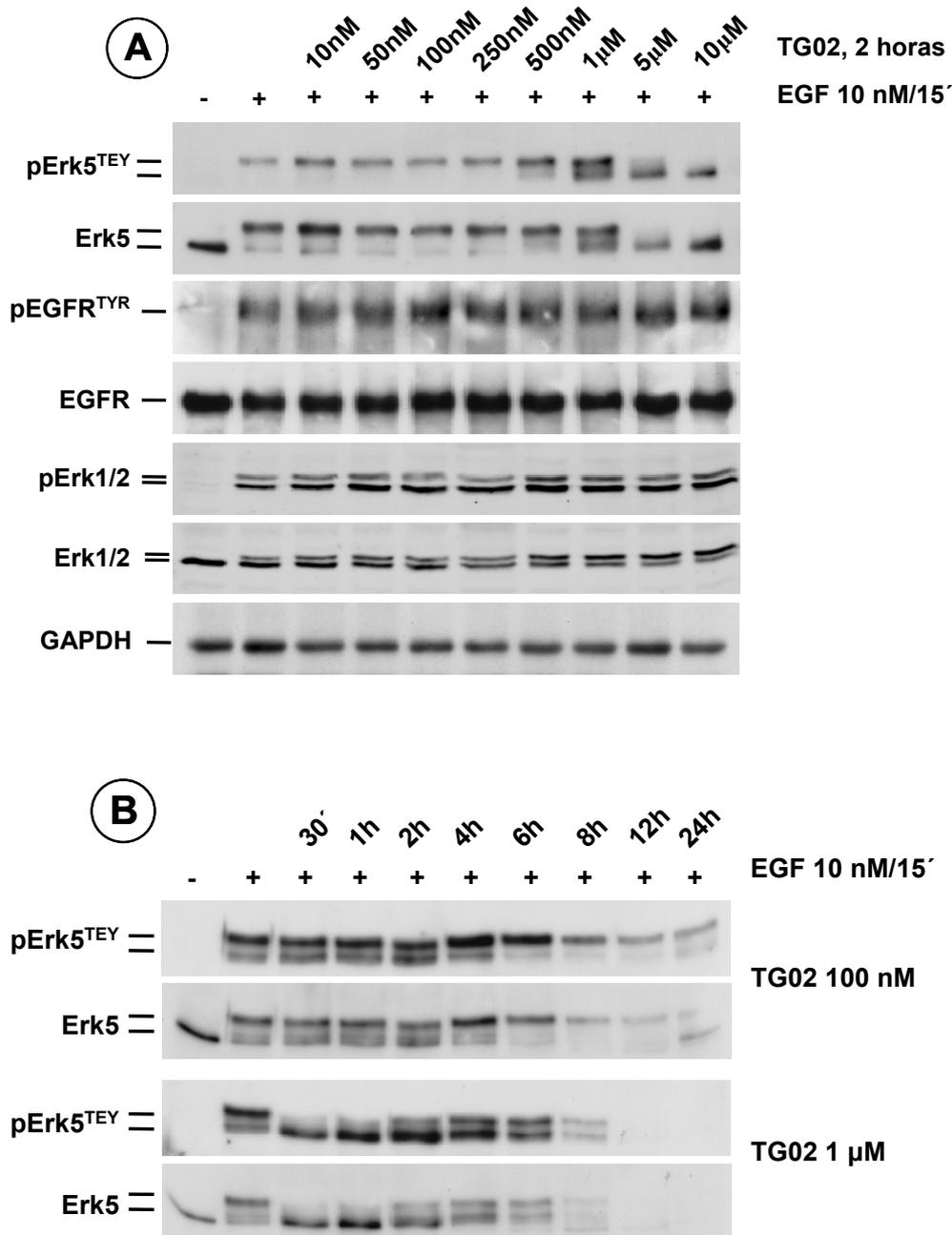


Figura 33. Expresión de pErk5^{TEY}, Erk5, pEGFR^{TYR}, EGFR pErk1/2, Erk1/2 y GAPDH (A), y expresión de pErk5^{TEY} y Erk5 (B), tras el tratamiento con TG02 en células HeLa estimuladas con EGF. Para ver la expresión de Erk5, los lisados fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal y se realizó el Western blot con los anticuerpos anti-pErk5^{TEY} y anti-Erk5 C-terminal. Se inmunoprecipitó EGFR con el anticuerpo anti-EGFR y se realizó el Western blot con los anticuerpos anti-pTyr y anti-EGFR. El Western blot de pErk1/2 y Erk1/2 se realizó en extractos celulares con anticuerpos específicos anti-pErk1/2 y anti-Erk1/2. Como control de carga se analizó la proteína citoplasmática GAPDH con el anticuerpo anti-GAPDH.

Recientes estudios han descrito la fosforilación de Erk5 en los residuos Thr⁷³², Ser⁷⁰⁶, Ser⁷⁵³ and Ser⁷⁷³ durante la progresión del ciclo celular (Diaz-Rodriguez et al. 2010). Para averiguar si el cambio de movilidad observado previamente con el anticuerpo anti-pErk5^{TEY} y anti-Erk5 C-terminal tras el tratamiento con TG02 (Figura 33), pudiese ser consecuencia de la inhibición de la fosforilación de Erk5 en alguno de estos residuos localizados en su cola C-terminal, se han tratado células Hela con TG02 durante diferentes tiempos a la dosis de 1 μ M y posteriormente se han estimulado con EGF. Tras inmunoprecipitación de los lisados con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal, realizamos el Western blot con los anticuerpos anti-pErk5^{TEY}, anti-pErk5^{Thr732} y anti-Erk5 C-terminal. El resultado representado en la figura 34, mostró una clara inhibición de la fosforilación del residuo Thr⁷³² en comparación con el motivo TEY a todos los tiempos de tratamiento. Además, este resultado indica que son otros residuos (y no el Thr⁷³²) los que vuelven a fosforilarse desde 1 hora de tratamiento. La parte derecha de la figura sirve de control para indicar que TG02 no ejerce ningún efecto sobre la expresión basal de Erk5, aunque a 6 horas de tratamiento observamos un efecto inhibitorio de la expresión de Erk5, indicando que TG02 podría tener un papel sobre la transcripción génica, probablemente tras inhibición de dos de sus dianas, CDK7 y CDK9, implicadas en la regulación transcripcional (Dai et al. 2003).

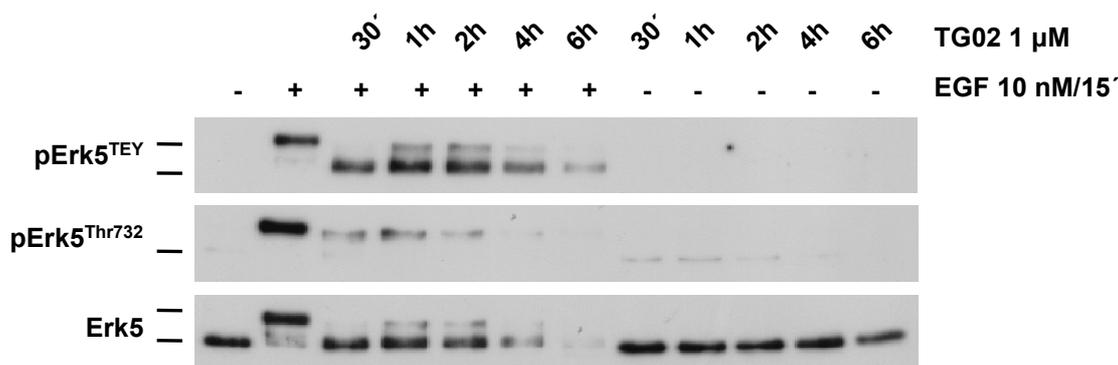


Figura 34. Expresión de Erk5, pErk5^{TEY} y pErk5^{Thr732} tras el tratamiento con TG02 1 μ M. Células Hela fueron tratadas con TG02 1 μ M a diferentes tiempos y a continuación estimuladas con EGF 10 nM/15 minutos. La expresión de Erk5 y su estado de fosforilación se analizó mediante inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal y posterior revelado con los anticuerpos anti- pErk5^{TEY}, pErk5^{Thr732} y Erk5 C-terminal respectivamente.

Una manera indirecta de averiguar si la actividad de Erk5 está comprometida, es analizar su capacidad de autofosforilación tras activación en el dominio TEY, mediante un ensayo de quinasa *in vitro*. Lisados de células Hela estimuladas con EGF, fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal. A continuación los inmunoprecipitados se trataron con concentraciones crecientes del fármaco durante 30 minutos previos al ensayo de quinasa *in vitro*. Tras realizar dicho ensayo se analizó la expresión de Erk5 mediante Western blot con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal. Como se observa en la figura 35, las células control que no han sido sometidas al ensayo de quinasa *in vitro*, muestran una estimulación con EGF similar a los experimentos previos, donde Erk5 se activa tras fosforilación en el dominio TEY, y esto queda representado como una banda más retardada en el gel. En cambio, cuando estos mismos controles son sometidos al ensayo de quinasa *in vitro*, en el cual Erk5 tiene acceso a moléculas de ATP, el resultado varía, como se demuestra en el carril estimulado con EGF, el cual presenta una banda superior adicional, que corresponde a otros residuos de su molécula que han sido activados por el propio Erk5, dada su capacidad para autofosforilarse (Morimoto et al. 2007). Si nos fijamos en los carriles tratados con el fármaco, observamos que TG02 (entre 500 nM y 1 μ M) es capaz de inhibir claramente la capacidad de autofosforilación de Erk5, ya que la banda mas retardada en el gel, correspondiente a los residuos que ella misma es capaz de fosforilar, se convierte en varias bandas que se caracterizan por una decreciente movilidad. A dosis superiores, se observa un perfil similar al carril correspondiente a las células control estimuladas con EGF, indicando que TG02 inhibe completamente su capacidad de autofosforilación.

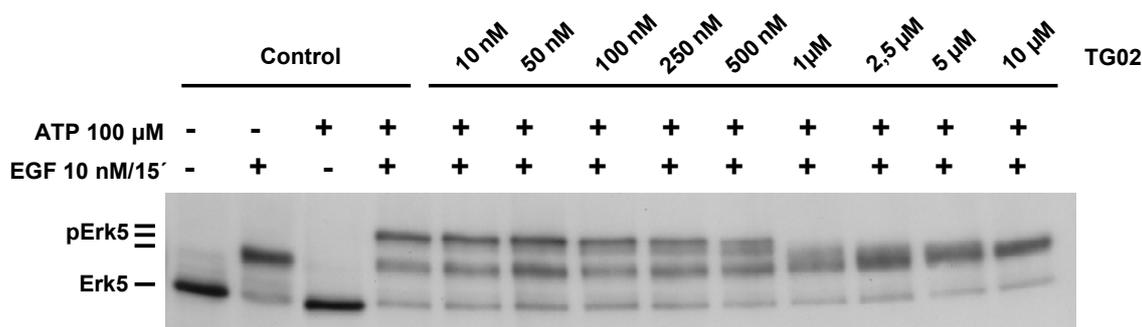


Figura 35. Ensayo de quinasa *in vitro*. Células Hela fueron estimuladas con EGF 10 nM/15 minutos y tras la inmunoprecipitación de Erk5 con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal, los IPs se trataron con dosis crecientes de TG02. A continuación se realizó el ensayo de quinasa *in vitro*. El Western blot se realizó con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal.

Concluimos que TG02, tiene un efecto claro de inhibición de la fosforilación en la cola C-terminal de Erk5, al menos sobre la Thr⁷³², sin afectar al motivo TEY en respuesta a estimulación con EGF. Además, esta inhibición es específica sobre esta molécula y no sobre otras implicadas en su activación, como el receptor EGFR u otras que conjuntamente se activen en respuesta al mismo estímulo, como Erk1/2. Al mismo tiempo, hemos demostrado una clara inhibición de su capacidad para autofosforilarse, como se manifiesta en el ensayo de quinasa *in vitro*.

3.2 Efecto de TG02 en cáncer de mama

Estudiamos el efecto de TG02 en las líneas celulares de cáncer de mama de los subtipos RE (células MCF7 y T47D), HER2 (células BT474 y SKBR3) y TNBC (células MDAMB231 y HBL100) mediante ensayos de proliferación celular y observamos que las líneas celulares más sensibles a la acción de este fármaco fueron las del subtipo triple negativo.

El cáncer de mama triple negativo representa aproximadamente el 15 % de todos los tipos de cáncer mamarios en diversos estudios retrospectivos (Cleator et al. 2007). Estos pacientes presentan muy mal pronóstico y su única opción terapéutica en la actualidad es la quimioterapia.

Basándonos en estos hechos, hemos investigado si TG02 podría ser una buena terapia dirigida para este subtipo de tumores de cáncer de mama.

3.2.1 Expresión a nivel de ARNm de las dianas potenciales de TG02 en cáncer de mama triple negativo

Para analizar la expresión de las diferentes dianas de TG02 en cáncer de mama tripe negativo, utilizamos un panel de 9 líneas celulares y analizamos la expresión de ARNm mediante RT-PCR con oligos específicos (Figura 36).

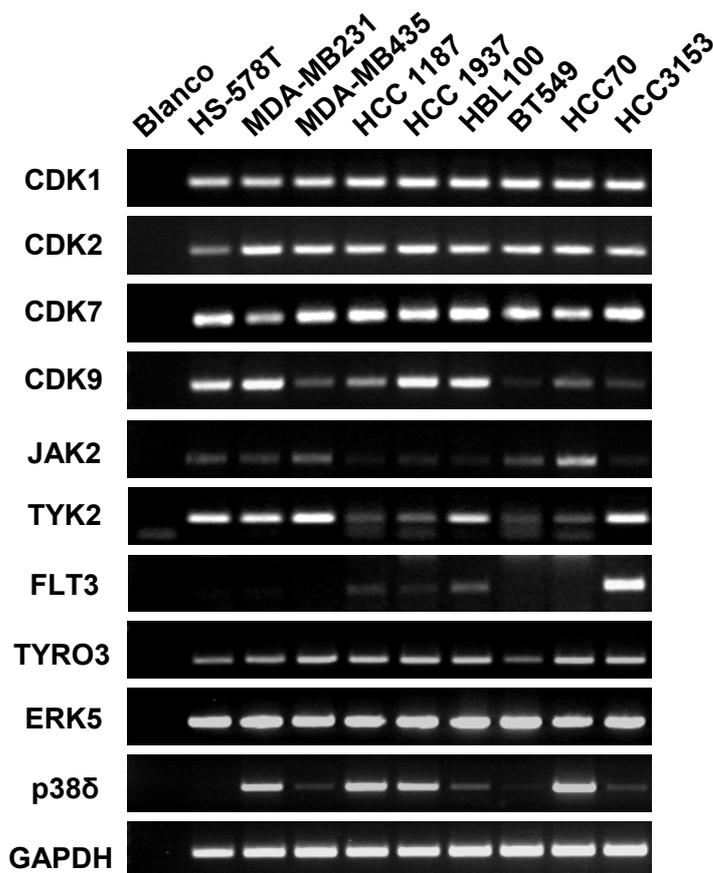


Figura 36. Expresión de ARNm de dianas potenciales de TG02 en un panel de líneas celulares del subtipo triple negativo de cáncer de mama.

Estos datos indican en una primera aproximación, que la mayoría de las líneas tienen expresión de ARNm que codifica CDK1, CDK2, CDK7, TYRO3 y Erk5, mientras que solo algunas de ellas presentaron ARNm para CDK9, TYK2 y p38δ. FLT3 y JAK2, no parecen ser dianas importantes en estas líneas ya que la mayoría de ellas mostraron niveles de expresión muy bajos.

Se validó el resultado de la PCR para el caso de Erk5, con el objetivo de determinar tanto la expresión como la actividad de esta quinasa en el subtipo triple negativo de cáncer de mama. Llevamos a cabo la inmunoprecipitación de lisados de cada una de las líneas celulares citadas con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal y posterior Western blot con el mismo anticuerpo. El resultado reveló una marcada expresión de Erk5 en la mayoría de las líneas celulares y al mismo tiempo, varias de ellas mostraron activación constitutiva de Erk5, como queda reflejado por la presencia de bandas con menor movilidad (Figura 37).

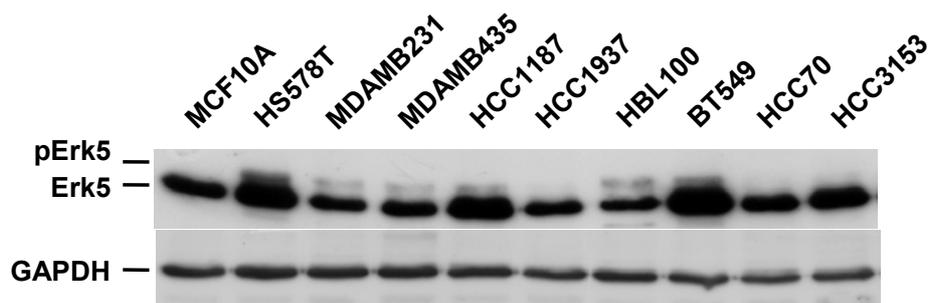


Figura 37. Expresión de Erk5 en líneas celulares del subtipo triple negativo de cáncer de mama. Los extractos celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Erk5 C-terminal y se realizó el Western blot con el mismo anticuerpo. Se utilizó como control de carga la proteína citoplasmática GAPDH.

Dado que ya hemos demostrado que la inhibición de Erk5 representa una buena opción terapéutica en cáncer de mama y puesto que TG02 es capaz de inhibir su actividad catalítica, consideramos que TG02 podría ser una buena opción terapéutica en este subtipo de tumores de cáncer de mama.

3.2.2 Evaluación de la eficacia y acción de TG02 sobre células de cáncer de mama triple negativo

Para determinar el efecto de TG02 en la supervivencia de células de cáncer de mama triple negativo, llevamos a cabo el tratamiento con diferentes dosis del fármaco en el panel previo de líneas celulares, con el objetivo de medir la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT.

Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes entre 25 nM y 10 μ M del fármaco durante 24, 48 y 72 horas. Los resultados se describen comparando el efecto de TG02 sobre cada línea celular, y tomando como 100 % la absorbancia de las células control tratadas únicamente con el solvente. Los datos se representan en escala semilogarítmica como la media de un triplicado \pm la desviación estándar de un experimento que se repitió al menos dos veces (Figura 38).

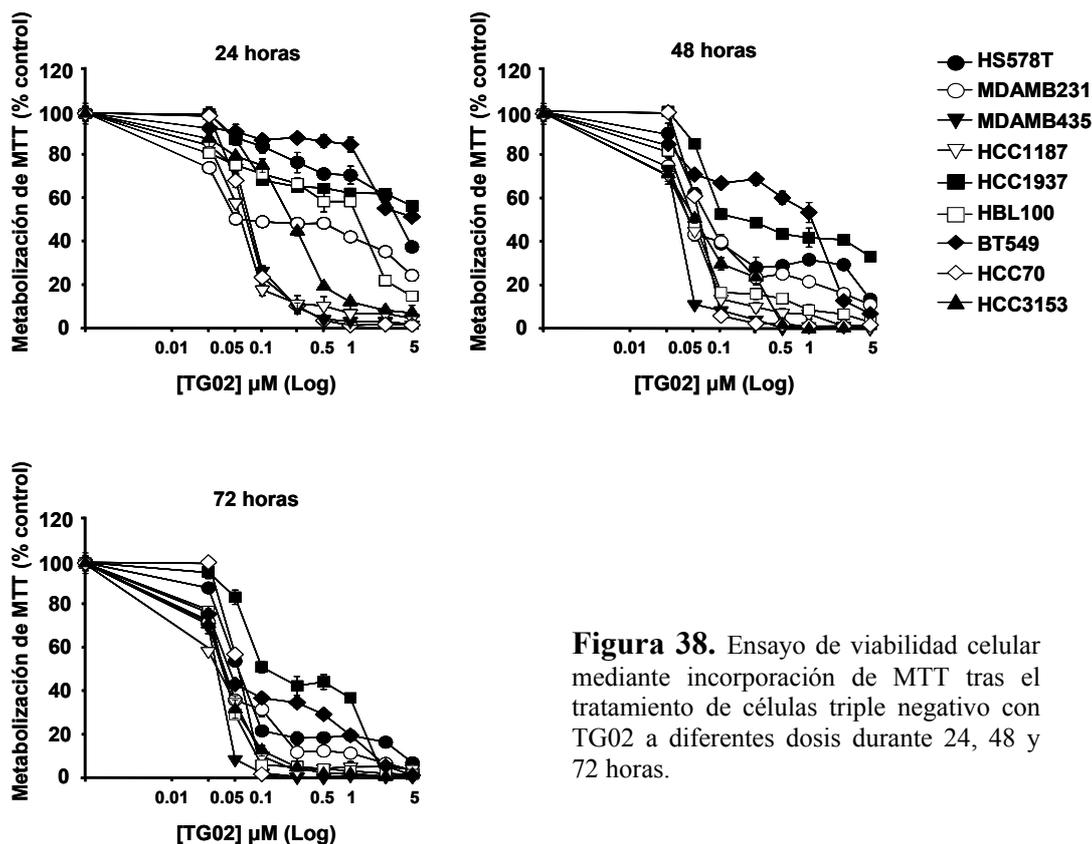


Figura 38. Ensayo de viabilidad celular mediante incorporación de MTT tras el tratamiento de células triple negativo con TG02 a diferentes dosis durante 24, 48 y 72 horas.

Los resultados obtenidos mostraron dos grupos claramente definidos por su mayor o menor sensibilidad al fármaco a dosis > 500 nM a 24 horas. Las líneas celulares HCC1187, HCC70 y MDAMB435 fueron las más sensibles, mientras que en las demás líneas el efecto de TG02 fue dependiente del tiempo de tratamiento, mostrando en general mayor sensibilidad a partir de las 48 horas, con la excepción de las líneas HCC1937 y BT549 que mostraron ser las más resistentes a los tres tiempos estudiados.

En la Tabla XIV se expone la IC_{50} para cada línea y para cada tiempo calculado con el programa Sigmaplot. En la mayoría de las líneas celulares la IC_{50} fue menor de 100 nM a los tiempos de 48 y 72 horas, con la excepción de la línea HCC1937 cuyos valores fueron mucho mayores.

Tabla XIV. Representación de la IC₅₀ a los tiempos de 24, 48 y 72 horas para cada línea celular calculadas con el programa Sigmaplot

| Línea celular | 24 hr IC ₅₀ (nM) | 48 hr IC ₅₀ (nM) | 72 hr IC ₅₀ (nM) |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| HBL100 | 1183 | 46 | 35 |
| BT549 | 3750 | 734 | 60 |
| HCC 3153 | 161 | 69 | 33 |
| MDAMB231 | 160 | 85 | 45 |
| HS578T | 2701 | 101 | 60 |
| HCC70 | 71 | 57 | 45 |
| HCC1187 | 53 | 43 | 24 |
| HCC1937 | > 5000 | 221 | 196 |
| MDAMB435 | 94 | 21 | 19 |

En base a estos datos, y para caracterizar el efecto de TG02 hemos seleccionado dos líneas celulares, una representativa del grupo con mayor resistencia al fármaco, como es la línea MDAMB231 y otra representativa del grupo con mayor sensibilidad, como es la línea HCC1187.

3.2.3 Efecto sobre ciclo celular y apoptosis

Llevamos a cabo un primer estudio del ciclo celular y apoptosis mediante FACS a las dosis de 100 nM y 1 μ M durante 24 horas, marcando con IP y Anexina V/IP respectivamente. Estas dosis fueron elegidas en base a los ensayos de MTT. Observamos que TG02 actuó principalmente por dos mecanismos diferentes dependiendo de la línea celular. Mientras que en MDAMB231 el efecto primordial fue de parada del ciclo (Figura 39), en la línea HCC1187 el efecto observado fue principalmente de apoptosis (Figura 40). Estos datos fueron corroborados en otras líneas celulares representativas de ambos grupos (datos no presentados). Los resultados coincidían con las observaciones al microscopio: en el grupo de líneas más resistentes, las células mostraban una apariencia normal aunque no proliferaban, mientras que en el grupo más sensible, las células estaban muertas y flotando en el medio de cultivo.

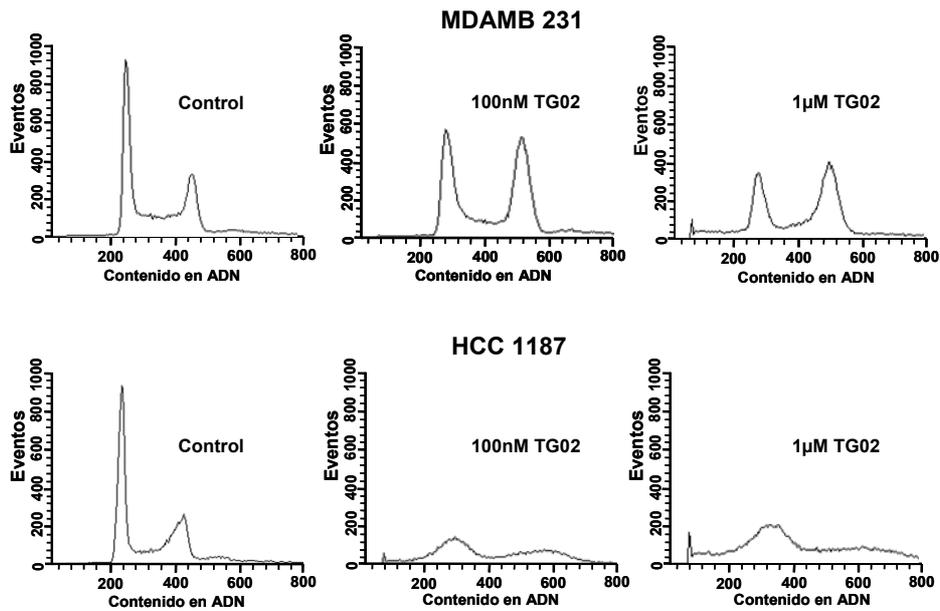


Figura 39. Efecto de TG02 sobre el perfil del ciclo celular en las líneas celulares MDAMB231 y HCC1187. Las células fueron tratadas con TG02 100 nM y 1 μ M durante 24 horas y posteriormente marcadas con IP para su análisis mediante FACS.

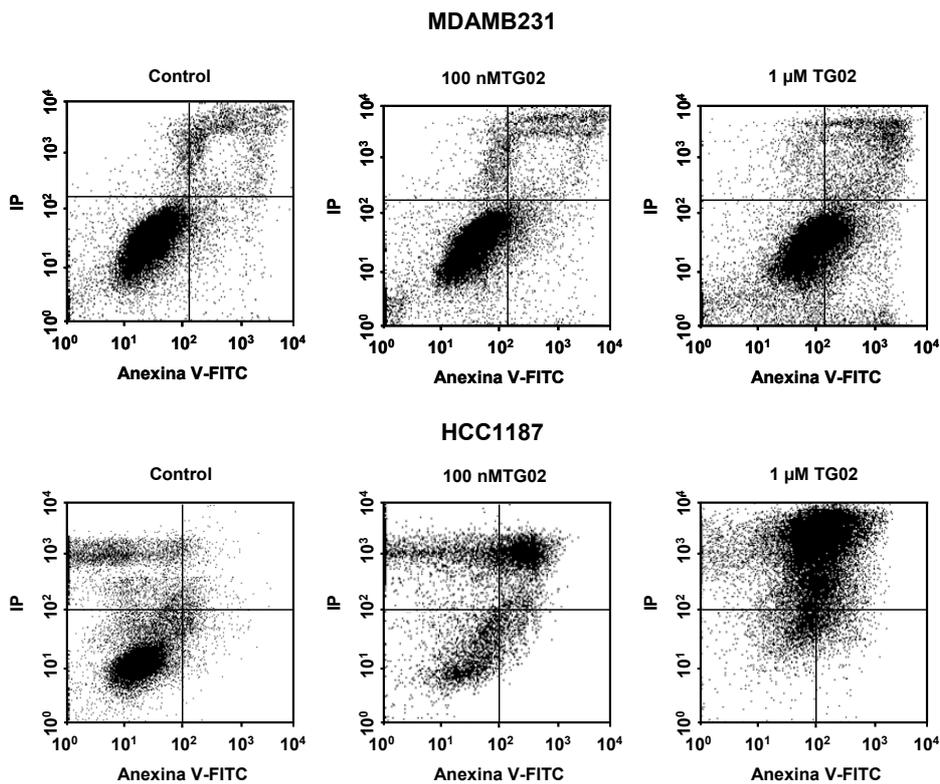


Figura 40. Efecto de TG02 sobre apoptosis en las líneas celulares MDAMB231 y HCC1187. Las células fueron tratadas con TG02 100 nM y 1 μ M durante 24 horas y posteriormente marcadas con Anexina V-FITC y ip para su análisis mediante FACS.

Dado que los principales efectos observados son los de parada de ciclo en MDAMB231 y apoptosis en HCC1187, decidimos encaminar nuestro estudio en dilucidar el mecanismo de acción de TG02 estudiando en profundidad ambos procesos, además de otros que de manera indirecta contribuyen a los primeros, tales como la regulación de la transcripción génica o daño y reparación en el ADN.

3.3 Análisis del efecto de TG02 en la línea celular MDAMB231

3.3.1 Efecto de TG02 en el ciclo celular

Analizamos el ciclo celular mediante citometría de flujo con el objetivo de evaluar el efecto de parada observado previamente en la figura 39, tras tratamiento de las células MDAMB231 a dosis constante de 100 nM a diferentes tiempos. Observamos que TG02 parece inducir un retraso en la transición G1/S y G2/M desde las 6 horas de tratamiento (Figura 41).

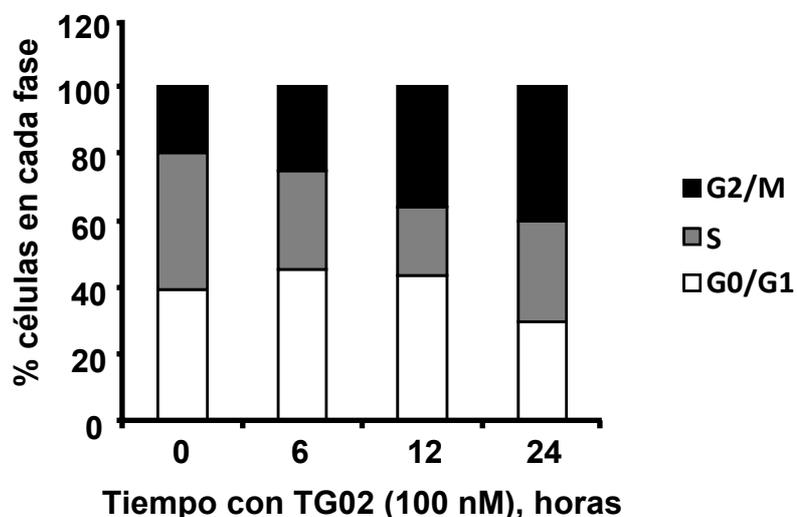


Figura 41. Representación en porcentaje de las distintas poblaciones de células de un cultivo asincrónico en función de su contenido en ADN tras el tratamiento con TG02 100 nM, analizado mediante FACS.

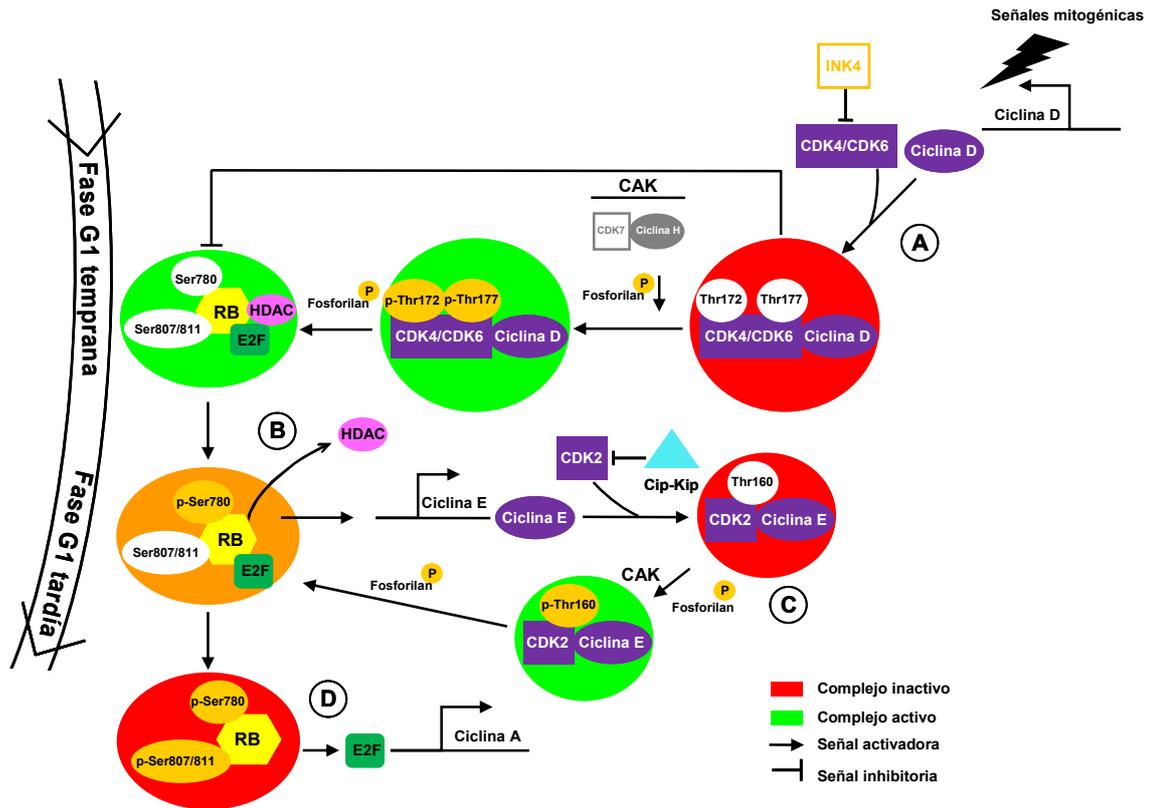


Figura 42. Transición de fases G1/S. Figura adaptada de Lapenna et al. 2009. En la fase G0, la proteína Rb activa en su forma hipofosforilada se une e inhibe factores de transcripción de la familia E2F, que están compuestos de dímeros de una proteína E2F y una proteína DP (Dimerization partner) (Elledge 1996). Los complejos E2F-DP son capaces de activar la transcripción de una serie de genes que inducen la entrada de la célula en fase S (De Veylder et al. 2003; de Jager et al. 2005). Al formar complejo con Rb, E2F-DP permanece inactivo y la célula estancada en la fase G1, de forma que Rb funciona como un supresor de la proliferación celular al inhibir la progresión a través del ciclo celular (Korenjak et al. 2005). El complejo Rb-E2F/DP también produce la unión de una histona deacetilasa (HDAC) a la cromatina, lo cual disminuye la transcripción de factores que promueven la entrada en fase S. En respuesta a factores mitogénicos, se activa la expresión de ciclina D que inicia la fase G1 del ciclo tras formar complejo con CDK4 y CDK6 (A). Estos complejos tras su activación por el complejo CAK (CDK7/ciclina H) desactivan a la proteína Rb mediante fosforilación específica en el residuo Ser⁷⁸⁰ (Brugarolas et al. 1999), provocando la disociación de la histona-deacetilasa-1 (HDAC1) del complejo Rb/HDAC/E2F, que facilita la transcripción de determinados genes como la ciclina E (B). La ciclina E forma complejo con CDK2 en la fase G1 tardía, y tras su activación por CAK, induce la hiperfosforilación de Rb en los residuos Ser^{807/811} (Brugarolas et al. 1999) promoviendo la entrada en fase S (C). Esto provoca la liberación del factor de transcripción E2F y con ello, la expresión de proteínas necesarias en fase S tales como la ciclina A (D).

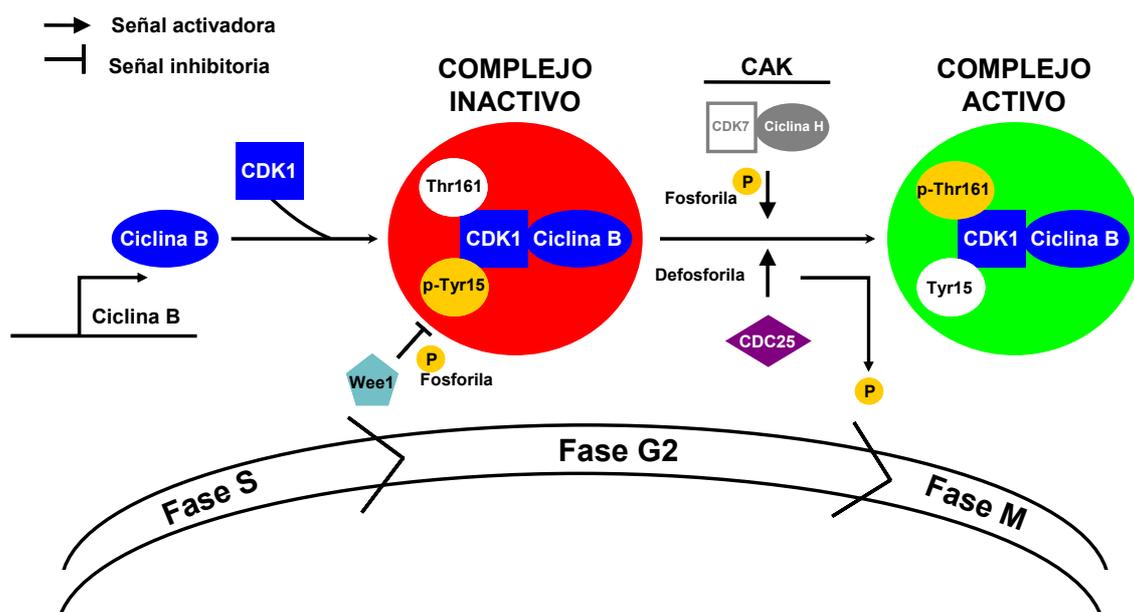


Figura 43. Transición de fases G2/M. Figura adaptada de GENESETBANK (Contributed by Dr. Koji Nakade). En la transición de fases G2/M está implicado el complejo CDK1/ciclina B cuyo papel principal se basa en mantener en un estado hiperfosforilado y por tanto inactivo a la proteína Rb, de manera que las células pueden progresar en el ciclo. En su paso a través de la fase G2, este complejo se mantiene inactivo tras fosforilación en el residuo Tyr¹⁵ por parte de una proteína inhibitoria denominada Wee1. Cuando progresan hacia mitosis, el complejo CAK (CDK7/ciclina H) activa a CDK1 tras fosforilación en la Thr¹⁶¹ y desfosforilación del residuo en Tyr¹⁵ por la fosfatasa CDC25C (Watanabe et al. 1995). En mitosis, se produce la condensación de cromosomas, proceso acompañado de la fosforilación de histonas como la histona H3 (Hans et al. 2001), utilizada ampliamente como marcador mitótico.

3.3.1.1 Efecto de TG02 en la transición de fases G2/M

Dado que TG02 es inhibidor específico de CDK1 y que uno de los retrasos observados en la figura 41 es en la transición de fases G2/M, analizamos más detalladamente este efecto. Para poder estudiar únicamente la transición de fases G2/M, se sincronizaron las células en un punto anterior del ciclo donde no se observó efecto claro de parada. Se llevó a cabo un doble bloqueo de 24 horas con timidina, que sincroniza las células al final de la fase G1/principio de S. Las células se lavaron con PBS para retirar la timidina y liberarlas del bloqueo, y a continuación, a las células control se les añadió medio DMEM + 10% FBS y a las demás se les añadió medio DMEM + 10% FBS suplementado con TG02 100 nM. Se estudió a lo largo del tiempo

el ciclo celular en ambas condiciones mediante citometría de flujo. Mientras que las células control muestran un progreso normal a lo largo de todo el ciclo (Figura 44A), las células tratadas con TG02 sufren un claro bloqueo en la fase G2/M (Figura 44B) indicando que TG02 podría estar inhibiendo a CDK1.

Junto con este resultado hemos de resaltar un dato muy interesante en relación al complejo CDK2/ciclina A implicado en el paso de fase S a G2. Dado que no observamos ningún efecto de parada en fase S, parece indicar que TG02 no inhibe de forma específica a CDK2 en este modelo celular.

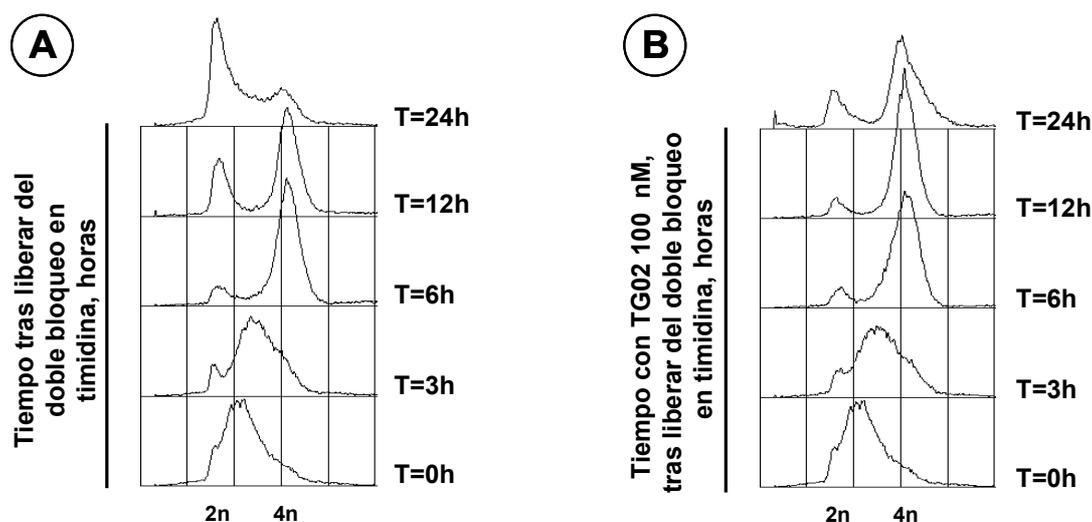


Figura 44. Representación del bloqueo inducido por TG02 en G2/M. Las células MDAMB231 fueron sincronizadas en G1/S mediante un doble bloqueo con timidina. Posteriormente fueron liberadas en presencia o ausencia de TG02 100 nM y se analizó el perfil del ciclo celular mediante FACS.

El siguiente paso fue averiguar bioquímicamente en cual de las dos fases se induce el bloqueo y demostrar la inhibición de CDK1. Para ello analizamos mediante Western blot diversas proteínas implicadas en ambas fases. TG02 induce claramente un arresto en G2 inhibiendo a CDK1, ya que las células tratadas muestran expresión de pCDK1^{Tyr15} y acúmulo de Wee1 a 12 y 24 horas (Figura 45B), lo que manifiesta la inactividad del complejo CDK1/ciclina B (Ver figura 43). Además, el marcador mitótico fosfo-histona H3 muestra una expresión mínima a 12 horas en comparación con las células control (Figura 45B y 45A).

Las células control en cambio, tras su liberación presentan un progreso normal en el ciclo desde la fase S a G2 (figura 45A) al tiempo de 6 horas, como queda demostrado por la mayor expresión de Wee1 y de pCDK1^{Tyr15}. Llegadas las 12 horas la mayoría de las células están en mitosis, y por ello observamos la pérdida de expresión de Wee1 y de pCDK1^{Tyr15} y el aumento de la fosforilación de la histona H3.

Otra manera de demostrar la inhibición de CDK1 es a través de la expresión de pRb, ya que su función es mantenerlo en un estado hiperfosforilado. Tanto pRb^{Ser780} como pRb^{Ser807/811} disminuyeron claramente su expresión a 6 horas, coincidiendo con la entrada de las células en fase G2, lo que demuestra una vez más la inhibición específica de TG02 sobre CDK1 (Figura 45B).

Como ya comentamos previamente, TG02 también es inhibidor específico de CDK7 y CDK9. Está descrito que CDK7/ciclina H y CDK9/ciclina T son reguladores transcripcionales que activan la elongación del ARN mediante la fosforilación del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II (Dai and Grant 2003). Además, CDK7/ciclina H (CAK) tienen un papel fundamental en el ciclo celular activando a las CDKs tras fosforilación en residuos de treoninas centrales (Thr¹⁶¹ de CDK1, Thr¹⁶⁰ de CDK2, Thr¹⁷² de CDK4 y Thr¹⁷⁷ de CDK6) (Dai and Grant 2003). De esta manera las células progresan en el ciclo inactivando a Rb tras fosforilación específica en residuos tales como la Ser⁷⁸⁰ o Ser^{807/811} (Brugarolas et al. 1999) (Ver figura 42).

Es posible que además del efecto observado sobre CDK1, TG02 inhiba también a CDK7 o CDK9, promoviendo aún más la parada del ciclo tras desregular la transcripción de genes fundamentales y adicionalmente en el caso de CDK7, inhibiendo a CAK. Un indicador indirecto de esta inhibición es la fosforilación de la ARN polimerasa II (pRpb1). El tratamiento con TG02 indujo una disminución de la expresión de pRpb1 a 6 y 12 horas en comparación con las células control (Figura 45B y 45A).

Por tanto, TG02 parece inducir una parada en fase G2 inhibiendo específicamente a CDK1, aunque también podrían verse afectadas CDK7 o CDK9 dada la disminución en la expresión de pRpb1. En cambio, debido a que CDK2, otra de las dianas específicas de TG02, no es inhibida puesto que las células tratadas con TG02 progresan de fase S a G2, y ya que la activación del complejo CDK2/ciclina B es dependiente del complejo CAK (Dai and Grant 2003), no parece que TG02 ejerza un efecto inhibitorio sobre CDK7 que favorezca la parada en fase G2.

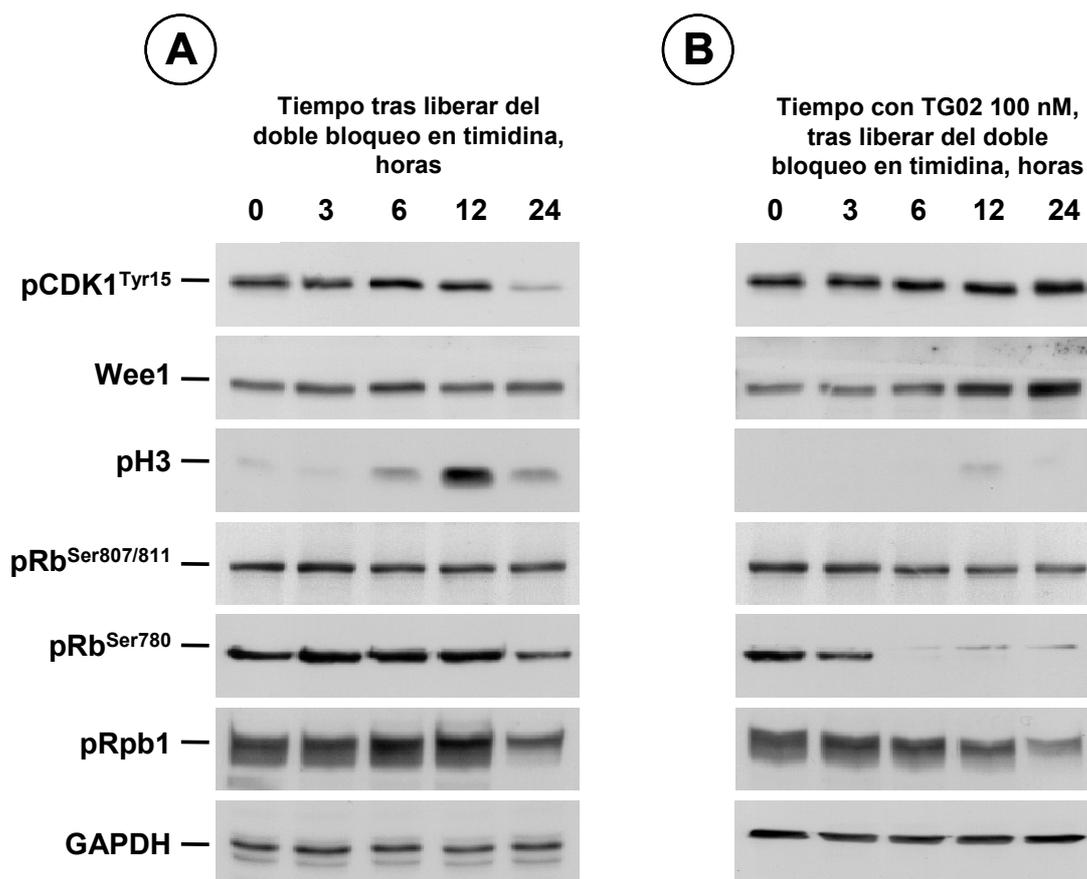


Figura 45. Análisis de expresión de proteínas implicadas en el mecanismo de parada en G2/M inducido por TG02. Las células MDAMB231 fueron sincronizadas en G1/S mediante un doble bloqueo con timidina. Posteriormente fueron liberadas en presencia o ausencia de TG02 100 nM y en los extractos celulares se analizó la expresión de pCDK1^{Tyr15}, Wee1, pH3, pRb^{Ser807/811}, pRb^{Ser780} y pRpb1 mediante Western blot con anticuerpos específicos. Como control de carga se utilizó la proteína citoplasmática GAPDH.

3.3.1.2 Efecto de TG02 en la transición de fases G1/S

Para demostrar el efecto de TG02 en la transición de fases G1/S planteamos sincronizar las células de manera similar al experimento anterior, en una fase previa a fase G1 donde no se observó parada, como son la fase G0 o M del ciclo. Dada la imposibilidad de mantener las células en fase G0, decidimos sincronizarlas en mitosis y liberarlas posteriormente en presencia del fármaco.

Nuestro principal objetivo fue el de clarificar el retraso observado en la fase G1 del ciclo (Figura 41). Como ya hemos comentado, las principales CDKs implicadas en esta fase son CDK4, CDK6 y CDK2, además de CDK7 formando parte del complejo CAK importante en la activación de las anteriormente citadas (Figura 42).

Se sincronizaron las células en mitosis durante 14 horas con nocodazol. Pasado este tiempo las células se lavaron con PBS para eliminar cualquier resto de nocodazol. Seguidamente se obtuvo exclusivamente por medio de un “shaking” de las placas, la población de células mitóticas, que fueron posteriormente plaqueadas en dos nuevas placas de Petri. Las células mitóticas control fueron plaqueadas en medio DMEM + 10% FBS, y las células mitóticas a tratar con nuestro fármaco, fueron plaqueadas en medio DMEM + 10% FBS suplementado con TG02 100 nM. Analizamos a lo largo del tiempo el ciclo celular en ambas condiciones mediante citometría de flujo. Como se muestra en la figura 46, mientras que las células control muestran un progreso normal del ciclo (Figura 46A), las células tratadas con TG02 quedan bloqueadas en la fase G1 (Figura 46B).

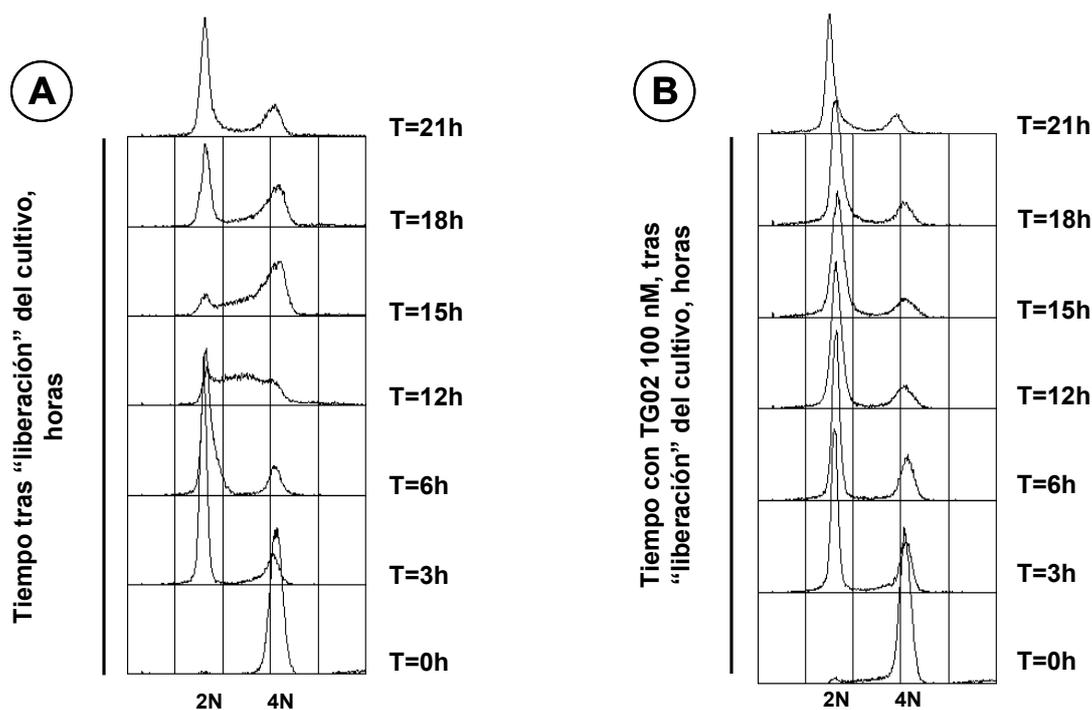


Figura 46. Representación del bloqueo inducido por TG02 en fase G1. Las células MDAMB231 fueron sincronizadas en mitosis mediante un bloqueo con nocodazol. Posteriormente fueron liberadas en presencia o ausencia de TG02 100 nM y se analizó el perfil del ciclo celular mediante FACS.

En primer lugar, corroboramos con un marcador mitótico como es la fosfo-histona H3, que tanto las células control como las tratadas con TG02 están paradas en mitosis tras el bloqueo con nocodazol (Figura 47A y 47B). Una vez liberadas, las células control mantienen una sincronía casi perfecta durante unas 12 horas, momento a partir del cual comienzan a perderla obteniendo una mezcla de poblaciones en distintas fases del ciclo (Figura 47A). En comparación, las células tratadas con TG02, aunque consiguen salir de mitosis sin problemas, hay que resaltar que lo hacen de una forma un poco más retardada como queda reflejado tras 3 horas de tratamiento, donde el porcentaje de células en fase M es mayor en comparación con las células control (Figura 46B y 46A).

Como hemos mencionado anteriormente, CDK7/ciclina H es el complejo encargado de activar a CDK4 tras fosforilarlo en la Thr¹⁷² y CDK6 en la Thr¹⁷⁷ (Dai and Grant 2003) (Ver figura 42). Como no disponemos de anticuerpos anti-fosfo específicos de estas treoninas, hemos demostrado de manera indirecta que CDK7 puede estar inhibida por TG02 al observar los niveles de expresión de pRpb1. El resultado muestra claramente la desfosforilación de pRpb1 desde las 6 horas de tratamiento con TG02 respecto al control (Figura 47B), indicando la posible inhibición de CDK7 y en consecuencia, que los complejos CDK4/CDK6/ciclina D continúen inactivos. Asimismo, este resultado también puede ser indicativo de inhibición sobre CDK9.

Una manera de demostrar que CDK4/CDK6/ciclina D están siendo inhibidos por TG02, ya sea directamente o indirectamente a través de la inhibición de CAK, es analizando la fosforilación de la proteína Rb en el residuo Ser⁷⁸⁰ (pRb^{Ser780}), que es específicamente fosforilada por estos complejos (Brugarolas et al. 1999). El resultado (Figura 47B) mostró una disminución progresiva de su fosforilación indicando una Rb activa y una consecuente parada del ciclo celular. Aún así, la liberación de HDAC y progresión del ciclo (ver figura 42) parece inducirse, aunque de forma tardía, respecto a las células control, como queda reflejado por el aumento de expresión de ciclina E (Figura 47B), indicando que la inhibición sobre estos complejos no es total.

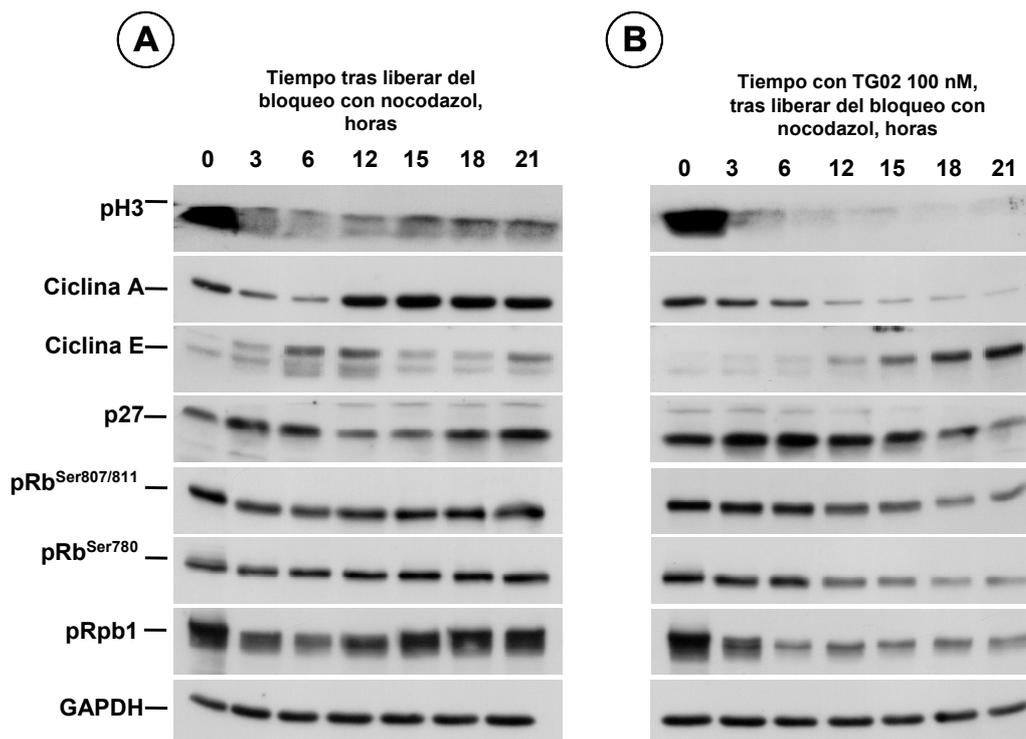


Figura 47. Análisis de expresión de proteínas implicadas en el mecanismo de parada en fase G1 inducido por TG02. Las células MDAMB231 fueron sincronizadas en mitosis mediante un bloqueo con nocodazol. Posteriormente fueron liberadas en ausencia (A) o presencia (B) de TG02 100 nM y en los extractos celulares se analizó la expresión de pH3, ciclina A, ciclina E, p27, pRb^{Ser807/811}, pRb^{Ser780} y pRpb1 mediante Western blot con anticuerpos específicos. Como control de carga se utilizó la proteína citoplasmática GAPDH.

Otro dato que merece atención, es la disminución de p27 observada cuando aumentan los niveles de ciclina E (Figura 47B). p27 es miembro de la familia de inhibidores Cip/Kip de CDKs, que mantienen específicamente secuestrada a CDK2 mientras no se induzca la expresión de ciclina E. Cuando esto ocurre, ciclina E se une y activa a CDK2 promoviendo la liberación de p27 (Figura 42). Tras su liberación, p27 es degradada por proteólisis (Lapenna et al. 2009), lo que explicaría la bajada de expresión observada (Figura 47B).

Si las células progresasen en el ciclo para entrar en la fase S, el complejo CDK2/ciclina E una vez activado por CDK7/ciclina H hiperfosforilaría a Rb en la Ser807/811 (Brugarolas et al. 1999) (Figura 45C), promoviendo la salida del factor de transcripción E2F, dando lugar a la expresión de otras proteínas implicadas en la fase S como la ciclina A, necesaria para activar nuevamente a CDK2 y progresar en el ciclo o ciclina B, necesaria para activar a CDK2 y progresar a fase G2. En nuestro caso, se aprecia una desfosforilación gradual en los residuos pRb^{Ser807/811} (Figura 47B), concordante con la parada en G1 y una bajada importante de expresión de ciclina A.

Basándonos en estos resultados parece que TG02 causa un retraso importante en la fase G1 como consecuencia de la inhibición de CDK6 o CDK4. Datos proporcionados por la farmacéutica Tragara revelaron que CDK4 presentó solo un 16% de inhibición a dosis superiores a 100 nM de TG02 en los ensayos de quinasa *in vitro*, si bien sobre CDK6 la IC₅₀ mostró un valor de 113 nM. Esto indicaría que a la dosis a la que trabajamos (100 nM) el efecto inhibitorio ocurriría principalmente sobre CDK6, pero sin descartar el posible efecto sobre CDK4. Adicionalmente, TG02 también podría inhibir a CDK7 y con ello a CAK, contribuyendo también a la inhibición de los complejos CDK4/CDK6/ciclina D que provocaría parada en G1. Además, conjuntamente con CDK7, TG02 podría inhibir a CDK9 como queda reflejado por la inhibición de pRpb1, afectando a la regulación transcripcional de proteínas clave en el ciclo celular.

En resumen parece que en este modelo celular TG02 tendría dos efectos principales sobre el ciclo celular: un retraso importante desde la fase G1 temprana por inhibición de CDK6 o CDK4 y bloqueo en la fase G2 tras inhibición de CDK1. Adicionalmente, también podría verse afectadas CDK7 y CDK9.

En base a todos estos resultados, hemos intentando explicar el resultado obtenido en la figura 41, que representa el efecto de TG02 sobre un cultivo asincrónico, en el cual tenemos una mezcla de poblaciones en distintas fases del ciclo.

La línea celular MDAMB231 se caracteriza por tener un ciclo con una fase G2/M muy corta, por ello la población de células en fase G1/S suele ser mayoritaria.

Dentro de la fase G1 tendremos células al inicio y al final de fase, de manera que el efecto de TG02 nunca provocará un bloqueo total sino mas bien observaremos un retraso, como queda reflejado en la figura 41, ya que todas las células que estén en la fase tardía de G1 pasarán el punto de control G1/S al no ejercer TG02 ningún efecto aparente sobre CDK2, mas que el provocado de manera indirecta por la inhibición de CAK. En cambio sí que observamos un claro bloqueo en fase G2/M, indicando la clara inhibición de CDK1, mientras que el punto de control en fase S lo pasan sin problemas, manifestando una vez más que CDK2 no está siendo inhibida. Como ya comentamos CDK7 junto con ciclina H es la encargada de activar a CDK4, CDK6, CDK2 y CDK1, de manera que si, como ya hemos demostrado, TG02 la inhibe específicamente, en un cultivo asincrónico deberían verse afectados todos los complejos por igual. En base a estos datos, creemos que la inhibición de CDK7 por tanto, no sería suficiente para explicar el bloqueo en fase G1 temprana, por lo que es muy probable que el retraso en

fase G1 sea consecuencia de la inhibición específica de CDK6 sin descartar un efecto sobre CDK4.

3.3.2 Efecto de TG02 en daño al ADN y apoptosis

Para analizar el efecto de TG02 sobre apoptosis, se trataron las células MDAMB231 con TG02 a las dosis de 100 nM y 1 μ M durante diferentes tiempos y se realizaron estudios mediante citometría de flujo marcando con Anexina V y IP. Además se analizó la expresión de proteínas implicadas en este proceso.

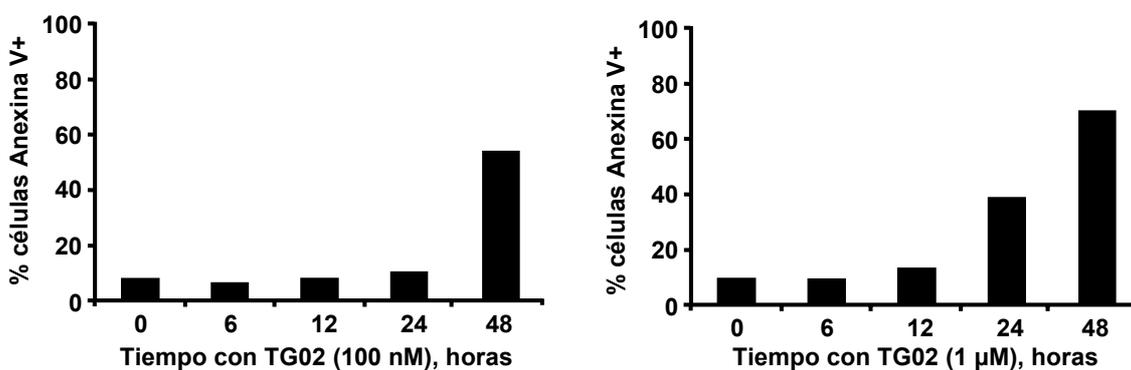


Figura 48. Representación del porcentaje de células Anexina V positivas tratadas con TG02. Células MDAMB231 fueron tratadas con TG02 100 nM y 1 μ M durante diferentes tiempos y marcadas con Anexina V-FITC y IP para su posterior análisis mediante FACS.

Tras 24 horas de tratamiento con TG02 no se observa marcaje con Anexina V a la dosis de 100 nM, mientras que a la dosis de 1 μ M la inducción de apoptosis fue del 40 %. Pasadas 48 horas, la apoptosis fue inducida por ambas dosis (Figura 48), indicando que este efecto es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al fármaco. Los estudios bioquímicos de Parp-1 y caspasas corroboraron estos resultados (Figura 49).

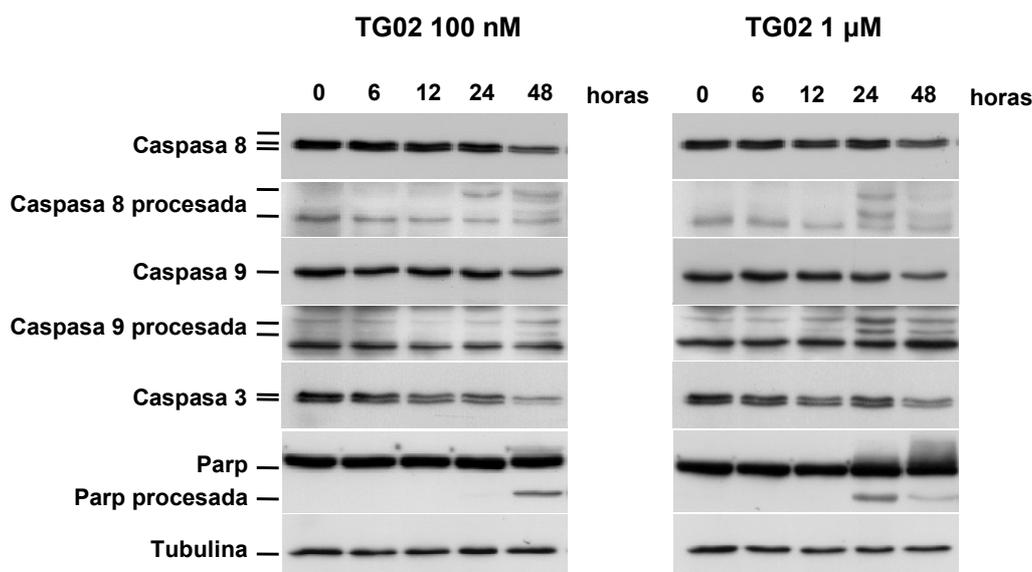


Figura 49. Expresión de proteínas implicadas en apoptosis, en células MDAMB231 tratadas con TG02 100 nM y 1 μM durante diferentes tiempos. La expresión de caspasa 8, caspasa 9, caspasa 3 y Parp-1 se analizó en extractos celulares mediante Western blot con anticuerpos específicos. La tubulina fue utilizada como control de carga.

Para evaluar la posibilidad de que la apoptosis inducida por TG02 fuese consecuencia de un efecto primario de daño en el ADN de las células, analizamos la expresión de proteínas implicadas en los procesos de daño y reparación de ADN. La generación de una rotura en el ADN induce la activación del complejo ATM/ATR (Ataxia telangiectasia mutated)/(Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) provocando la parada del ciclo celular tras activación por fosforilación de sus sustratos Checkpoint 1 (CHK1) y Checkpoint 2 (CHK2). Durante este tiempo la célula intenta reparar el daño ocasionado, activando proteínas de reparación de ADN tales como histona H2AX o Parp-1 (Bouchard et al. 2003; Harper et al. 2007).

La histona H2AX es uno de los sustratos activados por ATM/ATR implicados en reparación de ADN (Harper and Elledge 2007), mientras que Parp-1 (Poly [ADP-ribose] polymerase 1) a través de un proceso de poli-ADP-ribosilación, induce la modificación postraduccional de proteínas nucleares en respuesta a daño en el ADN, además de implicarse en otros procesos fundamentales como la reparación del ADN y la apoptosis (Bouchard et al. 2003; Huber et al. 2004).

Ambas dosis de TG02 inducen la activación de CHK1 y CHK2, además de la activación de H2AX (Figura 50) y procesamiento de Parp-1 (Figura 49).

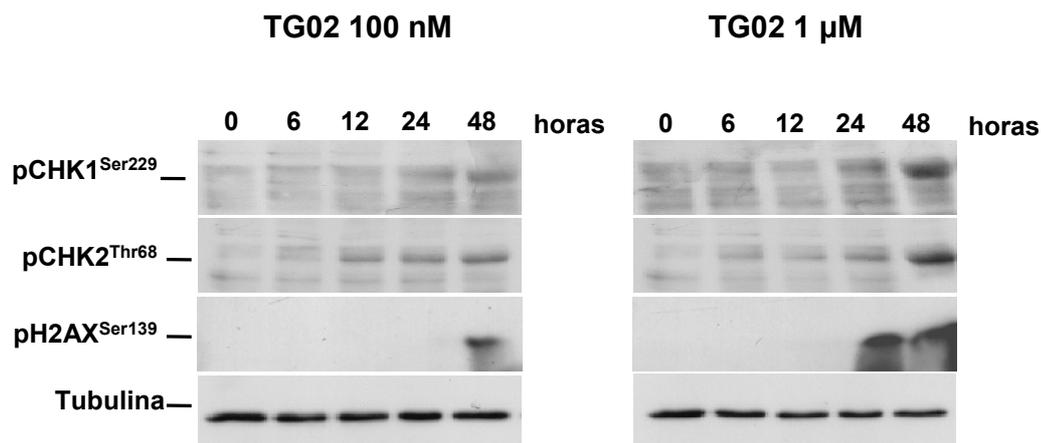


Figura 50. Expresión de proteínas implicadas en la reparación y daño al ADN en células MDAMB231 tratadas con TG02 100 nM y 1μM durante diferentes tiempos. La expresión de pCHK1^{Ser229}, pCHK2^{Thr68} y pH2AX^{Ser139} se analizó en extractos celulares mediante Western blot con anticuerpos fosfo-específicos. La tubulina fue utilizada como control de carga.

Por tanto, aunque el efecto principal que desencadena TG02 en la línea celular MDAMB231 es de parada de ciclo como consecuencia de la inhibición de varias CDKs, concomitantemente provoca un daño en su ADN induciendo a través de la vía de ATM/ATR la activación de CHK1 y CHK2, favoreciendo la parada del ciclo en los checkpoints 1 y 2, y promoviendo así la activación de proteínas de reparación como H2AX (Tanaka et al. 2009) y Parp-1 (Bouchard et al. 2003; Huber et al. 2004). La parada de ciclo junto con el daño al ADN, provocan en última instancia la muerte celular por apoptosis, como queda demostrado a través del FACS y del procesamiento de Parp-1 y caspasas.

3.3.3 Efecto de TG02 en la expresión génica

Para investigar en profundidad el mecanismo de acción de TG02, analizamos los cambios inducidos por este compuesto en el perfil de expresión génica del modelo celular MDAMB231.

Para ello, se realizó la extracción de ARNm de células MDAMB231 sin tratar y tratadas con TG02 100 nM durante 12 y 24 horas, en tres experimentos distintos. Previo al análisis de arrays, se comprobó mediante FACS el efecto de parada en el ciclo celular de todas las muestras tratadas (datos nos mostrados), para verificar la correcta funcionalidad del fármaco.

A continuación la Unidad de Genómica de nuestro centro llevó a cabo el análisis de microarrays utilizando el modelo de array HuGene-1_0-st-v1.r4 (Affymetrix) que

cubre 33252 genes. El análisis de los resultados se expone en el apartado de Material y Métodos.

El tratamiento con TG02 en la línea celular MDAMB231 indujo principalmente la desregulación de genes implicados en los procesos biológicos de ciclo celular y replicación, recombinación y reparación de ADN (Tablas XV y XVI).

Tabla XV. Genes implicados en la categoría funcional de “Ciclo celular”, desregulados en células MDAMB231 tratadas con TG02 100 nM durante 12 y 24 horas

| <i>Gen</i> | <i>Símbolo</i> | <i>Fold Change</i> |
|--|----------------|--------------------|
| AHR: aryl hydrocarbon receptor | AHR | -3.11 |
| ANLN: anillin, actin binding protein | ANLN | -2.32 |
| BUB1: BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast) | BUB1 | -2.13 |
| CCNA2: cyclin A2 | CCNA2 | -2.43 |
| CCNB2: cyclin B2 | CCNB2 | -2.17 |
| CDC27: cell division cycle 27 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) | CDC27 | -2.36 |
| CDT1: chromatin licensing and DNA replication factor 1 | CDT1 | 2.71 |
| CP110: CP110 protein | CP110 | -2.52 |
| DNM1L: dynamin 1-like | DNM1L | -3.34 |
| EGFR: epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, FAM175A: family with sequence similarity 175, member A | EGFR | -2.47 |
| | FAM175A | -2.37 |
| FOXP3: forkhead box N3 | FOXP3 | -2.69 |
| ITSN1: intersectin 1 (SH3 domain protein) | ITSN1 | -2.11 |
| KIF11: kinesin family member 11 | KIF11 | -3.47 |
| KNTC1: kinetochore associated 1 | KNTC1 | -2.19 |
| MDM2: Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse) | MDM2 | -3.23 |
| MRE11A: MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>) | MRE11A | -2.22 |
| NAE1: NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1 | NAE1 | -2.34 |
| NAMPT: nicotinamide phosphoribosyltransferase | NAMPT | -2.52 |
| NBN: nibrin | NBN | -3.45 |
| NDC80: NDC80 homolog, kinetochore complex component (<i>S. cerevisiae</i>) | NDC80 | -2.15 |
| NEK2: NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2 | NEK2 | -3.08 |
| OPA1: optic atrophy 1 (autosomal dominant) | OPA1 | -2.83 |
| PBRM1: polybromo 1 | PBRM1 | -2.31 |
| PCM1: pericentriolar material 1 | PCM1 | -2.31 |
| POT1: POT1 protection of telomeres 1 homolog (<i>S. pombe</i>) | POT1 | -2.49 |
| PPP2R3A: protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B', alpha | PPP2R3A | -3.16 |
| RAD21: RAD21 homolog (<i>S. pombe</i>) | RAD21 | -2.03 |
| RAD50: RAD50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) | RAD50 | -2.59 |
| RB1: retinoblastoma 1 | RB1 | -2.36 |
| RBBP8: retinoblastoma binding protein 8 | RBBP8 | -2.23 |
| RRM2B: ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible) | RRM2B | -3.15 |
| SMARCA1: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin | SMARCA1 | -2.16 |
| SMARCA5: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin | SMARCA5 | -2.63 |
| SMC3: structural maintenance of chromosomes 3 | SMC3 | -2.86 |
| SRPK1: SFRS protein kinase 1 | SRPK1 | -2.24 |
| TOP2A: topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa | TOP2A | -2.74 |
| TOPBP1: topoisomerase (DNA) II binding protein 1 | TOPBP1 | -2.58 |
| TPR: translocated promoter region (to activated MET oncogene) | TPR | -2.61 |
| TUSC2: tumor suppressor candidate 2 | TUSC2 | 2.08 |
| TXNIP: thioredoxin interacting protein | TXNIP | 2.71 |
| UIMC1: ubiquitin interaction motif containing 1 | UIMC1 | 2.41 |
| WRN: Werner syndrome | WRN | -2.16 |

Tabla XVI. Genes implicados en la categoría funcional de “Replicación, recombinación y reparación de ADN”, desregulados en células MDAMB231 tratadas con TG02 100 nM durante 12 y 24 horas

| Gen | Símbolo | Fold Change |
|--|----------------|-------------|
| <i>BUB1: BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)</i> | <i>BUB1</i> | -2.13 |
| <i>BRCC3: BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3</i> | <i>BRCC3</i> | -2.12 |
| <i>CCNA2: cyclin A2</i> | <i>CCNA2</i> | -2.43 |
| <i>CCNB2: cyclin B2</i> | <i>CCNB2</i> | -2.17 |
| <i>CDT1: chromatin licensing and DNA replication factor 1</i> | <i>CDT1</i> | 2.71 |
| <i>DHX36: DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36</i> | <i>DHX36</i> | -2.92 |
| <i>DNA2: DNA replication helicase 2 homolog (yeast)</i> | <i>DNA2</i> | -2.23 |
| <i>FAM175A: family with sequence similarity 175, member A</i> | <i>FAM175A</i> | -2.37 |
| <i>FOXN3: forkhead box N3</i> | <i>FOXN3</i> | -2.69 |
| <i>KNTC1: kinetochore associated 1</i> | <i>KNTC1</i> | -2.19 |
| <i>MRE11A: MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)</i> | <i>MRE11A</i> | -2.22 |
| <i>NAE1: NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1</i> | <i>NAE1</i> | -2.34 |
| <i>NAMPT: nicotinamide phosphoribosyltransferase</i> | <i>NAMPT</i> | -2.52 |
| <i>NBN: nibrin</i> | <i>NBN</i> | -3.45 |
| <i>NDC80: NDC80 homolog, kinetochore complex component (S. cerevisiae)</i> | <i>NDC80</i> | -2.15 |
| <i>PBRM1: polybromo 1</i> | <i>PBRM1</i> | -2.31 |
| <i>PCM1: pericentriolar material 1</i> | <i>PCM1</i> | -2.31 |
| <i>PDGFC: platelet derived growth factor C</i> | <i>PDGFC</i> | -3.18 |
| <i>RAD21: RAD21 homolog (S. pombe)</i> | <i>RAD21</i> | -2.03 |
| <i>RAD50: RAD50 homolog (S. cerevisiae)</i> | <i>RAD50</i> | -2.59 |
| <i>RB1: retinoblastoma 1</i> | <i>RB1</i> | -2.36 |
| <i>RBMS1: RNA binding motif, single stranded interacting protein 1</i> | <i>RBMS1</i> | -2.04 |
| <i>RBBP8: retinoblastoma binding protein 8</i> | <i>RBBP8</i> | -2.23 |
| <i>SMARCA1: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin</i> | <i>SMARCA1</i> | -2.16 |
| <i>SMARCA5: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin</i> | <i>SMARCA5</i> | -2.63 |
| <i>SMC4: structural maintenance of chromosomes 4</i> | <i>SMC4</i> | -2.68 |
| <i>SRPK1: SFRS protein kinase 1</i> | <i>SRPK1</i> | -2.24 |
| <i>TMPO: thymopoietin</i> | <i>TMPO</i> | -1.99 |
| <i>TOP2A: topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa</i> | <i>TOP2A</i> | -2.74 |
| <i>TOP2B: topoisomerase (DNA) II beta 180kDa</i> | <i>TOP2B</i> | -2.73 |

Dentro de la categoría de replicación, recombinación y reparación de ADN, encontramos un importante número de genes implicados en reparación de roturas de doble cadena (DSB) tales como *BRCC3*, *FAM175A*, *MRE11A*, *NBN*, *RAD21*, *RAD50*, *RBBP8* y *UIMC1*. Este tipo de lesiones ocasionan aberraciones cromosómicas, mutaciones y transformación celular, e incluso la muerte celular si no se reparan correctamente (Iliakis 1991). Además, también obtuvimos un importante número de genes down-regulados implicados en muerte celular, de los cuales podemos resaltar *GLRX*, *XIAP*, *APAF1*, *TCF4*, *ITSN1* y *EGFR*, por su implicación en procesos apoptóticos. Por tanto, parece que el daño ocasionado por TG02 en el ADN podría ser del tipo DSB, y que ante la imposibilidad de reparación por parte de la célula, estimularía finalmente un proceso apoptótico.

3.4 Análisis del efecto de TG02 en la línea celular HCC1187

3.4.1 Efecto de TG02 sobre apoptosis

El tratamiento con TG02 100 nM y 1 μ M a 24 horas en la línea celular HCC1187 tuvo un claro efecto de apoptosis dependiente de la dosis, como ya demostramos previamente en la figura 40. Para caracterizar este efecto las células HCC1187 se trataron con TG02 1 μ M a distintos tiempos realizando paralelamente estudios de citometría de flujo marcando con Anexina V y IP y análisis de proteínas. Como se observa en la figura 51, la estimulación de apoptosis tiene lugar a partir de las 6 horas de tratamiento con el fármaco.

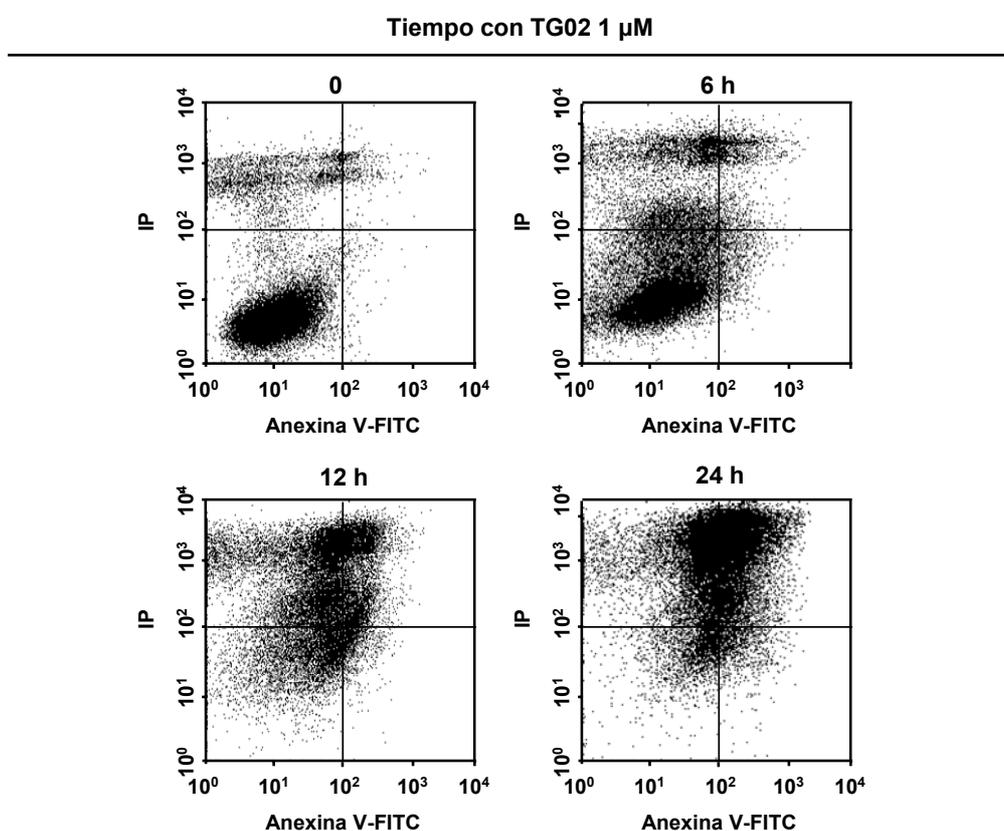


Figura 51. Representación de la inducción de apoptosis provocada por TG02 a distintos tiempos de tratamiento. Células HCC1187 fueron tratadas con TG02 1 μ M durante diferentes tiempos y posteriormente marcadas con Anexina V-FITC y IP para su posterior análisis mediante FACS.

Como la mitocondria es un orgánulo directamente implicado en la inducción de apoptosis (Danial et al. 2004), investigamos si TG02 alteró el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). El análisis mediante citometría de flujo marcando con el fluorocromo TMRE (Trimetilrodamina, etil ester), reveló una disminución progresiva del $\Delta\Psi_m$ desde las 6 horas de tratamiento con TG02 1 μM (figura 52).

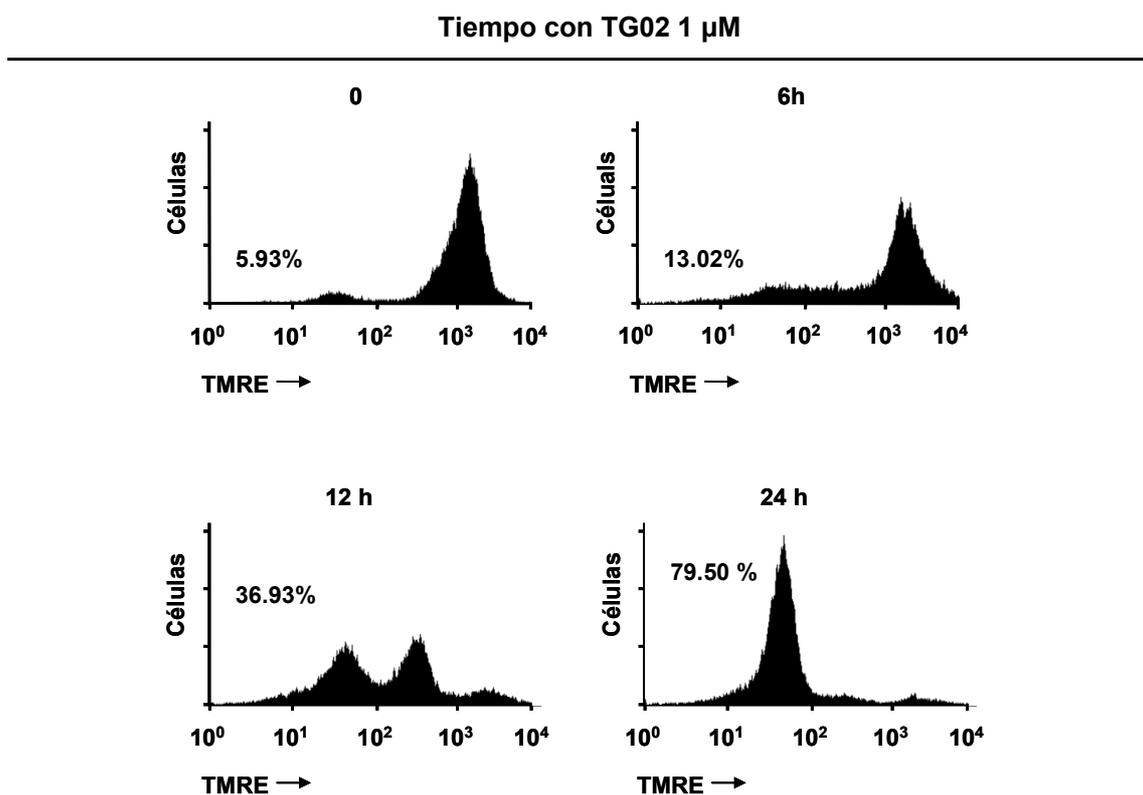


Figura 52. Representación de la pérdida de potencial de membrana provocada por TG02. Células HCC1187 fueron tratadas con TG02 1 μM durante diferentes tiempos y posteriormente marcadas con TMRE para su posterior análisis mediante FACS.

Otro rasgo distintivo de la apoptosis es la condensación y posterior fragmentación internucleosomal del ADN, que como principal efecto originará la incapacidad celular para la replicación (Vaux et al. 1994). Comprobamos el efecto de TG02 1 μ M sobre el ADN a 12 y 24 horas, y observamos un efecto claro de fragmentación desde las 12 horas de tratamiento (Figuras 53).

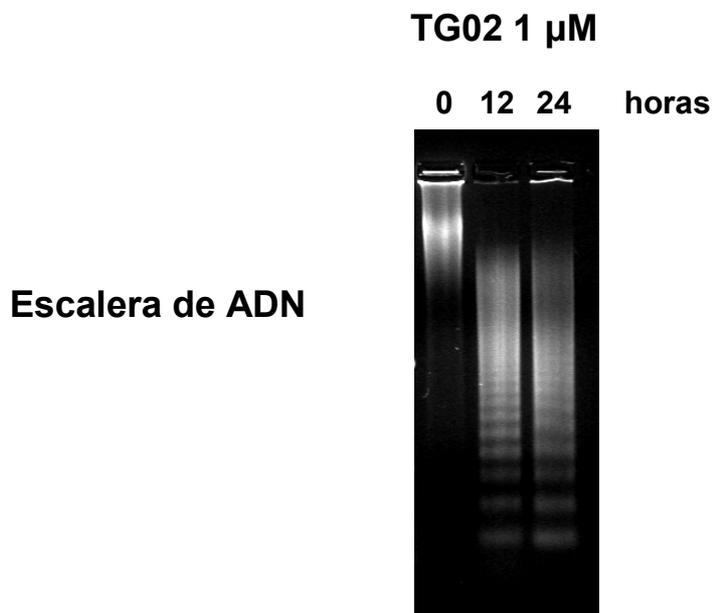


Figura 53. Representación de la fragmentación del ADN ocasionada tras el tratamiento con TG02. Se aisló ADN de células HCC1187 tratadas con TG02 1 μ M durante 12 y 24 horas y su fragmentación fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.4.2 TG02 induce apoptosis de manera dependiente e independiente de caspasas

El evento bioquímico más importante responsable de la mayoría de las alteraciones anteriormente mencionadas es la rotura específica de infinidad de proteínas celulares llevada a cabo por una familia de cisteína-proteasas denominadas caspasas, encargadas del desmantelamiento celular (Siegel 2006).

Evaluamos si las caspasas estaban implicadas en la muerte celular inducida por TG02. El tratamiento con TG02 1 μ M provocó el procesamiento de Parp-1 desde las 6 horas de tratamiento, así como la fragmentación de la caspasa 8 y de la caspasa 7, mientras que la caspasa 9 y caspasa 3 se procesaron a partir de las 12 horas (Figura 54).

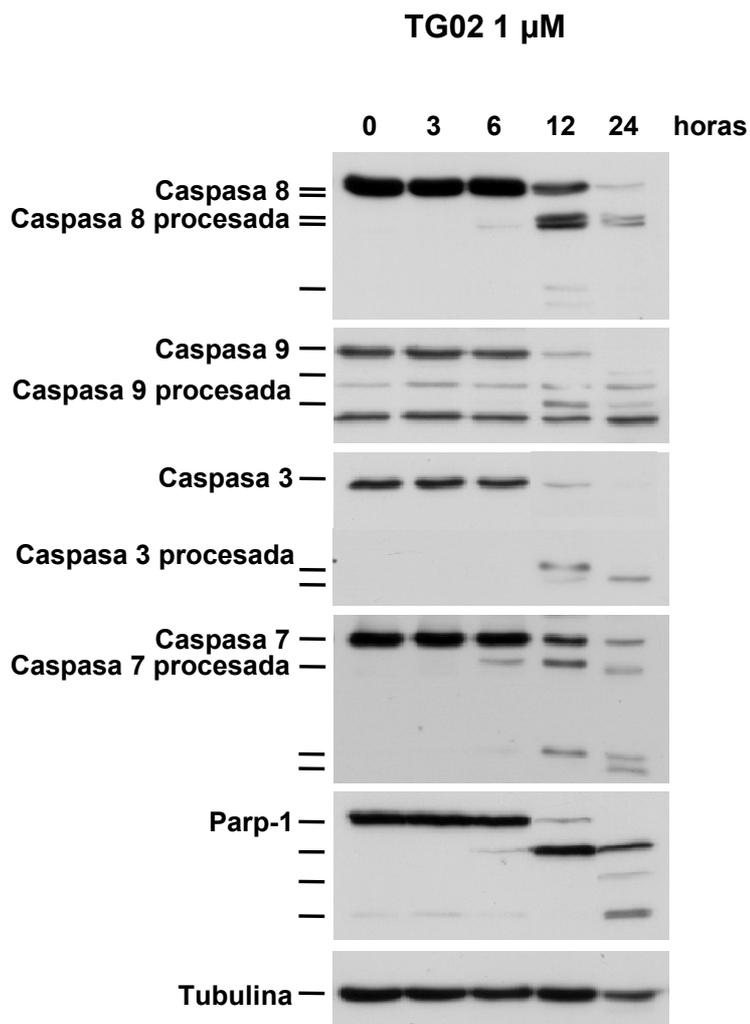


Figura 54. Expresión de proteínas implicadas en apoptosis, en células HCC1187 tratadas con TG02 1 μ M durante diferentes tiempos. La expresión de caspasa 8, caspasa 9, caspasa 3, caspasa 7 y Parp-1 se analizó en extractos celulares mediante Western blot con anticuerpos específicos. La tubulina fue utilizada como control de carga.

La implicación de las caspasas en el proceso de muerte inducido por TG02, fue corroborado utilizando el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK. Este inhibidor se une de manera irreversible al dominio catalítico de las proteínas caspasas inhibiendo la inducción de apoptosis.

Previo al tratamiento con TG02, se preincubaron las células durante 60 minutos con el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK a la dosis de 50 μ M, y a continuación se añadió TG02 1 μ M. El análisis mediante FACS se realizó a las 6, 12 y 24 horas de tratamiento con TG02. Como se muestra en la figura 55, Z-VAD-FMK inhibió parcialmente la muerte inducida por TG02, indicando que parte del proceso de muerte celular observado es dependiente de caspasas.

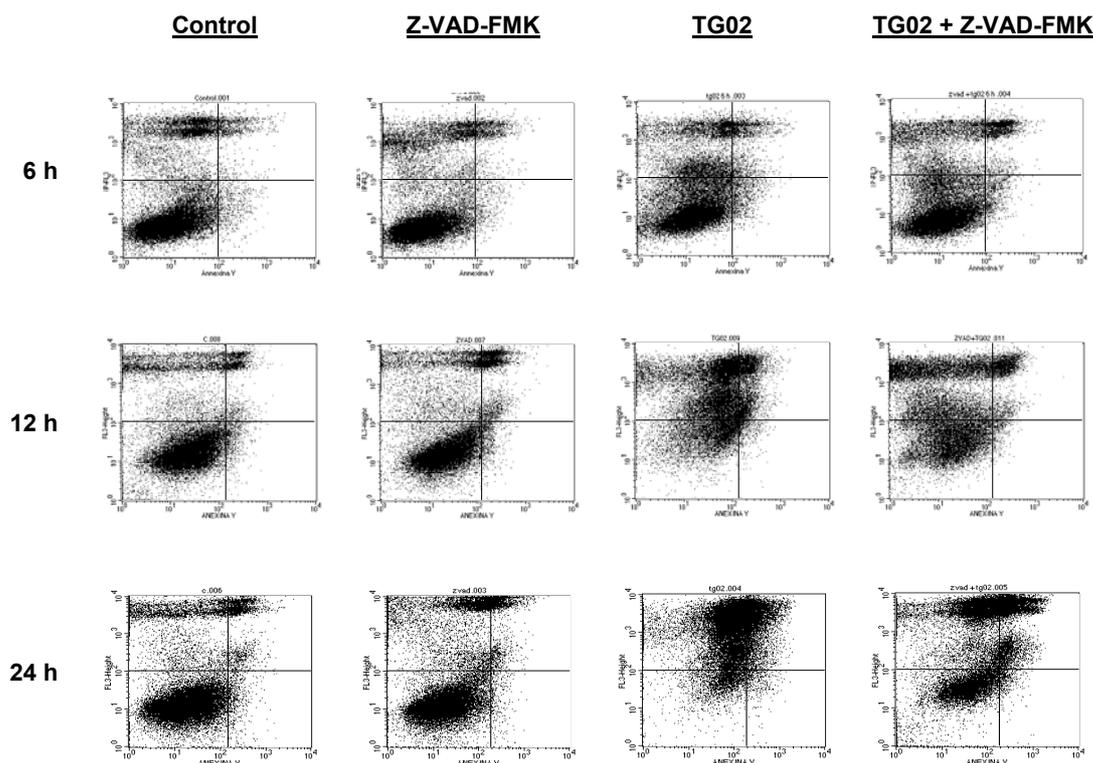


Figura 55. Efecto inhibitorio de Z-VAD-FMK sobre la apoptosis dependiente de caspasas originada por TG02, representado mediante FACS. Células HCC1187 fueron pretratadas con el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK (25 μ M) durante 60 minutos. Posteriormente se añadió TG02 1 μ M y el experimento continuó durante 6, 12 y 24 horas. La inducción de apoptosis se analizó mediante FACS.

La pérdida de potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y el procesamiento de la caspasa 9 observados previamente en las figuras 52 y 54 respectivamente, indican que parte del proceso de apoptosis inducido por TG02 es a través de la vía intrínseca mitocondrial (Green et al. 1998; van Loo et al. 2002). Este mecanismo parece estar mediado por proteínas reguladoras de la apoptosis pertenecientes a la familia Bcl-2 que actúan directamente en la membrana mitocondrial externa. Miembros anti-apoptóticos de esta familia bloquearían la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (PMME), mientras que miembros pro-apoptóticos la promoverían.

Como se observa en la figura 55, tras el tratamiento con TG02 los miembros anti-apoptóticos tales como Bcl2, Bcl_x y Mcl1 disminuyen sus niveles de expresión a 12 horas de tratamiento. Por otro lado, otros miembros pro-apoptóticos como Bid, son activados por proteólisis dando lugar a los fragmentos de 15 y 7 KDa (Bid₁₅) (Figura 54) que una vez liberados se traslocarían a la membrana mitocondrial provocando la permeabilización de la misma y la liberación de factores apoptogénicos como citocromo

C y SMAC/DIABLO (van Gurp et al. 2003). Este corte puede ser provocado por diferentes proteasas como la caspasa 8 (Luo et al. 1998), la caspasa 3 (Woo et al. 1999), proteasas lisosomales (Stoka et al. 2001) y por granzima B (Heibein et al. 2000).

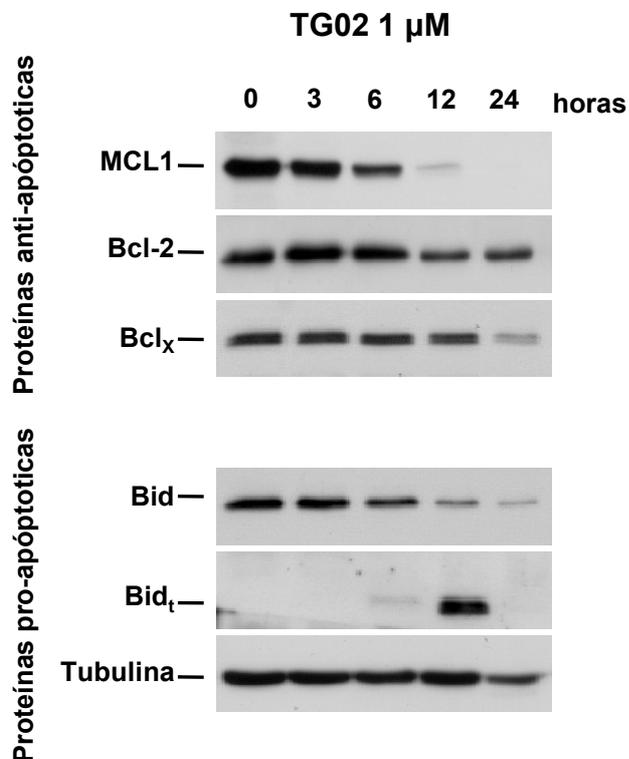


Figura 55. Expresión de proteínas anti-apoptóticas y pro-apóptóticas tras el tratamiento con TG02. Células HCC1187 fueron tratadas con TG02 1μM durante diferentes tiempos. La expresión de proteínas anti- y pro-apoptóticas se analizó en extractos celulares mediante Western blot con anticuerpos específicos. La tubulina fue utilizada como control de carga.

La pérdida de $\Delta\Psi_m$ junto con determinadas proteínas como Bid provocan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, facilitando la liberación de proteínas que desencadenan la muerte celular (Danial and Korsmeyer 2004). Entre las proteínas que son liberadas se encuentra el citocromo C que junto con la proteína citoplasmática Apaf-1 y la pro-caspasa 9, forman el apoptosoma (Danial and Korsmeyer 2004), un complejo macromolecular que causa la activación de la caspasa 3 efectora (Danial and Korsmeyer 2004). Además también se liberan SMAC/DIABLO, un inhibidor de las IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins) (Du et al. 2000; Verhagen et al. 2000), junto con AIF y EndoG, proteínas implicadas en procesos apoptóticos independientes de caspasas que inducen la fragmentación del ADN (Susin et al. 1999; Li et al. 2001).

Para comprobar si TG02 induce la liberación mitocondrial de todas esas proteínas, llevamos a cabo el fraccionamiento subcelular de HCC1187 tratadas con TG02 1 μ M durante los tiempos de 12 y 24 horas, tiempos a los que ya hemos demostrado que existe variación en el potencial de membrana mitocondrial, procesamiento de caspasa 9, proteólisis de Bid y una fragmentación del ADN. Como controles del fraccionamiento subcelular hemos utilizado la proteína mitocondrial Cox IV y la proteína citoplasmática Erk1/2.

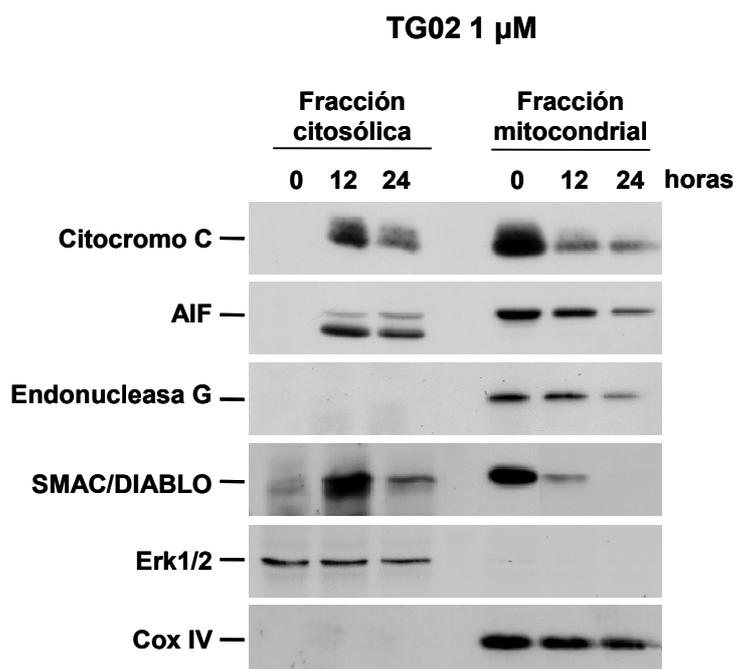


Figura 57. Fraccionamiento subcelular de células HCC1187 tratadas con TG02 1 μ M durante diferentes tiempos. La liberación al citoplasma de proteínas mitocondriales implicadas en apoptosis se analizó mediante Western blot con anticuerpos específicos. Erk1/2 y CoxIV fueron utilizados como marcadores de la fracción citoplasmática y mitocondrial respectivamente.

Como se observa en la figura 57, los niveles de expresión de citocromo C en la mitocondria disminuyen tras el tratamiento, observándose un acúmulo en el citoplasma que explicaría el procesamiento de caspasa 9 observado previamente (Figura 52). Por otro lado, también existe una disminución de la expresión de SMAC/DIABLO tras el tratamiento con TG02 y aumento de su expresión en el citoplasma. Una manera de comprobar que SMAC/DIABLO una vez liberado al citoplasma está ejerciendo su acción inhibitoria sobre las IAPs, es comprobando la expresión de estas proteínas tras el tratamiento con TG02. Como se observa en la figura 58 a partir de 12 horas

coincidiendo con la salida de SMAC/DIABLO de la mitocondria hay una disminución de la expresión de XIAP, c-IAP1 y c-IAP2.

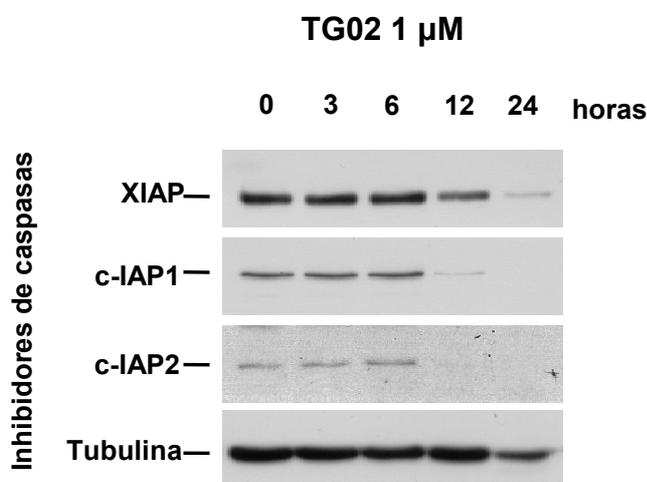


Figura 58. Los niveles de expresión de proteínas inhibidoras de caspasas (IAPs) en células HCC1187 tras tratamiento con TG02 1 μM durante diferentes tiempos, fueron analizados mediante Western blot con anticuerpos específicos. La tubulina fue utilizada como control de carga.

AIF y EndoG también disminuyen su expresión tras el tratamiento con TG02 (Figura 57), sin embargo ninguno de los efectos inducidos por estas proteínas como la fragmentación del ADN o la pérdida de potencial de membrana mitocondrial son dependientes de caspasas (Susin et al. 1999; Susin et al. 2000; Joza et al. 2001; Li et al. 2001). Esto demuestra como TG02 induce paralelamente un proceso de muerte celular independiente de caspasas, que explicaría por qué el inhibidor Z-VAD-FMK sólo reduce parcialmente el proceso de muerte celular.

3.4.3 Efecto de TG02 en la regulación de la transcripción génica

Ya que no observamos ningún efecto aparente sobre el ciclo celular, analizamos si TG02 tendría algún efecto en las CDKs implicadas en la transcripción génica (CDK7 y CDK9).

Como se observa en la figura 59, ya desde las 6 horas de tratamiento se consigue una inhibición parcial de la fosforilación de la ARN polimerasa II (pRpbI). Además, también se observa una disminución de la expresión tanto de CDK7 como CDK9 desde 3-6 horas de tratamiento. Por tanto, TG02 claramente tras la inhibición de ambas CDKs induce la inactivación de la ARN pol II y en consecuencia la transcripción de genes.

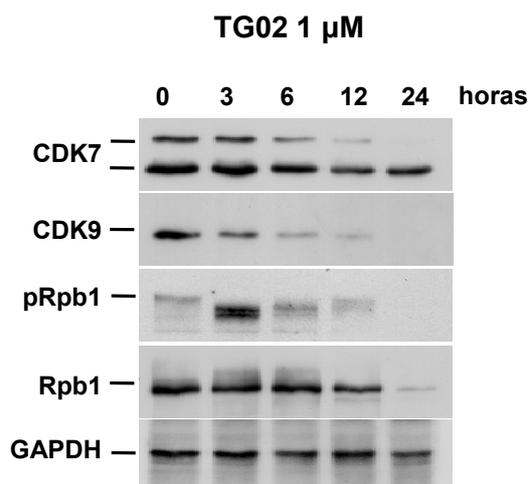


Figura 59. Expresión de proteínas implicadas en la regulación de la transcripción génica. Células HCC1187 fueron tratadas con TG02 1 μ M durante diferentes tiempos y la expresión de CDK7 y CDK9 y activación de su sustrato Rpb1 (RNA pol II) fue analizada mediante Western blot con anticuerpos específicos. Como control de carga se utilizó la proteína citoplasmática GAPDH.

3.4.4 Efecto de TG02 sobre el daño y reparación al ADN

Para evaluar la posibilidad de que la apoptosis inducida por TG02 en esta línea celular fuese consecuencia de un efecto primario de daño en el ADN de las células, analizamos la expresión de proteínas implicadas en los procesos de daño y reparación de ADN, de manera similar a la línea MDAMB231.

El tratamiento de la línea celular HCC1187 con TG02 1 μ M durante diferentes tiempos indujo la fosforilación de la histona H2AX, de CHK1 y CHK2 desde las 6 horas de tratamiento (Figura 60).

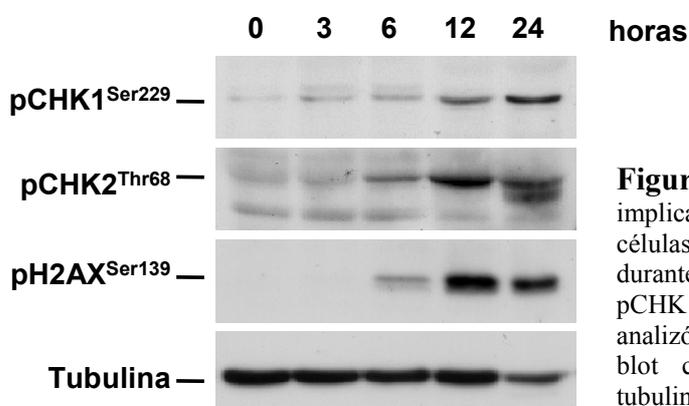


Figura 60. Expresión de proteínas implicadas en la reparación y daño al ADN en células HCC1187 tratadas con TG02 1 μ M durante diferentes tiempos. La expresión de pCHK1^{Ser229}, pCHK2^{Thr68} y pH2AX^{Ser139} se analizó en extractos celulares mediante Western blot con anticuerpos fosfo-específicos. La tubulina fue utilizada como control de carga.

En base a todos los datos obtenidos podemos concluir, que en esta línea celular TG02 induce un fuerte daño en su ADN, activando la vía de señalización de ATM/ATR, como queda demostrado por la fosforilación de varios de sus sustratos como CHK1, CHK2 o de H2AX (Harper and Elledge 2007). ATM tras su activación impide la progresión en el ciclo de las células dañadas, lo que genera tiempo para que la lesión pueda ser reparada, activando vías de reparación que implican la activación de histona H2AX o el procesamiento de Parp-1. Pero si el daño ocasionado en el ADN no ha sido reparado o está mal reparado, se desencadena la muerte celular o apoptosis, como hemos demostrado con los estudios de citometría de flujo marcando con Anexina V y IP. El proceso de apoptosis dependiente de caspasas, se manifestó cuando observamos el procesamiento de caspasa 8, caspasa 7, caspasa 9 y caspasa 3, además de la inhibición parcial de la apoptosis cuando utilizamos el inhibidor de caspasas de amplio espectro, Z-VAD-FMK. La liberación al citoplasma de proteínas mitocondriales como citocromo C y SMAC/DIABLO, implicadas en apoptosis dependiente de caspasas, y AIF y EndoG, implicadas en apoptosis independiente de caspasas, demostraron que el proceso de apoptosis desencadenado por TG02 implicó también a la ruta intrínseca mitocondrial. Además, la liberación de AIF y EndoG demostró por qué el inhibidor Z-VAD-FMK evitó sólo parcialmente el proceso de muerte, manifestando claramente que la apoptosis provocada por TG02 es tanto dependiente como independiente de caspasas.

3.5 Combinación farmacológica de TG02 con quimioterapia adyuvante

El tratamiento de la mayoría de los cánceres, incluyendo el cáncer de mama, se basa en la combinación de fármacos con diferentes mecanismos de acción. Nosotros estudiamos el efecto de TG02 en combinación con fármacos que actualmente se utilizan como quimioterapia adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo tales como Taxotere, Vinorelbina, Doxorrubicina y Cisplatino, en dos líneas representativas con alta tasa de proliferación como son MDAMB231 y HBL100.

Para ello tratamos las células con las diferentes combinaciones de fármacos durante 48 horas, a diferentes dosis de TG02 y Taxotere, Vinorelbina, Doxorrubicina y Cisplatino, respectivamente. La interacción entre TG02 y las diferentes drogas fue analizada con el programa CalcuSyn, basado en el método de Chou y Talalay (Chou et

al. 1984), para establecer el índice de combinación (IC) que determina si el efecto es sinérgico, aditivo o antagonista. Se mantuvo una relación constante entre las distintas dosis de los fármacos que se combinaron.

Tabla XVII. Índices de combinación obtenidos al combinar TG02 con quimioterapia en células MDAMB231

| 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | TG02 (nM) |
|------|------|------|------|------|-----------|
| 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 | DOX (nM) |
| 1.68 | 0.86 | 0.69 | 0.92 | 1.40 | IC |

| 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | TG02 (nM) |
|------|------|------|------|------|-----------|
| 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | TXT (nM) |
| 0.37 | 0.42 | 0.39 | 0.51 | 0.86 | IC |

| 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | TG02 (nM) |
|------|------|------|------|------|-----------|
| 1.5 | 3 | 6 | 12 | 24 | VIN (nM) |
| 1.84 | 0.81 | 0.95 | 1.68 | 2.89 | IC |

| 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | TG02 (nM) |
|------|------|------|-----|------|-----------|
| 3.75 | 7.5 | 15 | 30 | 60 | Cis (µM) |
| 0.88 | 0.88 | 0.63 | 1.3 | 2.17 | IC |

| IC (índice de combinación) | |
|-----------------------------------|--|
| Sinergismo fuerte (0.1-0.3) | |
| Sinergismo (0.3-0.7) | |
| Sinergismo moderado (0.7-0.9) | |
| Aditivo (0.9-1.1) | |
| Antagonismo (1.1-1.45) | |
| Antagonismo moderado (1.45-3.3) | |
| Antagonismo fuerte (≥ 3.3) | |

La combinación de TG02 con Doxorrubicina en la línea celular MDAMB231 mostró un sinergismo moderado a las dosis de 40 nM TG02/200 nM DOX y 80 nM TG02/400 nM DOX, mientras que el resto de combinaciones fueron aditivas o antagonicas. La combinación con Taxotere fue sinérgica en todas las combinaciones exceptuando la combinación 320 nM TG02/16 nM TXT que fue moderadamente sinérgica. La combinación con Vinorelbina no fue muy eficaz, ya que la mayoría de los ICs mostraron un efecto antagónico. Finalmente, la combinación con Cisplatino mostró sinergismo moderado a las dosis más bajas de combinación (Tabla XVII).

Tabla XVIII. Índices de combinación obtenidos al combinar TG02 con quimioterapia en células HBL100

| 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | TG02 (nM) |
|------|------|------|------|------|-----------|
| 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 | DOX (nM) |
| 1.78 | 0.42 | 0.42 | 0.82 | 0.88 | IC |

| 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | TG02 (nM) |
|------|------|------|------|------|-----------|
| 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | TXT (nM) |
| 2.03 | 0.98 | 1.08 | 1.36 | 1.57 | IC |

| 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | TG02 (nM) |
|------|------|------|------|------|-----------|
| 1.5 | 3 | 6 | 12 | 24 | VIN (nM) |
| 1.37 | 0.72 | 1.34 | 1.08 | 2.16 | IC |

| 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | TG02 (nM) |
|------|------|------|------|------|-----------|
| 3.75 | 7.5 | 15 | 30 | 60 | Cis (µM) |
| 0.77 | 0.74 | 0.83 | 1.36 | 1.96 | IC |

| IC (índice de combinación) | |
|---------------------------------|--|
| Sinergismo fuerte (0.1-0.3) | |
| Sinergismo (0.3-0.7) | |
| Sinergismo moderado (0.7-0.9) | |
| Aditivo (0.9-1.1) | |
| Antagonismo (1.1-1.45) | |
| Antagonismo moderado (1.45-3.3) | |
| Antagonismo fuerte (≥3.3) | |

La combinación de TG02 con Doxorrubicina en la línea celular HBL100 mostró un sinergismo moderado en las combinaciones con dosis más elevadas de ambos fármacos, sinergismo en las combinaciones de 40 nM TG02/200 nM DOX y 80 nM TG02/400 nM DOX y un efecto antagónico en la combinación de dosis más bajas. La combinación con Taxotere o Vinorelbina en la mayoría de los casos fue aditiva o antagónica. Finalmente, la combinación con Cisplatino mostró sinergismo moderado a las dosis más bajas, al igual que en la línea MDAMB231 (Tabla XVIII).

Por tanto, parece que la mejor combinación en la línea celular MDAMB231 es la de TG02 con Taxotere en la mayoría de las dosis utilizadas, todo lo contrario a la línea HBL100 donde parece que esta combinación de fármacos es más bien antagónica.

En la línea celular HBL100 parece que la mejor combinación sería la de TG02 con Doxorrubicina, ya que la mayoría de las combinaciones muestran los ICs más bajos.

Para ambas líneas la combinación con Vinorelbina no parece ser muy eficaz mostrando en la mayoría de los casos efectos antagónicos.

Con respecto al Cisplatino, el comportamiento en ambas líneas celulares es similar, mostrando los mejores ICs en las combinaciones a dosis mas bajas de ambos fármacos.

En conclusión, la mejor combinación de TG02 con quimioterapia estándar parece depender del tipo celular, ya que ambas líneas celulares pertenecientes al mismo subtipo triple negativo de cáncer de mama presentan respuestas muy diferentes. Este resultado no ha de extrañarnos ya que este subtipo de cáncer, como ya comentamos previamente en la introducción, abarca a su vez diversos subtipos actualmente no definidos, de ahí la importancia de hacer una buena clasificación que nos ayude a encontrar el mejor tratamiento dirigido para cada uno de ellos.

3.6 Actividad antitumoral *in vivo* de TG02 como agente único

La actividad antitumoral *in vivo* de TG02 como agente único se analizó en tumores de ratones xenografts (*nu/nu*, Harlan) generados a partir de la línea celular MDAMB231.

El estudio comenzó a los treinta y tres días tras la inyección de las células, día que denominamos como D1, cuando los tumores habían alcanzado un volumen entre 75-144 mm³, con un volumen medio del tumor por grupo de 102-105 mm³.

El estudio se compuso de tres grupos (10 ratones por grupo) (Tabla XIX); grupo 1, tratados con el vehículo (0.5% metil-celulosa (0.1% Tween® 80 en agua desionizada)); grupo 2, tratados diariamente con la sal de TG02 a razón de 46.92 mg/Kg de peso; y grupo 3, tratados con TG02 de manera intermitente (dos veces por semana) a razón de 93.84 mg/Kg de peso.

El grupo 1 recibió el vehículo diariamente hasta el final del estudio. Este grupo (n=10) se diseñó como control para poder analizar el porcentaje de inhibición del tumor (% ICT). Como se observa en la figura 61, el volumen medio del tumor (VMT) a día 24 (D24) fue de 1519 mm³, y el rango del volumen del tumor individual entre los 10 ratones fue de 650 mm³ de volumen mínimo a 1688 mm³ de volumen máximo. En este grupo no se produjo regresión de los tumores.

El grupo 2 (n=9) recibió diariamente TG02 hasta el final del estudio. Un animal de este grupo fue excluido ya que presentó un peso inferior a 21 g al comienzo del tratamiento. Este animal murió antes de finalizar el estudio. El volumen medio del

tumor a D24 fue de 666 mm³, que corresponde a un ICT del 56% (Tabla XIX), con un rango del volumen del tumor individual de los 9 ratones de 126 mm³ de volumen mínimo y 1470 mm³ de volumen máximo (Figura 61).

El grupo 3 (n=10) recibió TG02 de manera intermitente hasta el final del estudio. La media del volumen del tumor a D24 fue de 1096 mm³, que corresponde a una ICT del 28% (Tabla XIX), con un rango del volumen del tumor individual de los 10 ratones entre 446 mm³ de volumen mínimo y 2025 mm³ de volumen máximo (Figura 61).

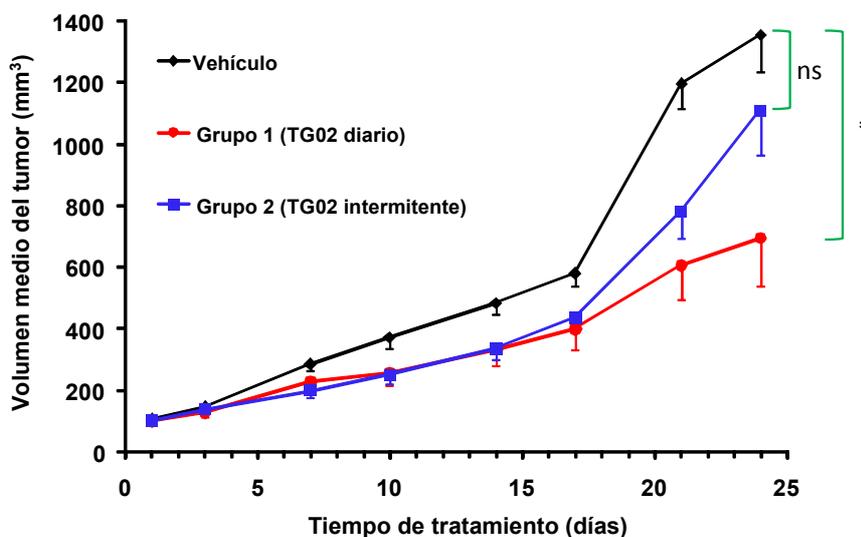


Figura 61. Gráfica representativa del crecimiento del tumor medio respecto al tiempo (días) relativa al estudio in vivo de TG02 en xenoinjertos de células MDAMB231 (ns = no significativa; * = $p \leq 0.01$).

Tabla XIX. Datos relativos al estudio del efecto de TG02 in vivo en xenoinjertos de células MDAMB231

| Grupo | n | Regimen de tratamiento | | | VTM (n) Día 24 | % ICT | Estat. Signif. vs Gr 1 | Regresión | | Muertes | | |
|-------|----|------------------------|-------|------|-------------------|-----------|---------------------------|-------------|----|---------|----|-----|
| | | Agente | mg/Kg | Ruta | | | | Tratamiento | RP | RC | RT | NRT |
| 1 | 10 | vehículo 1 | | oral | diario | 1519 (10) | --- | --- | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 9 | TG02 | 46,92 | oral | diario | 666 (9) | 56 | * | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 3 | 10 | TG02 | 93,84 | oral | bisemanal | 1096 (10) | 28 | ns | 0 | 0 | 0 | 0 |

Fin del estudio = 1500 mm³; Duración del estudio = 24 días

n = número de animales en cada grupo

% ICT = $[1 - (VMT_{\text{tratadas con el fármaco}} / VTM_{\text{control}})] \times 100$ = % de inhibición del volumen del tumor, comparado vs. Grupo 1

oral = tratamiento oral mediante canulación gástrica

Estadísticamente Significativo (Mann-Whitney U test): ns = no significativa, * = $P \leq 0.01$, comparado vs. Grupo 1

VMT (n) = volumen medio del del tumor (mm³) del número de animales existentes en el día del análisis de ICT

RP = regresión parcial; RC = regresión completa

RT = muerte relacionada con el tratamiento; NRT = muerte no relacionada con el tratamiento

En base al resultado del % ICT, consideramos que TG02 suministrado diariamente es un agente potencial y terapéuticamente activo, ya que el valor de ICT fue del 56%. En cambio suministrado de manera intermitente el valor fue del 28% (Tabla XIX).

Las diferencias entre el grupo 2 y el grupo 1 a D24 fueron estadísticamente significativas ($P < 0.01$). En cambio las diferencias entre el grupo 3 y el grupo 1 a D24 no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.05$). En ambos grupos tratados, el tratamiento con TG02 no causó regresión del tumor, aunque el grupo 2 retrasó el crecimiento considerablemente respecto al grupo 1 (Figura 61) (Tabla XIX).

En conclusión, el tratamiento diario con TG02 a dosis más bajas fue doblemente efectivo respecto a dosis más altas de forma intermitente.

Este estudio preclínico del efecto de TG02 sobre tumores de mama del subtipo triple negativo sienta las bases para pensar en un estudio clínico.

Conclusiones

Conclusiones

1. Nuestros hallazgos en tumores de mama humanos indican que:

- Los niveles de pErk5/Erk5 pueden estar regulados por mecanismos dependientes e independientes de sobreexpresión de HER2.
- La expresión de Erk5 correlaciona inversamente con la supervivencia.
- La sobreexpresión de Erk5 es un factor pronóstico independiente en cáncer de mama.
- Erk5 regula la respuesta a tratamientos anti-HER2, puesto que la inhibición de la expresión o activación de Erk5 sensibiliza a las células de cáncer de mama a tratamientos utilizados en clínica tales como Herceptina.

Por tanto Erk5 podría considerarse como una diana terapéutica importante.

2. En tumores de mama de ratón, la sobreexpresión de HER2 está relacionada con un aumento en la expresión de Erk5 y su activación.

3. TG02, muestra un efecto inhibitorio de la fosforilación del residuo Thr⁷³² en la cola C-terminal de Erk5, sin afectar al motivo TEY en respuesta a estimulación con EGF. Además, esta inhibición es específica sobre Erk5 y no sobre otras moléculas implicadas en su activación como Mek5 o EGFR. TG02 también inhibe la capacidad de autofosforilación de Erk5.

4. Las células del subtipo de cáncer de mama triple negativo son muy sensibles al fármaco TG02 a bajas dosis y tiempos cortos.

- TG02 induce retraso en la transición G1/S del ciclo celular, arresto en fase G2 y provoca apoptosis, según las líneas celulares.
- TG02 sensibiliza a la célula tumoral de cáncer de mama a la quimioterapia, con un efecto sinérgico o aditivo.

5. TG02 exhibe un efecto antitumoral in vivo en xenoinjertos de la línea celular MDAMB231 en ratón. Estos resultados sientan las bases para el desarrollo de un estudio clínico de este compuesto en cáncer de mama triple negativo.

Bibliografía

Bibliografía

- Abe, J., M. Kusuhara, et al. (1996). "Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase." *J Biol Chem* 271(28): 16586-90.
- Abe, J., M. Takahashi, et al. (1997). "c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1." *J Biol Chem* 272(33): 20389-94.
- Allred, D. C., G. M. Clark, et al. (1992). "Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer." *Hum Pathol* 23(9): 974-9.
- Ananieva, O., A. Macdonald, et al. (2008). "ERK5 regulation in naive T-cell activation and survival." *Eur J Immunol* 38(9): 2534-47.
- Ausubel, K. and B. Gitler (1987). "Swallow syncope in an otherwise healthy young man." *Am Heart J* 113(3): 831-2.
- Bain, J., L. Plater, et al. (2007). "The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update." *Biochem J* 408(3): 297-315.
- Bartkova, J., J. Lukas, et al. (1994). "Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer." *Int J Cancer* 57(3): 353-61.
- Beatson, G. (1896). "On the treatment of inoperable cases of the mamma: Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases." *Lancet Oncol*: 104-107.
- Bhargava, R., J. Striebel, et al. (2009). "Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers." *Int J Clin Exp Pathol* 2(5): 444-55.
- Biondi, R. M. and A. R. Nebreda (2003). "Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions." *Biochem J* 372(Pt 1): 1-13.
- Bjornsti, M. A. and P. J. Houghton (2004). "The TOR pathway: a target for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 4(5): 335-48.
- Borges, J., A. Pandiella, et al. (2007). "Erk5 nuclear location is independent on dual phosphorylation, and favours resistance to TRAIL-induced apoptosis." *Cell Signal* 19(7): 1473-87.
- Bouchard, V. J., M. Rouleau, et al. (2003). "PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage." *Exp Hematol* 31(6): 446-54.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Braun, S., G. Schlimok, et al. (2001). "ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients." *Cancer Res* 61(5): 1890-5.
- Brugarolas, J., K. Moberg, et al. (1999). "Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(3): 1002-7.
- Burstein, H. J., Y. Sun, et al. (2010). "Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer." *J Clin Oncol* 28(8): 1301-7.
- Buschbeck, M., J. Eickhoff, et al. (2002). "Phosphotyrosine-specific phosphatase PTP-SL regulates the ERK5 signaling pathway." *J Biol Chem* 277(33): 29503-9.
- Buschbeck, M. and A. Ullrich (2005). "The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling." *J Biol Chem* 280(4): 2659-67.

- Buse, P., S. H. Tran, et al. (1999). "Cell cycle and hormonal control of nuclear-cytoplasmic localization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, in mammary tumor cells. A novel convergence point of anti-proliferative and proliferative cell signaling pathways." *J Biol Chem* 274(11): 7253-63.
- Cabrera, N., E. Díaz-Rodríguez, et al. (1996). "TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment." *J Cell Biol* 132(3): 427-36.
- Cameron, S. J., J. Abe, et al. (2004). "Differential role of MEK5alpha and MEK5beta in BMK1/ERK5 activation." *J Biol Chem* 279(2): 1506-12.
- Cameron, S. J., S. Itoh, et al. (2004). "Activation of big MAP kinase 1 (BMK1/ERK5) inhibits cardiac injury after myocardial ischemia and reperfusion." *FEBS Lett* 566(1-3): 255-60.
- Cameron, S. J., S. Malik, et al. (2003). "Regulation of epidermal growth factor-induced connexin 43 gap junction communication by big mitogen-activated protein kinase1/ERK5 but not ERK1/2 kinase activation." *J Biol Chem* 278(20): 18682-8.
- Campbell, R. A., P. Bhat-Nakshatri, et al. (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance." *J Biol Chem* 276(13): 9817-24.
- Canagarajah, B. J., A. Khokhlatchev, et al. (1997). "Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation." *Cell* 90(5): 859-69.
- Carey, L. A., C. M. Perou, et al. (2006). "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study." *Jama* 295(21): 2492-502.
- Cargnello, M. and P. P. Roux "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." *Microbiol Mol Biol Rev* 75(1): 50-83.
- Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." *Microbiol Mol Biol Rev* 75(1): 50-83.
- Carvajal-Vergara, X., S. Tabera, et al. (2005). "Multifunctional role of Erk5 in multiple myeloma." *Blood* 105(11): 4492-9.
- Castro, N. E. and C. A. Lange (2010). "Breast tumor kinase and extracellular signal-regulated kinase 5 mediate Met receptor signaling to cell migration in breast cancer cells." *Breast Cancer Res* 12(4): R60.
- Cavanaugh, J. E. (2004). "Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival." *Eur J Biochem* 271(11): 2056-9.
- Citri, A., K. B. Skaria, et al. (2003). "The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3." *Exp Cell Res* 284(1): 54-65.
- Cleator, S., W. Heller, et al. (2007). "Triple-negative breast cancer: therapeutic options." *Lancet Oncol* 8(3): 235-44.
- Cobleigh, M. A., V. K. Langmuir, et al. (2003). "A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer." *Semin Oncol* 30(5 Suppl 16): 117-24.
- Colombo, M., F. Corsi, et al. (2010). "HER2 targeting as a two-sided strategy for breast cancer diagnosis and treatment: Outlook and recent implications in nanomedical approaches." *Pharmacol Res* 62(2): 150-65.

- Coussens, L., T. L. Yang-Feng, et al. (1985). "Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene." Science 230(4730): 1132-9.
- Cude, K., Y. Wang, et al. (2007). "Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NFkappaB signaling pathway." J Cell Biol 177(2): 253-64.
- Chang, C. I., B. E. Xu, et al. (2002). "Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b." Mol Cell 9(6): 1241-9.
- Chao, T. H., M. Hayashi, et al. (1999). "MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway." J Biol Chem 274(51): 36035-8.
- Chen, L. M., W. W. Kuo, et al. (2007). "Eccentric cardiac hypertrophy was induced by long-term intermittent hypoxia in rats." Exp Physiol 92(2): 409-16.
- Chivukula, M., R. Bhargava, et al. (2008). "Clinical importance of HER2 immunohistologic heterogeneous expression in core-needle biopsies vs resection specimens for equivocal (immunohistochemical score 2+) cases." Mod Pathol 21(4): 363-8.
- Chou, T. C. and P. Talalay (1984). "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors." Adv Enzyme Regul 22: 27-55.
- Dai, H., L. van't Veer, et al. (2005). "A cell proliferation signature is a marker of extremely poor outcome in a subpopulation of breast cancer patients." Cancer Res 65(10): 4059-66.
- Dai, Y. and S. Grant (2003). "Cyclin-dependent kinase inhibitors." Curr Opin Pharmacol 3(4): 362-70.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." Cell 116(2): 205-19.
- De Laurentiis, M., D. Cianniello, et al. "Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives." Cancer Treat Rev 36 Suppl 3: S80-6.
- De Laurentiis, M., D. Cianniello, et al. (2010). "Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives." Cancer Treat Rev 36 Suppl 3: S80-6.
- De Graffenried, L. A., B. Chandrasekar, et al. (2004). "NF-kappa B inhibition markedly enhances sensitivity of resistant breast cancer tumor cells to tamoxifen." Ann Oncol 15(6): 885-90.
- De Jager, S. M., S. Maughan, et al. (2005). "The developmental context of cell-cycle control in plants." Semin Cell Dev Biol 16(3): 385-96.
- De Veylder, L., J. Joubes, et al. (2003). "Plant cell cycle transitions." Curr Opin Plant Biol 6(6): 536-43.
- Díaz-Rodríguez, E. and A. Pandiella (2010). "Multisite phosphorylation of Erk5 in mitosis." J Cell Sci 123(Pt 18): 3146-56.
- Dickinson, R. J. and S. M. Keyse (2006). "Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases." J Cell Sci 119(Pt 22): 4607-15.
- Dickson, C., V. Fantl, et al. (1995). "Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer." Cancer Lett 90(1): 43-50.
- Dodge-Kafka, K. L., J. Soughayer, et al. (2005). "The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways." Nature 437(7058): 574-8.

- Downward, J., Y. Yarden, et al. (1984). "Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences." *Nature* 307(5951): 521-7.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* 102(1): 33-42.
- Dudderidge, T. J., S. R. McCracken, et al. (2007). "Mitogenic growth signalling, DNA replication licensing, and survival are linked in prostate cancer." *Br J Cancer* 96(9): 1384-93.
- Dwivedi, P. P., C. S. Hii, et al. (2002). "Role of MAP kinases in the 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced transactivation of the rat cytochrome P450C24 (CYP24) promoter. Specific functions for ERK1/ERK2 and ERK5." *J Biol Chem* 277(33): 29643-53.
- EBCTG, E. B. C. T. C. G. (2005). "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." *Lancet Oncol* 365(9472): 1687-717.
- Ebisuya, M., K. Kondoh, et al. (2005). "The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity." *J Cell Sci* 118(Pt 14): 2997-3002.
- Elledge, S. J. (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." *Science* 274(5293): 1664-72.
- Elledge, R. M., S. Green, et al. (2000). "Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study." *Int J Cancer* 89(2): 111-7.
- Ellis, M. J., A. Coop, et al. (2001). "Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial." *J Clin Oncol* 19(18): 3808-16.
- English, J. M., G. Pearson, et al. (1998). "Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases." *J Biol Chem* 273(7): 3854-60.
- English, J. M., C. A. Vanderbilt, et al. (1995). "Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms." *J Biol Chem* 270(48): 28897-902.
- Esparrís-Ogando, A., E. Díaz-Rodríguez, et al. (2002). "Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2." *Mol Cell Biol* 22(1): 270-85.
- Esparrís-Ogando, A., A. Ocana, et al. (2008). "Synergic antitumoral effect of an IGF-IR inhibitor and trastuzumab on HER2-overexpressing breast cancer cells." *Ann Oncol* 19(11): 1860-9.
- Finegan, K. G., X. Wang, et al. (2009). "Regulation of neuronal survival by the extracellular signal-regulated protein kinase 5." *Cell Death Differ* 16(5): 674-83.
- Finn, R. S., J. Dering, et al. (2007). "Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro." *Breast Cancer Res Treat* 105(3): 319-26.
- Flaherty, P. T., I. Chopra, et al. (2010). "Identification of benzimidazole-based inhibitors of the mitogen activated kinase-5 signaling pathway." *Bioorg Med Chem Lett* 20(9): 2892-6.

- Francis Burrows, K. C. G., Veronica Novotny-Diermayr, Stefan Hart, Yong Cheng Tan, Yung Kiang Loh, Lynn A. Cheatham, Kathryn R. Meshaw, Sara Zaknoen, Jeanette Wood. (2010). "TG02, A MULTI-KINASE INHIBITOR WITH POTENT SINGLE AGENT AND CHEMOSENSITIZATION ACTIVITY AGAINST SOLID TUMORS."
- Garrett, M. D. and A. Fattaey (1999). "CDK inhibition and cancer therapy." Curr Opin Genet Dev **9**(1): 104-11.
- Geyer, C. E., J. Forster, et al. (2006). "Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer." N Engl J Med **355**(26): 2733-43.
- Girio, A., J. C. Montero, et al. (2007). "Erk5 is activated and acts as a survival factor in mitosis." Cell Signal **19**(9): 1964-72.
- Grandis, J. R., S. D. Drenning, et al. (2000). "Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4227-32.
- Grant, S. and J. D. Roberts (2003). "The use of cyclin-dependent kinase inhibitors alone or in combination with established cytotoxic drugs in cancer chemotherapy." Drug Resist Updat **6**(1): 15-26.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-12.
- Gschwind, A., O. M. Fischer, et al. (2004). "The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy." Nat Rev Cancer **4**(5): 361-70.
- Gusterson, B. A., D. T. Ross, et al. (2005). "Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer." Breast Cancer Res **7**(4): 143-8.
- Guy, P. M., J. V. Platko, et al. (1994). "Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 8132-6.
- Haneda, M., T. Sugimoto, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase phosphatase: a negative regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade." Eur J Pharmacol **365**(1): 1-7.
- Hans, F. and S. Dimitrov (2001). "Histone H3 phosphorylation and cell division." Oncogene **20**(24): 3021-7.
- Harper, J. W. and S. J. Elledge (2007). "The DNA damage response: ten years after." Mol Cell **28**(5): 739-45.
- Hayashi, M., C. Fearn, et al. (2005). "Big mitogen-activated protein kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway is essential for tumor-associated angiogenesis." Cancer Res **65**(17): 7699-706.
- Hayashi, M., S. W. Kim, et al. (2004). "Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure." J Clin Invest **113**(8): 1138-48.
- Hayashi, M. and J. D. Lee (2004). "Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice." J Mol Med **82**(12): 800-8.
- Hayashi, M., R. I. Tapping, et al. (2001). "BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase." J Biol Chem **276**(12): 8631-4.
- He, C., M. Hobert, et al. (2002). "The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core." J Biol Chem **277**(41): 38284-93.

- Heibein, J. A., I. S. Goping, et al. (2000). "Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax." J Exp Med **192**(10): 1391-402.
- Herschkowitz, J. I., K. Simin, et al. (2007). "Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors." Genome Biol **8**(5): R76.
- Herskowitz, I. (1995). "MAP kinase pathways in yeast: for mating and more." Cell **80**(2): 187-97.
- Howe, L. R., S. J. Leever, et al. (1992). "Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf." Cell **71**(2): 335-42.
- Hsieh, F. C., G. Cheng, et al. (2005). "Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer." Biochem Biophys Res Commun **335**(2): 292-9.
- Huber, A., P. Bai, et al. (2004). "PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 1103-8.
- Hudziak, R. M., G. D. Lewis, et al. (1989). "p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor." Mol Cell Biol **9**(3): 1165-72.
- Hynes, N. E. and H. A. Lane (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." Nat Rev Cancer **5**(5): 341-54.
- Iliakis, G. (1991). "The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells." Bioessays **13**(12): 641-8.
- Inesta-Vaquera, F. A., D. G. Campbell, et al. (2010). "Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle." Cell Signal **22**(12): 1829-37.
- Ishizawa, R. and S. J. Parsons (2004). "c-Src and cooperating partners in human cancer." Cancer Cell **6**(3): 209-14.
- Jones, C., A. Mackay, et al. (2004). "Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer." Cancer Res **64**(9): 3037-45.
- Joza, N., S. A. Susin, et al. (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." Nature **410**(6828): 549-54.
- Kamakura, S., T. Moriguchi, et al. (1999). "Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus." J Biol Chem **274**(37): 26563-71.
- Kang, S. P., M. Martel, et al. (2008). "Triple negative breast cancer: current understanding of biology and treatment options." Curr Opin Obstet Gynecol **20**(1): 40-6.
- Kasler, H. G., J. Victoria, et al. (2000). "ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain." Mol Cell Biol **20**(22): 8382-9.
- Kato, Y., V. V. Kravchenko, et al. (1997). "BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C." Embo J **16**(23): 7054-66.
- Kato, Y., R. I. Tapping, et al. (1998). "Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor." Nature **395**(6703): 713-6.
- Kato, Y., M. Zhao, et al. (2000). "Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family." J Biol Chem **275**(24): 18534-40.
- Kayahara, M., X. Wang, et al. (2005). "Selective regulation of c-jun gene expression by mitogen-activated protein kinases via the 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive element and myocyte enhancer factor 2 binding sites." Mol Cell Biol **25**(9): 3784-92.

- Kesavan, K., K. Lobel-Rice, et al. (2004). "MEKK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts." J Cell Physiol 199(1): 140-8.
- Kil, S. J. and C. Carlin (2000). "EGF receptor residues leu(679), leu(680) mediate selective sorting of ligand-receptor complexes in early endosomal compartments." J Cell Physiol 185(1): 47-60.
- King, C. R., M. H. Kraus, et al. (1985). "Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma." Science 229(4717): 974-6.
- King, M. C., S. Rowell, et al. (1993). "Inherited breast and ovarian cancer. What are the risks? What are the choices?" Jama 269(15): 1975-80.
- Kondoh, K., K. Terasawa, et al. (2006). "Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms." Mol Cell Biol 26(5): 1679-90.
- Korenjak, M. and A. Brehm (2005). "E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development." Curr Opin Genet Dev 15(5): 520-7.
- Kraus, M. H., W. Issing, et al. (1989). "Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors." Proc Natl Acad Sci U S A 86(23): 9193-7.
- Laakso, M., M. Tanner, et al. (2006). "Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer." Clin Cancer Res 12(14 Pt 1): 4185-91.
- Lacroix, H., J. D. Iglehart, et al. (1989). "Overexpression of erbB-2 or EGF receptor proteins present in early stage mammary carcinoma is detected simultaneously in matched primary tumors and regional metastases." Oncogene 4(2): 145-51.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-5.
- Lakhani, S. R. and M. J. O'Hare (2001). "The mammary myoepithelial cell--Cinderella or ugly sister?" Breast Cancer Res 3(1): 1-4.
- Lange-Carter, C. A., C. M. Pleiman, et al. (1993). "A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf." Science 260(5106): 315-9.
- Lapenna, S. and A. Giordano (2009). "Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer." Nat Rev Drug Discov 8(7): 547-66.
- Lee, J. D., R. J. Ulevitch, et al. (1995). "Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase." Biochem Biophys Res Commun 213(2): 715-24.
- Lin, N. U. and E. P. Winer (2008). "Advances in adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women." J Clin Oncol 26(5): 798-805.
- Liu, L., J. E. Cavanaugh, et al. (2003). "ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons." Proc Natl Acad Sci U S A 100(14): 8532-7.
- Liu, L., P. Cundiff, et al. (2006). "Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 5 is necessary and sufficient to specify cortical neuronal fate." Proc Natl Acad Sci U S A 103(25): 9697-702.
- Li, L. Y., X. Luo, et al. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." Nature 412(6842): 95-9.
- Lombardo, C. R., T. G. Consler, et al. (1995). "In vitro phosphorylation of the epidermal growth factor receptor autophosphorylation domain by c-src: identification of phosphorylation sites and c-src SH2 domain binding sites." Biochemistry 34(50): 16456-66.

- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-90.
- Massague, J. and A. Pandiella (1993). "Membrane-anchored growth factors." *Annu Rev Biochem* **62**: 515-41.
- McCaw, B. J., S. Y. Chow, et al. (2005). "Identification and characterization of mErk5-T, a novel Erk5/Bmk1 splice variant." *Gene* **345**(2): 183-90.
- McClue, S. J., D. Blake, et al. (2002). "In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine)." *Int J Cancer* **102**(5): 463-8.
- McIntosh, G. G., J. J. Anderson, et al. (1995). "Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer." *Oncogene* **11**(5): 885-91.
- Mehta, P. B., B. L. Jenkins, et al. (2003). "MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion." *Oncogene* **22**(9): 1381-9.
- Millikan, R. C., B. Newman, et al. (2008). "Epidemiology of basal-like breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **109**(1): 123-39.
- Mody, N., D. G. Campbell, et al. (2003). "An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro." *Biochem J* **372**(Pt 2): 567-75.
- Mody, N., J. Leitch, et al. (2001). "Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway." *FEBS Lett* **502**(1-2): 21-4.
- Morimoto, H., K. Kondoh, et al. (2007). "Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation." *J Biol Chem* **282**(49): 35449-56.
- Morrison, D. K. and R. J. Davis (2003). "Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals." *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 91-118.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Mulloy, R., S. Salinas, et al. (2003). "Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade." *Oncogene* **22**(35): 5387-98.
- Muthuswamy, S. K. (2011). "Trastuzumab resistance: all roads lead to SRC." *Nat Med* **17**(4): 416-8.
- Nahta, R., M. C. Hung, et al. (2004). "The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells." *Cancer Res* **64**(7): 2343-6.
- Nakamura, K. and G. L. Johnson (2003). "PB1 domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PB1 domain for activation of the ERK5 pathway." *J Biol Chem* **278**(39): 36989-92.
- Nakaoka, Y., K. Nishida, et al. (2003). "Activation of gp130 transduces hypertrophic signal through interaction of scaffolding/docking protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 in cardiomyocytes." *Circ Res* **93**(3): 221-9.
- Neshat, M. S., I. K. Mellinghoff, et al. (2001). "Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10314-9.
- Nicol, R. L., N. Frey, et al. (2001). "Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy." *Embo J* **20**(11): 2757-67.

- Niehans, G. A., T. P. Singleton, et al. (1993). "Stability of HER-2/neu expression over time and at multiple metastatic sites." J Natl Cancer Inst 85(15): 1230-5.
- Nishimoto, S. and E. Nishida (2006). "MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2." EMBO Rep 7(8): 782-6.
- Ocana, A., J. J. Cruz, et al. (2006). "Trastuzumab and antiestrogen therapy: focus on mechanisms of action and resistance." Am J Clin Oncol 29(1): 90-5.
- Ocana, A. and A. Pandiella (2008). "Identifying breast cancer druggable oncogenic alterations: lessons learned and future targeted options." Clin Cancer Res 14(4): 961-70.
- Ocana, A. and A. Pandiella (2011). "Personalized therapies in the cancer "omics" era." Mol Cancer 9: 202.
- Olopade, O. I., T. A. Grushko, et al. (2008). "Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine." Clin Cancer Res 14(24): 7988-99.
- Oshima, R. G., J. Lesperance, et al. (2004). "Angiogenic acceleration of Neu induced mammary tumor progression and metastasis." Cancer Res 64(1): 169-79.
- Paik, S., J. Bryant, et al. (2000). "HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15." J Natl Cancer Inst 92(24): 1991-8.
- Pal, S. K., B. H. Childs, et al. (2011). "Triple negative breast cancer: unmet medical needs." Breast Cancer Res Treat 125(3): 627-36.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev 22(2): 153-83.
- Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature 406(6797): 747-52.
- Pi, X., C. Yan, et al. (2004). "Big mitogen-activated protein kinase (BMK1)/ERK5 protects endothelial cells from apoptosis." Circ Res 94(3): 362-9.
- Piccart-Gebhart, M. J., M. Procter, et al. (2005). "Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer." N Engl J Med 353(16): 1659-72.
- Plowman, G. D., J. M. Culouscou, et al. (1993). "Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family." Proc Natl Acad Sci U S A 90(5): 1746-50.
- Pouyssegur, J., V. Volmat, et al. (2002). "Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling." Biochem Pharmacol 64(5-6): 755-63.
- Prat, A. and C. M. Perou (2010). "Deconstructing the molecular portraits of breast cancer." Mol Oncol 5(1): 5-23.
- Rakha, E. A., M. E. El-Sayed, et al. (2007). "Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression." Histopathology 50(4): 434-8.
- Rakha, E. A., M. E. El-Sayed, et al. (2008). "Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer." Histopathology 52(1): 67-81.
- Rakha, E. A., J. S. Reis-Filho, et al. (2008). "Basal-like breast cancer: a critical review." J Clin Oncol 26(15): 2568-81.
- Ramsauer, V. P., C. A. Carraway, et al. (2003). "Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells." J Biol Chem 278(32): 30142-7.
- Ranganathan, A., G. W. Pearson, et al. (2006). "The MAP kinase ERK5 binds to and phosphorylates p90 RSK." Arch Biochem Biophys 449(1-2): 8-16.

- Regan, C. P., W. Li, et al. (2002). "Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects." Proc Natl Acad Sci U S A 99(14): 9248-53.
- Reis-Filho, J. S. and A. N. Tutt (2008). "Triple negative tumours: a critical review." Histopathology 52(1): 108-18.
- Romond, E. H., E. A. Perez, et al. (2005). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer." N Engl J Med 353(16): 1673-84.
- Ross, J. S. and J. A. Fletcher (1998). "The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy." Stem Cells 16(6): 413-28.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning, 2nd ed." Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, J. D., T. Kawamoto, et al. (1983). "Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors." Mol Biol Med 1(5): 511-29.
- Sawhney, R. S., W. Liu, et al. (2009). "A novel role of ERK5 in integrin-mediated cell adhesion and motility in cancer cells via Fak signaling." J Cell Physiol 219(1): 152-61.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." Mol Cell Biol 19(4): 2435-44.
- Schechter, A. L., D. F. Stern, et al. (1984). "The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen." Nature 312(5994): 513-6.
- Schlessinger, J. (2004). "Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors." Science 306(5701): 1506-7.
- Schuchard, M., J. P. Landers, et al. (1993). "Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes." Endocr Rev 14(6): 659-69.
- Seidel, J. J. and B. J. Graves (2002). "An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors." Genes Dev 16(1): 127-37.
- Seoane, S., J. C. Montero, et al. (2010). "Effect of multikinase inhibitors on caspase-independent cell death and DNA damage in HER2-overexpressing breast cancer cells." J Natl Cancer Inst 102(18): 1432-46.
- Seyfried, J., X. Wang, et al. (2005). "A novel mitogen-activated protein kinase docking site in the N terminus of MEK5alpha organizes the components of the extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway." Mol Cell Biol 25(22): 9820-8.
- Sherr, C. J. (2000). "Cell cycle control and cancer." Harvey Lect 96: 73-92.
- Shishido, T., C. H. Woo, et al. (2008). "Effects of MEK5/ERK5 association on small ubiquitin-related modification of ERK5: implications for diabetic ventricular dysfunction after myocardial infarction." Circ Res 102(11): 1416-25.
- Siegel, R. M. (2006). "Caspases at the crossroads of immune-cell life and death." Nat Rev Immunol 6(4): 308-17.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, et al. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science 235(4785): 177-82.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." Science 244(4905): 707-12.
- Smith, I. E. and M. Dowsett (2003). "Aromatase inhibitors in breast cancer." N Engl J Med 348(24): 2431-42.
- Sohn, S. J., G. M. Lewis, et al. (2008). "Non-redundant function of the MEK5-ERK5 pathway in thymocyte apoptosis." Embo J 27(13): 1896-906.

- Sohn, S. J., B. K. Sarvis, et al. (2002). "ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression." *J Biol Chem* 277(45): 43344-51.
- Song, H., X. Jin, et al. (2004). "Stat3 upregulates MEK5 expression in human breast cancer cells." *Oncogene* 23(50): 8301-9.
- Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19): 10869-74.
- Sorlie, T., Y. Wang, et al. (2006). "Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms." *BMC Genomics* 7: 127.
- Squires, M. S., P. M. Nixon, et al. (2002). "Cell-cycle arrest by PD184352 requires inhibition of extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 but not ERK5/BMK1." *Biochem J* 366(Pt 2): 673-80.
- Sticht, C., K. Freier, et al. (2008). "Activation of MAP kinase signaling through ERK5 but not ERK1 expression is associated with lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma (OSCC)." *Neoplasia* 10(5): 462-70.
- Stoka, V., B. Turk, et al. (2001). "Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route." *J Biol Chem* 276(5): 3149-57.
- Sun, W., K. Kesavan, et al. (2001). "MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway." *J Biol Chem* 276(7): 5093-100.
- Sun, W., X. Wei, et al. (2003). "MEK kinase 2 and the adaptor protein Lad regulate extracellular signal-regulated kinase 5 activation by epidermal growth factor via Src." *Mol Cell Biol* 23(7): 2298-308.
- Susin, S. A., E. Daugas, et al. (2000). "Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis." *J Exp Med* 192(4): 571-80.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." *Nature* 397(6718): 441-6.
- Suzaki, Y., M. Yoshizumi, et al. (2002). "Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults." *J Biol Chem* 277(11): 9614-21.
- Takahashi, N., Y. Saito, et al. (2005). "Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes." *J Mol Cell Cardiol* 38(1): 185-92.
- Takeishi, Y., J. Abe, et al. (1999). "Differential regulation of p90 ribosomal S6 kinase and big mitogen-activated protein kinase 1 by ischemia/reperfusion and oxidative stress in perfused guinea pig hearts." *Circ Res* 85(12): 1164-72.
- Tanaka, T., D. Halicka, et al. (2009). "Cytometric analysis of DNA damage: phosphorylation of histone H2AX as a marker of DNA double-strand breaks (DSBs)." *Methods Mol Biol* 523: 161-8.
- Tanoue, T., M. Adachi, et al. (2000). "A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators." *Nat Cell Biol* 2(2): 110-6.
- Tanoue, T., R. Maeda, et al. (2001). "Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions." *Embo J* 20(3): 466-79.
- Tatake, R. J., M. M. O'Neill, et al. (2008). "Identification of pharmacological inhibitors of the MEK5/ERK5 pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 377(1): 120-5.

- Terasawa, K., K. Okazaki, et al. (2003). "Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway." *Genes Cells* 8(3): 263-73.
- Thien, C. B. and W. Y. Langdon (2001). "Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4): 294-307.
- Turjanski, A. G., J. P. Vaque, et al. (2007). "MAP kinases and the control of nuclear events." *Oncogene* 26(22): 3240-53.
- Ullrich, A., L. Coussens, et al. (1984). "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells." *Nature* 309(5967): 418-25.
- van de Vijver, M., R. van de Berselaar, et al. (1987). "Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene." *Mol Cell Biol* 7(5): 2019-23.
- van Gorp, M., N. Festjens, et al. (2003). "Mitochondrial intermembrane proteins in cell death." *Biochem Biophys Res Commun* 304(3): 487-97.
- van Loo, G., X. Saelens, et al. (2002). "The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet." *Cell Death Differ* 9(10): 1031-42.
- Vaux, D. L., G. Haeccker, et al. (1994). "An evolutionary perspective on apoptosis." *Cell* 76(5): 777-9.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell* 102(1): 43-53.
- Walsh, T. and M. C. King (2007). "Ten genes for inherited breast cancer." *Cancer Cell* 11(2): 103-5.
- Wang, X., A. J. Merritt, et al. (2005). "Targeted deletion of mek5 causes early embryonic death and defects in the extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2 cell survival pathway." *Mol Cell Biol* 25(1): 336-45.
- Wang, X. and C. Tournier (2006). "Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway." *Cell Signal* 18(6): 753-60.
- Watanabe, N., M. Broome, et al. (1995). "Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle." *Embo J* 14(9): 1878-91.
- Watson, F. L., H. M. Heerssen, et al. (2001). "Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response." *Nat Neurosci* 4(10): 981-8.
- Weber, B. L. (1996). "Familial breast cancer." *Recent Results Cancer Res* 140: 5-16.
- Weldon, C. B., A. B. Scandurro, et al. (2002). "Identification of mitogen-activated protein kinase kinase as a chemoresistant pathway in MCF-7 cells by using gene expression microarray." *Surgery* 132(2): 293-301.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." *Physiol Rev* 79(1): 143-80.
- Woo, M., A. Hakem, et al. (1999). "In vivo evidence that caspase-3 is required for Fas-mediated apoptosis of hepatocytes." *J Immunol* 163(9): 4909-16.
- Woo, C. H., T. Shishido, et al. (2008). "Extracellular signal-regulated kinase 5 SUMOylation antagonizes shear stress-induced antiinflammatory response and endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells." *Circ Res* 102(5): 538-45.
- Xu, B., S. Stippec, et al. (2001). "Hydrophobic as well as charged residues in both MEK1 and ERK2 are important for their proper docking." *J Biol Chem* 276(28): 26509-15.

- Xu, B. E., S. Stippec, et al. (2004). "WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism." J Biol Chem 279(9): 7826-31.
- Yamamoto, T., H. Hihara, et al. (1983). "A new avian erythroblastosis virus, AEV-H, carries erbB gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcomas." Cell 34(1): 225-32.
- Yan, C., H. Luo, et al. (2001). "Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains." J Biol Chem 276(14): 10870-8.
- Yan, C., M. Takahashi, et al. (1999). "Fluid shear stress stimulates big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) activity in endothelial cells. Dependence on tyrosine kinases and intracellular calcium." J Biol Chem 274(1): 143-50.
- Yan, L., J. Carr, et al. (2003). "Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development." BMC Dev Biol 3: 11.
- Yang, J., M. Boerm, et al. (2000). "Mekk3 is essential for early embryonic cardiovascular development." Nat Genet 24(3): 309-13.
- Yang, Q., X. Deng, et al. (2010). "Pharmacological Inhibition of BMK1 Suppresses Tumor Growth through Promyelocytic Leukemia Protein." Cancer Cell 18(3): 258-67.
- Yarden, Y., J. Baselga, et al. (2004). "Molecular approach to breast cancer treatment." Semin Oncol 31(5 Suppl 10): 6-13.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol 2(2): 127-37.
- Yu, H. and R. Jove (2004). "The STATs of cancer--new molecular targets come of age." Nat Rev Cancer 4(2): 97-105.
- Zhou, B., L. Wu, et al. (2001). "Multiple regions of MAP kinase phosphatase 3 are involved in its recognition and activation by ERK2." J Biol Chem 276(9): 6506-15.
- Zhou, C., A. M. Nitschke, et al. (2008). "Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha resistant human breast cancer cells reveals a MEK5/Erk5-mediated epithelial-mesenchymal transition phenotype." Breast Cancer Res 10(6): R105.
- Zhou, G., Z. Q. Bao, et al. (1995). "Components of a new human protein kinase signal transduction pathway." J Biol Chem 270(21): 12665-9.