

Tesis de Posgrado

Interacción entre las vías de transducción de señales activadas por el receptor de progesterona y las activadas por receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I y II en cáncer de mama

Labriola, Leticia

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Labriola, Leticia. (2002). Interacción entre las vías de transducción de señales activadas por el receptor de progesterona y las activadas por receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I y II en cáncer de mama. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3450_Labriola.pdf

Cita tipo Chicago:

Labriola, Leticia. "Interacción entre las vías de transducción de señales activadas por el receptor de progesterona y las activadas por receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I y II en cáncer de mama". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3450_Labriola.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

Interacción entre las vías de transducción de señales activadas por el receptor de progesterona y las activadas por receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I y II en cáncer de mama.

Autor: **Lic. Leticia Labriola**

Director: **Dra. Patricia V. Elizalde**

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME).

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
(Orientación Química Biológica)

2002



**SCHOOL OF EXACT AND NATURAL SCIENCES
UNIVERSITY OF BUENOS AIRES**

Cross-talks between progesterone receptor and type I
and II receptor tyrosine kinase signaling pathways in
breast cancer.

Author: **Lic. Leticia Labriola**

Director: **Dr. Patricia V. Elizalde**

Workplace: **Instituto de Biología y Medicina
Experimental (IBYME).**

Ph.D. Thesis

2002

AGRADECIMIENTOS

Recién cuando empecé a hacer la lista de agradecimientos tomé más conciencia de todos los que de alguna forma me habían ayudado a llevar adelante esta empresa. Va para todos ellos mi más sincero agradecimiento. En primer lugar a los que estuvieron directamente involucrados en mi iniciación en esto de la investigación científica; la Dra. Patricia Elizalde y el Dr. Eduardo Charreau. A Patricia por haberme aceptado como su becaria de doctorado y haber estado siempre pendiente de que este proyecto llegará a concretarse. Desde poder contar con todo los reactivos necesarios, enseñarme a marcar las sondas, pasando por conectarme con la gente que pudiera ayudarme con las nuevas técnicas que había que aprender, enseñarme a escribir un informe, resumen o lo que tocara; hasta hacerme ver cuan importante es no perder de vista lo que se hace en todos lados y permitirme ser acompañante en la AACR.

Al Dr. Charreau por estar dispuesto a escuchar mis preguntas, a ofrecerme respuestas, soluciones o las tan preciadas anécdotas de las personas que hacen ciencia y sobretodo por tenerme confianza suficiente para dejarme usar su kit personal para hacer los ensayos de "binding" del receptor de progesterona.

Al CONICET por haberme dado la oportunidad de empezar en esto de la investigación.

A las chicas del 213, las inigualables compañeras que hacen que las numerosas horas que uno pasa en el laboratorio sean mucho más que horas de trabajo. Mariana con su paz, alegría interior, sus consejos tan acertados que me hicieron descubrir que hay cosas que pueden ser más simples y que hay muchos más amigos de los que uno piensa. Ceci por estar tan dispuesta a aprender, a enseñarme cosas sobre internet, cine, teatro y sobretodo por estar siempre dispuesta a compartir el te o mate de la tarde. Vicky, Giselle, Mariu y Mercedes actuales o ex compañeras con las cuales compartimos tantos ratos de laboratorio o extracurriculares.

A Romina y Roxana por haber aceptado ser las nuevas integrantes de la troupe del 213.

A toda la familia del primer piso que, como toda familia, está con vos en todo: Vani, Loli, Diego, Mauro, Déborah, Ale, Mariano (por adopción), Fer, Pato, Silvina, Carolina, Andrea, Karina, Pata.

A los compañeros del Instituto que estuvieron dispuestos a ayudarme: Guille, Pablo, Arturo, Laura, Juan Carlos, Carolina, Eleonora, Marcela, Alejandro, Marcelo, Néstor, Luis.

A Leo Bussmann, Omar Pignataro por tener siempre un consejo o una mano para ofrecer.

A Juan Carlos Calvo por estar siempre dispuesto a ayudarme pero sobretodo a escuchar y a tranquilizarme ante lo que para mí era una catástrofe.

A Santiago Werbjahr y Alberto Kornblihtt por aceptar ayudarme tan desinteresadamente.

A Adalí Pecci, Omar Coso y sus colaboradores por escuchar mis pedidos de auxilio y responder a ellos siempre.

A Violeta por ayudarme con los dosajes de progesterona y compartir tantos festejos y anécdotas.

A Ana Rosa por tenernos siempre el agua caliente para el té, conocer todas las calles y colectivos de Buenos Aires, regar las plantas de nuestro cantero, ser tan ordenada con los pedidos del papel y tubos polistor, darme fuerzas para aprender portugués y organizar unas jornadas en la isla inolvidables.

A los buenos amigos que te depara el destino y los congresos; en síntesis la banda de Quilmes: Daniel Alonso, Hernán, Mariano y Mariana. Todas personas excepcionales que desinteresadamente me ofrecieron consejos y están siempre dispuestos a una charla café de por medio.

A René por enseñarme a investigar en lo profundo sobretodo de mi persona.

A los amigos de siempre que no me preguntaron en que trabajaba además de hacer el doctorado y están siempre dispuestos a compartir todos los momentos: Syl, Asun, Paula, Carina, Rayo, Charly, Sanjui, la banda del Esquiú y del Marín.

A Cristian mi consejero y amigo que nunca deja de rezar por mí.

A la familia Sola con todos sus integrantes porque cada cual a su forma me apoyó y me sigue apoyando en todo lo que hago.

A los abuelos por estar siempre al lado mío inspirándome...

A la familia Cerqueiro-Labriola (Mamá, Papá, Guille y Juli) por acompañarme, escucharme, aguantarme y alentarme en todo lo que emprendo. En fin, por quererme siempre.

Y finalmente a Martín por ser una parte esencial de este proyecto, estar al lado, tenerme paciencia y apoyarme con una fe ciega en lo que hago todos los días.

Pero sobretodo gracias a Dios por ponerme cerca de tanta gente buena que me ayudó en este proyecto.

RESUMEN

Existe numerosa evidencia que indica que los progestágenos están involucrados en el control de la tumorigénesis mamaria. A pesar de ello, los mecanismos por los cuales las hormonas esteroideas estimulan el crecimiento de células de cáncer de mama no han sido todavía descifrados completamente. Uno de los mecanismos propuestos ha sido la regulación de la expresión de factores de crecimiento que actuarían como mitógenos de las células tumorales.

En particular, se ha demostrado previamente en el laboratorio que Heregulina (HRG), ligando de receptores con actividad de tirosina quinasa (RTK) tipo I, estimula el crecimiento de células epiteliales provenientes de cultivos primarios del tumor mamario progestágeno-dependiente C4HD y potencia los efectos mitogénicos del acetato de medroxiprogesterona (MPA) (Balañá et al., 1999; 2001).

La primera parte del presente trabajo se centró en el estudio de interacciones entre los caminos de señalización activados por progestágenos y por RTKS tipo I y II en el modelo de carcinogénesis mamaria inducida por acetato de medroxiprogesterona en ratones Balb/c (Molinolo et al., 1987; Lanari et al., 1989).

El tratamiento de las células C4HD con MPA indujo tanto el aumento de los niveles proteicos de ErbB-2 como el aumento de su fosforilación. Habíamos demostrado anteriormente que el receptor tipo I del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-IR) y el ErbB-2 están involucrados en la proliferación de estas células mediada por MPA. Al estudiar el bloqueo simultáneo de ErbB-2 y IGF-IR sobre la proliferación inducida por MPA, no se observaron efectos aditivos ni sinérgicos. Efectos aditivos hubieran sido esperados si IGF-IR y ErbB-2 activaran vías de señalización independientes. Una interacción sinérgica hubiera existido si el camino de transducción de señales activado por uno de los receptores potenciara el del otro receptor. Por lo tanto tan sólo un mecanismo que involucrara una interacción jerárquica entre IGF-IR y ErbB-2, en el cual uno de ellos es esencial para la activación de

del otro, podía explicar nuestros resultados. En efecto, al suprimir la expresión del IGF-IR, la fosforilación del ErbB-2 inducida por MPA se vio totalmente inhibida. Sin embargo, el bloqueo de la síntesis de ErbB-2 no afectó la fosforilación del IGF-IR. Estos resultados muestran la existencia de una interacción jerárquica entre IGF-IR y ErbB-2; por medio de la cual IGF-IR dirige la activación de ErbB-2. Se demostró, por primera vez, que esta interacción involucra la asociación física de ambos receptores en un complejo heteromérico. Es más, experimentos de microscopía confocal laser mostraron que el MPA fue capaz de inducir la co-localización de ErbB-2 y IGF-IR.

El propósito de la segunda parte del trabajo fue el de investigar la capacidad de HRG de activar al receptor de progesterona (RP) utilizando el mismo modelo experimental que en la primera parte. Es así que pudimos observar que HRG fue capaz de regular las características bioquímicas del RP en forma similar a la efectuada por la activación del receptor luego de la unión a un progestágeno. Se encontró que HRG fue capaz de inducir una disminución de los niveles proteicos de ambas isoformas, A y B, del RP y de disminuir la cantidad de sitios específicos de unión a progestágenos. Además, el tratamiento con HRG produjo un aumento de la proporción de RP con localización nuclear. Estudios posteriores nos permitieron saber que el tratamiento con HRG podía también inducir la unión del RP a su elemento respondedor en el ADN (PRE) y aumentar la transcripción de un gen reportero que contenía dos PRE en su promotor. Un antiprogestágeno como el RU486 provocó la inhibición de la activación transcripcional del RP mediada por HRG. Al profundizar en los mecanismos moleculares que estaban involucrados en los efectos de la HRG sobre el RP, pudimos observar que era necesaria la presencia de ErbB-2 funcional así como de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en su estado activo. Es más, MAPKs activadas por HRG tuvieron la capacidad de fosforilar al RP en ensayos de fosforilación *in vitro*. Los mismos estudios se realizaron en la línea de carcinoma mamario humano T47D obteniéndose resultados similares.

Nuestros resultados mostraron que, en ausencia de progestágenos, HRG activa al RP tanto murino como humano mediante un mecanismo que requiere la presencia de ErbB-2 funcional así como la activación de MAPKs.

Además, se proporciona la primer evidencia de que MAPK activadas por HRG tiene la capacidad de fosforilar *in vitro* al RP humano y murino.

PALABRAS CLAVE: cáncer de mama - receptor de progesterona - receptores ErbBs - receptor tipo I de IGF - progestágenos - heregulina.

ABSTRACT

Accumulated evidence has indicated that progestins are involved in controlling mammary tumorigenesis. Although the mechanisms by which steroid hormones stimulate growth of breast cancer cells have not been completely deciphered, regulation of the expression of growth factors which in turn act as mitogens for tumor cells, has already been proposed.

Particularly, we have previously demonstrated that Heregulin (HRG) stimulates growth of primary cultures of the progestin-dependent C4HD mammary tumor epithelial cells and potentiates medroxyprogesterone acetate (MPA) mitogenic effects (Balañá et al., 1999; 2001).

The first part of the present study focused on interactions between signaling pathways activated by progestins and by type I and II receptor tyrosine kinases (RTKs) in mammary tumors. An experimental model in which the synthetic progestin medroxyprogesterone acetate (MPA) induced mammary adenocarcinomas in Balb/c mice was used (Molinolo et al., 1987; Lanari et al., 1989).

MPA-stimulated proliferation of epithelial cells from primary cultures of progestin-dependent tumors induced up-regulation of ErbB-2 protein levels and tyrosine phosphorylation of this receptor. Recent findings in our laboratory indicate that type I insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) and ErbB-2 are involved in proliferative signaling pathways in C4HD cells. Thus, we investigated the potential antiproliferative effect of the simultaneous down-regulation of ErbB-2 and IGF-IR. The simultaneous blockage of ErbB-2 and IGF-IR showed neither synergistic nor additive effects on the inhibition of MPA-induced proliferation of C4HD cells. Additive effects could have been expected if IGF-IR and ErbB-2 targeted different independent signaling pathways. Synergistic interaction could have existed if one receptor pathway potentiated the other receptor biochemical pathway. Thus, only a mechanism involving a hierarchical interaction between IGF-IR and ErbB-2, wherein one of the receptors is essential for the activation of signal transduction pathways elicited by the other, could fit our results. In fact, suppression of IGF-IR by

antisense oligodeoxynucleotides (ASODN) resulted in complete abrogation of MPA-induced phosphorylation of ErbB-2 in C4HD cells, whereas blockage of ErbB-2 did not affect IGF-IR phosphorylation. These results show the existence of hierarchical interactions between IGF-IR and ErbB-2, by means of which IGF-IR directs ErbB-2 phosphorylation. We demonstrated, for the first time, that this hierarchical interaction involves physical association of both receptors, resulting in the formation of a heteromeric complex. Furthermore, confocal laser microscopy experiments demonstrated that MPA was able to induce co-localization of ErbB-2 and IGF-IR.

The aim of the second part of this study was to investigate the capacity of HRG to activate progesterone receptor (PR) by using the same model of hormonal mammary carcinogenesis.

We first found that HRG was able to induce a decrease on PR A and B isoforms at protein level and to promote a significant increase in the nuclear localization of PR. Further studies allowed us to know that HRG was also able to induce PR binding to a progesterone response element (PRE) and significantly increased the transcription of a reporter gene with two PREs in its promoter. When we investigated molecular mechanisms involved in HRG action, we found that both the presence of functional ErbB-2 and activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) were needed. Additionally, HRG activated-MAPKs were able to phosphorylate PR *in vitro*. This PR activation by HRG was also seen in T47D human breast cancer cells.

Our findings demonstrated that in the absence of progestins, HRG activates PR in both human and mouse breast cancer cells by a mechanism that requires both a functional ErbB-2 and MAPK activation. In addition, herein we provide the first evidence that MAPK activated by HRG are able to phosphorylate human and mouse PR *in vitro*.

KEY WORDS: breast cancer- progesterone receptor – heregulin – type I IGF receptor – ErbBs receptor - progestins

Los resultados de la primera parte de este trabajo han sido publicados en:

“Activation of ErbB-2 via a hierarchical interaction between ErbB-2 and Type I insulin-like growth factor receptor in mammary tumor cells.” María Eugenia Balañá, **Leticia Labriola**, Mariana Salatino, Federico Movsichoff, Giselle Peters, Eduardo H. Charreau and Patricia V. Elizalde. **Oncogene** (2001), 20, 34-47.

INTRODUCCIÓN

Cáncer de mama.	1
Receptores de hormonas esteroideas.	3
Receptor de progesterona.	4
Órganos blanco y respuesta a la progesterona.	6
Factores de crecimiento, receptores de factores crecimiento y oncogenes en el proceso de carcinogénesis mamaria.	10
Receptores de factores de crecimiento con actividad de tirosina Quinasa.	11
Familia de receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I (RTKs I).	12
Familia de receptores con actividad de tirosina quinasa tipo II (RTKs II).	14
Ligandos de los RTKs I: Familia del EGF y la heregulina (HRG).	17
Heregulinas.	18
Heregulinas y cáncer de mama.	22
RTKs I y cáncer de mama.	23
Mecanismos de transducción de señales de RTKs.	24
Modelo experimental de adenocarcinomas mamarios inducidos por progestágenos.	29

OBJETIVOS

33

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales	34
Tumores	34
Hormonas, antagonistas de hormonas, factores de crecimiento e	

inhibidores de quinasas.	34
Medios de Cultivo y suero fetal bovino	35
Soluciones utilizadas para los cultivos	36
Cultivos primarios	36
Ensayos de proliferación	37
Oligonucleótidos	38
Estudios de expresión de receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I y II. Western blot.	39
Análisis de fosforilación en tirosina de los RTKs.	40
Asociación entre ErbB-2 e IGF-IR.	41
Cuantificación del receptor tipo I de IGF.	42
Microscopía confocal y tinción inmunofluorescente.	42
Obtención de extractos proteicos totales para extracción de RP.	43
Obtención de extractos citosólicos o nucleares.	43
Estudios de expresión de receptores de progesterona.	
a. Western Blot.	44
b. ensayos de radio ligando- receptor.	45
Ensayos de corrimiento de movilidad electroforética (EMSA).	46
Transfecciones transientes.	47
Ensayos de medición de la actividad CAT.	48
Ensayos de medición de actividad de β -galactosidasa.	49
Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> para actividad de MAPquinasa.	49
Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> del RP.	50

RESULTADOS

Parte I.	53
Interacción entre los caminos de transducción de señales de ErbB-2y del IGF-IR.	57
Efecto sobre la fosforilación de ErbB-2 producida por el bloqueo de la síntesis de IGF-IR.	59
Interacción física de ErbB-2 e IGF-IR. Formación de un complejo heteromérico.	63
 Parte II.	
Efecto del antiprogestágeno RU486 en la proliferación de células C4HD y T47D mediada por Heregulina.	70
Efecto de HRG sobre la expresión del receptor de Progesterona.	73
Efecto de HRG sobre la localización del RP.	77
Efecto de HRG sobre la formación del complejo RP-PRE.	79
Efecto de HRG sobre la actividad transcripcional del RP.	84
Efecto de las MAPK sobre la fosforilación del RP.	86
 <u>DISCUSIÓN</u>	95
Conclusiones generales	114
 <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	116

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AR	Anfiregulina
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASODNs	Oligonucleótidos Antisentido
ATP	Adenosín trifosfato
β-Gal	β-galactosidasa
BTC	Betacelulina
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
CMV	citomegalovirus
DAG	Diacilglicerol
DS	Desviación Estándar
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EMSA	Ensayos de corrimiento movilidad electroforética
ERK	Proteínas quinasas activadas por señales extracelulares (ver MAPK)
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GF-R	Receptor para Factor de Crecimiento
GFs	Factores de Crecimiento
GGF	Factor de Crecimiento Glial
HA	Hemoaglutinina
HB-EGF	EGF que se une a Heparina
HD	Progestágeno -Dependiente
HI	Progestágeno -Independiente
HRG	Heregulina
IGF-I	Factor de Crecimiento semejante a la Insulina tipo I
IGF-II	Factor de Crecimiento semejante a la Insulina tipo II
IGF- I R	Receptor para IGFs tipo I
IGFs	Factores de Crecimiento semejantes a la Insulina

MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos.
MBP	Proteína mielina básica.
MEK	Proteína quinasa de MAPKs.
MPA	Acetato de Medroxiprogesterona
NDF	Factor de diferenciación neu
p180^{erbB-3}	Proteína codificada por el erbB-3
p180^{erbB-4}	Proteína codificada por el erbB-4
p185^{erbB-2}	Proteína codificada por el erbB-2
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PDGF	Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas
PDGF- R	Receptor para PDGF
pERK	ERK fosforilada
PI-3K	Fosfatidil Inositol 3-Quinasa
PIP₃	Fosfatidil Inositol 4,5 bifosfato
PRE	Elemento respondedor a progesterona
RE	Receptor de estrógenos
R-EGF	Receptor de EGF
RP	Receptor de Progesterona
RTKs	Receptores con Actividad de tirosina -quinasa
RTKs-I	Receptores con Actividad de tirosina -quinasa tipo I
RTKs-II	Receptores con Actividad de tirosina -quinasa tipo II
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEM	Error estándar de la media
SFBch	Suero Fetal Bovino adsorbido con carbón activado
SH2	Dominio de homología src- 2
Shc	Proteína que contiene SH2
SODNs	Oligonucleótidos Sentido
SRE	Elemento de respuesta a esteroides.
TGF-α	Factor de Transformación tipo α
TGF-β	Factor de Transformación tipo β
Tk	timidina quinasa
tRNA	ARN de transferencia

INTRODUCCIÓN

CÁNCER DE MAMA

La transformación neoplásica resulta de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas, que conducen finalmente al crecimiento no controlado y a la diseminación metastásica de las células tumorales. Dado que los cambios moleculares asociados con el cáncer de mama son heterogéneos, ha sido muy difícil caracterizar patrones comunes asociados a la progresión del carcinoma mamario. Esta situación, sumada a la dificultad de encontrar asociaciones entre las modificaciones moleculares presentes en las neoplasias mamarias y la fisiología de la glándula mamaria, ha frenado considerablemente el progreso en el conocimiento de la biología de la carcinogénesis mamaria. Cabe destacar que, existen pocos modelos experimentales de progresión del carcinoma mamario bien caracterizados. Este ansia de conocimiento va mucho más allá del simple interés académico, dado que el cáncer de mama es una enfermedad con una altísima incidencia. Solamente en Estados Unidos 180,000 mujeres enferman anualmente y su incidencia es de 1 cada 8 mujeres que vivan hasta los 85 años. Por razones tanto humanitarias como económicas la investigación en todos los aspectos de la función de la glándula mamaria y del proceso de transformación neoplásica es considerada prioritaria.

A pesar de los avances reportados en la detección temprana y en el tratamiento del cáncer de mama, el índice de mortalidad ha variado poco en las últimas décadas. Desafortunadamente, a diferencia de lo que sucede en cáncer de pulmón donde hay una asociación directa entre el cigarrillo y la incidencia de la enfermedad, para el carcinoma mamario no se conoce un agente etiológico mayor. Los estudios epidemiológicos han identificado varios factores de riesgo, incluyendo la influencia hormonal. No obstante todos estos factores considerados en forma conjunta, sólo pueden correlacionarse con un tercio de los casos de cáncer de mama.

Estudios realizados en modelos animales y en humanos han indicado que se requiere un entorno hormonal adecuado para la proliferación de las células epiteliales mamarias. Este es también un requisito previo para la inducción de la carcinogénesis (Dickson, Lippman, 1995).

INTRODUCCIÓN.

La influencia de los estrógenos en el desarrollo del cáncer de mama ha sido establecida hace tiempo. Sin embargo, estudios más recientes han implicado a ambas hormonas ováricas, estrógenos y progesterona en la génesis de la enfermedad. En modelos murinos de cáncer de mama inducido químicamente o de aparición espontánea, se ha demostrado que, tanto los progestágenos como los estrógenos son capaces de inducir la formación del tumor y de estimular su crecimiento en etapas tempranas (King, 1993; Dickson, Lippman, 1995; Nandi et al. 1995; Medina, 1996). Así, el concepto primitivo que consideraba a los estrógenos inductores y a la progesterona protectora en el carcinoma mamario, se encuentra actualmente en proceso de revisión. Es más, en los estudios de proliferación y desarrollo de la glándula mamaria normal durante el ciclo menstrual se han encontrado más evidencias que refuerzan la hipótesis de una función de los progestágenos en la transformación neoplásica del epitelio mamario. La actividad mitótica del epitelio mamario humano es máxima en la última fase secretoria del ciclo menstrual cuando las concentraciones séricas de estrógenos y progesterona son máximas. Una ola sincrónica de apoptosis epitelial sigue después de que termina la proliferación. Se postula que podría existir una relación semejante entre niveles de estrógenos y progesterona y proliferación en el ciclo más corto de los roedores. Es interesante tener en cuenta que los ciclos de proliferación y apoptosis en la glándula mamaria están desfasados con respecto al endometrio (donde las mitosis se registran principalmente en la fase folicular). Actualmente, uno de los aspectos más interesantes en el estudio de la influencia hormonal en el carcinoma mamario es dilucidar la función precisa de los progestágenos en la génesis de la enfermedad (Dickson, Lippman, 1995) (King, 1993; Nandi et al. 1995; Medina, 1996). Esta necesidad es aún más evidente cuando al analizarse los datos de la suplementación con progestágenos en la terapia de reemplazo endocrina de pacientes post-menopáusicos, éstos sugieren que dicha terapia podría aumentar el riesgo de cáncer mamario (Bergkvist et al. 1989).

RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS.

Debido al interés en la familia de receptores de hormonas esteroideas (SHR) tanto como proteínas involucradas en la regulación de la transcripción de genes como por sus implicancias clínicas en enfermedades relacionadas con la función endócrina, estas proteínas han sido estudiadas en forma intensiva. Así, los SHR ejercen su influencia en el desarrollo embrionario y en la homeostasis del adulto como reguladores transcripcionales activados por hormonas. Sus dominios estructurales que incluyen un dominio de unión al ADN (DBD), una secuencia de localización nuclear, un dominio de unión al ligando (LDB) y varios sitios con función de activadores transcripcionales (AFs) están conservados dentro de la familia de receptores nucleares (FIG.1). Sólo los SHRs tienen la habilidad de unirse luego de la activación a secuencias palindrómicas de ADN llamadas elementos de respuesta a hormonas (HRE) exclusivamente como homodímeros al menos *in vivo*. Los receptores para glucocorticoides, mineralocorticoides, progesterona y andrógenos reconocen la misma secuencia de ADN (AGAACA como hemi-sitio), mientras que el ER reconoce a la secuencia AGGTCA, idéntica al hemi-sitio que reconocen los receptores nucleares no esteroideos. Los hemi-sitios son distinguidos por varios aminoácidos de una hélice de reconocimiento (Pbox) que está coordinada por un dedo de zinc y hace contactos específicos entre las bases en el surco mayor. Un segundo átomo de zinc organiza tanto a una α -hélice como al dominio de dimerización. Luego de unirse al ADN, el receptor interactuaría con la maquinaria de transcripción basal y con factores de transcripción específicos de secuencia. Se ha mostrado que los SHRs interactúan *in vitro* directamente con componentes del complejo de iniciación de la transcripción (Tsai and O'Malley, 1994). Existe también evidencia de la existencia de coactivadores que actuarían como puentes entre los SHRs y el complejo de iniciación de la transcripción. Así, una cantidad de este tipo de factores intermediarios que interactúan con el AF2 en el extremo carboxiterminal del SHR en forma agonista-dependiente han sido identificados (Halachmi et al., 1995).

Cabe destacar que los SHR pueden existir en conformaciones transactivantes o transrepressoras en las que el dominio de activación está velado.

En contraste con los otros receptores nucleares, todos los SHR sin ligando están asociados con un gran complejo multiproteico de chaperonas entre las que se incluyen a la Hsp90 y la inmunofilina Hsp56 (review Pratt, 1993). Las proteínas chaperonas tienen una función importante en mantener al SHR funcional.

La generación de ratones mutantes para los SHR indica que sólo la falta del receptor de glucocorticoides es letal para los embriones.

Además el estudio de ratones deficientes en los receptores de hormonas sexuales indicaría que la ausencia de estos receptores no es letal y que esto no afecta el proceso que lleva a la determinación del sexo.

Una incógnita que permanece en discusión es la de los efectos mitogénicos de las hormonas esteroideas, en particular las acciones proliferativas de los estrógenos y progesterona en el útero y las glándulas mamarias. Ha sido descrito que las hormonas ováricas aumentan la transcripción de genes tempranos como c-fos, c-jun y ciclina D1. La interrupción de la síntesis de la ciclina D1 previene la proliferación de la glándula mamaria durante la preñez (Sicinsky et al., 1995).

RECEPTOR DE PROGESTERONA.

El receptor de progesterona (RP) es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la familia de receptores nucleares (Evans, 1988). En ausencia de hormona, el receptor transcripcionalmente inactivo permanece asociado al gran complejo de las proteínas de shock térmico en el núcleo de las células blanco (Smith et al., 1990). Luego de la unión de la hormona, el receptor se disocia del complejo, dimeriza y se une a los elementos respondedores a progesterona (PRE) presentes en las regiones reguladoras de los genes blanco (Beato et al., 1987; McDonnell et al., 1995). Una vez unido al ADN, el RP en forma de dímero entra en contacto con los componentes de la maquinaria de transcripción ya sea directa (Ing et al., 1992) o indirectamente via cofactores tales como co-activadores o co-represores (Oñate et al., 1995; Smith et al., 1996; Voegel et al., 1996; Hardin et al., 1997) y modula tanto

positiva como negativamente la transcripción de esos genes. Todos estos procesos están acompañados por fosforilaciones en residuos serina y treonina. Una vez que se une el ligando existen por lo menos tres etapas de fosforilación del RP (FIG.2).

A toda esta vía de transducción de señales debe agregarse un factor más de complejidad ya que el RP está presente en dos isoformas tanto en ratones como en humanos; la isoforma A de 94kDa en humanos (hPRA) y la B de 120kDa en humanos (hPRB) (Lessey et al., 1983). hPRA es una forma truncada de la B a la que le falta una porción del dominio aminoterminal desde los aminoácidos 1 hasta el 164. Las dos isoformas se transcriben a partir del mismo gen en dos sitios alternativos de inicio de la transcripción presentes en dos promotores distintos (Kastner et al., 1990; Gronemeyer et al., 1991). A pesar de que ambas isoformas tienen afinidades por el ADN similares (Christensen et al., 1991), ellas parecerían tener en varios casos actividad transcripcional opuesta (Tung et al., 1993; Vegeto et al., 1993; Chalbous et al., 1994; McDonnell and Goldman, 1994; Wen, Xu et al., 1994). En la mayoría de los contextos, hPRB funciona como un activador de los genes respondedores a progesterona, mientras que hPRA permanece inactivo (Tung et al., 1993; Vegeto et al., 1993). Además, hPRA puede también funcionar como un fuerte trans-represor de la actividad transcripcional de hPRB (Vegeto et al., 1993) y de hER en presencia tanto de agonistas como de antagonistas del RP (Giangrande et al., 1997; McDonnell et al., 1994; Vegeto et al., 1993; Wen et al., 1994).

Los receptores de progesterona han sido detectados en útero, ovario, glándula mamaria, hipotálamo, hipófisis. De los estudios llevados a cabo en animales mutantes nulos construidos por ingeniería genética (*knock-out*) para el RP se pudieron extraer conclusiones sobre la función de este receptor en los distintos órganos donde se expresa. Así, estos animales mostraron que RP es esencial para la fertilidad femenina ya que presentan incapacidad para ovular, hiperplasia e inflamación uterina, defectos en la implantación, incompleta morfogénesis de la glándula mamaria, pérdida de las respuestas de comportamiento sexual ante un estímulo con progesterona y una falta de adaptación inmune del timo ante la preñez (Lyndon et al., 1995)

En lo que respecta específicamente a la glándula mamaria, los RPs tienen una función importante en la proliferación del epitelio ductal y son esenciales para la diferenciación alveolar de los lóbulos que ocurre durante la preñez. A lo largo del desarrollo postpuberal, los RPs se expresan sólo en cúmulos de células epiteliales a lo largo del epitelio ductal que parecen segregadas de las células epiteliales en proliferación (Seagroves et al., 2000). Este patrón de expresión sugiere que la regulación de la proliferación de células epiteliales por progesterona podría ocurrir a través de un mecanismo paracrino donde los RPs expresados en células no proliferativas inducirían la expresión de señales mitogénicas que promoverían la proliferación de células vecinas (Coneely et al., 2001). Los experimentos con *knock-out* para PR aportaron evidencias que apoyan esta hipótesis ya que se demostró que: (1) Los RPs que se expresan en el epitelio mamario y no en el compartimento estromal son necesarios para el desarrollo de las ramificaciones de los ductos; y (2) que mientras el epitelio mamario de los ratones deficientes en RP no pueden producir la ramificación de los ductos, experimentos mixtos utilizando este tipo celular y células normales demostraron que este defecto puede revertirse cuando las células provenientes de los animales *knock-out* son cultivadas en contacto cercano con las células RP positivas (Briskin et al., 1998).

Es importante destacar que los estudios con los ratones *knock-out* permitieron saber que la isoforma B del RP es la encargada de llevar a cabo la proliferación y la diferenciación normal del epitelio mamario en respuesta a progesterona y ninguno de estos procesos parece requerir la expresión funcional de la isoforma A de esta proteína (Mulac-Jericevic et al., 2000).

ÓRGANOS BLANCO Y RESPUESTA A LA PROGESTERONA.

Las hormonas esteroideas controlan muchos eventos metabólicos y biosintéticos. Estas respuestas parecen ser reguladas por la unión de los esteroides a sus respectivos receptores.

En lo que respecta a la función uterina, la progesterona actúa modificando y redirigiendo el crecimiento celular y la actividad biosintética del útero. La progesterona inhibe la mayor proliferación del epitelio uterino inducido por estrógenos y convierte al endometrio en un tejido secretorio. En este estadio

progestacional, el endometrio está ahora listo para la implantación del blastocito y el consiguiente mantenimiento de la preñez. Las funciones de la progesterona dependen de una elevación previa de los niveles del RP inducido por estrógeno. La progesterona disminuye luego los niveles tanto de estrógeno como de su propio receptor.

En relación con la glándula mamaria, se ha visto que la interrupción de la expresión de la ciclina D1 previene la proliferación de la glándula mamaria durante la preñez (Sicinsky et al., 1995) y conduce a un fenotipo similar al observado en ratones²⁴deprivados de RP (Lyndon et al., 1995). Las vías de señalización que llevan a la activación de la ciclina D1 están en investigación y pueden ser un área importante a tener en cuenta para una terapia contra el cáncer.

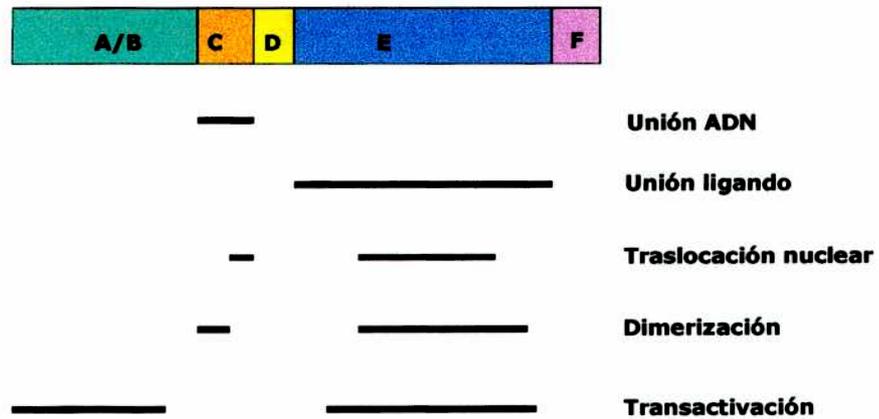


Figura 1: Receptores de hormonas esteroideas.

Esquema de un prototipo de receptor para hormonas esteroideas indicando sus dominios estructurales y la función biológica asignada.

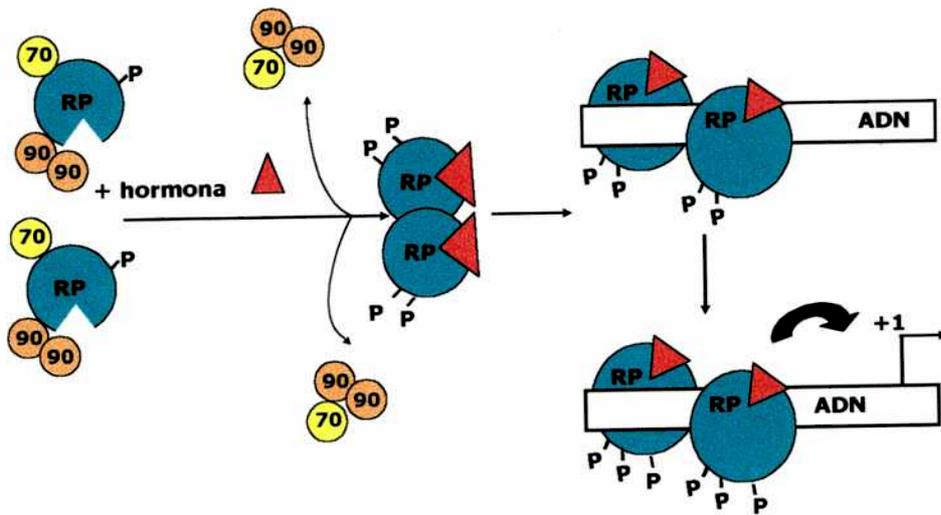


Figura 2: Modelo de acción de receptor de progesterona.

En presencia de la hormona, el RP se fosforila y se disocia de las proteínas chaperonas (hsp90 y 70 entre otras). Luego dimeriza y se une a los elementos respondedores (PRE) presentes en los promotores de los genes cuya transcripción regula. Se produce una ronda más de fosforilación y comienza el reclutamiento de las proteínas necesarias para el comienzo de la transcripción.

FACTORES DE CRECIMIENTO, RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO, Y ONCOGENES EN EL PROCESO DE CARCINOGENESIS MAMARIA.

Los factores de crecimiento (GFs) constituyen un grupo de polipéptidos involucrados en la regulación de la proliferación y de la diferenciación celular. Los GFs actúan a través de receptores de membrana (GF-R) con actividad de tirosina o serina/treonina quinasas. La unión del GF a su receptor inicia una cascada de quinasas intracelulares que conduce a la regulación de la síntesis de ADN. A diferencia de las hormonas polipeptídicas, los GFs pueden actuar como factores i) autocrinos (o intracrinos), actúan sobre la misma célula que los sintetiza, a través de receptores de superficie o intracelulares, ii) paracrinos, actúan uniéndose a receptores presentes en células próximas a las que los sintetizan y, iii) yuxtacrinos, permanecen anclados en la membrana de la célula que los expresa y ejercen su acción biológica uniéndose a receptores presentes en células vecinas.

Entre las neoplasias malignas, el cáncer de mama constituye un modelo extraordinariamente atractivo para el estudio de la participación de los GFs en el proceso de transformación neoplásica. En efecto, uno de los pilares centrales de la acción de las hormonas esteroideas es la capacidad de estas hormonas sistémicas de regular la producción local de GFs en la glándula mamaria. La interacción de estos factores con los productos de otros genes inducidos hormonalmente dentro del contexto estructural de la mama regula su función glandular y muchas veces participan en el desarrollo del cáncer (Dickson, Lippman, 1995).

La mayoría de los GFs involucrados en el desarrollo del cáncer de mama son polipéptidos mitogénicos tales como: **A-** Factores de crecimiento que se unen a los receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I. Esta familia está compuesta por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de transformación tipo alfa (TGF- α), heregulina (HRG), anfiregulina, betacelulina, un EGF capaz de unirse a heparina (HB-EGF), cripto-1 y una serie de factores codificados por virus, entre los que se encuentran el factor de crecimiento del virus vaccinia, y del fibroma de Shope, **B-** Factores de crecimiento semejantes

a la insulina tipo I y II (IGF-I, IGF-II) C- Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y D- Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), que comprenden el FGF-1 o ácido, FGF-2 o básico, FGF-3, FGF-4 y FGF-5. Por el contrario, los factores de transformación tipo β (TGF- β) son los agentes más firmemente postulados como inhibidores de la proliferación en cáncer de mama (Dickson, Lippman, 1995).

Muchas de las evidencias más convincentes relacionando los GFs y el cáncer han sido proporcionadas por la gran cantidad de trabajos experimentales que asocian GFs y oncogenes.

En efecto, la clase I de protooncogenes codifica para GFs y la Clase II para receptores de GFs.

Entre las proteínas oncogénicas de la Clase II, se encuentran las que codifican para receptores de GFs con actividad de tirosina-quinasa, ampliamente relacionadas con la etiología del cáncer de mama.

RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO CON ACTIVIDAD DE TIROSINA QUINASA

Los receptores con actividad de tirosina quinasa (RTKs) forman una familia numerosa de receptores de membrana a los que se unen la mayoría de los GFs y también una hormona proteica, la insulina. Estos receptores participan en la normal regulación del crecimiento celular, la morfogénesis y la diferenciación. El análisis de la estructura de los RTKs ha revelado que todos poseen un dominio extracelular altamente glicosilado donde está localizado el sitio de unión del ligando (extremo amino-terminal), un dominio hidrofóbico anclado a la membrana plasmática y un dominio citosólico en el cual se localiza el sitio catalítico con actividad de tirosina quinasa (extremo carboxi-terminal).

En base a la similitud en su secuencia y diferentes características estructurales, se clasifican en 4 subclases (Ullrich, Schlessinger, 1990): la familia RTKs de tipo I comprende al receptor del factor de crecimiento epidérmico (R-EGF o ErbB-1), al ErbB-2, al ErbB-3 y al ErbB-4; a la de tipo II pertenecen entre otros el receptor de insulina y el receptor del factor de

crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF -R I), los miembros más importantes de los receptores de tipo III son los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R A y PDGF-R B) mientras que los de tipo IV incluyen a los receptores de los factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico (FGF-R, flg y bek). Se ha encontrado una gran variedad de alteraciones estructurales en oncogenes derivados de estos receptores que lleva a su activación constitutiva y a la consecuente disregulación de los mecanismos de control del ciclo celular y de las señales del receptor favoreciendo el desarrollo del cáncer. En ese marco, el estudio de la regulación de la activación del receptor y de sus señales de transducción adquiere mayor importancia.

FAMILIA DE RECEPTORES CON ACTIVIDAD DE TIROSINA QUINASA TIPO-I (RTKs-I)

La unión del ligando a los RTKs-I lleva a la dimerización, activación de la actividad de tirosina -quinasa y la autofosforilación de los residuos tirosina de los receptores.

Los cuatro miembros de la familia de RTKs-I o familia de receptores ErbBs comparten una estructura molecular que incluye un gran dominio extracelular glicosilado con dos dominios ricos en cisteína (CRDs), una región simple de transmembrana (TM) y una larga extensión citoplasmática que contiene los sitios de tirosina-quinasa y de autofosforilación. El sitio de unión al ligando está confinado al dominio inter-CRD (dominio III) y el extremo N-terminal, por lo menos en el caso del ErbB-1. El dominio III está relativamente conservado, a pesar de las notables diferencias de especificidad de ligando. El dominio catalítico de tirosina quinasa (TK) también está relativamente conservado entre los miembros de esta familia, pero la región lateral a la yuxtamembrana y el extremo C-terminal, que se auto - o trans-fosforila, muestra variaciones en la secuencia (FIG. 3).

A pesar de que la estructura primaria está bastante conservada, cada uno de estos cuatro receptores tiene rasgos funcionales únicos. El más importante

es la potencia y especificidad de sustrato de la actividad de tirosina-quinasa. El ErbB-3, a diferencia de los demás, prácticamente carece de actividad de tirosina quinasa aunque es capaz de unir ATP (Guy et al. 1994). Contrariamente, el ErbB-2 posee una alta actividad de tirosina-quinasa basal. Las secuencias de aminoácidos linderas a los sitios de autofosforilación de cada receptor también son notablemente diferentes, pues estas regiones determinan la identidad de las proteínas de señalización con homología Src 2 (SH2) que se asocian con cada receptor; esta diversidad conduce a especificidad en la vía de señalización (Carraway, Cantley, 1994). El ErbB-3 es el único miembro de esta familia que posee la capacidad de activar la fosfatidil inositol 3 -quinasa (PI-3K) (Carraway, Cantley, 1994; Fedi et al., 1994), lo que le otorga la posibilidad de compartir con los IGFs vías de transducción de señales, pues la activación del receptor tipo I de IGF (IGF-R I) produce la fosforilación de la proteína IRS-1 que finalmente se une a la subunidad regulatoria de la PI-3K (p85) (Backer et al., 1993).

Aparentemente, la ruta celular de cada receptor, luego de la unión del ligando, constituye otra diferencia funcional. Así, aunque el ErbB-1 sufre una rápida internalización, las otras moléculas ErbBs son internalizadas lentamente (Baulida et al., 1996; Pinkas-Kramaski et al., 1996) y pueden ser recicladas para volver a la membrana celular sin degradación significativa del receptor endocitado. Por último, diferentes patrones de expresión caracterizan a los cuatro receptores. El ErbB-2 es el que se expresa en una mayor diversidad de células, mientras que el ErbB-3 se encuentra expresado en varios tipos de células epiteliales y el ErbB-4 está mayormente expresado en células nerviosas, musculares y de la glía. El ErbB-1 está expresado por las células del parénquima del hígado, fibroblastos y células epiteliales de todo tipo.

FAMILIA DE RECEPTORES CON ACTIVIDAD DE TIROSINA QUINASA
TIPO-II (RTKs-II)

Esta familia de receptores está compuesta por los receptores de insulina (IR) y los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGFR-I). Los primeros tiene como ligando a la insulina y los últimos al factor de crecimiento similar a la insulina tanto tipo I como II (IGF-I; IGF-II). Los receptores son proteínas integrales de membrana y están constituidos por dos cadenas α y dos β que se encuentran formando un tetrámero (FIG.4). En este caso el ligando se une al tetrámero y produce fosforilaciones en residuos tirosina presentes en ambas cadenas que llevan a la activación de su vía de transducción de señales como se detalla a continuación (FIG.7). Esta activación es necesaria para el incremento de la captación de glucosa en tejido adiposo y músculo esquelético en respuesta a insulina, o para promover la supervivencia de las células en respuesta a IGF-I (White et al., 1994).

Ratones transgénicos que sobreexpresan al IGF-I y a la isoforma 3 de la proteína ligadora de IGF (IGFBP-3) en la glándula mamaria exhibieron un retraso en la involución y una disminución en la apoptosis (Neuenschwander et al., 1996). Se ha demostrado que el IGF-I estaría involucrado tanto en la proliferación como en la supresión de la apoptosis, y que el IGFBP-3 facilitaría las acciones del IGF-I en la glándula mamaria.

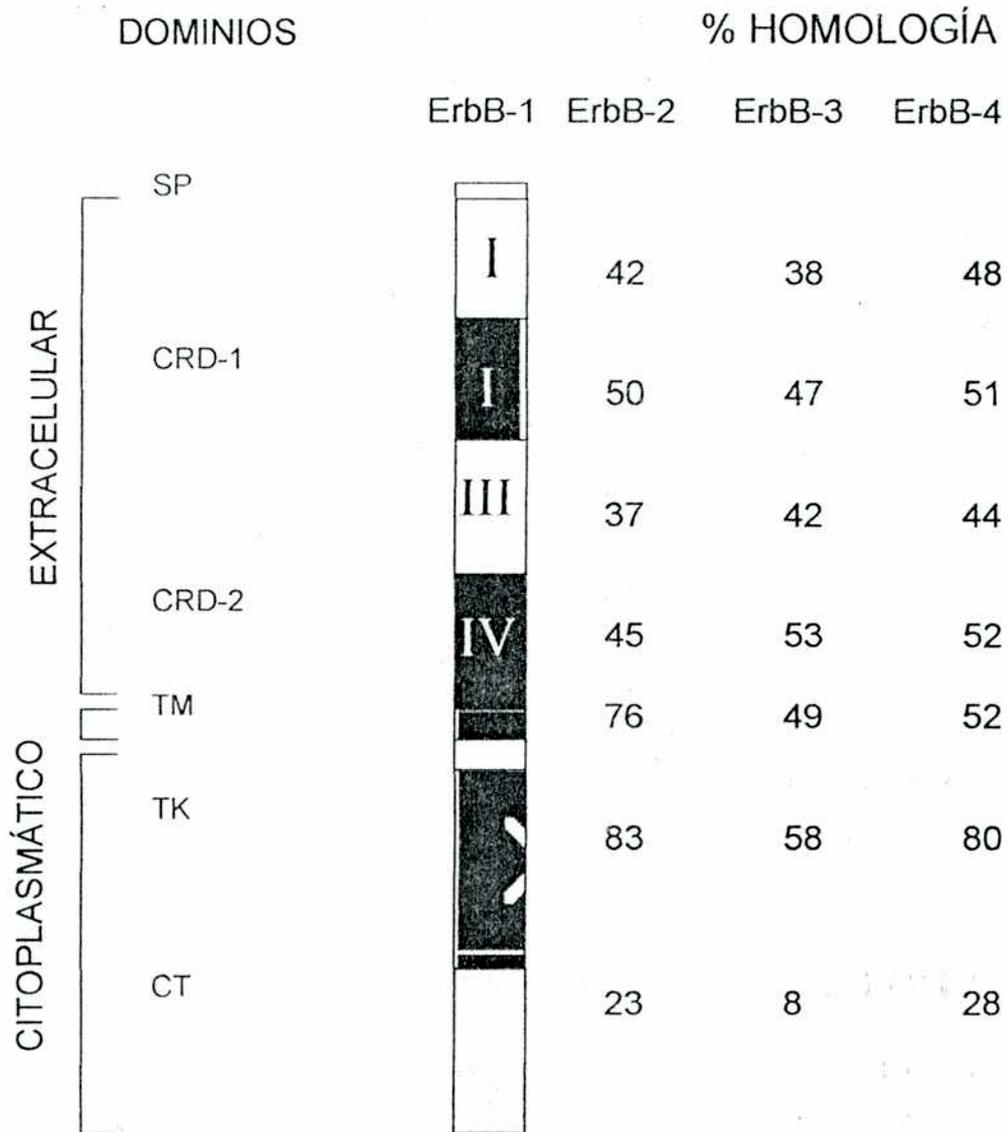


Figura 3: Representación esquemática del dominio estructural de los ErbBs y su homología. Se muestran los siguientes dominios extracelulares: péptido señal N-terminal (SP), dominios ricos en cisteína (CRDs en los dominios II y IV), dominio de transmembrana (TM); el dominio citoplasmático de tirosina quinasa (TK) y el extremo carboxi-terminal (CT). El ErbB-3 es el miembro con menor homología.

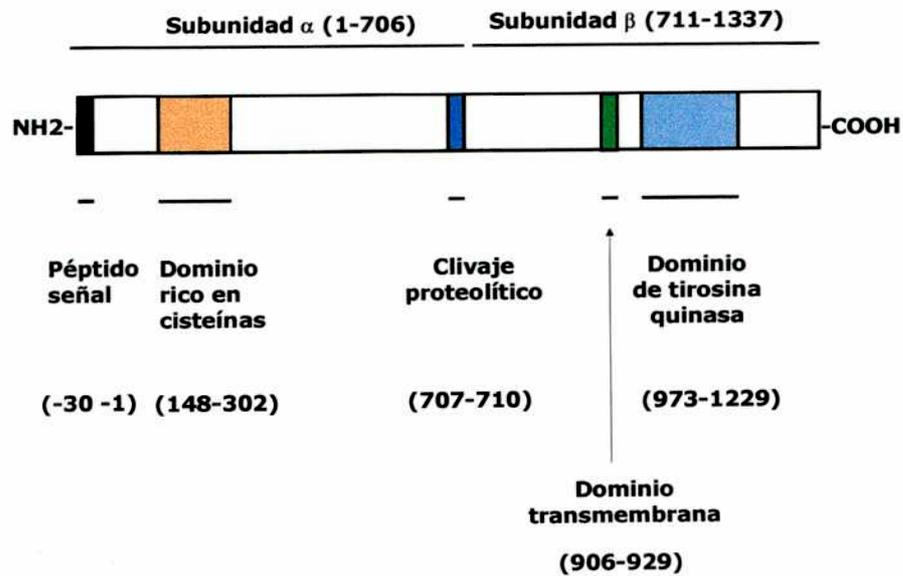


Figura 4: Representación esquemática de los dominios estructurales del precursor del IGF-IR humano.

El dominio de péptido señal es el responsable de transferir la cadena peptídica naciente dentro del retículo endoplasmático. Luego de la digestión por endopeptidasas en el sitio proteolítico de clivaje (Arg-Lys-Arg-Arg) localizado en los residuos 707 al 710, las subunidades α y β son liberadas y unidas por uniones puente disulfuro para otorgarle la conformación de receptor maduro. Se muestran aquí en una representación esquemática además, los dominios ricos en cisteína de la subunidad α y los de transmembrana y de tirosina quinasa de la subunidad β .

LIGANDOS DE LOS RTKs-I: FAMILIAS DEL EGF Y LA HEREGULINA (HRG)

Los ligandos de los RTKs tipo I se caracterizan por tener en su estructura un dominio semejante al EGF (*EGF-like motif*). Este dominio está definido por seis residuos de cisteína espaciados característicamente dentro de una secuencia de 35-50 aminoácidos, formando tres puentes disulfuro. De acuerdo a su especificidad de unión se clasifican en dos familias de ligandos. El primer grupo se une al EGFR e incluye al EGF, el factor de transformación tipo alfa (TGF- α , anfiregulina (AR), betacelulina (BTC), EGF capaz de unirse a heparina (HB-EGF), epiregulina y una serie de factores codificados por pox virus, entre los que se encuentran el factor de crecimiento del virus vaccinia, y del fibroma de Shope.

Tanto el EGF como el TGF- α , se encuentran altamente expresados en los estadios tempranos del desarrollo embrionario y en el sistema nervioso. AR y HB-EGF son factores de crecimiento de 43 y 48 aminoácidos respectivamente, que se unen a heparina. La betacelulina se une y activa al ErbB-1 y puede interactuar también con el ErbB-4 (Riese et al., 1996). La epiregulina fue recientemente purificada de una línea celular tumoral derivada de fibroblastos de ratón (Toyoda H et al., 1995); inhibe el crecimiento de varias líneas tumorales epiteliales y estimula el crecimiento de otras.

La búsqueda de ligandos capaces de activar al ErbB-2 llevó al aislamiento del factor de diferenciación de neu (NDF) del medio de fibroblastos de rata transformados por el oncogen *ras* y de heregulina (HRG) o gp30 del medio de células de cáncer de mama humano (Peles, Yarden, 1993). Luego se encontró que el NDF / HRG activaba al ErbB-2 de manera indirecta a través de la unión a ErbB-3 o ErbB-4. Se aislaron también dos factores neuronales relacionados llamados factor de crecimiento glial (GGF) (Marchionini MA et al. 1993) y el inductor de la actividad del receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls et al., 1993). Todos estos factores son distintas isoformas de una misma proteína generadas por *splicing* alternativos de un único gen ubicado en el cromosoma humano 8 (Orr-Urtregger et al., 1993) y constituyen la familia de heregulinas (HRGs) cuyos receptores son el ErbB-3 y ErbB-4.

Ninguno de los ligandos de estas familias se une directamente al ErbB-2 (Fig. 5).

La dualidad funcional de los ligandos de los ErbBs como factores inhibitorios o estimulatorios ha sido observada en numerosos casos, y el tipo de respuesta biológica dependería de la concentración de ligando, los factores séricos y la presencia y nivel relativo de expresión de los ErbBs presentes en un tipo celular determinado.

HEREGULINAS

La familia de HRGs/NDF1 está compuesta por 15 isoformas generadas por splicing alternativo de un único gen. Como la mayoría de los ligandos del R-EGF, los precursores de la heregulina son proteínas de transmembrana que luego son glicosilados y secretados. Una porción de la molécula es clivada proteolíticamente para dar lugar a la HRG madura que se secreta al medio (Burgess et al., 1995) (FIG.6). La molécula consta de un dominio semejante a la secuencia aminoacídica del EGF cuya variación estructural da lugar a las isoformas α y β , una unidad homóloga a un dominio de la inmunoglobulina, un dominio citoplasmático de longitud variable (isoformas a, b y c) y un tramo adyacente a la yuxtamembrana (isoformas 1 a 4) (Wen et al., 1994).

La HRG/NDF1 es el ligando del ErbB-3 (Carraway et al., 1994) y del ErbB-4 (Plowman et al., 1995).

Recientemente, otras dos familias de heregulinas, NDF2 y NDF3, han sido descritas. Ellas están codificadas por dos genes diferentes al de NDF1/HRG (Chang et al., 1997; Zhang et al., 1997).

Luego de la unión al ligando ambos receptores forman o estabilizan dímeros con el producto del oncogen ErbB-2 ($p185^{erbB2}$). Si bien tanto $p180^{erbB4}$ como $p180^{erbB3}$ son receptores de HRG, el ErbB-4 tiene mayor afinidad por HRG que el ErbB-3, pero el heterodímero $p180^{erbB3} / p185^{erbB2}$ tiene mayor afinidad que cualquiera de las moléculas por separado.

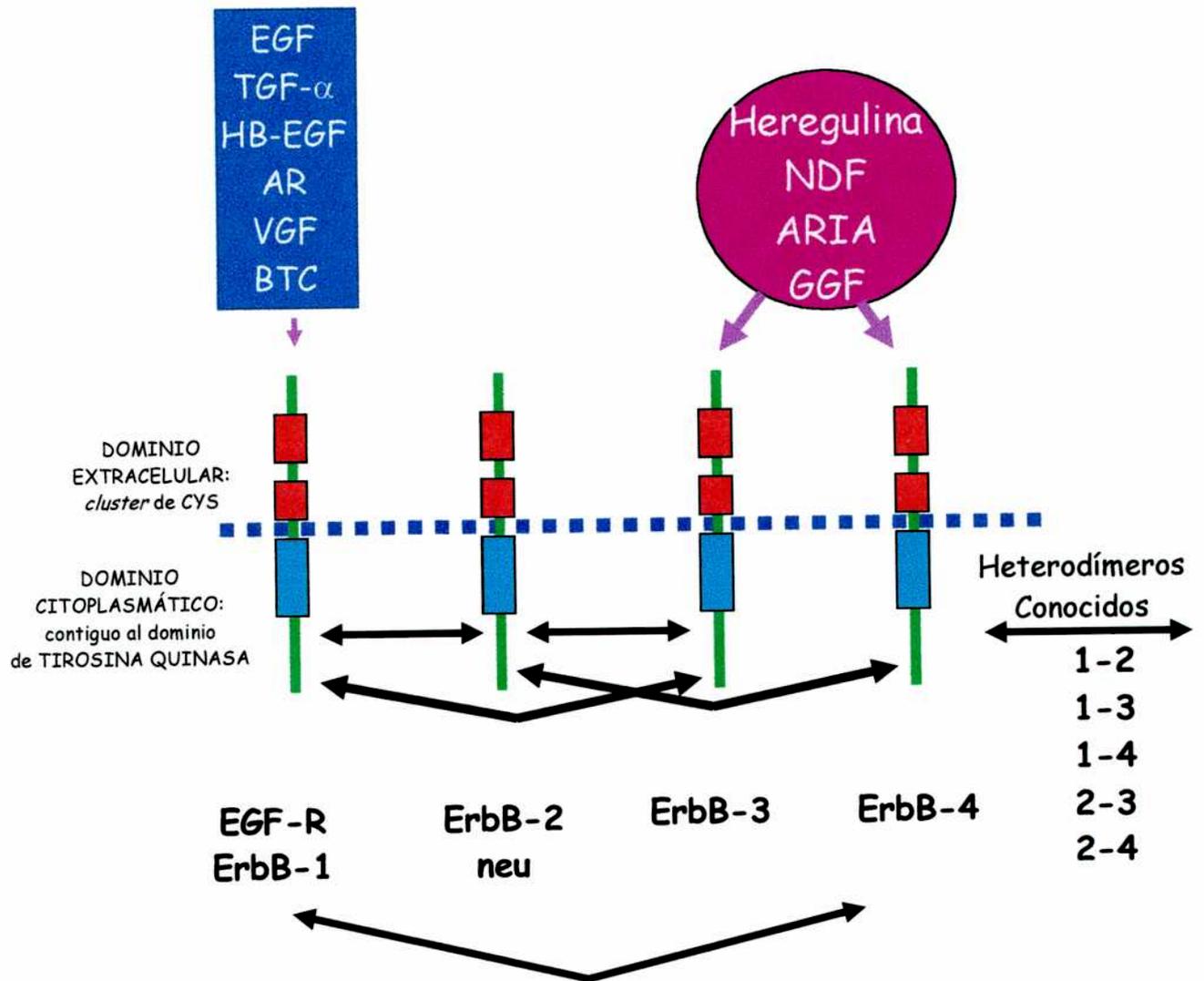


Figura 5: Heterodimerización de receptores con actividad de tirosina -quinasa tipo I.

Las respuestas biológicas a la HRG dependen del tipo celular, la concentración del ligando y la identidad de la isoforma. En la glándula mamaria, la HRG estimula el desarrollo lobuloalveolar y la producción de las proteínas de la leche (Yang et al., 1995) durante la preñez. Si bien el EGF y el TGF- α son expresados por el epitelio mamario, la HRG se expresa en las células del estroma. Se ha visto que HRG puede también inducir la síntesis de componentes de la leche (caseína y lípidos) en ciertas líneas celulares de carcinoma mamario (Wen et al., 1992).

En el sistema nervioso la HRG actúa como mediador paracrino, a altas concentraciones promueve la proliferación de células maduras de Schwann y a bajas concentraciones aumenta su movilidad y previene la apoptosis (Trachtenberg, Thompson, 1996). Por otro lado actúa sobre las sinapsis neuromusculares produciendo efectos más relacionados con la diferenciación celular que con la proliferación.

Consistente con las múltiples funciones biológicas de la HRG, la inactivación del gen en ratones lleva a la muerte del embrión (Meyer, Birchmeier, 1995). Así también, el *knock-out* de su receptor directo, el ErbB-4 y su co-receptor el ErbB-2 tienen efectos similares.

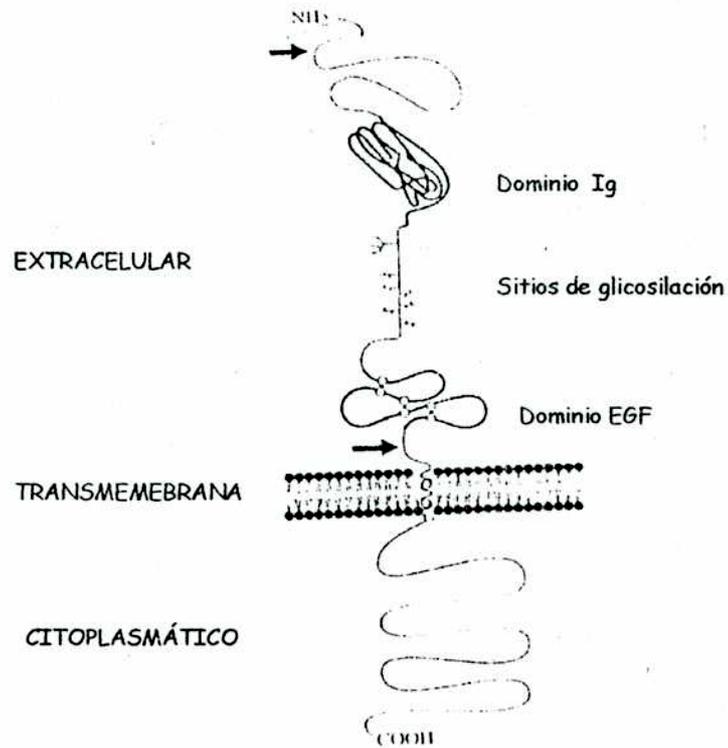


Figura 6: Representación esquemática del precursor de HRG

Los dominos de inmunoglobulina (Ig) y de EGF están representados con línea más gruesa, y los residuos cisteína se indican con círculos. Las flechas indican los sitios de procesamiento del precursor en el extremo N-terminal y el sitio proteolítico putativo cercano a la membrana plasmática.

HEREGULINAS Y CÁNCER DE MAMA

Múltiples evidencias experimentales han demostrado que la HRG está involucrada en la carcinogénesis mamaria. Se ha detectado su expresión en tumores primarios humanos (Holmes et al., 1992; Lewis et al., 1996).

Las isoformas β de HRG y en menor proporción α , son mitogénicas para algunas líneas de cáncer de mama humano y para líneas mamarias epiteliales no transformadas (Mincione et al., 1996; Peles et al., 1992). Así, la línea tumoral de cáncer de mama de ratón HC11, las líneas humanas MCF-10A, SK-BR-3, MCF-10 y T47D proliferan al ser tratadas con HRG; mientras que en la línea AU-565, la HRG produce la aparición de un fenotipo diferenciado y la expresión de moléculas de adhesión intercelular -1 (ICAM-1) (Peles et al., 1992; Bacus et al., 1993). El hecho de que en los tumores de mama primarios que co-expresan HRG e ICAM-1 no haya complicación de los ganglios linfáticos sugiere que la inducción de ICAM-1 por HRG afectaría la capacidad de estos tumores de formar metástasis (Bacus et al., 1993)

El ARNm de HRG fue hallado tanto en tejido de mama normal como tumoral pero la distribución de su expresión se encuentra restringida; existen dos líneas de cáncer de mama humano carentes de RE que expresan altos niveles de HRG, mientras que sólo en una línea que expresa RE se han detectado bajos niveles de ARNm de HRG. En las células MCF-7, su expresión no se ve afectada por el tratamiento con 17α estradiol (Normanno et al., 1993). Se han descrito interacciones entre las vías de señalización de la HRG y la vía de señalización de los RE. El tratamiento con HRG de líneas de cáncer de mama hormono-dependientes disminuye la expresión del RE tanto a nivel ARNm como proteína (Pietras et al., 1995; Saceda et al., 1996) y el tratamiento con HRG disminuye la expresión de ErbB-2 (Grunt et al., 1995)

Se ha detectado expresión de HRG en aproximadamente 25-30% de los carcinomas primarios de mama, en los cuales existe una fuerte correlación con la expresión de ErbB-4 (Normanno et al., 1995). La transformación de las líneas epiteliales mamarias de ratón NOG-8 y humana MCF-10A con el

gen mutado c-Ha-ras o con el proto-oncogen ErbB-2 da lugar a una expresión aumentada de HRG (Mincione et al., 1996). La sobreexpresión de HRG- β 1 en las células MCF-7 de cáncer de mama conduce al desarrollo de un fenotipo hormono- independiente debido a una regulación negativa de la expresión del receptor de estrógenos (Pietras et al., 1995). Recientemente se han generado ratones transgénicos que sobreexpresan HRG- β 2 (Krane, Leder, 1996) en los cuales existe una persistencia anormal de los brotes terminales de la glándula mamaria. Estos ratones desarrollan adenocarcinomas mamarios, a una edad promedio de 12 meses, luego de varias preñeces.

RTKs-I Y CÁNCER DE MAMA

El ErbB-2 parece estar críticamente involucrado en el crecimiento y diferenciación del cáncer de mama humano. La amplificación y sobreexpresión del ErbB-2 encontrada en el 20-30% de los tumores de mama humanos, tiene valor pronóstico, predictivo y de relevancia terapéutica. Su sobreexpresión se asocia a mal pronóstico (Slamon et al., 1987). Es el único gen de la familia que se encuentra frecuentemente amplificado en cáncer de mama, aproximadamente el 90% de los tumores sobreexpresan el gen como resultado de su amplificación. La participación de ErbB-2 en la carcinogénesis mamaria ha sido establecida en estudios en los cuales se ha alterado su expresión endógena o en experimentos de transfección que han conducido a un aumento de la tumorigénesis (Pinkas-Kramaski et al., 1997). Contrariamente al EGFR, el ErbB-2 se expresa a niveles muy bajos en tejidos normales y lesiones hiperproliferativas benignas. Esto sugiere que su expresión está bajo estricta regulación en la mama normal. Como en el caso del R-EGF, la amplificación y sobreexpresión del ErbB-2 está asociada a la ausencia de RE y RP. (Hynes, 1993; Hynes, Stern, 1994). Datos provenientes de estudios con tumores de mama indican que la expresión del ErbB-2 no sólo está regulada hormonalmente, sino que también están involucrados otros factores y niveles de regulación. En el cáncer de mama metastásico la

estricta regulación en la mama normal. Como en el caso del R-EGF, la amplificación y sobreexpresión del ErbB-2 está asociada a la ausencia de RE y RP. (Hynes, 1993; Hynes, Stern, 1994). Datos provenientes de estudios con tumores de mama indican que la expresión del ErbB-2 no sólo está regulada hormonalmente, sino que también están involucrados otros factores y niveles de regulación. En el cáncer de mama metastásico la expresión de ErbB-2 está asociada con un alto índice mitótico y una respuesta clínica pobre a ciertos agentes quimioterapéuticos como el cisplatino y la ciclofosfamida (Hynes, Stern, 1994; Lupu et al., 1996) y a insensibilidad a tamoxifeno (Dickson, Lippman, 1995; Pinkas-Kramaski et al., 1997).

Si bien los otros dos miembros de esta familia de receptores, ErbB-3 y ErbB-4 se han detectado en cáncer de mama, aún no se conoce su implicancia en el desarrollo de la tumorigénesis mamaria ni tampoco su significación clínica en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, aunque estudios recientes proporcionan indicios de algunas correlaciones (Lemoine et al., 1992; Bacus et al., 1994; Gasparini et al., 1994). El ErbB-3 y el ErbB-4 están expresados en un alto porcentaje de cánceres de mama. (96% y 75% respectivamente). Se encontró sobreexpresión del ErbB-3 en un 20 % de cánceres de mama, aparentemente debido a expresión aumentada del gen. La frecuente expresión conjunta de ErbB-2 y ErbB-3 sugiere algún tipo de participación del heterodímero en cáncer de mama (Gasparini et al., 1994). Se ha asociado positivamente alta expresión de ErbB-3 con alto índice de metástasis (Lemoine et al., 1992) pero carece de valor pronóstico. Por el contrario la expresión de ErbB-4 y HRG se asocia a factores de buen pronóstico como es el caso de la presencia de los receptores de estrógenos y progesterona (Bacus et al., 1994).

MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE RTKS

La cascada de transducción de señales de un receptor con actividad de tirosina quinasa comienza cuando es ocupado por alguno de sus ligandos. Esta ocupación resulta en una alteración de su conformación tridimensional en la membrana plasmática. Como consecuencia, se produce la dimerización del

receptor, que parece ser un paso crítico en la activación de los receptores con actividad de tirosina quinasa.

Una particularidad de los RTK tipo I es que entre ellos pueden formarse homo y heterodímeros. Los componentes de esos dímeros son elegidos por el ligando, y esta propiedad permite a su vez reclutar en forma combinatorial diferentes moléculas de señalización. Se ha reportado la existencia de por lo menos 10 combinaciones distintas de homo y heterodímeros de la familia ErbB. Sin embargo, esta red de interacciones inter-receptores posee una determinada jerarquía y no un patrón al azar. ErbB-2 parece ser el integrante preferido de los heterodímeros formados con los otros tres integrantes de la familia.

Al producirse la dimerización de los RTK inducida por la unión del ligando, la actividad de quinasa de cada monómero del receptor fosforila residuos tirosina localizados en el extremo carboxi-terminal del dominio intracitoplasmático en la molécula de su dímero asociado. A este proceso, se lo denomina autofosforilación.

Uno de los descubrimientos más críticos para dilucidar cual es el paso siguiente en el mecanismo de transducción de señales, ha sido la identificación de un dominio llamado SH2 (src-homología 2) en una serie de proteínas celulares que se han encontrado asociadas a los receptores a través de residuos fosfotirosina presentes en el receptor. A este dominio se lo ha llamado así dada su homología con una secuencia aminoacídica de la proteína citosólica con actividad de tirosina quinasa codificada por el oncogen *src:pp60^{src}*. De esta forma, el receptor fosforilado en tirosina, en el caso de los de la familia de ErbB y del receptor de PDGF (PDGF-R), es reconocido por proteínas que al poseer el dominio SH2 se le asocian directamente. Estas proteínas que asocian al receptor activado con otras moléculas de señalización, pero que carecen ellas mismas de actividad enzimática y se las denomina proteínas adaptadoras. En otros casos, como el del receptor de insulina y el receptor de IGFs tipo I (Myers Jr, White, 1993), se requiere la presencia de proteínas de "docking" (acercamiento). Esa proteína de docking de 185 Kda, denominada IRS-1 (sustrato del receptor de insulina-1) posee 21 sitios potenciales de fosforilación en residuos tirosina, 6 de los cuales están localizados en la secuencia YMXM

(Tirosina-Metionina-X-Metionina) que es una secuencia de reconocimiento para las proteínas que poseen el dominio SH2. También está involucrada en la cascada de señales de transducción de receptores con actividad de tirosina quinasa, y de una serie de tirosinas quinasas citoplasmáticas, una familia de proteínas adaptadoras que se denomina Shc (proteína que contiene dominios con src-homología 2). La familia Shc está compuesta por tres proteínas de 46, 52, y 66 kDa que poseen un sólo dominio SH2 y que carecen de actividad catalítica. Ha sido demostrado que Shc se asocia y es fosforilada por el R-EGF y R-PDGF. No se ha demostrado en cambio una asociación directa de Shc con el receptor de IGFs tipo I ni tampoco se ha descrito asociación entre IRS-1 y Shc. Dentro de las proteínas adaptadoras del grupo SH2 se ha identificado recientemente la denominada Grb2 (proteína unida a receptor de factor de crecimiento-2) como la proteína primaria que se une o bien al receptor fosforilado en tirosina, o a IRS-1 o Shc. Grb-2 es una proteína citoplasmática que está asociada a otra proteína, un intercambiador de nucleótidos de guanina, llamada Sos. El complejo RTK-Grb2-Sos (o bien IRS-1/Grb2/Sos) se une a su vez a la proteína p21^{ras} activándola mediante el intercambio de GDP por GTP. La superfamilia de las proteínas p21^{ras} (H-,K-and N-Ras) unen GDP y GTP con alta afinidad, ciclando entre los estados activo e inactivo a través de la unión con GTP o GDP respectivamente. Poseen a su vez un nivel bajo de actividad intrínseca de GTPasa que puede ser estimulado más de 100 veces por interacción con la proteína citosólica activadora de GTPasa (GAP). Ciertos efectos inhibitorios de TGF- β , cuyo receptor carece de actividad de tirosina quinasa, están también mediados por activación de ras.

El próximo paso en el camino de señales de transducción, es la asociación entre p21ras-GTP y la proteína producto del proto-oncogen raf-1. Permanece todavía sin dilucidar completamente cómo la formación de este complejo podría activar a raf-1, que es una proteína citoplasmática de 72-76 kDa con actividad intrínseca de serina/treonina quinasa. Raf-1 activa luego una cascada de fosforilación llamada la cascada de MAP quinasas (Blenis, 1993)(MAPK, proteínas quinasas activadas por mitógenos). A este camino también se lo llama camino de señalización de ras. (Boguski, McCormick, 1993) La mejor caracterizada de estas quinasas, en el extremo superior de la cascada, se denomina MEK (una quinasa de MAP quinasas). MEK es fosforilada por Raf-1

(probablemente también por otros mecanismos) y una vez activada por fosforilación activa a las MAPK (p44MAPK y p42MAPK) a través de una fosforilación dual en residuos tirosina y treonina específicos localizados en un motivo característico Thr-Glu-Tyr. La fosforilación tanto en Thr 183 como en Tyr 185 se requiere para una completa actividad enzimática de MAPK. La fosforilación de las MAPK conduce a su translocación al núcleo donde fosforilan, en residuos serina/treonina, proto-oncogenes tales como c-myc, c-jun p62^{TCF} y c-ets, modulando así, la actividad como factores transcripcionales de estos oncogenes. Los productos de los protooncogenes nucleares modulan la transcripción a través de la formación de heterodímeros (Myc-MAX, FOS-JUN). La regulación de alguno de los componentes de estos dímeros representa un sitio posible de control tanto de la expresión génica como del ciclo celular (Hartwell, Kasten, 1994) por la cascada de MAP quinasa. Se ha descrito recientemente que p42MAPK regula positivamente la transcripción de la ciclina D1. Este efecto está mediado por el factor de transcripción c-Ets-2 y depende de la presencia de un dominio de unión semejante al de Ets en la región proximal del promotor de ciclina D1. La fosforilación de p62^{TCF} por MAPK activa la formación de un complejo ternario entre p62^{TCF} y p67^{TCF} en el promotor de c-fos, activando la transcripción de c-fos.

Otra particularidad del camino de señales de transducción de GFs está dada por el hecho de que dentro de las proteínas con el dominio Sh2 también se encuentran algunas que a diferencia de las adaptadoras, tienen actividad enzimática. Entre ellas están la subunidad regulatoria (p85) de la fosfatidil inositol-3' quinasa (PI-3K). Se ha demostrado que la fosforilación de IRS-1 conduce a la activación de PI-3K y la consiguiente activación de los caminos de transducción de señales mediados por fosfadilinositol 4,5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). También pertenecen a este grupo Syp una fosfotirosina fosfatasa y la fosfolipasa C_γ. (FIG.7)

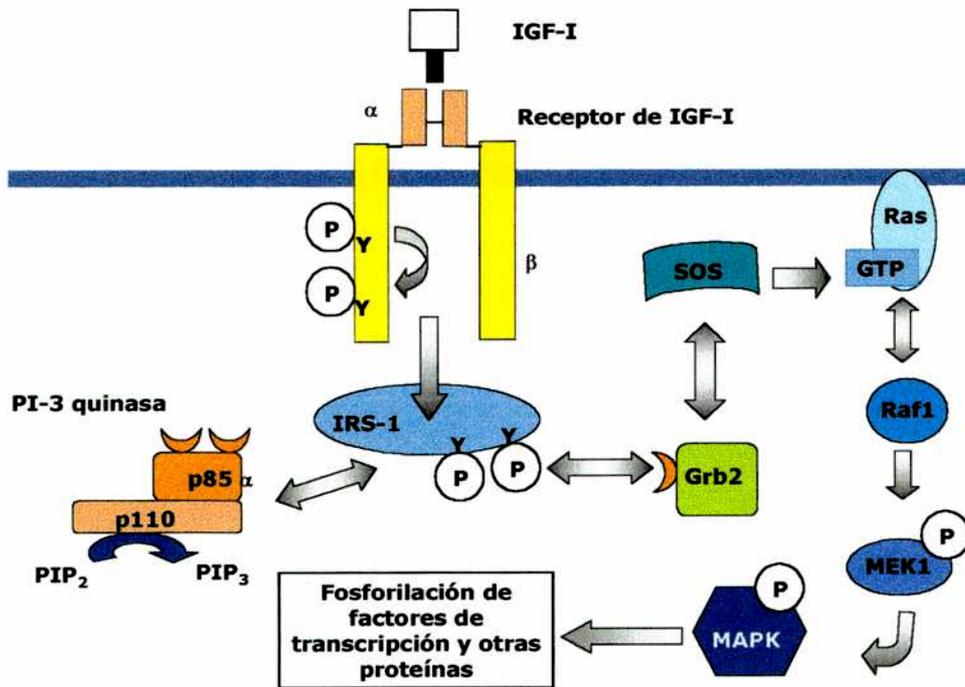


Figura 7: Receptores con actividad de tirosina quinasa

Señales de transducción de IGF-I: fosforilación del receptor y de IRS-1, proteínas adaptadoras, activación de PI3quinasa, activación de Ras y cascada de las MAP quinasa.

**MODELO EXPERIMENTAL DE ADENOCARCINOMAS MAMARIOS
INDUCIDOS POR PROGESTAGENOS**

La mayoría de los estudios realizados en cáncer de mama se han hecho utilizando líneas celulares en cultivo. Teniendo en cuenta la dificultad existente de extrapolar los estudios realizados *in vitro* al fenómeno biológico que ocurre *in vivo*, parte de este trabajo de investigación ha sido realizado en un modelo experimental *in vivo* de carcinogénesis hormonal. (Lanari et al., 1986).

En este modelo experimental, la administración del progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) a ratones hembra vírgenes de la cepa Balb/c dio lugar a la aparición de adenocarcinomas mamarios con una incidencia actuarial de 76 % y una latencia media de 52 ± 2 semanas (Lanari et al., 1986; Molinolo et al., 1987; Lanari et al., 1989; Kordon et al., 1991). Los tumores originados en ratones tratados con MPA son en su mayoría carcinomas ductales (FIG. 8) con capacidad de dar metástasis en pulmón y nódulos linfáticos (Lanari et al., 1989). Expresan altos niveles de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) y niveles bajos o no detectables de receptores de factor de crecimiento epidérmico (R-EGF). Estos tumores se mantienen por pasajes seriados en ratones hembra vírgenes Balb/c tratados con MPA y tienen un comportamiento progestágeno dependiente (HD) en su crecimiento (FIG. 9). Por pasajes a hembras sin tratar (FIG. 10), se seleccionaron variantes capaces de crecer sin el aporte exógeno de progestágenos, que han sido denominadas progestágeno-independientes (HI).

Las alteraciones morfológicas que preceden la formación de estos tumores son comparables a las lesiones preneoplásicas del cáncer de mama humano (Molinolo et al., 1987).

El hecho de contar con este modelo tumoral murino *in vivo* y la posibilidad de realizar cultivos primarios de estos tumores para realizar estudios *in vitro*, nos permitió estudiar los mecanismos involucrados en la respuesta al MPA de las células HD, así como también los mecanismos involucrados en la proliferación mediada por factores de crecimiento tales como la HRG.



Figura 8 : Carcinomas ductales

Carcinoma ductal compuesto por grupos de células que forman láminas sólidas. Éstas delimitan una cavidad quística irregular que contiene sangre, células descamadas y material amorfo. La lesión infiltra extensamente en el estroma adyacente que es fibroblástico denso. La vascularización es completa (Hematoxilina-eosina 40 X).

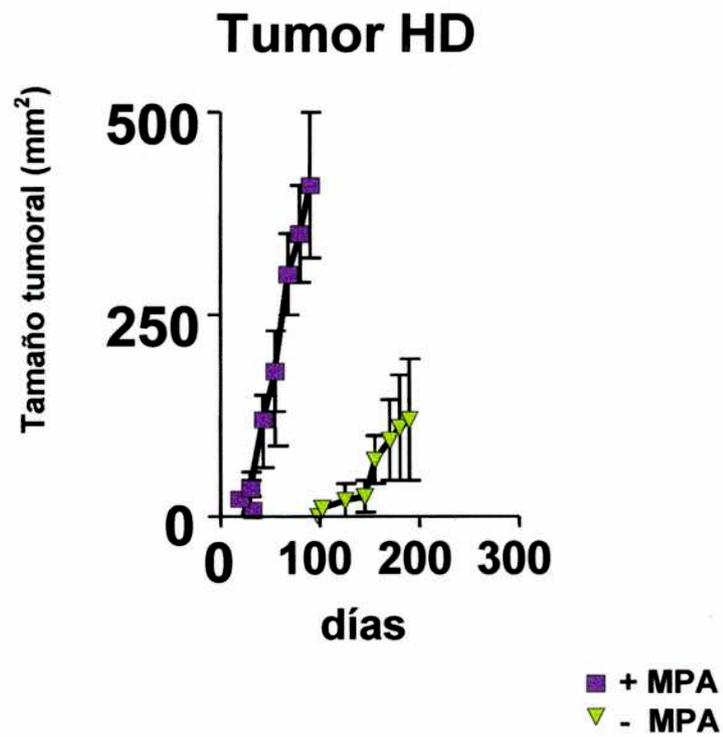


Figura 9: Crecimiento tumoral de adenocarcinomas mamarios ductales en presencia o ausencia de MPA. Los tumores son transplantados sc en ratones hembras tratadas o no con 40 mg de MPA. Los tumores ductales son progestágeno dependientes para su crecimiento (tumores HD).

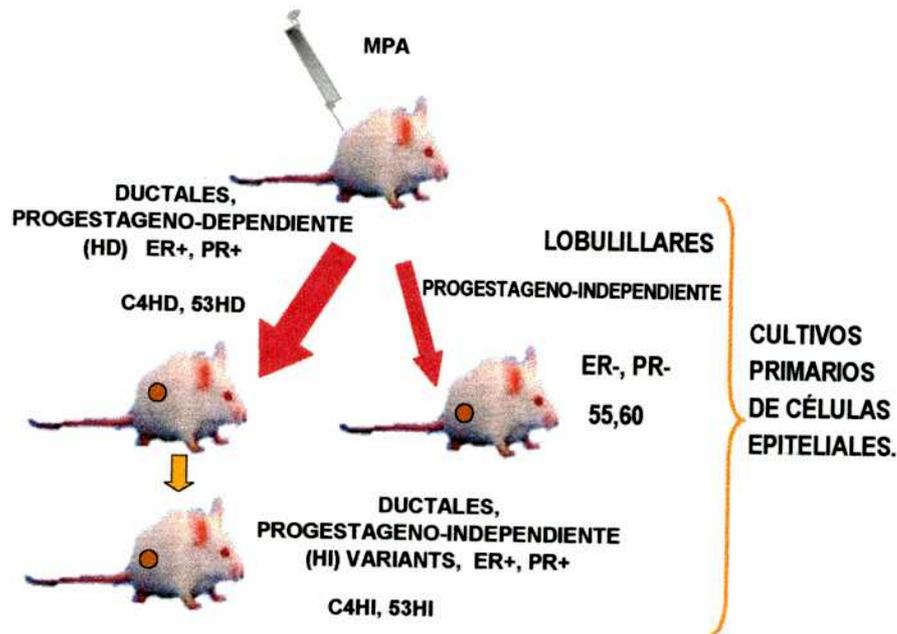


Figura 10: Obtención de líneas tumorales progestágeno-dependientes (HD y progestágeno -independientes (HI) de origen ductal.

Se transplantó el tumor a dos ratones tratados con MPA (20 mg depot, subcutáneo, contralateral al trasplante tumoral) y a dos ratones sin tratar. Los tumores ductales sólo crecen en los tratados con MPA durante los primeros 2-3 meses de seguimiento. Cuando el tumor alcanza un tamaño de 10-15 mm de diámetro, se transplanta a otros dos ratones tratados o no con MPA y así sucesivamente, controlando la hormono-dependencia, es decir que el tumor no crezca durante los 2 meses sin tratamiento. Para seleccionar una variante HI, se espera hasta que empiece a crecer un tumor en los animales sin tratar y se lo trasplanta sucesivamente a animales sin tratar

OBJETIVOS

OBJETIVOS.

Este trabajo tuvo como objetivo general, estudiar interrelaciones entre vías de transducción de señales activadas por progestágenos y por factores de crecimiento que llevan a la proliferación de células de cáncer de mama en modelos experimentales.

En particular, en la primer parte del mismo, debido a resultados previos del laboratorio en los que se encontró una potenciación de los efectos proliferativos de los progestágenos producida por factores de crecimiento (Balañá et al., 1999), se deseaba profundizar sobre los efectos de los progestágenos en las proteínas involucradas en la transducción de señales de los factores de crecimiento; especialmente los relacionados con la heregulina y el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I. A lo largo del trabajo, nuevos datos nos fueron induciendo al estudio de la existencia de interrelaciones entre las vías de señalización de los receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I y II.

En la segunda parte del trabajo, quisimos estudiar la posibilidad de la existencia de interacciones bidireccionales entre estas vías de proliferación celular. Es decir, evaluar la capacidad de HRG de activar la vía del RP que llevaría al aumento de la actividad transcripcional del mismo en ausencia de un progestágeno. En particular, nuestro interés se centró en el estudio de los efectos de HRG sobre la síntesis, localización, unión a un elemento respondedor a progesterona (PRE) y finalmente en el aumento de capacidad del RP de activar la transcripción de un gen reportero con dos PRE en su promotor. Otro de nuestros objetivos, de existir tal interacción, era el de profundizar en el mecanismo molecular utilizado por el factor de crecimiento para lograr dichos efectos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembra Balb/c de dos meses de edad, provenientes del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental y de la Academia Nacional de Medicina con agua y comida *ad libitum*, con doce horas de luz y doce de oscuridad.

Tumores

Se utilizaron adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por administración prolongada de MPA y mantenidos por pasajes singeneicos en hembras vírgenes Balb/c; dando origen a la línea tumoral *in vivo* C4HD. Se inocularon subcutáneamente mediante trócar, usando trozos de aproximadamente 2-3 mm² en la zona inguinal derecha del animal. Contralateralmente al inóculo tumoral se implantaron 40 mg de MPA depot (Medrosterona) (Lanari et al., 1989; Molinolo et al., 1987).

La línea tumoral C4HD es de origen ductal y expresa RP y RE (Lanari et al., 1989; Molinolo et al., 1987).

Hormonas, antagonistas de hormonas, factores de crecimiento e inhibidores de quinasas.

En los tratamientos *in vivo* se utilizó MPA depot de laboratorios Gador, Buenos Aires (Medrosterona). Tanto el MPA como el antirogestágeno RU486 empleados en los medios de cultivo son de Sigma Co. Ambos se utilizaron a partir de soluciones madre 1000X preparadas en etanol redistilado, para su posterior dilución en medio de cultivo. La concentración final de etanol no excedió el 0,12 % v/v y no afectó ni el crecimiento ni la morfología celular (Dran et al., 1995).

Se utilizó HRG-β1 de Neomarkers (Freemont, CA).

Para el caso del inhibidor específico de la MEK1, PD98059 (Sigma Co.) se utilizaron soluciones madre 2000X preparadas en DMSO para su posterior dilución en cultivo. La concentración final de DMSO no afectó el crecimiento celular.

Medios de cultivo y suero fetal bovino

Se utilizó DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12, 1:1) (Sigma) sin rojo fenol + sulfato de gentamicina comercial en concentración de 50 mg/l. Se preparó según las instrucciones del fabricante con agua bidestilada o deionizada.

Las células epiteliales se cultivaron con DMEM/F12 + 5% de SFB de complementado y adsorbido con carbón activado (SFBch).

El medio de lavado utilizado en las decantaciones fue DMEM/F12 + 2.5 % SFB.

Las células T47D se cultivaron con DMEM/F12 + 10% de SFB.

La de complementación del suero se llevó a cabo calentando el SFB a 56°C durante 30 minutos.

Para obtener el SFBch se incubó el SFB ya de complementado con 5 % de carbón activado durante 1 hora a 4°C en permanente agitación. Luego de la adsorción el suero se centrifugó 2 veces a 12000 rpm durante 20 minutos. Al sobrenadante se le adicionó 5 % de carbón activado y se lo incubó durante toda la noche con agitación. Se realizaron luego centrifugaciones sucesivas hasta eliminar completamente el carbón. Una vez diluido en el medio de cultivo se esterilizó por filtración (0,22 µm).

Soluciones utilizadas para los cultivos

Solución enzimática utilizada para la digestión tumoral

Tripsina (Gibco BRL) 0.25 % + Colagenasa Tipo II (Gibco BRL) 0.25 % o tipo IV Sigma (AE: 485 U/mg) + albumina sérica bovina (Sigma Co) 0.5 % en buffer fosfato (PBS).

Solución de tripsina

Para levantar las células se utilizó solución de Tripsina (Gibco BRL) 0.25 % en PBS (sin Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺).

Cultivos primarios

Para realizar cultivos primarios de las líneas tumorales C4-HD se extirparon en esterilidad tumores de 50-100 mm², aproximadamente a los 21 días del trasplante. Los tumores se disgregaron mecánicamente y luego en solución enzimática, agitando durante 40 minutos a 37°C. La suspensión celular obtenida, compuesta por una población de estirpe epitelial y otra fibroblástica, se separaron según la técnica de Pandis y col. (Pandis et al., 1992) con algunas modificaciones. Esta técnica se basa en que la velocidad de sedimentación de las células epiteliales que forman agregados celulares es mayor que la de los fibroblastos, permitiendo su separación luego de varias decantaciones diferenciales.

Las células se colocaron en un tubo de centrifuga con 15 ml de medio de lavado y se centrifugaron a 200 x g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 % de SFB. La solución se dejó sedimentar durante 20 minutos; el sedimento constituye la fracción enriquecida en células epiteliales que se encuentran habitualmente en agregados y del sobrenadante se obtuvo la fracción fibroblástica. Al tubo que contiene la fracción enriquecida en células epiteliales se le agregaron 15 ml de 2 % SFB para su resuspensión. Este procedimiento se repitió varias

veces, descartando cada vez el sobrenadante hasta que en él no se detectaron más células. Así se consideran separadas ambas poblaciones. En la última decantación las células epiteliales se resuspendieron en 10 % SFB y se sembraron en frascos de cultivo.

Para la obtención de cultivos enriquecidos en células epiteliales, los agregados celulares se dejaron adherir durante 48 hs. y se reemplazó el medio por 5% SFBch + MPA 10^{-8} M. Este medio de crecimiento se cambió cada 48 hs. y al cabo de 7-10 días las células se tripsinizaron y se repicaron a placas de 96 hoyos para la realización de los ensayos de proliferación celular o se trataron y lisaron para la obtención de proteínas totales, nucleares, citosólicas .

Repique de células

Las células se enjuagaron con solución de tripsina estéril y se incubaron durante 2-15 minutos a 37°C con la cantidad de tripsina necesaria para cubrir el fondo. Cuando se despegaron se las pasó a un tubo con 10 ml de medio + 10 % SFB que se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en medio 10 % SFB. Finalmente, se sembraron en las placas correspondientes.

Ensayos de proliferación

Los cultivos enriquecidos en células epiteliales se subcultivaron en microplacas de 96 hoyos y se incubaron durante 24-48 hs hasta su adhesión en medio 10%SFB. En el caso de las células T47D se sembraron 1.5×10^3 células/hoyo. Luego, el medio fue reemplazado por medio con las soluciones cuyo efecto se deseaba evaluar. Los ensayos se realizaron por octuplicado. Las células se incubaron durante 48 hs. con las soluciones correspondientes, reemplazándose a las 24 hs. el 50 % del volumen de cada hoyo por medio de prueba fresco. Durante las últimas 24 hs. de incubación se aplicó un pulso de 0.4 μ Ci de 3 H-timidina (NEN, actividad específica 20 Ci/mmol) en cada hoyo.

Los cultivos se tripsinizaron y se cosecharon en un cosechador de células Inotech. La radioactividad incorporada se midió en un contador beta de centelleo líquido durante 1 minuto.

Análisis estadístico

En cada experimento individual se calculan las cpm \pm DS (desviación standard) y se evalúa la significación estadística mediante un test de ANOVA. Para la comparación de distintos grupos (tratamientos) entre sí, se empleó la t de Tuckey.

Oligonucleotidos antisentido (ASODNs) y sentido (SODNs)

Los ODNs fueron sintetizados y purificados por HPLC (Nucleico, Buenos Aires, Argentina; DNagency, Cornell, NY y Biognostik, Göttingen, Alemania).

Para bloquear la expresión del erbB-2 se sintetizaron ASODNs contra dos regiones del ARNm; una región que abarcaba el codón de iniciación de la traducción (Colomer et al., 1994).

ErbB-2 ASODN: 5' GGC CGC CAG CTC CAT 3'

ErbB-2 SODN: 5' ATG GAG CTG GCG GCC 3'

El ASODN al receptor tipo I de IGF (IGF-IR) corresponde a los codones 21-26 de la secuencia señal de la subunidad del IGF-IR que precede a la secuencia del proreceptor.

ASODN: 5' TCC TCC GGA GCC AGA CTT 3'

SODN: 5' AAG TCT GGC TCC GGA GGA 3'

Estudios de expresión de Receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I y II. Western blot

a.-Obtención de extractos proteicos de cultivos celulares

Las células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores se dejaron crecer hasta obtener cúmulos de tamaño considerable, se homogeneizaron con buffer de lisis (50mM Tris (pH:7.4); 150mM NaCl; 1mM EGTA; 10% glicerol; 0.5% Nonidet P-40; 1mM MgCl₂; 1mM PMSF; 10µg/ml leupeptina; 5µg/ml pepstatina; 5µg/ml aprotinina; 1mM ortovanadato de sodio; 5mM NaF; 20mM molibdato de sodio; 5mM pirofosfato de sodio), las suspensiones celulares se pasaron por una jeringa de tuberculina por lo menos 10 veces y se centrifugaron a 30000 x g durante 40 min. Se separó el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry et al. 1951).

b.-Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Las proteínas se diluyeron tres veces en buffer de craqueo (6% v/v SDS, 6% β-mercaptoetanol, 0.18 M Tris-HCl pH 6.8, azul de bromofenol 0.006% p/v) y se calentaron durante 5 min. Se fraccionaron por electroforesis en geles 7.5% de poliacrilamida-SDS con buffer de corrida (Tris 0.3% p/v, glicina 1.44% p/v, 0.1% SDS) y fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en buffer de transferencia (Tris 0.3% p/v, glicina 1.44% p/v, 0.1% SDS, metanol 20% v/v). Las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada en PBS-Tween (0.1% v/v) durante 16h a 4°C y luego se incubaron durante 2 hs con anticuerpos primarios específicos diluïdos en PBS1X – Tween 20 0.1% según corresponda. Para el caso de los anticuerpos anti-fosfotirosina (ptyr) y anti-IGF-IR se los incubó también en

presencia de leche al 5% p/v en la solución antes mencionada de PBS y Tween20. Después de 3 lavados de 10 min. con PBS-Tween, las membranas fueron incubadas por 1 h. con una dilución 1:2000 del anticuerpo anti-ratón o anti-conejo conjugado con peroxidasa. Luego de lavar, los productos de reacción fueron visualizados usando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Amersham) con placas Kodak X-Omat. Las intensidades de las bandas se cuantificaron usando Image Quant versión 3.3. (Molecular Dynamics,CA).

c. Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal de conejo purificado específico anti-ErbB-2 Neu C-18 (Santa Cruz Biotechnology, CA); anticuerpo policlonal de conejo purificado específico anti-ErbB-3 C-17 (Santa Cruz Biotechnology, CA) anticuerpo policlonal de conejo purificado específico anti-ErbB-4 C-18 (Santa Cruz Biotechnology, CA), anticuerpo policlonal de conejo anti-c-erbB-4/HER-4 Oncoprotein Ab-2 (Neomarkers, Freemont,CA); anticuerpo policlonal de conejo purificado específico anti-HRG (C-20) (Santa Cruz Biotechnology, CA) , anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfotirosina (P-Tyr) PY99 (Santa Cruz Biotechnology, CA), anticuerpo monoclonal anti-subunidad β del IGF-IR Ab-5 (clone 1-2) (Neomarkers, Freemont, CA).

Análisis de fosforilación en tirosina de los RTKs.

Se inmunoprecipitaron lisados proteicos de células epiteliales C4HD (1mg) crecidas en 2.5 % SFBch y tratadas o no durante 48 hs. con MPA 10 nM. o tratadas durante 48h con los ASODN indicados y MPA 10 nM. La cantidad de proteínas inmunoprecipitada de las células creciendo o no con MPA fue diferente (entre 0.5-1.5 μ g) con el fin de corregir la inducción de la síntesis de los RTK tipo I provocada por el progestágeno.

Todos los lisados se inmunoprecipitaron con 2-5 μg de los anticuerpos específicos anti-ErbB-2 o anti-P-Tyr PY-99 (Santa Cruz Biotechnology, CA). Los inmunoprecipitados se incubaron 2 h a 4°C con agitación y los inmunocomplejos se capturaron agregando Proteína A-Agarosa agitando durante 1h. Las partículas de Proteína A se lavaron tres veces con buffer de lisis, se hirvieron 10 min en buffer de craqueo y se sometieron a electroforesis en gel 7.5% de poliacrilamida. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon en PBS 0.1% -Tween 20 (PBST), 5% de leche descremada; se incubaron durante 2 hs con un anticuerpo monoclonal anti-P-Tyr PY-99 (Santa Cruz Biotechnology, CA) cuando las inmunoprecipitaciones fueron hechas con el anticuerpo anti-ErbB-2 o con un anticuerpo monoclonal anti-subunidad β del IGF-IR Ab-5 (clone 1-2) (Neomarkers, Freemont, CA) en el caso de la inmunoprecipitación con anti-P-Tyr y luego con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Las proteínas se visualizaron usando un sistema de revelado por quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

Alícuotas de cada inmunoprecipitado se sometieron a inmunoblot con los anticuerpos anti-erbB-2 para verificar que se inmunoprecipitaron cantidades iguales de proteínas.

Asociación entre ErbB-2 y IGF-IR.

Se inmunoprecipitaron extractos de proteínas totales provenientes de cultivos primarios de células epiteliales C4HD (1 mg) con un anticuerpo anti-erbB-2 como se describe anteriormente y se realizaron Western blots incubando las membranas tanto con un anticuerpo policlonal de conejo anti-subunidad α del IGF-IR (N-20) (Santa Cruz) como con un anticuerpo monoclonal anti-subunidad β del IGF-IR Ab-5 (clone 1-2) (Neomarkers, Freemont, CA). Cuando se realizó la inversión del orden de los anticuerpos utilizados en el proceso de inmunoprecipitación e inmunoblot; los lisados de proteínas totales fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-subunidad α del IGF-IR (2C8) (Santa Cruz), y el western blot fue revelado

con un anticuerpo anti-FrbB-2. El anticuerpo monoclonal anti-ciclina D1 fue el clon 72-13G (Santa Cruz), el anti-TGF- β IIR fue el anticuerpo policlonal de conejo L-21 (Santa Cruz) y el péptido bloqueante del ErbB-2 fue también obtenido en Santa Cruz.

Cuantificación del receptor tipo I de IGF.

El IGF I fue cedido por el Dr. James Merryweather (Chiron, Emeryville, CA). La cuantificación de los receptores IGF-I R se realizó por ensayos de unión de IGF-I al receptor. Los estudios de unión del IGF-I a su receptor de membrana se realizaron en buffer Tris 25 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.4. El volumen final de incubación fue de 250 μ l. Una alícuota de los preparados de membrana (100 μ g de proteínas) se incubó con una concentración saturante de ¹²⁵I IGF-I (actividad específica 160 μ Ci/ μ g) por 2 horas a temperatura ambiente o 12 horas a 4 ° C. La unión inespecífica se determinó mediante el agregado adicional de un exceso de 500 ng de IGF-I. La incubación se detuvo con el agregado de 2 ml de buffer fosfato 0.05 M, NaCl 0.1 M, azida 0.05% y albúmina 0.2 %, separando la hormona unida de la libre por centrifugación a 3000 g por 15 min. La radioactividad retenida en el precipitado se cuantificó en un contador gama. Todas las determinaciones de cada muestra tumoral se realizaron por triplicado y los datos obtenidos se analizaron por el método de Scatchard (Scatchard, 1949). Los resultados se expresaron en fmol/mg de proteína de membrana.

Microscopía confocal y tinción inmunofluorescente.

Células C4HD creciendo en cubreobjetos de vidrio fueron incubadas con medio y 2.5% SFBch en presencia o en ausencia de MPA 10nM durante 48h. Luego fueron fijadas con paraformaldehído en PBS1X, pH 7.4 durante 20 min a 4°C y lavadas con PBS. Se las incubó posteriormente con una solución de bloqueo conteniendo PBS y 1% BSA durante 1h a temperatura ambiente. ErbB-2 fue localizado utilizando el anticuerpo policlonal de conejo

anti-ErbB-2 C-18 (Santa Cruz) y el IGF-IR usando el anticuerpo monoclonal anti-IGF-IR clone α IR3 (Oncogene, Cambridge, MA.). Ambos anticuerpos fueron incubados durante 1h a temperatura ambiente. Las células fueron luego lavadas e incubadas con un anticuerpo anti-conejo conjugado con rodamina (para ErbB-2) y con un anticuerpo anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (para IGF-IR) (Sigma Co.). Las células teñidas fueron analizadas usando un microscopio confocal de barrido laser Zeiss LSM510. El control negativo utilizando células incubadas solamente con los anticuerpos secundarios conjugados al cromóforo no mostró señal fluorescente.

Obtención de extractos proteicos totales para extracción de RP.

Las células fueron recolectadas de las placas de cultivo utilizando un scrapper y homogenizadas en presencia de un bufer de extracción (50mM Tris (pH: 7.4), 0.4 M KCl, 10% glicerol, 0.5 mM ditioneitol, 0.25 M sacarosa, 7.5 mM EDTA, 1mM PMSF, 5mM NaF, 10 μ g/ml leupeptina, 5 μ g/ml pepstatina, 5 μ g/ml aprotinina, 0.15mM espermina, 0.5mM espermidina). El homogenato celular fue incubado durante 30min a 4°C con agitación intermitente y luego centrifugado a 14000 rpm a una temperatura de 4°C durante 30min. El contenido proteico fue determinado de acuerdo al método de Lowry (Lowry et al. 1951).

Obtención de extractos citosólicos o nucleares.

Las células fueron recolectadas de las placas de cultivo utilizando un scrapper y homogenizadas en presencia de un bufer de extracción (50mM Tris (pH: 7.4), 10% glicerol, 0.5 mM ditioneitol, 0.25 M sacarosa, 7.5 mM EDTA, 1mM PMSF, 5mM NaF, 10 μ g/ml leupeptina, 5 μ g/ml pepstatina, 5 μ g/ml aprotinina, 0.15mM espermina, 0.5mM espermidina) en hielo utilizando una relación células: buffer de 1:2 (v/v). El homogenato fue centrifugado durante 10 min a 4°C a 1000x g, y el sobrenadante (citosol) fue colectado y almacenado a -70°C. El pellet nuclear crudo fue lavado a

4°C una vez con un buffer (50mM Tris (pH: 7.4), 7.5 mM EDTA, 10% glicerol, 0.5 mM ditioneitol, 0.25 M sacarosa, 0.01% Nonidet 40, 1mM PMSF, 5mM NaF, 10µg/ml leupeptina, 5µg/ml pepstatina, 5µg/ml aprotinina, 0.15mM espermina, 0.5mM espermidina) y centrifugado a 4°C durante 10 min a 1000x g. El pellet nuclear fue resuspendido en un buffer (50mM Tris (pH: 7.4), 7.5 mM EDTA, 0.4 M KCl, 0.5 mM ditioneitol, 0.25 M sacarosa, 1mM PMSF, 5mM NaF, 10µg/ml leupeptina, 5µg/ml pepstatina, 5µg/ml aprotinina, 0.15mM espermina, 0.5mM espermidina) a 4°C en una relación pellet: buffer de 1:1 (v/v) e incubado en hielo durante 30 min con agitación intermitente cada 10 min. La suspensión resultante fue centrifugada a 4°C durante 30 min a 12000 x g. El sobrenadante fue diluído en un volumen igual de buffer idéntico al anterior pero sin KCl para reducir la concentración salina y almacenado a -70°C. La concentración proteica de ambos extractos fue medida de acuerdo al método de Lowry (Lowry et al. 1951).

Estudios de expresión de Receptores de progesterona.

a. Western Blot.

Se prepararon lisados totales de células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores C4HD o de células T47D siguiendo la técnica descrita anteriormente. Alícuotas de los lisados conteniendo igual cantidad de proteínas totales, se diluyeron en buffer de craqueo (6% v/v SDS, 6% β-mercaptoetanol, 0.18 M Tris-HCl pH 6.8, azul de bromofenol 0.006% p/v) en una relación lisado proteico: buffer de craqueo de 2:1 y se calentaron 100°C durante 5 min. Se fraccionaron por electroforesis en geles 7.5% de poliacrilamida-SDS con buffer de corrida (Tris 0.3% p/v, glicina 1.44% p/v, 0.1% SDS) y fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en buffer de transferencia (Tris 0.3% p/v, glicina 1.44% p/v, 0.1% SDS, metanol 20% v/v). Las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada en PBS-Tween (0.1%v/v) durante 16h a 4°C y luego se

incubaron durante 2 h con un anticuerpo monoclonal anti-RP hPRab7 (Neomarkers, Freemont, CA) o con un anticuerpo monoclonal anti-fosfo Ser294 del hRP hPRab12 (Neomarkers, Freemont, CA) . Después de 3 lavados de 10 min. con PBS-Tween, las membranas fueron incubadas por 1 h. con un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (Vector). Luego de lavar, los productos de reacción fueron visualizados usando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Amersham) con placas Kodak X-Omat.

Luego de incubar las membranas con el anticuerpo anti-fosfo Ser294 del hRP y obtener las placas correspondientes, las membranas fueron incubadas según las indicaciones de ECL, Amersham, con una solución para separar al anticuerpo de la proteína. Luego las membranas fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-RP hPRab7 (Neomarkers, Freemont, CA). Después de 3 lavados de 10 min. con PBS-Tween, las membranas fueron incubadas por 1 h. con un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (Vector). Luego de lavar, los productos de reacción fueron visualizados usando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Amersham) con placas Kodak X-Omat. Las intensidades de las bandas se cuantificaron usando Image Quant versión 3.3. (Molecular Dynamics,CA).

b. Ensayos de radio ligando receptor.

La cantidad de sitios activos para la unión de progesterona fue dosada mediante ensayos con una concentración única de saturación. Brevemente, duplicados de alícuotas de extractos proteicos nucleares, citosólicos o totales de 20µl fueron incubadas a 4°C durante 18h con 5 µl de [³H] R5020 6µM en presencia o en ausencia de un exceso molar de 100 veces de hormona no marcada y con un exceso molar de 200 veces de cortisol para suprimir la unión no específica a proteínas del plasma, previamente evaporados bajo corriente de nitrógeno. Luego se agregó a cada muestra 100 µl de una suspensión de 1% carbón activado y 0.1% dextrano G-70 en buffer A (20mM Tris (pH: 7.4), 1.5mM EDTA, 10% glicerol, 0.25 mM ditiotreitól, 20mM Na₂MoO₄) y se incubaron a 4°C con agitación intermitente

se incubaron a 4°C con agitación intermitente durante 15 min. La fracción de hormona libre fue separada por centrifugación a 4°C durante 10min a 3500 rpm y contada en un contador β Beckman. Los resultados se expresaron como fmol de receptor/ mg de proteínas.

Ensayos de corrimiento de movilidad electroforética (EMSA) .

Se prepararon extractos nucleares de células C4HD o T47D que habían sido incubadas durante 2h a 37°C con MPA10nM, HRG 20ng/ml o sin el agregado de ninguno de estos compuestos. En alguno de los experimentos, las células fueron pretratadas durante 48h a 37°C con ODNs al ErbB-2 en una concentración de 2 μ M o 30 min con 10 μ M del compuesto PD98059. Alícuotas de dichos extractos conteniendo aproximadamente 4 fmol de RP (según ensayos de radioligando-receptor) y 20 μ g de proteínas nucleares fueron incubados durante 20 min a temperatura ambiente en un volumen final de 30 μ l con 0.8ng de un oligodeoxi nucleótido sintético doble cadena de 27 pares de bases (5'-GATCCTGTACAGGATGTTCTAGCTACA-3') conteniendo al elemento respondedor a progesterona (PRE) del promotor del gen de la aminotransferasa de rata (Santa Cruz Biothecnology, CA). El oligodeoxinucleótido fue marcado en el extremo 5' con γ [³²P]ATP y la T₄ polinucleótido quinasa hasta una actividad específica aproximada de 30000-50000 cpm/0.1 ng. La reacción de unión al ADN contenía también 2.5 μ g poly (dI-dC) como un competidor inespecífico de la unión al ADN en un buffer conteniendo 10mM Tris-HCl [pH: 7.4], 50mM NaCl, 10% glicerol, 1mM ditiotreitol, 5mM MgCl₂, 0.5 μ g/ 1mM, 5 μ g/ μ l gelatina, 1mM fluoruro de fenil-metil-sulfonilo(PMSF), 10 μ g/ml leupeptina, 5 μ g/ml pepstatina y 5 μ g/ml aprotinina. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en condiciones no desnaturizantes en geles de poliacrilamida 5.5% (30:1) en un buffer de baja fuerza iónica TBE (10mM Tris-Borato, pH: 7.5, 0.025mM EDTA). Antes de sembrar las muestras los geles fueron precorridos durante una hora a 10mA/gel y luego de la siembra se corrieron a 20mA/gel durante 120 min a temperatura ambiente. Para prevenir el calentamiento de los mismos, las corridas se efectuaron con recirculación de agua.

Posteriormente, los geles fueron secados sin fijación con vacío y fueron autorradiografiados por exposición a películas Kodak X-OMAT a -70°C .

Como control de la especificidad de la unión del PR al ADN, se realizaron EMSAs siguiendo el mismo protocolo excepto que los extractos también fueron incubados en presencia de un exceso del mismo oligodeoxinucleótido sintético no marcado o de un oligodeoxinucleótido sintético con 4 pares de bases mutadas en la zona del palíndromo como competidores específicos (5'-GATCCTCAACAGGATCATCTAGCTACA-3').

Transfecciones transientes.

Se plaquearon células C4HD en placas de seis hoyos con medio suplementado con 5% SFBch y MPA 10nM o células T47D con medio suplementado con 10%SFB sin antibióticos y fueron cultivadas por 48h o 24h antes de la transfección.

Las mismas se realizaron siguiendo las indicaciones para el uso del reactivo de transfección DOTAP (Roche Biochemicals) con $4\mu\text{g}$ de ADN por hoyo durante 48h a 37°C . Las células fueron luego incubadas en presencia de medio suplementado con 2.5%SFBch ó 0.1%SFBch (para las células C4HD o T47D respectivamente) durante 24h y luego tratadas con los distintos compuestos según se indica en cada experimento por 24 o 48h (T47D o C4HD respectivamente) antes de ser levantadas con *Lysis reporter buffer* (Promega, Madison, WI).

En los experimentos en los que se usaron las células para estudiar la fosforilación del hPRB por p42MAPK, el protocolo de transfección fue el descrito anteriormente excepto que las células conteniendo en plásmido pcDNA3-HA-ERK2 fueron tratadas o no durante 10 min a 37°C con HRG y las células conteniendo al plásmido hPR1-Flag permanecieron en DMEM suplementado o no con 2.5% SFBch (C4HD o T47D respectivamente) antes de ser levantadas.

El plásmido PRE₂-TATA_{tk}-CAT, que contiene dos elementos respondedores a progesterona (PRE) fusionados a una porción del promotor de timidina quinasa del *simplex virus* río arriba del gen de la cloranfenicol-

Posteriormente, los geles fueron secados sin fijación con vacío y fueron autorradiografiados por exposición a películas Kodak X-OMAT a -70°C .

Como control de la especificidad de la unión del PR al ADN, se realizaron EMSAs siguiendo el mismo protocolo excepto que los extractos también fueron incubados en presencia de un exceso del mismo oligodeoxinucleótido sintético no marcado o de un oligodeoxinucleótido sintético con 4 pares de bases mutadas en la zona del palíndromo como competidores específicos (5'-GATCCTCAACAGGATCATCTAGCTACA-3').

Transfecciones transientes.

Se plaquearon células C4HD en placas de seis hoyos con medio suplementado con 5% SFBch y MPA 10nM o células T47D con medio suplementado con 10%SFB sin antibióticos y fueron cultivadas por 48h o 24h antes de la transfección.

Las mismas se realizaron siguiendo las indicaciones para el uso del reactivo de transfección DOTAP (Roche Biochemicals) con $4\mu\text{g}$ de ADN por hoyo durante 48h a 37°C . Las células fueron luego incubadas en presencia de medio suplementado con 2.5%SFBch ó 0.1%SFBch (para las células C4HD o T47D respectivamente) durante 24h y luego tratadas con los distintos compuestos según se indica en cada experimento por 24 o 48h (T47D o C4HD respectivamente) antes de ser levantadas con *Lysis reporter buffer* (Promega, Madison, WI).

En los experimentos en los que se usaron las células para estudiar la fosforilación del hPRB por p42MAPK, el protocolo de transfección fue el descrito anteriormente excepto que las células conteniendo en plásmido pcDNA3-HA-ERK2 fueron tratadas o no durante 10 min a 37°C con HRG y las células conteniendo al plásmido hPR1-Flag permanecieron en DMEM suplementado o no con 2.5% SFBch (C4HD o T47D respectivamente) antes de ser levantadas.

El plásmido PRE₂-TATA_{tk}-CAT, que contiene dos elementos respondedores a progesterona (PRE) fusionados a una porción del promotor de timidina quinasa del *simplex virus* río arriba del gen de la cloranfenicol-

acetiltransferasa (CAT), fue gentilmente cedido por el Dr. M.Beato (Marburg, Alemania) (Sartorius et al., 1994). El vector de expresión para la β -galactosidasa, CMV- β -gal (Clontech, Palo Alto, CA) fue utilizado para corregir la eficiencia de transfección. El vector de expresión del hPRB fusionado a Flag (hPR1-Flag) fue gentilmente cedido por la Dra. K.B.Horwitz (Denver, Colorado, USA) (Richer et al., 1998) y el vector de expresión de ERK2 fusionado a HA (pcDNA3-HA-ERK2) fue gentilmente cedido por el Dr. O.A.Coso (Buenos Aires, Argentina) (Coso et al., 1997).

Ensayos de medición de la actividad de CAT.

Cada placa con células fue lavada una vez con PBS sin calcio y magnesio. Las células fueron luego levantadas y lisadas en 500 μ l del Reporter Buffer 1X (Promega, Madison, WI) utilizando un scrapper. Los lisados fueron centrifugados a 14000 rpm durante 15 min a 4°C. La concentración proteica fue determinada por el ensayo de Bradford en microplacas (Bradford M.M et al., 1976). La actividad de CAT fue determinada por incubación de 100 μ g proteínas provenientes de los lisados celulares con 0.2 μ Ci [14 C]cloranfenicol (20 μ Ci/ μ mol)(DuPont NEN) y 250 μ M butirilcoenzima A (SIGMA) en 100 μ l de 100mM Tris-HCl, pH:7.5 durante toda la noche a 37°C. Las muestras fueron calentadas a 60°C durante 8 min antes del agregado de los sustratos. El cloranfenicol acilado fue extraído utilizando 200 μ l de una mezcla 2:1 de TMPD y xilenos (SIGMA Co, St Louis, Mo) y la fase orgánica fue contada en un contador de centelleo. Los valores de los blancos de reactivos fueron sustraídos de todas las muestras antes del cálculo de los resultados. Para compensar la variación en la eficiencia de la transfección, las células fueron cotransfectadas con un vector de expresión que contenía al gen de la β -galactosidasa (CMV- β -gal) como gen reportero. Los resultados de la actividad de CAT fueron calculados como la relación de las unidades de CAT por unidad de actividad de β -gal. La actividad transcripcional dependiente de MPA fue tomada como 100%.

Ensayos de medición de actividad de β -galactosidasa.

Una alícuota de los lisados anteriores fue separada antes del calentamiento a 60°C y utilizado para medir la actividad de β -galactosidasa. Para ello se incubaron alícuotas idénticas de cada muestra con 100 μ l de orto-nitro-fenil- β galactósido (ONPG) (4mg/ml) en un volumen final de 500 μ l a 28°C hasta aparición de una leve coloración amarilla. Luego se agregaron 250 μ l de Na₂CO₃ 1M y se determinó la actividad de la enzima por una lectura en un espectrofotómetro a 205nm.

Ensayo para visualización de la actividad quinasa de las MAPK.

Las células fueron plaqueadas a 10% de confluencia y cultivadas durante 48h. Luego fueron incubadas durante 18h en medio suplementado o no con 2.5% SFBch (C4HD o T47D respectivamente). Posteriormente ellas fueron estimuladas o no durante 10 min con HRG 20ng/ml a 37°C; algunas placas fueron tratadas durante 30 min con PD980591 10 μ M antes de la estimulación con HRG. Las células fueron luego lavadas con PBS frío, levantadas con scrapper y colectadas por centrifugación a 3500 rpm durante 5 min a 4°C. Las proteínas fueron extraídas por agregado de buffer de lisis (20mM Hepes pH: 7.5, 10mM EGTA, 40mM β -glycerolfosfato, 1% NP-40, 2.5mM MgCl₂, 2mM Na₃(VO₄)₂, 1 mM ditiotreitól, 1mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptina, 5 μ g/ml pepstatina, 5 μ g/ml aprotinina) a los pellets celulares y agitación en vortex durante 10 a 15 sec seguida por centrifugación a 14000 x g durante 15 min a 4°C. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados en hielo durante 2h con un anticuerpo anti-MAPK (SC-154, Santa Cruz Biothecnology, CA) y durante 1h con proteína A-agarosa (SIGMA). Los inmunoprecipitados fueron luego lavados una vez con PBS, 1% NP-40 y 2mM Na₃(VO₄)₂, una vez con 100mM Tris-HCl pH: 7.5 y 0.4 mM LiCl y tres veces con el buffer de reacción de quinasa (12.5mM MOPS pH: 7.5, 12.5mM β -glycerolfosfato, 7.5mM MgCl₂, 0.5mM EGTA, 0.5mM NaF y 0.5mM Na₃(VO₄)₂). La actividad quinasa fue medida incubando 30 min a 30°C los inmunocomplejos resuspendidos

en 30 μ l de buffer de reacción de quinasa con agregado de 3.3mM DTT, 0.05mM rATP, 10 γ [³²P]ATP y 1.5 μ g/ μ l de la proteína mielina básica (MBP) (SIGMA,Co) como sustrato de las MAPK. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE en geles 12%. Los geles fueron secados sin fijación con vacío y fueron autorradiografiados por exposición de placas Kodak X-OMAT a -70°C.

Ensayos de fosforilación *in vitro* del RP.

La fosforilación *in vitro* del RP endógeno o del transfectado con el vector hPR1-Flag por MAPK endógenas o transfectadas con el vector pcDNA3-HA-ERK2 fue determinada según el siguiente protocolo. Las células fueron sembradas a 10% de confluencia y cultivadas por 48 para hacer los ensayos de actividad endógena o transfectadas con los vectores hPR1-Flag o pcDNA3-HA-ERK2 utilizando la técnica descrita para el reactivo DOTAP (Roche Biochemicals). La cantidad total de DNA fue ajustada a 4-5 μ g/placa. 48h después, las células fueron incubadas en presencia de medio suplementado o no con 2.5%SFBCCh (C4HD o T47D respectivamente) durante 18h. Posteriormente, las células fueron pretratadas o no durante 30 min con 10 μ M PD98059 antes de ser estimuladas o no con HRG durante 10 min a 37°C. Las células fueron luego lavadas con PBS frío, levantadas con scrapper y colectadas por centrifugación a 3500 rpm durante 5 min a 4°C. Las proteínas fueron extraídas por agregado de buffer de lisis (20mM Hepes pH: 7.5, 10mM EGTA, 40mM β -glycerolfosfato, 1% NP-40, 2.5mM MgCl₂, 2mM Na₃(VO₄)₂, 1 mM ditiotreitól, 1mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptina, 5 μ g/ml pepstatina, 5 μ g/ml aprotinina) a los pellets celulares y agitación en vortex durante 10 a 15 sec seguida por centrifugación a 14000 x g durante 15 min a 4°C. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados en hielo durante 2h con un anticuerpo anti-MAPK (SC-154, Santa Cruz Biothecnology, CA) para el caso de MAPK endógenas y con un anticuerpo monoclonal anti-HA (HA.11, Berkeley Antibody Co., CA) para el caso de p42MAPK transfectado y luego durante 1h con proteínaA/G-agarosa (SIGMA). Los lisados de células transfectados o no con el vector hPR1-Flag que no fueron estimulados con HRG, fueron inmunoprecipitados en hielo durante 2h con un anticuerpo

monoclonal anti-RP A y B (h-PRab 7, Neomarkers, Freemont, CA) para el caso del receptor endógeno y con un anticuerpo anti-Flag (antiFlagM2, Sigma. Co) para el caso del hRPB transfectado, seguido por la absorción durante 1h a 4°C con esferas de proteínaG-Agarosa (Sigma. Co). Los inmunoprecipitados fueron luego lavados una vez con PBS, 1%NP-40 y 2mM Na₃(VO₄)₂, una vez con 100mM Tris-HCl pH: 7.5y 0.4 mM LiCl y tres veces con el buffer de reacción de quinasa (12.5mM MOPS pH: 7.5, 12.5mM β-glycerolfosfato, 7.5mM MgCl₂, 0.5mM EGTA, 0.5mM NaF y 0.5mM Na₃(VO₄)₂). La actividad quinasa fue medida incubando 30 min a 30°C los inmunocomplejos resuspendidos en 30 μl de buffer quinasa con agregado de 3.3mM DTT, 0.05mM rATP, 10 γ[³²P]ATP y cantidades iguales de la suspensión de las esferas provenientes de la inmunoprecipitación con anti-RP o antiFlag como sustrato de las MAPK. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE en geles 12%. La parte superior de los geles fue secada sin fijación con vacío y fue autorradiografiada por exposición de placas Kodak X-OMAT a -70°C. Las intensidades de las bandas se cuantificaron usando Image Quant versión 3.3 (Molecular Dynamics,CA). Para controlar que la fosforilación se debía sólo a las MAPK activadas por HRG, la parte inferior de los geles fue electrotransferida a membranas de nitrocelulosa para realizar ensayos de western blot. Los ensayos fueron realizados según lo descrito anteriormente excepto que las membranas fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-fosfoMAPK (Santa Cruz Biothecnology, CA) seguido por la incubación con un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (Vector). Luego de lavar, los productos de reacción fueron visualizados usando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Amersham) con placas Kodak X-Omat. Luego de incubar las membranas con el anticuerpo anti-fosfoMAPK y obtener las placas correspondientes, las membranas fueron incubadas según las indicaciones de ECL, Amersham, con una solución para separar al anticuerpo de la proteína. Luego las membranas fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-MAPK (SC-154, Santa Cruz, CA). Después de 3 lavados de 10 min. con PBS-Tween 0.1%, las membranas fueron incubadas por 1 h. con un anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa (Vector). Luego de lavar, los productos de reacción fueron visualizados usando un sistema de

quimioluminiscencia (ECL, Amersham) con placas Kodak X-Omat. Las intensidades de las bandas se cuantificaron usando Image Quant versión 3.3. (Molecular Dynamics,CA).

Como control de las transfecciones de RP-Flag o de p42MAPK-HA, lisados de células transfectados o no con los vectores de expresión fueron incubados o no con 1µg de anticuerpo anti-HA o anti-Flag durante 2h a 4°C, seguidos por la incubación durante 1h a 4°C con proteína G-agarosa. Luego del lavado de los inmunoprecipitados, las proteínas fueron analizadas por western blot utilizando anticuerpos primarios específicos anti-RP o anti-MAPK. Las mismas membranas luego del tratamiento para eliminar la unión de las proteínas con los anticuerpos, fueron reincubadas con anticuerpos anti-HA o anti-Flag.

RESULTADOS

PARTE I

Resultados

El objetivo de esta parte del trabajo fue el de investigar la posible existencia de interrelaciones entre las vías de señalización de progestágenos y receptores con actividad de tirosina quinasa (RTK) en el modelo de adenocarcinoma mamario murino inducido por acetato de medroxiprogesterona (MPA) (Lanari et al., 1989; Molinolo et al., 1987).

Para este fin, se utilizaron cultivos primarios de células epiteliales de tumores provenientes de la línea tumoral hormono-dependiente C4HD.

Resultados previos del laboratorio habían demostrado que las células C4HD sobreexpresan ErbB-2, contienen altos niveles de ErbB-3 y bajos niveles de ErbB-4 (Balañá et al., 1999).

En primer lugar, se procedió a estudiar la expresión de RTK tipo I. Mediante la técnica de western blot se pudo observar que el tratamiento de las células con MPA produjo un aumento significativo en los niveles de expresión de ErbB-2 y ErbB-3 sin modificar los de ErbB-4 (Fig.11). El tratamiento con el antiprogestágeno RU486, que inhibe la proliferación inducida por MPA de las células C4HD, inhibió la capacidad de MPA de aumentar la expresión de ErbB-2 y 3 (Fig. 11).

Con el fin de estudiar si los efectos proliferativos del MPA estaban asociados no sólo al aumento de los niveles de ErbB-2 sino también a su activación, se investigó luego el grado de fosforilación en tirosina de ErbB-2 en cultivos primarios de células epiteliales C4HD. Para ello, extractos totales de células C4HD, tratadas o no con MPA, fueron inmunoprecitados con anticuerpos anti-ErbB-2 y el contenido en fosfotirosina de estos receptores fue determinado por western blot con un anticuerpo anti-fosfotirosina. En la figura 12 se puede ver que, mientras que en los extractos de células no tratadas con MPA se encontraron niveles bajos de fosforilación, MPA indujo una fuerte fosforilación de ambos receptores. Para verificar que el incremento en la fosforilación de ErbB-2 se debía a la activación de los receptores por MPA y no al aumento de la expresión de los mismos inducida por el progestágeno, se inmunoprecipitaron distintas cantidades de proteínas de

los extractos de células tratadas o no con MPA a fin de corregir el aumento de los niveles de ErbB-2 producto del tratamiento con el progestágeno. Con idénticas alícuotas de cada inmunoprecipitado se realizaron western blots utilizando anticuerpos anti-ErbB-2. En la figura 12 se puede observar que se inmunoprecipitaron aproximadamente idénticas cantidades en cada caso. Esto nos permitió demostrar que MPA es capaz de inducir la fosforilación de ErbB-2.

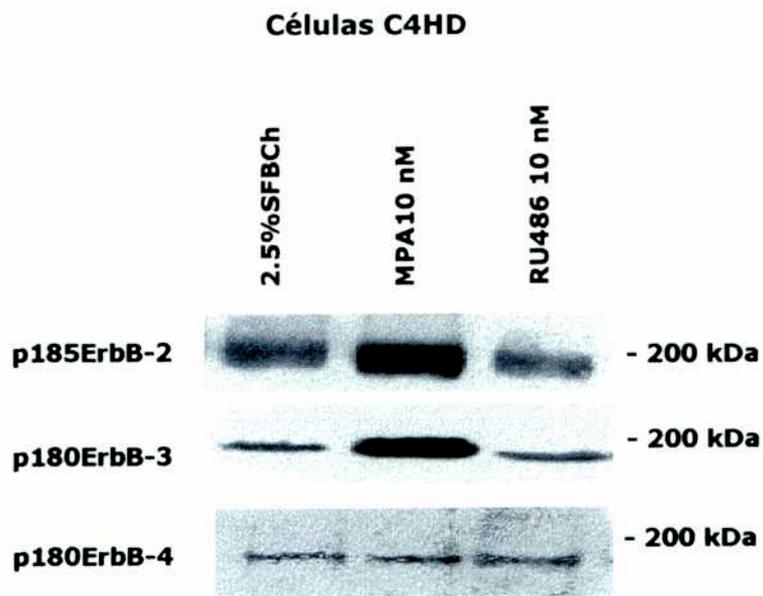


Figura 11. Expresión a nivel proteico de los RTKs. Cultivos primarios de células epiteliales de tumores C4HD fueron tratadas durante 48h con MPA (10 nM), MPA +RU486 (10nM) o mantenidas sin tratamiento en medio con 2.5%ChFCS. Ochenta microgramos de proteínas provenientes de lisados celulares fueron sometidos a electroforesis y posterior inmunoblot con anticuerpos anti-ErbB-2, anti-ErbB-3 o anti-ErbB-4.

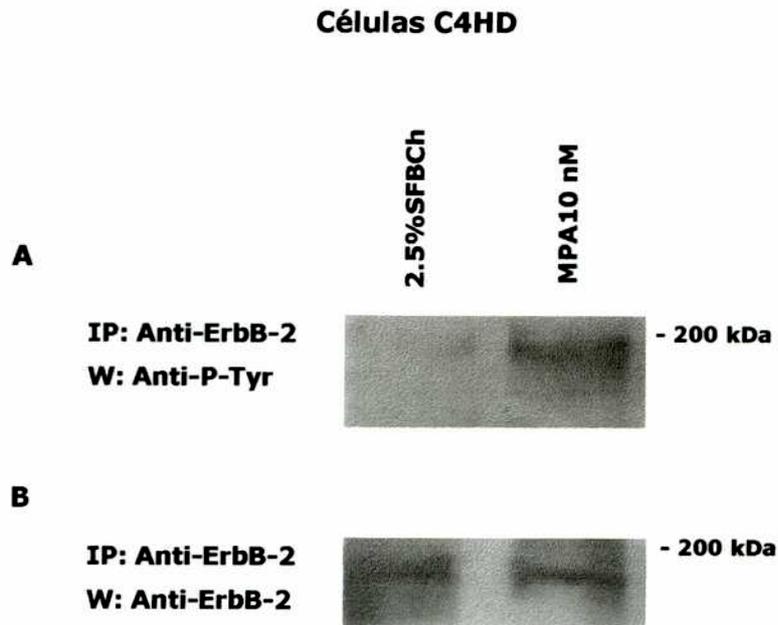


Figura 12. Fosforilación en tirosina de ErbB-2. (A) Extractos celulares provenientes de cultivos primarios de células epiteliales de tumores C4HD fueron inmunoprecipitados utilizando un anticuerpo anti ErbB-2; los inmunocomplejos fueron sometidos a SDS-PAGE (7.5%) y analizados por western blot con un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (Ptyr). (B) Para corregir el aumento de ErbB-2 inducido por MPA, las cantidades de proteínas totales inmunoprecipitadas variaron de 0.5 a 1.5mg. Alícuotas idénticas de cada inmunoprecipitado fueron sembradas en los geles y sometidas a análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti-ErbB-2. W: western blot, IP: inmunoprecipitación.

Interacción entre los caminos de transducción de señales de ErbB-2 y del IGF-IR.

En el laboratorio se había encontrado expresión de IGF-IR, un miembro de la familia de los RTK tipo II y de su ligando IGF-I en las células C4HD (Elizalde et al., 1998). MPA no produjo cambios en la expresión de IGF-IR ni de IGF-I en estas células. Se encontró también que el tratamiento de células C4HD con oligodeoxinucleótidos antisentido (ASODNs) al IGF-IR producía una inhibición dosis-dependiente de la proliferación celular mediada por MPA (Elizalde et al., 1998). Por otro lado, hallazgos recientes de nuestro laboratorio demostraron que la incubación de células C4HD con ASODN al sitio de inicio de la traducción del ARNm del ErbB-2 produjo también una inhibición dosis-dependiente de la proliferación mediada por MPA (Balañá et al., 1999). Estos resultados indican que IGF-IR, activado por IGF-I y ErbB-2, activado por HRG y MPA, en células C4HD, están involucrados en las vías de señalización que conducen a proliferación. Por lo tanto, se investigó el probable efecto antiproliferativo de la inhibición simultánea de ErbB-2 e IGF-IR. Células C4HD fueron tratadas o no con ASODN contra IGF-IR y con ASODN dirigidos contra ErbB-2. La figura 13 muestra que mientras una concentración de $1\mu\text{M}$ del ASODN contra IGF-IR provocó una inhibición de la proliferación del 47% y $1\mu\text{M}$ del ASODN contra ErbB-2 lo hizo en un 52%; la combinación de $1\mu\text{M}$ de cada uno produjo una inhibición del 69%. Estos resultados mostraron la falta de efectos aditivos o sinérgicos entre los ASODNs. Se probaron también combinaciones de ambos ASODNs a dosis menores en las que el efecto antiproliferativo se encontraba en el rango de 35-45%. En las células C4HD, una concentración de $0.5\mu\text{M}$ del ASODN contra IGF-IR produjo una inhibición de la proliferación del 42% mientras que $1\mu\text{M}$ del ASODN contra ErbB-2 lo hizo en un 39% (Fig. 13). Una combinación de $0.5\mu\text{M}$ de cada uno provocó una inhibición del 56% (Fig. 13). Estos resultados refuerzan la noción de que podría haber un cruce entre las vías de señalización del ErbB-2 y del IGF-IR.

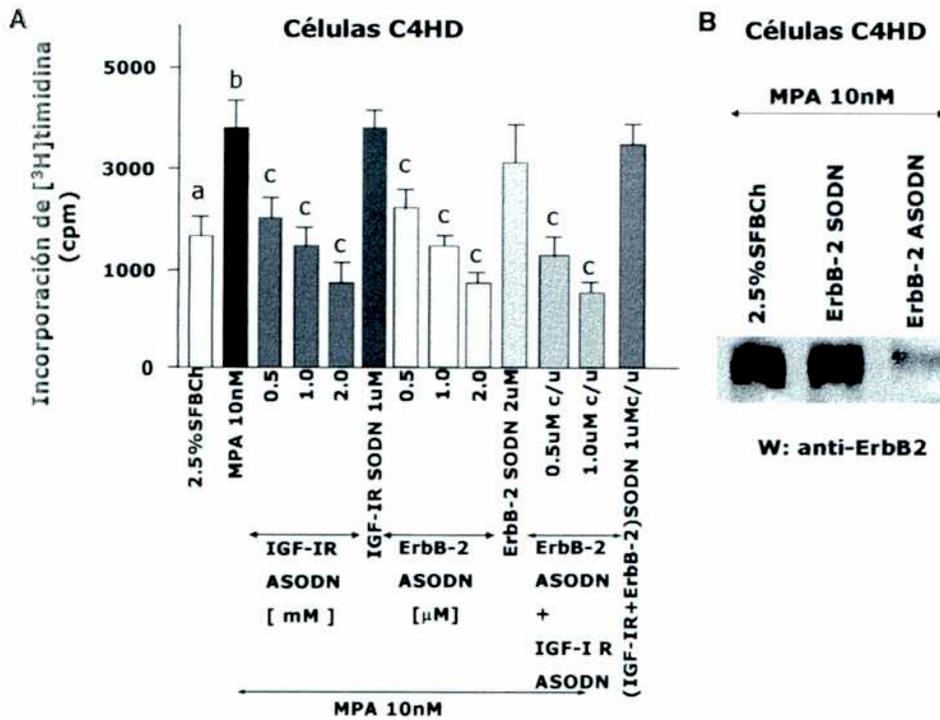


Figura 13. Efecto de la combinación de ASODNs al ErbB-2 y ASODNs al IGF-IR en el crecimiento de células C4HD. (A) Cultivos primarios de células epiteliales de tumores C4HD fueron tratados durante 48h en medio con 2.5%SFbCh suplementado con MPA 10nM y MPA +ASODNs o SODNs al ErbB-2, IGF-IR o combinaciones de ambos. Los datos se presentan como media \pm sd. b vs a; c vs b: $P < 0.001$. El experimento mostrado es representativo de un total de ocho. (B) Para estudiar el efecto de ASODN al ErbB-2 en la síntesis proteica, 80 μ g de proteínas provenientes de lisados celulares obtenidos de células tratadas o no con ASODN al ErbB-2 (2 μ M) fueron sometidas a electroforesis y posterior análisis por Western blot con un anticuerpo anti-ErbB-2. El análisis densitométrico de la banda correspondiente a ErbB-2 expresado como porcentaje respecto del control (células C4HD creciendo en medio con 2.5%SFbCh y MPA 10nM) fue de 28% para las células tratadas durante 48h con ASODN al ErbB-2 (2 μ M). No se hallaron diferencias significativas entre los valores densitométricos de la banda de ErbB-2 en las células control y las tratadas con SODN al ErbB-2 (2 μ M). Se muestra aquí un experimento representativo de un total de ocho, el S.E.M. estuvo siempre dentro del 10%. El número de receptores IGF-IR en células creciendo con MPA 10nM o tratadas con SODN al IGF-IR (2 μ M) fue de 63.2 ± 4.8 fmol/mg de proteína, mientras que para las células tratadas con ASODN al IGF-IR (2 μ M) el número fue de 15.2 ± 2.0 fmol/mg de proteína. Los ensayos de binding fueron realizados según lo descrito en Materiales y Métodos y los datos fueron analizados por análisis de Scatchard (Scatchard, 1949).

El bloqueo de la expresión de IGF-IR con ASODNs produce una inhibición en la fosforilación en tirosina del ErbB-2.

Se había reportado previamente que el bloqueo de IGF-IR con ASODN no afectaba los niveles proteicos de ErbB-2, ErbB-3 o ErbB-4 (Balañá et al., 1999). Se encontró además que el bloqueo con ASODN contra ErbB-2 no alteraba los niveles proteicos de ErbB-3 o ErbB-4 (Balañá et al., 1999). Se demostró ahora que el tratamiento con ASODN contra ErbB-2 no reguló el contenido de IGF-IR en las células C4HD (Fig. 14). Por lo tanto, a fin de dilucidar si la interacción entre ErbB-2 e IGF-IR pudiera involucrar alteraciones en la activación de las vías de señalización, se estudió el nivel de fosforilación en tirosina de ErbB-2 como un marcador de su activación. Como se mostró anteriormente, el tratamiento de las células con MPA indujo una fuerte fosforilación en tirosina de ErbB-2 (Fig. 12). Extractos proteicos totales de células tratadas durante 48 horas o no con ASODN contra IGF-IR y MPA fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-ErbB-2. El contenido en fosfotirosina fue estudiado por western blot con un anticuerpo anti-fosfotirosina. En la figura 15 puede observarse que el bloqueo de la expresión de IGF-IR resultó en la inhibición de la capacidad de MPA de inducir la fosforilación de ErbB-2. Se exploró luego la posibilidad de que el bloqueo de ErbB-2 afectara el estado de fosforilación del IGF-IR. Se trataron células C4HD con ASODN ErbB-2 y MPA durante 48 horas; luego se realizaron los extractos proteicos que fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-fosfotirosina. Posteriormente se realizó un western blot con un anticuerpo anti-cadena β del IGF-IR. Un nivel importante de fosforilación en tirosina de la cadena β del IGF-IR fue detectable en los extractos de células tratadas con MPA (Fig. 15). Esto se debería, según lo descrito anteriormente (Elizalde et al., 1998), a la existencia de una regulación autocrina funcional entre el IGF-IR y el IGF-I. Como puede verse en la (Fig. 15) el bloqueo de la expresión de ErbB-2 no modificó el estado de fosforilación en tirosina de la cadena β del IGF-IR. Esta estrategia experimental impedía dosar la cantidad de IGF-IR del modo en que se hizo para el caso de ErbB-2. Por lo tanto

para poder demostrar que idénticas cantidades de fosforilación en tirosina del IGF-IR corresponden a iguales cantidades de dicho receptor, se inmunoprecipitó 1mg de proteínas totales provenientes de los extractos de células sometidas a los distintos tratamientos con un anticuerpo anti-cadena α del IGF-IR y se determinó la cantidad de IGF-IR mediante western blot con un anticuerpo anti-cadena α del IGF-IR. Las mismas membranas fueron luego incubadas con anticuerpos anti-cadena β del IGF-IR. Como puede verse en la Fig. 15 el tratamiento de las células con el ASODN ErbB-2 no modificó los niveles proteicos del IGF-IR.

Los resultados obtenidos hasta el momento son consistentes con la hipótesis de que la interacción entre ErbB-2 y IGF-IR no es bidireccional sino que por el contrario, se manifiesta una jerarquía en la que el IGF-IR es requerido para que ocurra la fosforilación de ErbB-2.

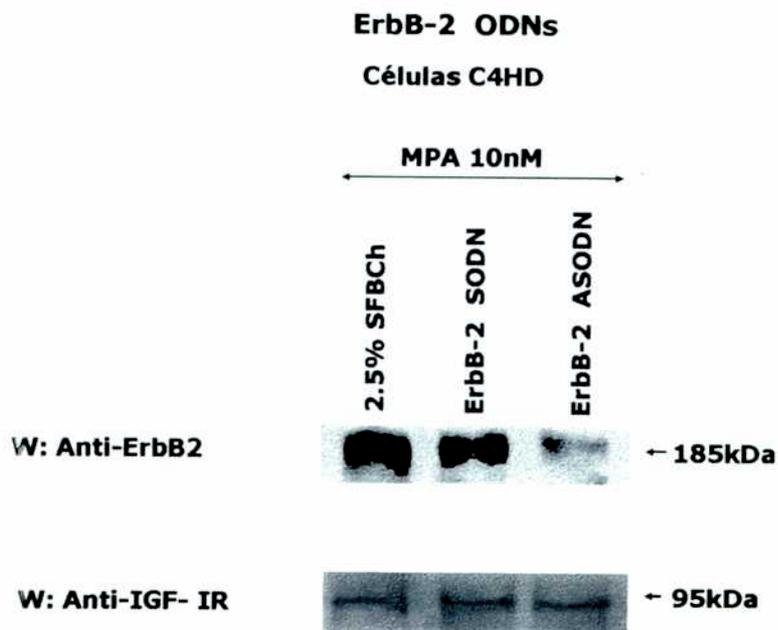


Figura 14. Efecto del ASODN al ErbB-2 en la expresión del IGF-IR. Células C4HD fueron cultivadas en presencia de MPA 10nM y tratadas o no con ASODN y SODN al ErbB-2 (2 μ M). Cien microgramos de proteínas provenientes de lisados celulares fueron sometidos a electroforesis y posterior inmunoblot con anticuerpos anti-IGF-IR y anti-ErbB-2. El experimento mostrado es representativo de un total de cuatro realizados.

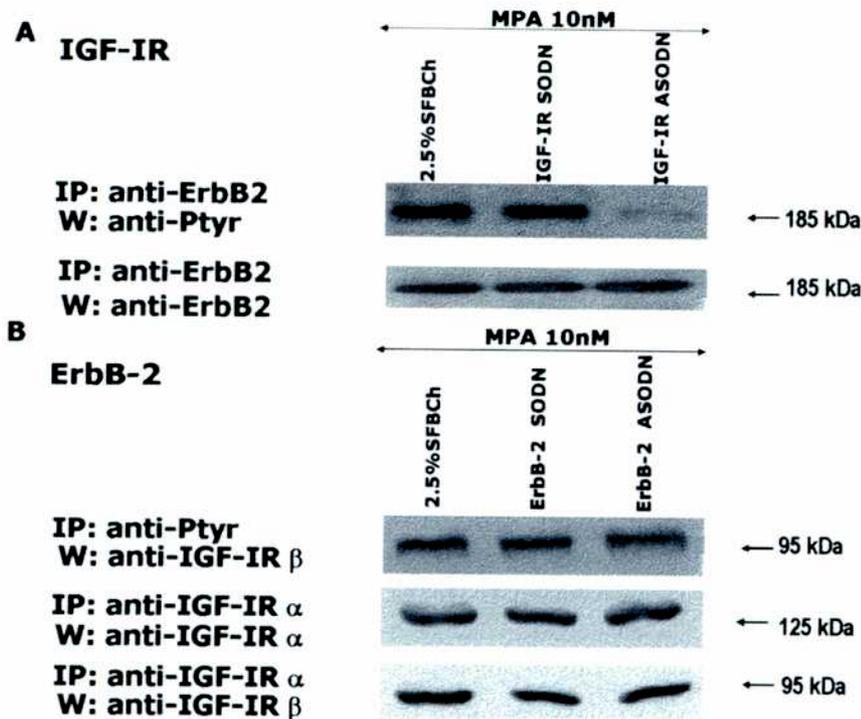


Figura 15. El bloqueo del IGF-IR inhibe la fosforilación en tirosina del ErbB-2 pero ASODNs al ErbB-2 no tienen efecto sobre la fosforilación en tirosina del IGF-IR. (A) Células C4HD creciendo en presencia de MPA 10nM fueron tratadas o no con ASODN y SODN al IGF-IR. Un miligramo de proteínas totales proveniente de lisados celulares fue inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-ErbB-2 y los inmunocomplejos fueron luego sometidos a SDS-PAGE y Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (Ptyr). En el panel inferior, alícuotas idénticas de cada inmunoprecipitado fueron sometidas a análisis por inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-ErbB-2 para verificar que aproximadamente iguales cantidades de proteínas inmunoprecipitadas fueran sembradas en los geles. **(B)** Células C4HD creciendo en presencia de MPA 10nM fueron tratadas o no con ASODN y SODN al ErbB-2. Un miligramo de proteínas totales proveniente de lisados celulares fue inmunoprecipitado con un anticuerpo monoclonal anti-Ptyr y los inmunocomplejos fueron luego sometidos a SDS-PAGE y Western blot con un anticuerpo anti-cadena β del IGF-IR. En el panel del centro un miligramo de proteínas totales proveniente de lisados celulares fue inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-cadena α del IGF-IR (Santa Cruz 2C8) y los inmunocomplejos fueron luego sometidos a SDS-PAGE y Western blot con un anticuerpo anti-cadena α del IGF-IR (Santa Cruz N-20). Panel inferior, las membranas del panel central fueron reincubadas luego con un anticuerpo anti-cadena β del IGF-IR. W: Western blot. IP: inmunoprecipitación.

ErbB-2 e IGF-IR interactúan físicamente para formar un complejo heteromérico.

Se había reportado previamente que las células C4HD expresan HRG y que MPA produce un aumento en su expresión (Balañá et al., 1999). Además, se había encontrado que HRG tenía la capacidad de inducir la fosforilación de ErbB-2 en células C4HD (Balañá et al., 1999).

Por lo tanto, se evaluó en primer lugar si el IGF-IR pudiera tener una función indirecta en la transactivación de ErbB-2. Esta posibilidad implicaría que un IGF-IR funcional pudiera ser requerido por MPA para inducir la síntesis de HRG. En este trabajo se muestra que el bloqueo de IGF-IR por ASODNs no afectó la capacidad de MPA de inducir la síntesis de HRG (Fig. 16). Este resultado sugiere que el papel de IGF-IR en la activación de ErbB-2 podría deberse a una interacción directa entre ambos receptores. Aún cuando la existencia de heterodimerizaciones entre miembros de los RTKs tipo I ha sido bien documentada, la formación de complejos entre miembros de diferentes tipos de RTK no ha sido reportada.

Con la intención de definir en forma más precisa la interacción entre ErbB-2 e IGF-IR se estudió la probable asociación entre estos dos receptores. Extractos proteicos de cultivos primarios de células C4HD tratadas o no con MPA obtenidos en condiciones no reductoras fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-ErbB-2; posteriormente se realizaron western blots utilizando anticuerpos anti-cadena α del IGF-IR o anti-cadena β del IGF-IR.

Como puede verse en la figura 17A el panel inferior de, se encontró la co-inmunoprecipitación del ErbB-2 y la cadena α (panel superior) y β (panel medio) del IGF-IR. Puede verse también que el tratamiento de las células con MPA durante 48 horas indujo un aumento de tres veces en la abundancia del complejo entre los receptores. Este aumento correlaciona con el aumento en la expresión de ErbB-2 inducido por el progestágeno (Fig. 17A panel inferior). La interacción entre ErbB-2 y IGF-IR fue también detectada cuando se invirtió el proceso de inmunoprecipitación. Cuando extractos celulares fueron inmunoprecipitados con

anticuerpos anti-cadena α del IGF-IR y los western blots correspondientes revelados con un anticuerpo anti-ErbB-2; una clara asociación entre ambas proteínas pudo ser detectada (Fig. 17B panel inferior). De acuerdo a lo esperado, cuando los western blots de los inmunoprecipitados con anticuerpos anti-cadena α del IGF-IR fueron revelados con anticuerpos anti-cadena β del IGF-IR, la asociación entre ambas cadenas fue evidente (Fig. 17B panel intermedio). Con el objeto de obtener mayor información acerca de la asociación preferencial de ErbB-2 con las cadenas α o β del IGF-IR; se redujeron los puentes disulfuro que unen ambas subunidades usando DTT en los extractos. Sin embargo, cuando se inmunoprecipitaron los extractos obtenidos en condiciones reductoras con un anticuerpo anti-cadena α del IGF-IR y se realizaron los western blots utilizando un anticuerpo anti-cadena β del IGF-IR, la asociación entre ambas cadenas permanecía (datos no mostrados). Este fenómeno podría deberse a la estrecha interacción que mantienen las cadenas en el complejo tetramérico del receptor. Este hecho nos impidió profundizar en la localización más definida de los sitios de interacción entre ErbB-2 y IGF-IR.

La especificidad de la interacción entre ErbB-2 y IGF-IR fue demostrada por múltiples abordajes experimentales. Se muestran los resultados obtenidos para células C4HD creciendo en medio con suero 2.5%ChFCS y MPA 10nM. En primer lugar, suero preimmune de conejo fue incapaz de inmunoprecipitar ErbB-2 (Fig. 18) e inmunocomplejos obtenidos a partir de suero preimmune de ratón no contenían ninguna de las dos cadenas del IGF-IR (Fig. 18). La inmunoprecipitación de ErbB-2 en presencia de un péptido bloqueante también fue usada como control (Fig. 18). En segundo lugar, como control de que ErbB-2 y IGF-IR se unieran en forma inespecífica a otras proteínas, se evaluaron inmunoprecipitaciones y western blots contra otras dos proteínas. Con ese propósito se eligió otro receptor de membrana, el receptor tipo II del factor de crecimiento transformante β (TGF- β RII), que pertenece a la familia de las serina/treonina quinasas transmembrana, y a la ciclina D1, una proteína involucrada en el control del ciclo celular en el núcleo de las células. En la figura (Fig. 18) se muestra que ni bandas correspondientes a la ciclina D1 ni al TGF- β RII se encontraron presentes cuando los extractos celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-ErbB-2 o

cadena α del IGF-IR. Los mismos resultados se encontraron haciendo el procedimiento inverso de inmunoprecipitación. Los inmunoprecipitados realizados con anticuerpos anti-ciclina D1 o TGF- β R2 no contenían bandas correspondientes a ErbB-2 ni a ninguna de las dos cadenas del IGF-IR (Fig. 18). Estos datos indicarían que ErbB-2 y IGF-IR no interactúan en forma promiscua con otras proteínas celulares, incluyendo otros receptores de membrana o una proteína que ejerce su función en el núcleo. Se encontró también que una significativa cantidad de ErbB-2 (aproximadamente el 6%) estaba asociada a IGF-IR (Fig. 18). Una mayor evidencia de la existencia de una asociación entre ErbB-2 y IGF-IR en células intactas fue provista por estudios de microscopía confocal de fluorescencia. Células C4HD fueron cultivadas en ausencia o en presencia de MPA 10nM durante 48h. El análisis de la inmunofluorescencia mostró que tanto ErbB-2 como IGF-IR están distribuidos homogéneamente en la superficie celular de las C4HD (Fig. 19 panel izquierdo y central de ambas filas). Cuando la localización relativa de ambos receptores fue determinada por superposición de las dos imágenes (Fig. 19 panel derecho de ambas filas), se encontró que MPA indujo una extensa co-localización de ErbB-2 (rojo) y IGF-IR (verde) al producir una señal fluorescente amarilla. (Fig. 19 panel derecho y fila inferior).

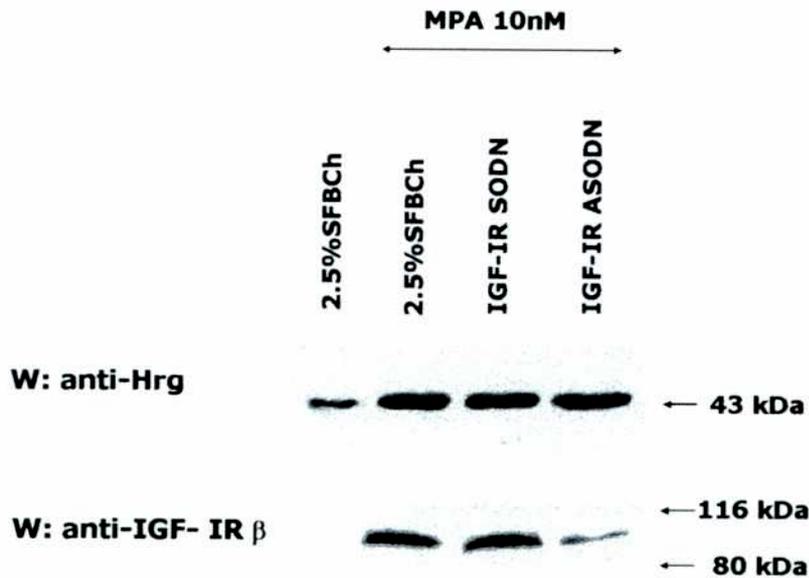


Figura 16. El bloqueo del IGF-IR no afecta la capacidad de MPA de inducir la síntesis de HRG. Cultivos primarios de células fueron incubadas durante 48 h en medio con 2.5%ChFCS, en medio con 2.5%ChFCS suplementado con MPA 10nM o con MPA + ASODNs o SODNs al ARNm del IGF-IR (2 μ M). Cien microgramos de proteínas provenientes de lisados celulares fueron sometidos a electroforesis y luego a ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo anti-HRG. En el panel inferior se muestra la inhibición de la expresión del IGF-IR en las células C4HD tratadas con ASODNs al IGF-IR.

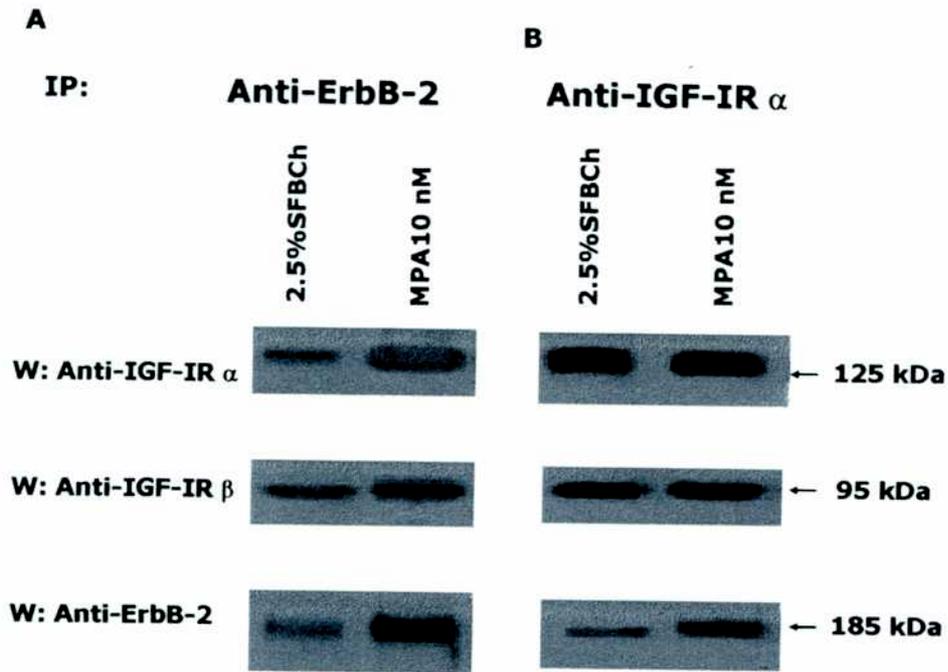


Figura 17. Complejo binario entre ErbB-2 y IGF-IR. Extractos proteicos provenientes de células C4HD fueron obtenidos como se detalla en Materiales y Métodos. ErbB-2(A) y IGF-IR (B) fueron inmunoprecipitados a partir de 1 mg de los extractos; los inmunocomplejos fueron sometidos a SDS-PAGE (7.5%) y analizados por Western blot con un anticuerpo anti-cadena α del IGF-IR (panel superior), un anticuerpo anti-cadena β del IGF-IR (panel intermedio) o un anticuerpo anti-ErbB-2 (panel inferior).

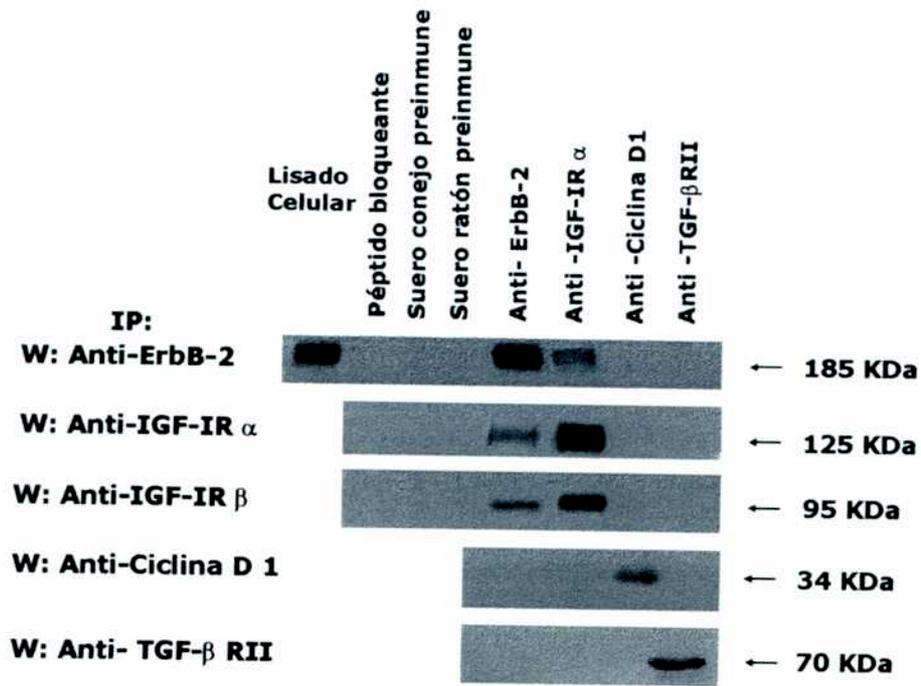


Figura 18. Especificidad de la interacción entre ErbB-2 y IGF-IR. Extractos proteicos (1mg) de células C4HD tratadas con MPA 10nM fueron inmunoprecipitados con los anticuerpos indicados. Como controles, ErbB-2 fue inmunoprecipitado en presencia de un péptido bloqueante y extractos proteicos fueron incubados con sueros preinmunes de ratón o conejo. Cien microgramos de proteínas de lisados celulares fueron sometidos directamente a ensayos de inmunoblot con un anticuerpo anti-ErbB-2 (primera calle del panel superior). W; Western blot realizado con los anticuerpos indicados. IP: inmunoprecipitación.

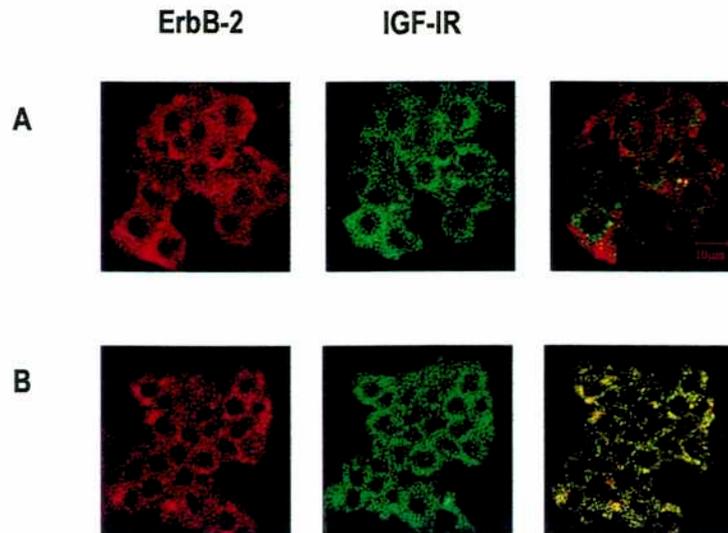


Figura 19. Localización del ErbB-2 y del IGF-IR por microscopía confocal de fluorescencia. Células C4HD fueron incubadas durante 48 h a 37°C en medio 2.5%SFBCn en ausencia (A) o en presencia (B) de MPA. ErbB-2 fue localizado utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-ErbB-2 seguido de una incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con rodamina (fluorescencia roja). IGF-IR fue localizado usando un anticuerpo monoclonal anti-IGF-IR seguido por una incubación con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC (fluorescencia verde). Las mismas células son mostradas en cada fila y las imágenes del panel derecho se formaron por la superposición de las imágenes de los otros dos paneles de la misma fila. La co-localización de ErbB-2 y de IGF-IR inducida por MPA se visualiza por la coloración amarilla (co-localización de una fluorescencia roja y una verde) en la superficie de las células. Se muestra un experimento representativo de tres. Barra de escala, 10 μ m.

PARTE II

El antiprogestágeno RU486 bloquea la proliferación de células C4HD y T47D inducida por HRG.

Resultados del laboratorio han mostrado recientemente la existencia de interacciones entre las vías de transducción de señales de progestágenos y HRG en el modelo experimental de carcinogénesis hormonal descrito anteriormente (Balañá et al., 1999, 2001). Al estudiar los mecanismos involucrados en este proceso se ha demostrado que MPA es capaz de activar a ErbB-2 y a ErbB-3 así como de inducir la síntesis de HRG (Balañá et al., 1999; 2001).

El objetivo de esta parte del trabajo fue el de explorar la probable naturaleza bidireccional de esta interacción a través del estudio de la capacidad de HRG de transactivar al receptor de progesterona. Todos los estudios han sido realizados en células epiteliales provenientes de cultivos primarios de los tumores mamarios murinos C4HD (Dran et al., 1995). Resultados recientes del laboratorio muestran que HRG es capaz de inducir una respuesta proliferativa tan potente como la que producen los progestágenos en las células C4HD (Balañá et al., 1999). Por lo tanto, investigamos en primer lugar, si el antagonista del RP RU486 tenía algún efecto sobre la proliferación celular inducida por HRG.

Como se muestra en la figura 20, el efecto estimulador de HRG es totalmente inhibido por RU 486. Se puede observar también que ASODN al ARNm del ErbB-2 son también capaces de provocar la inhibición de la proliferación inducida por HRG en células C4HD (Balañá et al., 1999 y en la figura 20). Se estudiaron en este trabajo, las vías de transducción de señales activadas por HRG. Es ampliamente conocido que HRG activa p42/p44 MAPK en células de cáncer de mama humano (Marte et al., 1995; Sepp-Lorenzino et al., 1996). Por lo tanto, se investigó la participación de MAPKs en la proliferación inducida por HRG en células C4HD mediante la preincubación de las mismas con PD98059, un inhibidor específico de MEK1. Como se puede observar en la figura 20, la inducción del crecimiento de las células C4HD por HRG fue bloqueada por PD98059. Experimentos similares fueron realizados en células de la línea T47D de células epiteliales de cáncer de

RESULTADOS PARTE II

mama humano que expresan receptores de progesterona tanto A como B (Edwards et al., 1991). Como ha sido reportado previamente (Fiddes et al., 1998), HRG estimula la proliferación de células T47D y este efecto fue bloqueado completamente por el pretratamiento con PD98059 (Fig. 20). Es interesante destacar que tal como se ha observado en las células C4HD, se ha encontrado que en las células T47D el antiprogestágeno RU486 es capaz de inhibir el crecimiento inducido por HRG. Estos hallazgos sugieren que las acciones fisiológicas de HRG en cáncer de mama podrían estar mediadas en parte por el RP. En todos los experimentos descritos, las células C4HD utilizadas como control se cultivaron en medio de cultivo suplementado con 2.5% SFBCh y las T47D en medio de cultivo suplementado con 0.1% SFBCh; estas fueron las mejores condiciones para detectar un fuerte efecto estimulador de la proliferación inducido por HRG. Mediante RIA no fue detectada la presencia de progesterona ni en el SFBCh ni en el medio de cultivo de células C4HD o T47D creciendo en presencia o ausencia de HRG. Esto indica que los niveles de progesterona son menores que $10^{-13}M$, concentración insuficiente para inducir la actividad del RP como factor de transcripción en células de mamífero (Gass et al., 1998).

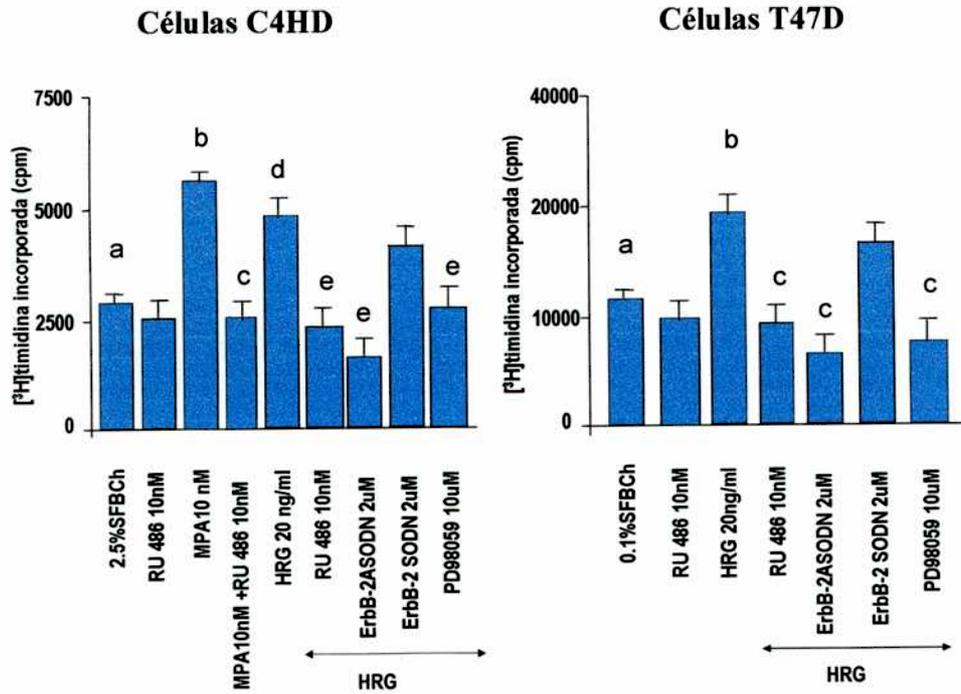


Fig. 20. Efectos de HRG en la proliferación celular. Células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores C4HD y células tumorales mamarias humanas T47D fueron incubadas durante 48h en medio con 2.5% o 0.1% SFBCCh respectivamente, suplementado o no con los siguientes compuestos: RU486, MPA, MPA+ RU486, HRG, HRG+ RU486, HRG+ ASODN ErbB-2, HRG + SODN ErbB-2 y HRG + PD 98059. Se utilizó la incorporación de [³H] timidina como medida de síntesis de DNA. Los datos se presentan como media ± SEM (n=8). Se muestra un experimento representativo de tres realizados. Para el caso de las células C4HD: b vs a; c vs b; d vs a; e vs d: p<0.001. Para el caso de las células T47D: b vs a; c vs b: p<0.001.

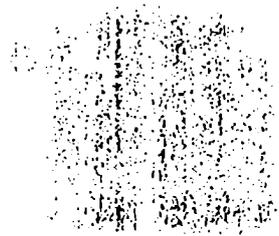
HRG induce la regulación negativa de ambas isoformas del receptor de progesterona.

Se investigó el efecto de HRG en la expresión a nivel proteico del RP en las células C4HD y en las T47D. Tanto la isoforma A como la B del RP fueron detectadas en las células C4HD por inmunoblots (Fig. 21). Según ha sido previamente descrito para la glándula mamaria murina normal (Shyamala et al., 1990), la isoforma A del RP (RP_A) fue la que se expresó en forma predominante en las células C4HD (Fig. 2). Luego de 2h de tratamiento de las células C4HD, HRG indujo una disminución significativa de los niveles proteicos detectados de RP_B (71± 7%) y RP_A (67±8%). El tratamiento de células C4HD con MPA produjo una disminución de 82± 6% y 87± 7% para RP_B y RP_A respectivamente. Estos datos son similares a los obtenidos en el tratamiento con HRG. Resultados comparables fueron encontrados en las células T47D en las que el tratamiento con HRG indujo una disminución de 71± 5% y 64± 4% para RP_B y RP_A respectivamente (Fig. 21). El tratamiento de estas células con MPA produjo un efecto similar ya que disminuyó en un 78± 6% y 82± 7% el RP_B y RP_A respectivamente. Es bien conocido que el tratamiento de células con progestágenos induce cambios en la movilidad electroforética de RP en geles con SDS que da como resultado un corrimiento hacia arriba de las bandas correspondientes a ambas isoformas (Takimoto et al., 1992; Beck et al., 1992; Clemm et al., 2000). Esto está asociado a un segundo paso en la fosforilación del RP inducida por el ligando que requiere entre 40 y 60min para completarse (Zhang et al., 1995). Se ha encontrado en este trabajo que el tratamiento con HRG tanto de las células C4HD como T47D indujo un corrimiento de las bandas correspondientes a ambas isoformas del RP similar al observado en el caso del tratamiento con MPA (Fig. 21). Este fue el primer indicio que sugería que HRG podría estar involucrada en la inducción de la fosforilación de RP.

De acuerdo con lo reportado previamente para el caso de tratamiento de células de cáncer de mama con progestágenos (Read et al., 1988), el tratamiento de las células C4HD o T47D con MPA produjo una disminución de los sitios de unión de

RESULTADOS PARTE II

progesterona detectados por ensayos de radioligando-receptor con dosis saturantes de [³H]R5020 (tabla 1). Es importante destacar que la disminución en la concentración proteica de RP inducida por HRG tanto en las células C4HD como T47D correlacionó también con una disminución de la cantidad de sitios de unión a progesterona detectados por ensayos de radioligando-receptor (tabla 1).



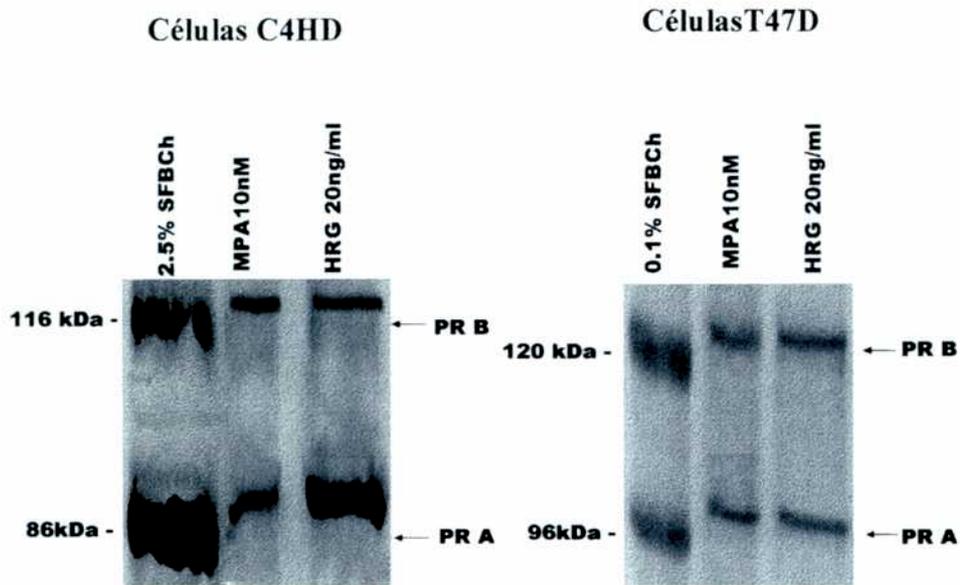


Fig.21 HRG induce una disminución de los niveles proteicos del RP. Células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores C4HD o células tumorales mamarias humanas T47D fueron incubadas durante 2h en medio con 2.5% o 0.1% SFBCh respectivamente, suplementado o no con MPA (10nM) o HRG (20ng/ml). 100µg de proteínas provenientes de lisados celulares totales fueron sometidos a electroforesis y western blot con un anticuerpo específico anti-RP (A y B). Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

Tabla 1: Disminución en los sitios específicos de unión a progestágenos inducida por HRG

	PR (fmol/mg proteína)		
	SFBCh	MPA (10nM)	HRG (20 ng/ml)
Células C4HD	1424.0 ± 355.8	350.3 ± 62.5 *	520.0 ± 80.1 *
Células T47D	939.0 ± 298.7	203.2 ± 58.9 *	198.2 ± 128.6 *

Niveles de RP medidos por ensayos a saturación de unión de [³H]R5020 según lo descrito en Materiales y Métodos. Cada valor representa la media ±SEM de seis determinaciones independientes.

*p<0.001 comparado con las respectivas células creciendo en SFBCh

Tabla1. Disminución en los sitios específicos de unión a progestágenos inducida por HRG. Células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores C4HD y células tumorales mamarias humanas T47D fueron incubadas durante 2h en medio con 2.5% o 0.1% SFBCh respectivamente, suplementado o no con MPA (10nM) o HRG (20ng/ml). Alícuotas de los lisados celulares totales fueron sometidos a ensayos de radioligando-receptor según lo descrito en Materiales y Métodos.

HRG aumenta la localización nuclear del receptor de progesterona.

Es ampliamente conocido que en ausencia de hormona el RP se distribuye entre la fracción extraíble por NaCl y la citosólica en extractos de células mamarias humanas mientras que luego de un tratamiento con hormona, se estimula al aumento de la cantidad de RP localizado en la fracción nuclear (El-Ashry et al., 1989). Se investigó entonces el efecto de HRG en la localización celular del RP. Como puede verse en la figura 22, el tratamiento de células C4HD con HRG durante 2h provocó un aumento significativo en la cantidad de RP con localización nuclear, medida por ensayos de radioligando-receptor, comparado con la que se obtuvo en células creciendo en medio suplementado con 2.5% SFBCh. Como era de esperarse, el tratamiento con MPA produjo un aumento de la unión específica de [³H] R5020 a la fracción nuclear comparado con la que se obtuvo en células creciendo en medio suplementado con 2.5% SFBCh. Resultados similares fueron hallados en las células T47D en las que tanto el tratamiento con HRG como con MPA indujo significativamente la localización nuclear comparado con la que se obtuvo para el caso de las células creciendo en medio con SFBCh 0.1% (Fig. 22).

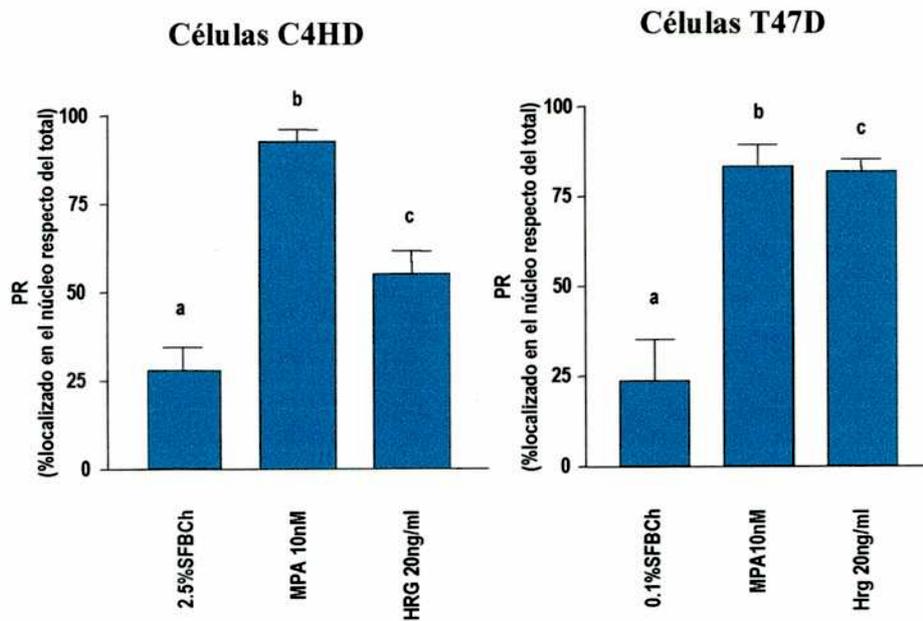


Fig.22 El tratamiento con HRG induce el aumento de la proporción de RP en el núcleo. RP se obtuvieron de extractos citoplasmáticos y nucleares de células epiteliales C4HD o T47D incubadas durante 2h en medio con 2.5% o 0.1% SFBCh respectivamente, suplementado o no con MPA (10nM) o HRG (20ng/ml). La cantidad de RP presentes en los extractos fue analizada por ensayos de radioligando-receptor utilizando dosis saturantes de [³H] R5020 y carbón -dextranso para separar el ligando libre del unido. Los datos se expresan como porcentajes en la fracción nuclear respecto del total de receptores en ambas fracciones(citosólica y nuclear). Los valores que se muestran en el histograma son la media \pm SE de ocho experimentos independientes. b vs a; c vs a: $p < 0.001$

HRG induce la unión del receptor de progesterona a un elemento respondedor a progesterona (PRE).

Se estudió si HRG era capaz de inducir la unión de RP a PRE, un requisito para la activación transcripcional inducida por RP. Para ello, extractos nucleares de células C4HD tratadas con HRG durante 2h fueron incubadas con una sonda marcada que corresponde a un oligodeoxinucleótido [³²P] PRE y la formación de complejos RP-PRE fue analizada por ensayos de corrimiento de la movilidad electroforética (EMSA). Los resultados de la figura 23 demuestran que HRG fue capaz de promover la formación de los complejos RP-PRE. El patrón de corrimiento observado en el caso del tratamiento de las células con HRG fue similar al observado en el caso del tratamiento con MPA. La especificidad de los complejos RP-PRE presentes luego del tratamiento con HRG así como con MPA fue demostrado por el desplazamiento de la marca observado sólo en el caso del agregado, en la mezcla de reacción, de cantidades crecientes de sonda no marcada; este efecto no pudo ser observado en el caso de la co-incubación con una sonda no marcada correspondiente a un PRE mutado (Fig. 23). Es importante destacar que debido a que el receptor de glucocorticoides (GR) se une al mismo elemento respondedor que RP, ninguno de los tipos celulares estudiados expresa al GR. (Montecchia et al., 1999; Gass et al., 1998).

Se estudiaron luego los mecanismos moleculares involucrados en la acción de HRG. Al haber demostrado que ErbB-2 tiene una importancia relevante en la proliferación inducida por HRG de las células C4HD (Balañá et al., 1999; 2001; Fig. 20); se estudió en primer lugar el efecto del bloqueo de la expresión de ErbB-2 en la inducción por HRG de la unión de RP al PRE. Como puede verse en la figura 24 A, el bloqueo de la expresión de ErbB-2 por el uso de ASODN al ARNm del ErbB-2, provocó una inhibición casi completa de la capacidad de HRG de inducir la formación del complejo RP-PRE. Se conoce también que HRG es capaz de activar MAPKs (Marte et al., 1995; Sepp-Lorenzino et al., 1996). Por lo tanto, se investigó luego si el bloqueo de la vía de señalización de MEK1-MAPK pudiera

inhibir la capacidad de HRG de promover la unión del RP al PRE. Como puede observarse en la figura 24 A, el pretratamiento de las células C4HD con PD98059, un inhibidor específico de MEK1, produjo una inhibición completa de la capacidad de HRG de inducir la formación del complejo PR-PRE. Resultados similares fueron hallados para el caso de las células T47D (Fig. 24 A). Los paneles inferiores de la figura 24 muestran el efecto específico de ASODN al ErbB-2 sobre la expresión a nivel proteico de ErbB-2 y de PD98059 sobre la activación de MAPKs. El efecto de ASODN ErbB-2 en la expresión de ErbB-2 a nivel proteína fue determinado por western blot en lisados celulares (Fig. 24 B). Como ya se había encontrado, (Balañá et al., 1999; 2001), el tratamiento de las células C4HD con 2 μ M ASODN redujo los niveles de ErbB-2 en un 65-75% mientras que los SODN no mostraron ningún efecto sobre los niveles proteicos ErbB-2. En forma similar, el tratamiento de células T47D con 2 μ M de ASODN al ErbB-2 redujo los niveles proteicos de ErbB-2 en un 70-80% mientras que los SODN no afectaron la expresión de ErbB-2 (Fig. 24 B). La actividad de las MAPKs en las células C4HD y T47D pretratadas con PD98059 fue evaluada por inmunoprecipitación de lisados celulares con un anticuerpo anti-MAPKs; los inmunocomplejos resultantes fueron luego sometidos a ensayos de fosforilación *in vitro* utilizando como sustrato a la proteína mielina básica (MBP). La activación de MAPKs por HRG en ambos tipos celulares fue suprimida por el pretratamiento con PD98059 (Fig. 24 C).

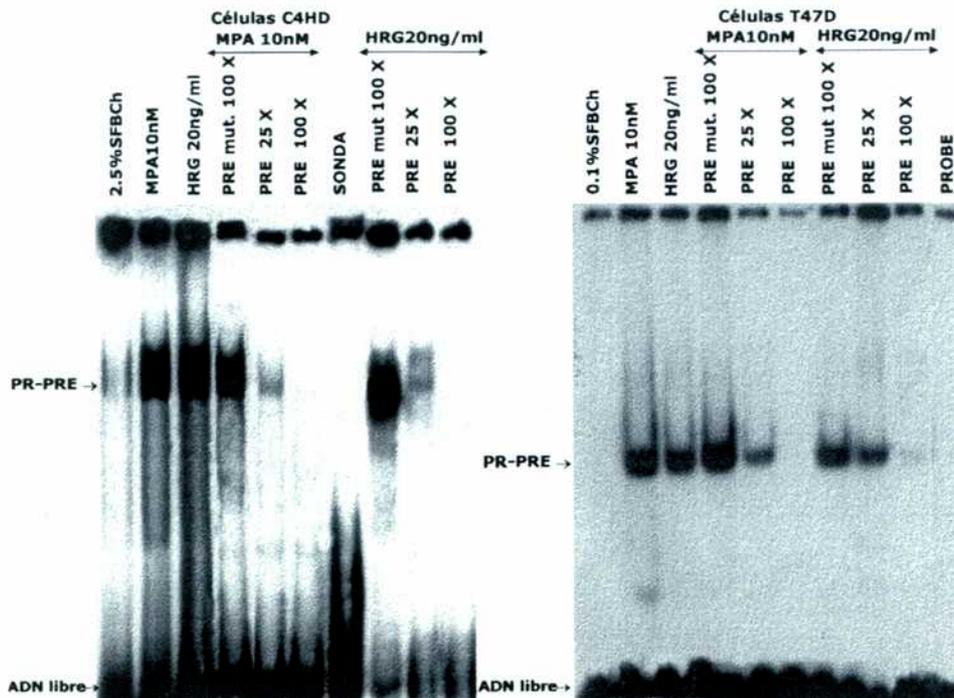


Fig.23 HRG promueve la unión del RP a un PRE. Células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores C4HD y células tumorales mamarias humanas T47D fueron incubadas durante 2h en medio con 2.5% o 0.1% SFBCh respectivamente, suplementado o no con MPA o HRG. Alícuotas de extractos nucleares de estas células conteniendo 4fmol de RP fueron incubadas con un 1 ng de una sonda de un oligodeoxinucléotido sintético de 27 pares de bases correspondiente a un [³²P]PRE durante 20 min a 37°C y luego analizadas por EMSA. La especificidad de los complejos RP-PRE se muestra en ensayos de desplazamiento de la marca utilizando cantidades crecientes (25 y 100 veces de exceso en masa) de PRE no marcado y 100 veces de PRE mutado (mut.). Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

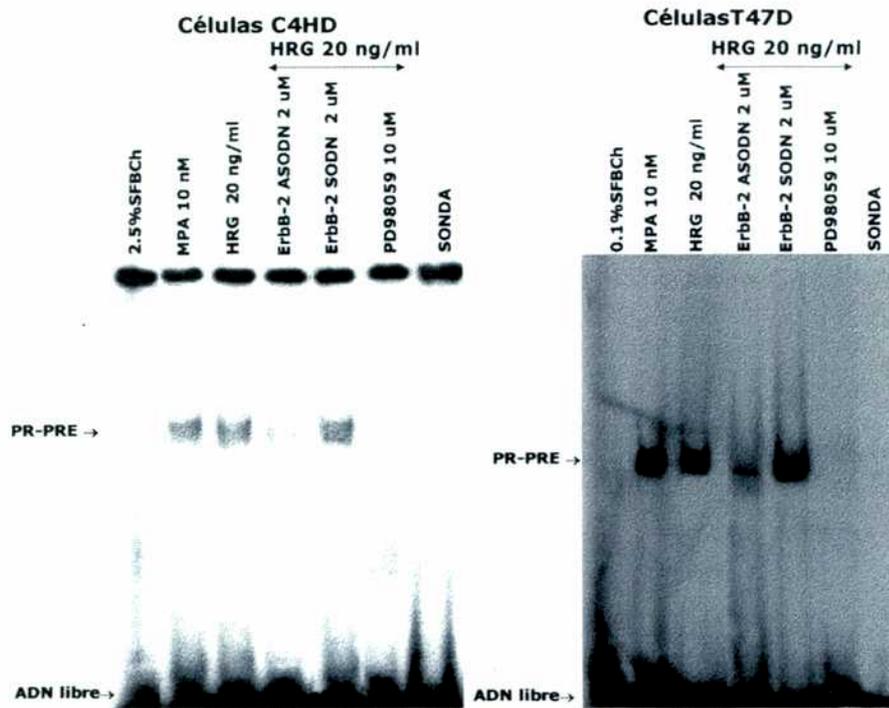
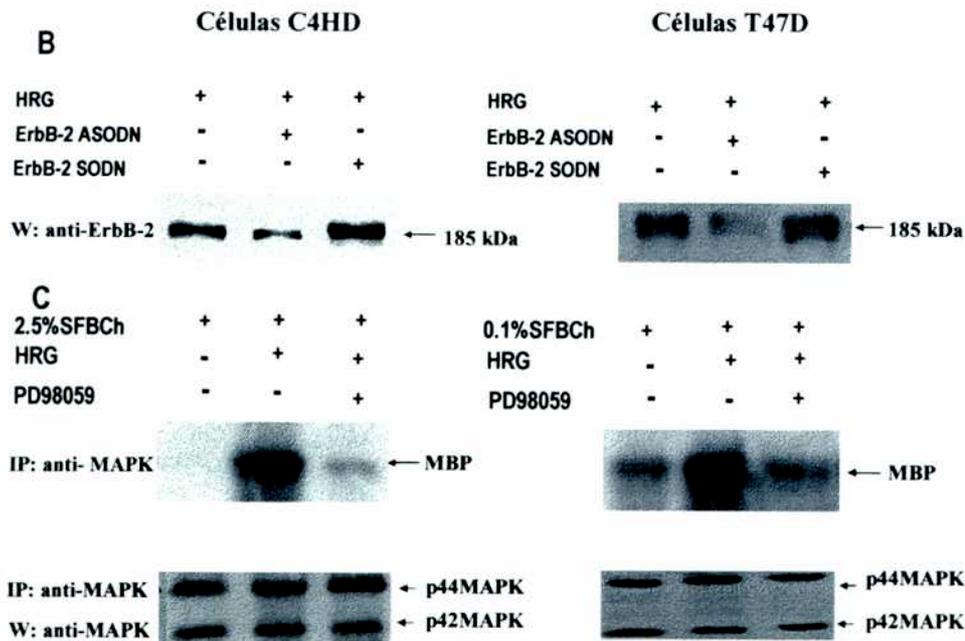


Fig. 24 El bloqueo de la expresión de ErbB-2 y la inhibición de la actividad de MAPK inhiben la capacidad de HRG de inducir la unión de RP a un PRE.

A.) Células C4HD o T47D en las cuales la expresión de ErbB-2 fue bloqueada por el uso de ASODN al ARNm de ErbB-2 o se inhibió la actividad quinasa de MEK1 al pretratarlas con un inhibidor farmacológico PD98059 fueron tratadas 2h a 37°C con HRG. Cuatro fmoles de RP provenientes de extractos nucleares de estas células fueron incubados con un 1 ng de una sonda de un oligodeoxinucléotido sintético de 27 pares de bases correspondiente a un [³²P]PRE durante 20 min a 37°C y luego analizadas por EMSA. Se incluye como control extractos correspondientes a células tratadas con el SODN al ARNm del ErbB-2.



B.) 80µg de proteínas provenientes de lisados de células C4HD o T47D tratadas durante 48h a 37°C con HRG, HRG + ASODN al ARNm de ErbB-2(2µM) y HRG + SODN al ARNm de ErbB-2 (2µM) fueron sometidos a electroforesis e *immunobloting* con un anticuerpo específico anti-ErbB-2. El análisis densitométrico de la banda correspondiente al ErbB-2 muestra un 68% de inhibición en su expresión luego del tratamiento con de ASODN al ARNm de ErbB-2. No se detectaron diferencias significativas en la expresión de ErbB-2 entre las células tratadas con HRG y las tratadas con SODN al ARNm del ErbB-2. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

C.) Células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores C4HD y células tumorales mamarias humanas T47D creciendo en medio con 2.5% o 0.1% SFBCCh respectivamente fueron incubadas durante 10 min con HRG (20ng/ml) o pretratadas durante 30 min con PD 98059(10µM) a 37°C antes de la estimulación con HRG. Se inmunoprecipitaron los lisados celulares utilizando un anticuerpo anti-MAPK. Se ensayó la actividad quinasa de MAPK en los inmunocomplejos usando la proteína mielina básica (MBP) como sustrato. Las proteínas fosforiladas fueron resueltas por electroforesis en geles 12% (SDS-PAGE) y reveladas por autorradiografía. En el panel inferior se muestra como control de carga, el análisis por inmunoblot con un anticuerpo anti-MAPK correspondiente a alícuotas idénticas de cada inmunoprecipitado. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

HRG induce la actividad transcripcional del receptor de progesterona.

Para investigar la capacidad de HRG de transactivar al RP se transfectaron en forma transiente células C4HD con un vector de expresión conteniendo al gen reportero CAT (cloranfenicol-acetil-transferasa) río abajo de dos secuencias PRE (PRE₂tk-CAT) y un vector de expresión para el gen de β -galactosidasa bajo el control de un promotor no inducible como el del citomegalovirus (CMV), como control interno de la transfección. El tratamiento de las células con MPA indujo la activación del gen reportero que fue completamente inhibida por el pretratamiento de las células con RU486 (Fig. 25). HRG fue capaz de promover una fuerte activación de PRE₂tk-CAT que fue inhibida por el tratamiento de las células tanto con ASODN al ErbB-2 como con PD98059 (Fig. 26). Estos resultados demuestran que la transactivación de RP por HRG requiere tanto un ErbB-2 funcional como la vía de las MAPK activa. Hallazgos similares fueron encontrados para el caso de las células T47D en los que HRG fue capaz de activar al gen reportero pero esa capacidad fue inhibida en los tratamientos con ASODN al ErbB-2 o con PD98059 (Fig. 25). La activación producida por HRG es dependiente del RP ya que RU486 inhibe completamente este efecto en ambos tipos celulares.

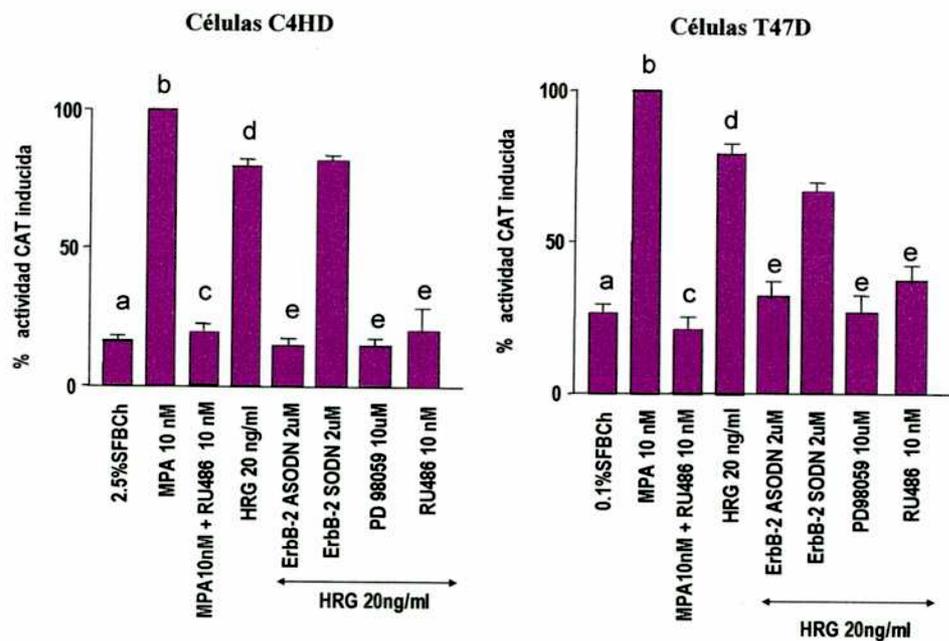


Fig. 25 HRG induce un aumento en la actividad transcripcional del RP. Células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores C4HD y células tumorales mamarias humanas T47D fueron transfectadas en forma transiente con 4µg/ml de un vector PRE₂-tk-CAT y 4µg/ml de un vector CMV-βGal como control interno de la transfección. Las células permanecieron sin tratar (2.5% o 0.1% SFBCCh respectivamente) o fueron tratadas con MPA, MPA + RU486, HRG, HRG + ASODN al ARNm de ErbB-2, HRG + SODN al ARNm de ErbB-2, HRG + PD98059 y HRG + RU486 durante 48 h a 37°C. Se midieron las actividades de CAT y β-Galactosidasa. Los resultados se presentan como un porcentaje de la activación donde 100% corresponde a la actividad máxima obtenida en presencia de MPA. Los datos se presentan como media ± SEM de seis experimentos independientes. b vs. a; c vs. b; a vs. d; e vs. d: p<0.001.

MAPK inducen la fosforilación del receptor de progesterona.

Es ampliamente conocido que el RP se encuentra fosforilado en ausencia de hormona y experimenta un aumento en su estado de fosforilación ante la estimulación hormonal (Takimoto et al., 1992; Edwards et al., 1993; Zhang et al., 1997; Knotts et al., 2001). Sin embargo, la importancia de su fosforilación permanece todavía sin dilucidar completamente. Numerosa evidencia parece indicar que la fosforilación del RP tiene un papel importante en la regulación tanto ligando-dependiente como independiente de la actividad transcripcional del RP (Zhang et al., 1994; Zhang et al., 1995; Takimoto et al., 1996; Bai et al., 1997). La mayoría de los sitios de fosforilación en el RP, así como en otros receptores de esteroides, contiene motivos Ser/Thr-Pro, que es una secuencia consenso para quinasas dependientes de prolina como las ciclinas dependientes de quinasas y las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Power et al., 1991; Zhang et al., 1995; 1997; Lange et al., 2000; Bagowski et al., 2001). En este trabajo, se encontró que el bloqueo de la activación de las MAPK provocó una inhibición en la capacidad de HRG de inducir tanto la unión de RP a PRE como la actividad del gen reportero (CAT) (Fig. 24 y 25). Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió evaluar la posibilidad de que MAPK activadas por HRG pudieran mediar la fosforilación de RP. Para estudiar si las MAPK podían inducir la fosforilación *in vitro* de RP, por un lado, se inmunoprecipitaron p42/p44MAPK de extractos proteicos de células C4HD tratadas o no con HRG durante 10 minutos y de células en las cuales la activación de las MAPK por HRG había sido bloqueada por la preincubación de las mismas con PD98059. Por otro lado, se inmunoprecipitó RP de células creciendo en medio suplementado con 2.5% SFBC h y se usó como fuente de RP en los ensayos de fosforilación *in vitro*. Como se mostró en la figura 25, RPs provenientes de células no estimuladas con MPA o HRG son transcripcionalmente inactivos. Se incubaron luego los inmunocomplejos de MAPK provenientes de células C4HD tratados según se describe anteriormente con el RP transcripcionalmente inactivo y se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* en presencia de [γ 32 P]ATP. Al finalizar la incubación, cada ensayo fue sometido a

electroforesis en condiciones desnaturalizantes (geles 10%); la parte superior de los geles fue secada y revelada por autorradiografía. La parte inferior de los geles, en donde se encontraban las MAPKs, fue electrotransferida a membranas de nitrocelulosa y revelada luego por western blot utilizando un anti-pMAPK como control de la activación de las MAPK (Fig.26 B). Estas membranas fueron luego tratadas para eliminar los anticuerpos unidos a ellas y reincubadas con un anticuerpo anti-MAPK para controlar que casi idénticas cantidades habían sido usadas en cada ensayo de fosforilación (Fig. 26 C). Como puede verse en la figura 26 A (1er.carril) y D del paper PR, MAPKs inactivas, obtenidas de células creciendo en medio suplementado con 2.5% SFBC_h no indujeron la fosforilación de RP. Sin embargo, MAPKs activadas por el tratamiento con HRG en células C4HD indujeron una fuerte fosforilación tanto de RP_A como de RP_B (Fig. 26 A (2do.carril) y D). Una mayor evidencia de que MAPKs estarían directamente involucradas en la fosforilación de PR está dada por el hecho de que, cuando MAPKs fueron inmunoprecipitadas de células en las cuales la activación de MAPKs por HRG había sido totalmente inhibida por PD98059, no se observó fosforilación del RP (Fig. 26 A (3er.carril)). La misma estrategia experimental se utilizó en el caso de las células T47D en este caso las condiciones de no activación fue la de células creciendo en medio sin suero. De acuerdo a lo que puede observarse en la figura 26 A y en el histograma de la figura 26 D se puede concluir que, MAPKs activadas por el tratamiento con HRG en la células T47D indujeron una fuerte fosforilación *in vitro* tanto de RP_A como de RP_B. Por lo tanto, estos resultados indicarían que tanto el RP humano como el murino puede ser fosforilado *in vitro* por MAPKs activadas por HRG. Como una confirmación más de estos hallazgos, se utilizó otro abordaje experimental. Por un lado se transfectaron en forma transiente células C4HD con un vector de expresión para la proteína de fusión HA-p42MAPK y 48h después de la transfección, las células fueron tratadas o no con HRG o bien fueron sometidas a un pretratamiento con PD98059 previo a la estimulación con HRG. Se inmunoprecipitó p42MAPK de los lisados celulares correspondientes a cada tratamiento con un anticuerpo anti-HA. Por otro lado, se transfectaron en forma transiente células C4HD con un vector de expresión para la proteína de fusión RP_B-Flag y luego se inmunoprecipitó RP_B de células creciendo en medio suplementado con

2.5% SFBCh con un anticuerpo anti-Flag y se usó como fuente de RP_B en los ensayos de fosforilación *in vitro*. Como control tanto del éxito de las transfecciones de ambas proteínas de fusión como de la especificidad de los anticuerpos, se realizaron inmunoprecipitaciones de lisados de las células, creciendo en medio suplementado con 2.5% SFBCh, transfectadas o no con uno u otro vector con anticuerpos anti-HA y anti-Flag. Los inmunocomplejos se sometieron a ensayos de western blot con un anticuerpo anti-HA o anti-Flag. Las membranas fueron luego tratadas para eliminar los anticuerpos unidos a ellas y reincubadas con anticuerpos anti-MAPK o anti-RP. Como control de la presencia de la proteína endógena, se agregaron en los geles muestras correspondientes a lisados de las mismas células sin inmunoprecipitar. Esas membranas fueron reveladas con anticuerpos anti-MAPK y anti-RP (Fig. 28).

Se realizaron a continuación ensayos de fosforilación *in vitro* con los inmunoprecipitados de p42-MAPK y de RP_B. Como puede verse en la figura 27 A (2do.carril) y D; p42-MAPK activada por HRG induce una fuerte fosforilación de RP_B. Resultados similares fueron obtenidos cuando las transfecciones se hicieron en células T47D (Fig. 27 A (2do.carril) y D).

Por otro lado; recientemente ha sido reportado a la ser294 del RP humano como un sitio importante en la activación del receptor por MAPK (Lange et al., 2000; Shen et al 2001; Knotts et al., 2001). Quisimos entonces estudiar la presencia de este residuo fosforilado para el caso del receptor humano tratado con HRG. Utilizando extractos de proteínas totales de células T47D que habían sido tratados o no con HRG y mediante ensayos de western blot utilizando anticuerpos específicos contra ese residuo fosforilado en el RP humano, pudimos detectar que HRG es capaz de inducir la fosforilación de este residuo a partir de por lo menos 10 minutos de tratamiento. Este efecto no se observó en células que no habían sido tratadas con el factor de crecimiento o bien que habían sido pretratadas con PD98509 previo a la estimulación con HRG (Fig. 29). Es importante destacar que este anticuerpo tiene una afinidad mayor por el residuo fosforilado en la isoforma B del RP que el que se encuentra en la isoforma A; esa es la causa por la cual la banda correspondiente a esta última aparece más tenue.

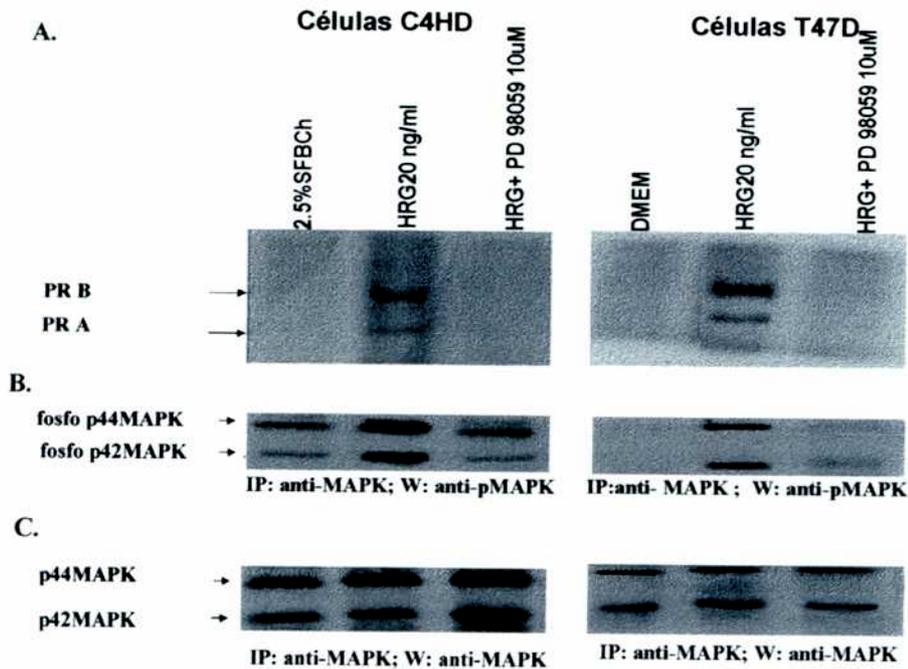


Fig. 26 La fosforilación de RP inducida por HRG involucra a las MAPK.

A.) Células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores C4HD y células tumorales mamarias humanas T47D creciendo en medio con 2.5% o libres de suero respectivamente fueron incubadas o no durante 10 min con HRG (20ng/ml) o pretratadas durante 30 min con PD 98059(10 μ M) a 37°C antes de la estimulación con HRG. MAPKs fueron inmunoprecipitadas de los lisados celulares utilizando un anticuerpo anti-MAPK. PR, inactivo transcripcionalmente, inmunoprecipitado de las células sin tratar con HRG fue utilizado como sustrato para ensayar la actividad quinasa de MAPK. Las proteínas fosforiladas fueron resueltas por electroforesis en geles 10% (SDS-PAGE) y la parte superior de los mismos fue revelada por autorradiografía. Se muestra un experimento representativo de tres realizados. **B.)** La activación de las MAPK se evaluó al electrotransferir la parte inferior de los geles a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente esas membranas fueron sometidas a western blot utilizando anticuerpos anti-fosfo MAPK. Se muestra un experimento representativo de tres realizados. **C.)** Las membranas fueron reincubadas con un anticuerpo anti-MAPK totales. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

D.

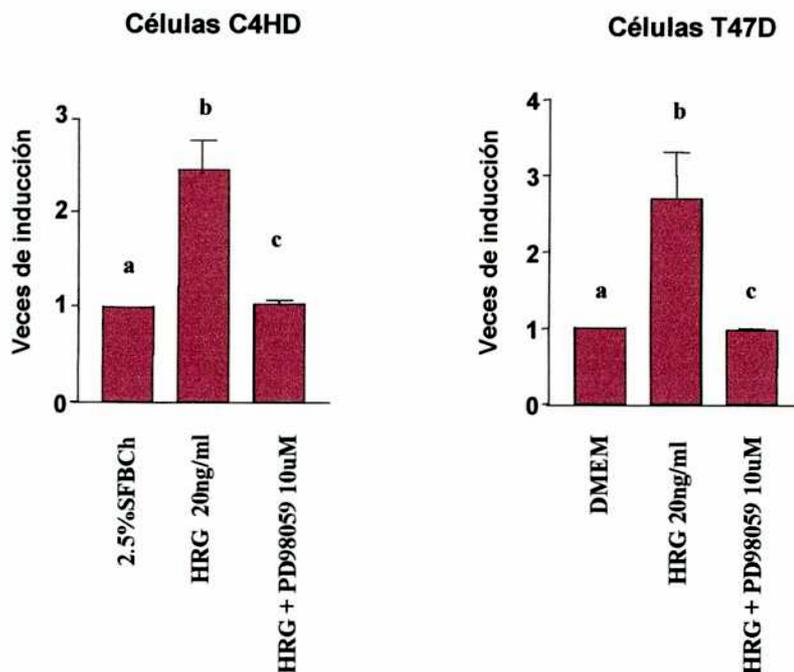


Fig. 26 La fosforilación de RP inducida por HRG involucra a las MAPK.

D.) Análisis densitométrico correspondientes a las bandas obtenidas en la autorradiografía. Los datos se presentan como veces de inducción respecto de la condición control (2.5% SFBCCh o DMEM) que se tomó como 1 y representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. En todos los casos se estandarizaron los valores obtenidos en las autorradiografías respecto de los valores de MAPK totales obtenidos para cada experimento. b vs a; c vs b: $p < 0.01$.

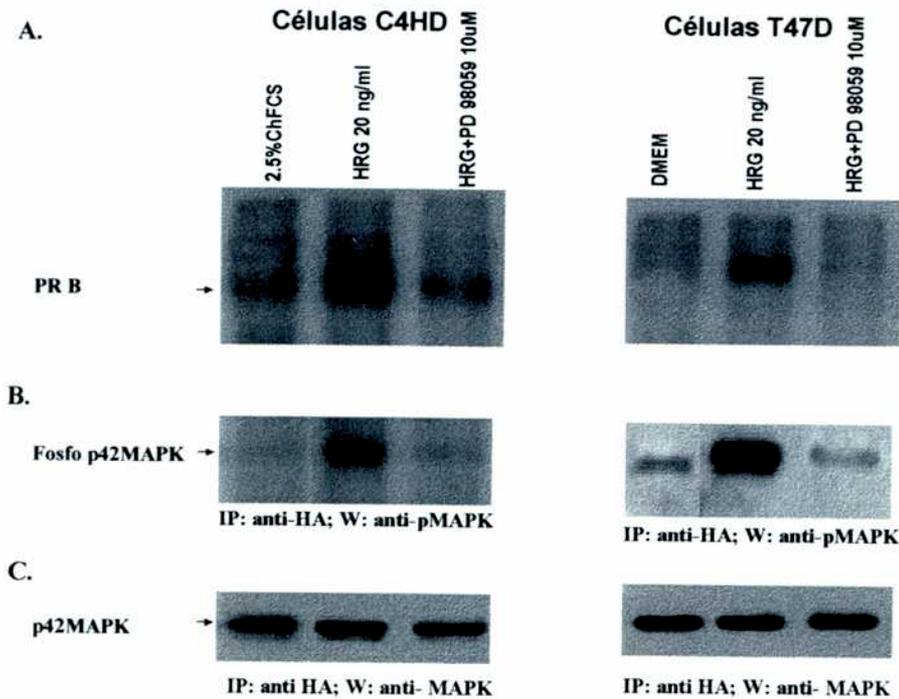


Fig. 27 La fosforilación de RP_B inducida por HRG involucra a p42MAPK.

A.) Células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores C4HD y células tumorales mamarias humanas T47D, fueron transfectadas en forma transiente con el vector de expresión HA-p42MAPK y 48h después fueron incubadas o no durante 10 min con HRG (20ng/ml) o pretratadas durante 30 min con PD 98059(10 μ M) a 37°C antes de la estimulación con HRG. Los lisados celulares y p42MAPK se inmunoprecipitó utilizando un anticuerpo anti-HA. Se ensayó la actividad quinasa de MAPK utilizando RP_B transcripcionalmente inactivo, de células transfectadas en forma transiente con el vector de expresión hPRB-FLAG y sin tratar con HRG, inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-Flag como sustrato. Las proteínas fosforiladas fueron resueltas por electroforesis en geles 10% (SDS-PAGE) y la parte superior de los mismos fue revelada por autorradiografía. Se muestra un experimento representativo de tres realizados. **B.)** La activación de las MAPK se evaluó al electrotransferir la parte inferior de los geles a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente esas membranas fueron sometidas a *immunoblotting* utilizando anticuerpos anti-fosfo MAPK. Se muestra un experimento representativo de tres realizados. **C.)** Las membranas fueron reincubadas con un anticuerpo anti-MAPK totales. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

D.

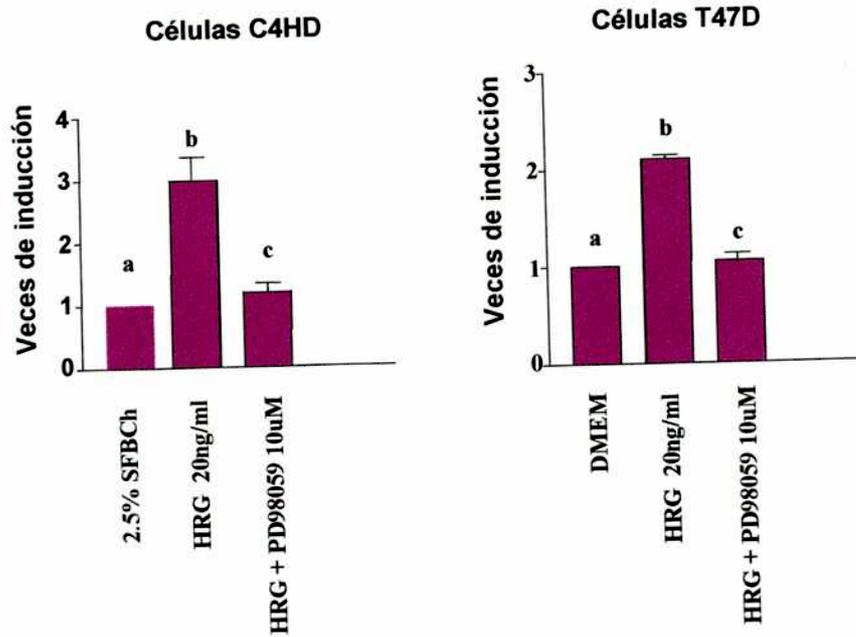


Fig. 27 La fosforilación de RP_B inducida por HRG involucra a ERK2.

D.) Análisis densitométrico correspondientes a las bandas obtenidas en la autorradiografía. Los datos se presentan como veces de inducción respecto de la condición control (2.5% SFBCCh o DMEM) y representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. En todos los casos se estandarizaron los valores obtenidos en las autorradiografías respecto de los valores de MAPK totales obtenidos para cada experimento. b vs a; c vs b: $p < 0.01$.

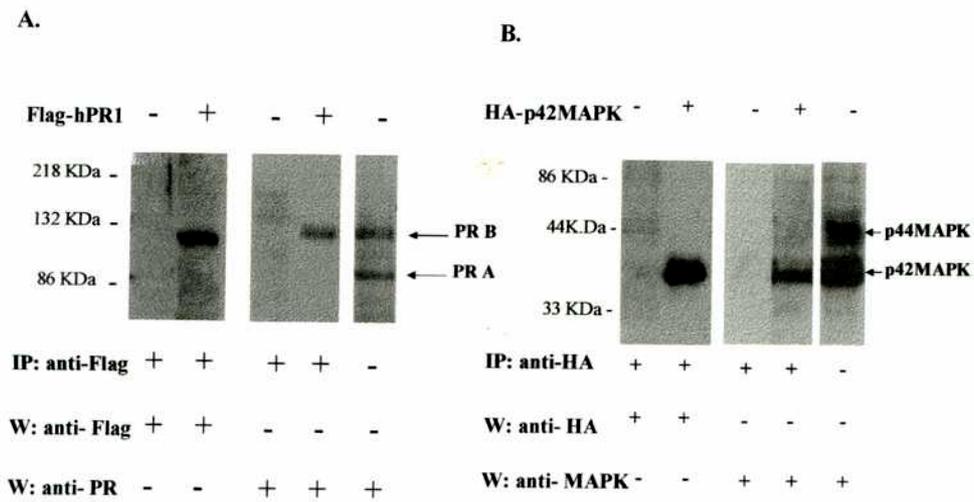


Fig. 28 Control de Expresión de PRB-FLAG y HA-ERK2. A.) Células epiteliales provenientes de cultivos primarios de tumores C4HD fueron transfectadas o no en forma transiente con 4µg/ml de un vector de expresión hPR1-FLAG que da como resultado la expresión de una proteína de fusión RP_B-FLAG. Luego de 48 h de incubación en medio 2.5%SFBC_h se realizaron extractos celulares totales. 1mg de proteínas provenientes de los extractos proteicos totales fueron inmunoprecipitados utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Los inmunocomplejos fueron sometidos a una electroforesis y western blot usando un anticuerpo anti-FLAG. Las membranas fueron luego reincubadas y reveladas usando un anticuerpo anti-RP. Como control se utilizó un lisado celular que fue revelado por la misma técnica con el mismo anticuerpo anti-RP. **B.)** Células epiteliales C4HD fueron transfectadas o no en forma transiente con 4µg/ml de un vector de expresión HA-p42MAPK que da como resultado la expresión de una proteína de fusión HA-p42MAPK. Luego de 48 h de incubación en medio 2.5%SFBC_h se realizaron extractos celulares totales. 1mg de proteínas provenientes de los extractos fueron inmunoprecipitados utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA. Los inmunocomplejos fueron sometidos a una electroforesis y western usando un anticuerpo anti-HA. Las membranas fueron luego reincubadas y reveladas usando un anticuerpo anti-MAPK. Como control se utilizó un lisado celular que fue revelado por la misma técnica con el mismo anticuerpo anti-MAPK.

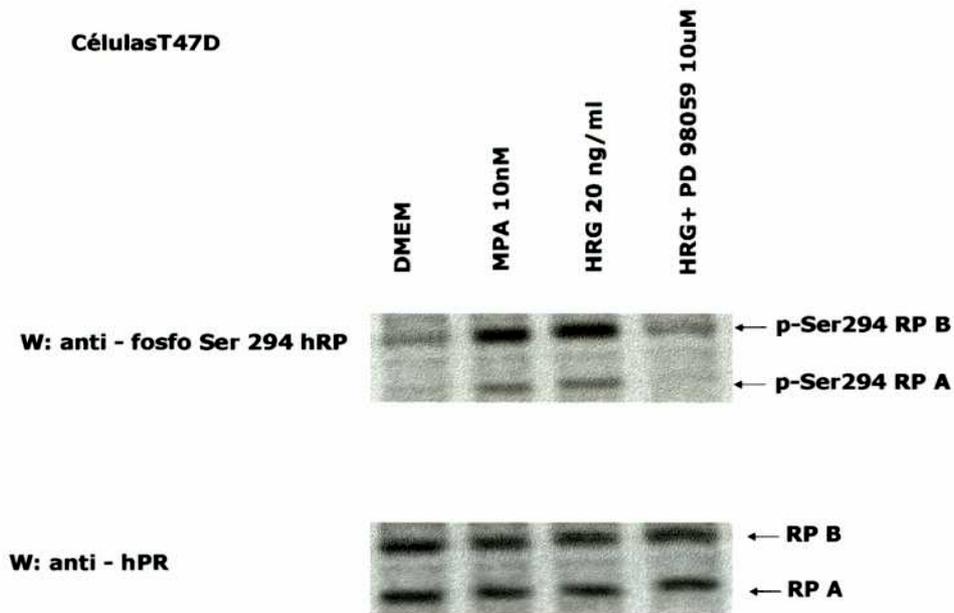


Fig. 29 MAPK activadas por HRG están involucradas en la fosforilación de la ser294 del RP humano. Panel superior. Células T47D creciendo en medio libre de suero fueron incubadas o no durante 10 min con HRG (20ng/ml) o pretratadas durante 30 min con PD 98059 (10 μ M) a 37°C antes de la estimulación con HRG. Extractos proteicos de estas células fueron sometidos a SDS-PAGE (7.5%) y luego electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa. El residuo Ser294 fosforilado en el RP fue detectado mediante western blot utilizando un anticuerpo específico anti-Ser294. Se muestra un experimento representativo de tres realizados. **Panel inferior.** Las membranas fueron tratadas para eliminar los anticuerpos unidos a ella y luego reincubadas con anticuerpo anti-RP. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

DISCUSIÓN

Discusión parte I.

Nuestros datos muestran una nueva red de interacciones entre las vías de transducción de señales activadas por PR y por los miembros de la familia de receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I y II, en un modelo en el cual los progestágenos son capaces de inducir tanto *in vivo* como *in vitro* la proliferación de células tumorales mamarias (Molinolo et al., 1987; Lanari et al., 1989).

Uno de los aspectos más importantes de esta parte del trabajo es la de haber podido ser capaces de demostrar la existencia de una interacción jerárquica entre IGF-IR y ErbB-2 en la cual el IGF-IR dirige la activación de ErbB-2.

MPA induce la expresión de ErbB-2 y ErbB-3 y la fosforilación en tirosina de ErbB-2 a través de la unión al receptor de progesterona.

La expresión de ErbB-2, ErbB-3 y ErbB-4 fue encontrada en cultivos primarios de células epiteliales de una línea tumoral inducida por acetato de medroxiprogesterona en ratones Balb/c. Los presentes resultados han demostrado que el tratamiento con MPA fue capaz de aumentar la expresión de ErbB-2 y ErbB-3 así como de inducir la fosforilación en tirosina de ErbB-2 en cultivos primarios de células epiteliales de tumores C4HD. Además, el antiprogestágeno RU486 inhibió la capacidad de MPA de inducir la expresión de estos dos RTKs, indicando que MPA ejercería su efecto a través de la unión al receptor de progesterona. Múltiples factores y niveles de regulación están involucrados en el control de los niveles de expresión de ErbB-2 en tumores de mama. En particular, la modulación

DISCUSIÓN DE RESULTADOS PARTE I.

hormonal ha sido descripta. Así, varios laboratorios han establecido claramente que los estrógenos inhiben la expresión de ErbB-2 tanto a nivel de ARNm como proteico y que este efecto es revertido por antiestrógenos (Dati et al., 1990; Read et al., 1990; Taverna et al., 1994; Grunt et al., 1995; De Bortoli and Dati, 1997). Aún cuando interacciones entre EGF-R y progestágenos han sido descriptas (Murphy et al., 1986,1988; Sarup et al., 1988), los efectos de estos esteroides sobre la expresión de ErbB-2 permanecen menos estudiados. Taverna et al., (1994) han descripto que en condiciones de cultivo en las que los progestágenos inhiben la proliferación celular de líneas celulares de tumores mamarios T47D y ZR 75.1, la progesterona es capaz de inducir el aumento de la expresión de ErbB-2 tanto a nivel de ARNm como proteico. Otros autores muestran también que la progesterona fue capaz de aumentar los niveles de fosforilación en tirosina de EGF-R y de ErbB-2 en la línea de adenocarcinoma felino K12; sin embargo no fue capaz de promover la proliferación celular en este modelo (Mondiano et al., 1991). En contraste con estos resultados, otros autores han reportado que el tratamiento con progestágenos o antiprogestágenos no ha causado ningún efecto en el RNAm de ErbB-2 o en su expresión a nivel de proteína en células MCF-7 pretratadas con estradiol aún cuando contengan altos niveles de PR y en las T47D con alto contenido de PR. Sin embargo, estos autores no describen el efecto de los progestágenos o los antiprogestágenos sobre la proliferación de estas células (Read et al., 1990). Los presentes hallazgos concuerdan más con los recientemente reportados por Lange et al., (1998) en los que se muestra que el progestágeno R5020 aumenta la expresión de ErbB-2 y de ErbB-3 en la línea celular de adenocarcinoma mamario T47DYB que expresa constitutivamente la isoforma B del receptor de progesterona. Existe sin embargo una diferencia destacable entre estos hallazgos y los nuestros ya que Lange et al., (1998) encuentran que mientras las células

DISCUSIÓN DE RESULTADOS PARTE I.

estaban en una fase de arresto celular provocada por el progestágeno, éste es capaz de inducir la inducción de la expresión de ErbB-2 y ErbB-3 así como de provocar una potenciación en la activación de las vías de transducción de señales estimuladas por EGF. Esto se evidencia como un aumento en la fosforilación en tirosina del EGF-R y en la activación de moléculas de señalización asociadas con RTKs tipo I como Cbl e isoformas de Shc (p66 y p52) respecto de la producida solamente por EGF.

Activación de ErbB-2 a través de una interacción jerárquica con IGF-IR.

La conexión entre los caminos de transducción de señales estimulados por RTKs tipo I y II la proporciona ErbB-3 ya que es el único miembro de los RTKs tipo I con la capacidad de unir y activar a la p85, subunidad regulatoria de la PI-3K (Carraway and Cantley, 1994; Fedi et al., 1994; Grauss-Porta et al., 1997). Esta habilidad le confiere al ErbB-3 la capacidad de compartir las vías de transducción de señales con los IGFs ya que, la activación del IGF-IR produce la fosforilación en tirosina de una proteína sustrato IRS-1 que a su vez se une y activa a la p85 (Backer et al., 1993). La existencia de interacciones entre ErbB-2 y IGF-IR ha sido un hallazgo consistente con lo previamente encontrado en el laboratorio al haber reportado que las células C4HD no tienen respuesta mitogénica frente a un estímulo con HRG en ausencia de un IGF-IR funcional (Balañá et al., 1999). En el transcurso de este trabajo, la presencia de interacciones entre ErbB-2 y IGF-IR fue sugerida por el hallazgo de que las combinaciones de ASODNs dirigidos al ErbB-2 y al IGF-IR mostraron la falta de efectos sinérgicos o aditivos. Efectos aditivos se hubieran esperado si ambos receptores

DISCUSIÓN DE RESULTADOS PARTE I.

gatillaran vías de señalización independientes. Efectos sinérgicos hubieran podido existir si la vía de señalización de un receptor potenciara o estimulara la del otro. Por lo tanto, sólo un mecanismo que involucrara una interacción jerárquica entre IGF-IR y ErbB-2 donde uno de ellos es esencial para la activación del otro, podía explicar los resultados obtenidos.

En efecto, se ha demostrado aquí que el bloqueo de la expresión de IGF-IR produjo la inhibición de la fosforilación en tirosina de ErbB-2 inducida por MPA en estas células. Como el bloqueo de la expresión de ErbB-2 no tuvo efecto sobre la fosforilación en tirosina del IGF-IR, estos hallazgos demuestran que efectivamente se requiere una interacción jerárquica para que ocurra la fosforilación y por consiguiente activación de ErbB-2. Existen reportes previos que muestran la relevancia de IGF-IR en los caminos de señalización de ErbBs. Así, fibroblastos embrionarios de ratón que sobre expresan ErbB-2 pero carecen de IGF-IR no responden a la mitogénesis ni a la transformación inducida por EGF (Coppola et al., 1994). Swantek y Baserga (1999) han visto que una activación prolongada de ERK2 por EGF requiere la presencia de IGF-IR funcional en fibroblastos embrionarios de ratón.

La interacción entre RTK tipo I y II ha sido también observada en células del epitelio mamario. Ethier y sus colaboradores demostraron la existencia de interacciones sinérgicas entre EGF-R y IGF-R en células epiteliales mamarias normales que presentan un requerimiento absoluto de la activación de ambos receptores para proliferar (Ram et al., 1995). En cáncer de mama se han reportado también interrelaciones entre ErbB-2 e IGF-IR. Así, en la serie de líneas celulares de carcinomas mamarios 21T, un incremento progresivo en los niveles de ErbB-2 y en su fosforilación constitutiva en tirosina correlaciona con una independencia de IGF-I en la células 21MT-2, que poseen niveles intermedios de ErbB-2 y con una independencia combinada de EGF e IGF-I en las 21MT-1 con altos niveles

DISCUSIÓN DE RESULTADOS PARTE I.

de ErbB-2 (Ram et al., 1996). Recientemente, ErbB-2 fue transfectado en las líneas celulares humanas provenientes de epitelio mamario normal MCF-10A y H10N2 (Woods Ignatoski et al., 1999). La sobre expresión de ErbB-2 le confiere a ambas líneas celulares la independencia de IGF-I para los procesos proliferativos. Nuestros propios resultados que demuestran un requerimiento de un IGF-IR funcional para fosforilar y por lo tanto activar al ErbB-2, están en concordancia con todos estos hallazgos. Es decir, puede interpretarse que ya que IGF-IR es requerido para activar ErbB-2, aquellas células que expresen altos niveles de un ErbB-2 constitutivamente activo no requieran un IGF-IR funcional para proliferar. Por lo tanto, existe así una independencia de IGFs en el evento de proliferación celular.

La interacción no ortodoxa entre miembros de la familia de los RTKs tipo I y II, descrita aquí por primera vez, involucra una asociación física entre ErbB-2 y IGF-IR directa o indirectamente a través de un componente adicional. Se encontró usando tanto inmunoprecipitación como microscopía confocal que MPA es capaz de aumentar los niveles del complejo heterómero en las células C4HD paralelamente con su capacidad de inducir el aumento en la expresión de ErbB-2.

En una visión de conjunto, estos resultados son consistentes con un modelo molecular completamente nuevo para explicar los mecanismos de activación de ErbB-2. Como ErbB-2 es un receptor para el cual no se ha descubierto aún un ligando, su activación ha sido siempre explicada por la formación de una extensa red de dímeros con otros RTKs tipo I inducida por los ligandos de EGF-R, ErbB-3 y ErbB-4 (Grauss-Porta et al., 1997). Se ha mostrado ahora que ErbB-2 es capaz de formar un complejo heterómero con IGF-IR, un RTK tipo II. La importancia jerárquica de IGF-IR en la activación de ErbB-2 ha sido demostrada por el hecho de que en ausencia de IGF-IR, ErbB-2 no resulta fosforilado aún cuando la expresión de sus compañeros de heterodimerización conocidos, a saber EGF-R, ErbB-

DISCUSIÓN DE RESULTADOS PARTE I.

3 y ErbB-4 no se halle afectada por la ausencia de IGF-IR. Resta por dilucidar si en la molécula de ErbB-2, la asociación física con IGF-IR provoca la fosforilación de un grupo de residuos tirosina distinto del que se fosforila cuando ErbB-2 heterodimeriza con los otros miembros de la familia de los RTKs tipo I y si la fosforilación de ambos grupos es requerida para conectar la activación de ErbB-2 con vías de señalización mitogénicas.



Discusión parte II.

¿Si los progestágenos pueden regular positivamente las vías de señalización de factores de crecimiento, por qué los factores de crecimiento no pueden modular la vía de los receptores de hormonas esteroideas? Esta es la pregunta que nos llevó a esta búsqueda. Una hipótesis podría ser que los factores de crecimiento actúan como amplificadores de la acción de los progestágenos. Por activación de un receptor de membrana, se gatilla una cascada de señalizaciones que da como resultado una respuesta biológica cuya característica depende tanto del ambiente celular como de la señal externa. Este ha sido tradicionalmente un principio en la traducción de señales celulares y desde hace algún tiempo, algunos de los mecanismos que postulaban la flexibilidad celular han sido develados. Una de estas estrategias es la comunicación tanto entre vías de señalización de receptores de membrana como entre receptores de membrana e intracelulares, con el objeto de alcanzar una integración del mensaje. En este trabajo se describe por primera vez, que la vía de señalización de HRG converge con la del receptor de progesterona al producir su activación como factor de transcripción en ausencia de progestágenos. Es importante destacar que este efecto estaría dado por un mecanismo que involucraría a la presencia de ErbB-2 funcional y de las MAPK activas. Además hemos sido capaces de demostrar que MAPK activadas por HRG han podido fosforilar *in vitro* al RP tanto murino como humano.

El antiprogestágeno RU486 bloquea la proliferación de células C4HD y T47D inducida por HRG.

Desde hace algún tiempo se está estudiando la hipótesis de que los factores de crecimiento podrían en realidad mediar los efectos de los esteroides en el útero y en el tejido mamario (Mc Lachlan et al., 1991; Dickson R.B., 1987) Resultados previos de nuestro laboratorio habían demostrado el efecto

DISCUSIÓN RESULTADOS PARTE II.

mitogénico de HRG en las células C4HD y la potenciación de su acción en combinación con MPA (Balañá et al., 1999). Asimismo, es ampliamente conocido el efecto proliferativo que ejerce tanto el EGF (Lange et al., 1999), como la HRG (Fiddes et al., 1998) en las células de carcinoma mamario humano T47D o en células de mama normal como las de la línea celular MCF-10A (Ram et al., 1995). Estos datos concuerdan con la capacidad que tienen células T47D pretratadas con progestágenos de proliferar en respuesta a EGF a pesar de los bajos niveles de que una proteína clave en el inicio de la transcripción de genes que está activa en su estado hiperfosforilado, retinoblastoma (RB) se encuentre en estados de fosforilación bajos, (Groshong et al., 1997) y refuerzan también la importancia de la influencia de los progestágenos y de sus receptores en estos eventos. Se ha descrito también una potenciación entre la acción del EGF y de los progestágenos en lo que concierne a la proliferación de las células T47D (Lange et al., 1998 y 1999). A diferencia de las células C4HD, los progestágenos en esta línea sólo producen una primera ronda de proliferación y provocan una mayor sensibilización de las células a los efectos de los factores de crecimiento (Lange et al., 1999).

En estos efectos estarían involucradas las MAPK activas, ya que se ha visto que el bloqueo de la actividad de las mismas inhibe la acción de los factores de crecimiento sobre la proliferación celular (Fiddes et al., 1998). Todos estos hallazgos proponían la hipótesis de una interacción en un sólo sentido: desde los progestágenos hacia la vía de los factores de crecimiento.

Hay poca información sobre la influencia de la vía de los factores de crecimiento con receptores de membrana sobre la de receptores de hormonas esteroideas. Existen evidencias de la acción del EGF como un factor con la capacidad de poder tener un efecto mimético al de los estrógenos en células del endometrio de ratón (Ignar-Trowbridge et al., 1992), pero poco se sabe sobre la influencia de esta familia de factores de crecimiento sobre el receptor de progesterona.

Al explorar la posible influencia de HRG sobre la proliferación celular mediada por progestágenos, en este trabajo se ha encontrado que el antiprogestágeno RU486 ha sido capaz de inhibir la proliferación inducida por este factor de

DISCUSIÓN RESULTADOS PARTE II.

crecimiento tanto en un modelo murino como en uno humano. Estos resultados estarían hablando de la participación del RP como una de las vías utilizadas por HRG para ejercer su efecto mitogénico y proporcionaron los primeros indicios para empezar a estudiar la naturaleza de la interacción entre estas vías de transducción de señales que aparecían cada vez más relacionadas entre sí.

Heregulina induce la disminución de los niveles proteicos de ambas isoformas del receptor de progesterona.

Ha sido ampliamente descrita la disminución de los niveles proteicos del RP por su ligando específico. Así, en células T47D el tratamiento con R5020 resultó en una disminución de los niveles de RP dependiente del tiempo que comienza a observarse notablemente a partir de pocas horas de incubación con el progestágeno y luego de 24h de tratamiento éstos se vuelven casi indetectables (Read et al., 1988; El-Ashry et al., 1989; Beck et al., 1992; Lange et al., 2000). Existen fuertes evidencias de que este proceso involucraría a la degradación de la proteína más que una regulación a nivel transcripcional (Lange et al., 2000). Si bien se desconoce la importancia biológica de este fenómeno, una razón por la cual las células podrían gastar energía para degradar receptores activados sería la de atenuar sus propias respuestas transcripcionales. Por otro lado, el *turnover* de los receptores nucleares podría proporcionar un mecanismo para reprogramar el aparato transcripcional luego de cada estímulo. De esta forma, receptores ya modificados podrían ser reemplazados por otros recién sintetizados y con todas sus funciones. Entonces, en el estado estacionario de los tejidos en los cuales los RPs están constantemente expuestos a niveles variables de hormona, la regulación negativa de los niveles proteicos del receptor podría permitir la continua activación transcripcional de los genes regulados por RP.

En este trabajo se ha podido ver que el tratamiento con HRG tanto de las células C4HD como de las T47D indujo tanto una disminución de los niveles de ambas isoformas del RP como una disminución de los sitios de unión a progesterona similar a la que indujo el tratamiento con el MPA. En coincidencia

DISCUSIÓN RESULTADOS PARTE II.

con estos resultados ha sido demostrado previamente que el tratamiento de células de carcinomas mamarios humanos T47D, MCF-7 y ZR75-1 con EGF produjo una disminución en la cantidad de sitios de unión a progesterona sin afectar su afinidad por el progestágeno (Sarup et al., 1988). Sin embargo, otros compuestos como el 8Br-AMPC y el ácido ocadaico que tienen la capacidad de aumentar la actividad transcripcional del RP de pollo (Bai et al., 1997) no son capaces de disminuir la cantidad de RP en células T47D (Beck et al., 1992). Como la cantidad de receptor de progesterona es un marcador de la respuesta de tumores a la terapia hormonal (Horwitz et al., 1975; Osborne et al., 1980; Degensheim et al., 1980; Clark et al., 1983) y se ha asociado la presencia de una gran cantidad de receptores de la familia del EGF con una baja presencia de receptores de hormonas esteroideas (Fitzpatrick et al., 1984; Sainsbury et al., 1985), los resultados encontrados en este trabajo indicarían que la disminución de los niveles de RP por HRG podría contribuir a un aumento en la sensibilidad de las células a los estímulos provenientes de factores de crecimiento.

Esta idea concuerda con los datos de Pietras y colaboradores que demuestran que la HRG induce una disminución en los niveles proteicos de ER en células donde se ha sobre expresado ErbB-2 (Pietras et al., 1995). Allí se postula que este mecanismo estaría relacionado con la evolución hacia la hormono-independencia de los tumores. En células de útero de ratón se ha visto que el EGF es capaz de disminuir los niveles proteicos del receptor de estrógeno demostrando que existen interacciones entre ambas vías de señalización (Ignar-Trowbridge et al., 1992).

Es importante destacar que al analizar los western blots para el RP, se ha encontrado que la disminución en sus niveles proteicos provocados tanto por el tratamiento con MPA como por HRG, correlaciona con el corrimiento hacia pesos moleculares mayores de las bandas correspondientes a ambas isoformas del receptor. Este corrimiento ha sido ampliamente descrito para el caso de células tratadas con progestágenos y se relaciona con una segunda ronda de fosforilación del receptor que sería ADN-dependiente (Edwards et al., 1993). En estudios realizados con el RP humano se ha visto que una vez unido al

DISCUSIÓN RESULTADOS PARTE II.

ligando, éste experimenta un incremento de alrededor de 2 veces en su fosforilación neta que ocurre dentro de los primeros 5 minutos de tratamiento con el progestágeno. Sin embargo el corrimiento de las bandas hacia pesos moleculares más altos recién ocurre luego de 2h aproximadamente (Takimoto et al., 1992; Edwards et al., 1993; Zang et al., 1994; Knotts et al., 2001).

El tratamiento con 8-Br-AMPC produce una fosforilación en el RP de pollo que se evidencia como un corrimiento hacia pesos moleculares mayores de la banda correspondiente al RP (Denner et al., 1987); sin embargo esto no ha sido visto para el RP humano (Beck et al., 1992; Edwards et al., 1993). Recientemente, Lange y sus colaboradores han demostrado que EGF, a través de una fosforilación del RP inducida por MAPK, es capaz de aumentar los efectos del progestágeno R5020 en lo que se refiere a la disminución de los niveles proteicos de RP (Shen et al., 2001).

La disminución de la movilidad electroforética del RP inducida por el tratamiento de las células con HRG fue el primer indicio de fosforilación tanto del RP murino como humano producido en ausencia de un progestágeno y estaría reforzando la idea de la existencia de interrelaciones entre la vía de transducción de señales activada por HRG y la del RP. Los datos presentados en este trabajo se sumarían a los de Pietras dónde se describe que HRG es capaz de producir la fosforilación de ER en ausencia de estrógeno (Pietras et al., 1995) para poner énfasis en la importancia de las propiedades de este factor de crecimiento en la transición hacia la hormona- independencia.

HRG aumenta la localización nuclear del receptor de progesterona.

La acción de las hormonas esteroideas involucra su entrada a las células donde se une y provoca cambios conformacionales a su receptor intracelular (Gorski et al., 1968; Jensen et al., 1968) que llevan a la traslocación nuclear y a la modulación de la expresión génica (O'Malley et al., 1969). Así, en ausencia de hormona RP se distribuye entre las fracciones nucleares extraíbles por NaCl y citosólicas. Con el tratamiento hormonal, la mayor cantidad de RP se une fuertemente al núcleo (El-Ashry et al., 1989; Weigel et al., 1992). Numerosos

DISCUSIÓN RESULTADOS PARTE II.

trabajos muestran que tanto progestágenos como antiprogestágenos inducen la traslocación nuclear del PR de especies tales como el pollo (Power et al., 1991), el ratón (Shyamala et al., 1990) y el humano (El-Ashry et al., 1989, Clemm et al., 2000). Para el caso del RP humano, estudios de Clemm y colaboradores muestran que en este proceso estaría involucrada la fosforilación de al menos dos sitios de fosforilación, la serina 190 y la 294 (Clemm et al., 2000).

Sin embargo hay pocos estudios que hayan centrado su atención en estudiar la traslocación nuclear de los receptores de hormonas esteroideas por otros compuestos en ausencia de sus ligandos.

En lo que respecta a los factores de crecimiento, se ha descrito que el EGF produce un aumento en la localización nuclear del ER (Ignar-Trowbridge et al., 1992). Este efecto también es producido por HRG en células de carcinoma mamario humano MCF-7 (Pietras et al., 1995). Existen evidencias de que en ausencia de hormona, la dopamina tiene la capacidad de inducir la traslocación nuclear del RP de pollo (Power et al., 1991).

En este trabajo se ha descrito por primera vez el aumento de la proporción de RP con localización nuclear producida por el tratamiento con HRG tanto en un modelo murino como en uno humano, hecho que estaría reforzando la hipótesis de la importancia de las interrelaciones entre las vías de señalización activadas por receptores de membrana en la modulación de la actividad de RP. Es importante destacar que para que ocurra la traslocación nuclear en el RP es necesario que éste adopte una conformación tal que haga que las interacciones con las proteínas chaperonas se desestabilicen exponiendo así las secuencias de reconocimiento nuclear que poseen. De esto se deduce que, el tratamiento de estas células con HRG provocaría cambios conformacionales tales que permitieran al RP dejar expuestas las secuencias que lo llevarían a migrar al núcleo celular.

HRG induce la unión del receptor de progesterona a un elemento respondedor a progesterona (PRE).

Como un modo general de acción, las hormonas esteroideas inducen cambios estructurales en su receptor que promueven a la unión del mismo a elementos respondedores de hormonas específicos (HRE) (Clark et al., 1992). La unión a los HRE de los promotores de los genes cuya transcripción regulan, involucra la dimerización de los receptores en el núcleo como un paso previo a la activación de la transcripción.

La misma secuencia que confiere la respuesta a glucocorticoides funciona también como elemento respondedor a progesterona (Cato et al., 1986; Von der Ahe et al., 1985), mineralocorticoides (Arriza et al., 1987) y andrógenos (Parker et al., 1987; Ham et al., 1988) pero no a estrógenos (Otten et al., 1988). Debido a este fenómeno y con el fin de estudiar sólo los procesos que involucraran al RP; era preciso para este trabajo utilizar células que no expresaran niveles proteicos apreciables de cualquier receptor con el mismo elemento respondedor que el receptor en estudio.

Es ampliamente conocido que los progestágenos inducen la unión del RP a su elemento respondedor (PRE) en ensayos de aumento de la movilidad electroforética (El-Ashry et al., 1989; Beck et al., 1992; Edwards et al., 1991; Edwards et al., 1993). Incluso algunos antiprogestágenos como el RU 486 y bajo ciertas condiciones el ZK98299 también son capaces de inducir esta unión (El-Ashry et al., 1989; Gass et al., 1998). Según Edwards, esta inducción estaría facilitada por una primera ronda de fosforilación del RP mediada por hormona. La formación del complejo [proteína-ADN] gatillaría la ronda de fosforilación más tardía que sería la responsable de los corrimientos en los geles con SDS descritos anteriormente (Edwards et al., 1991; Beck et al., 1992).

En lo que respecta a la inducción de esta unión por otros compuestos, se demostró que ni el 8Br-AMPC, activador de proteínas quinasas dependientes de AMPC; ni el ácido ocadaico, inhibidor de las proteínas fosfatasa 1 y 2A, o el

DISCUSIÓN RESULTADOS PARTE II.

H8, inhibidor de la proteína quinasa dependiente de nucleótidos cíclicos, fueron capaces de inducir la formación del complejo RP-PRE en modelos humanos en ausencia del tratamiento con progestágenos (Beck et al., 1992; Edwards et al., 1993). No se han hecho estudios similares utilizando el RP de ave o murino.

Con relación a los factores de crecimiento de la familia del EGF, sólo se ha descrito la capacidad que éste tiene para inducir la formación del complejo ER-ERE en extractos nucleares de células de útero de ratón (Ignar-Trowbridge et al., 1992).

En este trabajo se describe por primera vez que HRG es capaz de inducir en forma específica la unión del RP al PRE ya sea para el caso del receptor murino o humano. La especificidad de RP por unirse a un PRE y no a otro ADN estaría mostrada por el hecho de que un exceso de PRE frío es capaz de competir en forma efectiva la unión, mientras que un oligonucleótido mutado en cuatro aminoácidos de la secuencia consenso no es capaz de lograr el mismo efecto. Al bloquear la vía de transducción de señales de HRG en dos etapas distintas, se ha podido determinar que para que ocurra esta inducción de la formación del complejo receptor-ADN es necesaria tanto la presencia de ErbB-2 como la vía de las quinasas activadas por mitógenos activa. Como el RP es una proteína con por lo menos 14 sitios de fosforilación en serina y treonina, la importancia de la existencia MAPK activas podría relacionarse con la necesidad de que el RP haya pasado por lo menos por la ronda de fosforilación que induciría los cambios conformacionales tales que permitieran la dimerización de los receptores y la posterior unión a su elemento respondedor.

HRG induce la actividad transcripcional del receptor de progesterona.

Se conoce que los miembros de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas son activadores de la transcripción cuando han sido activados por sus ligandos específicos. En la visión convencional del mecanismo de acción, la unión del esteroide inicia una serie de eventos que incluyen la dimerización del receptor, la unión a los elementos respondedores en el ADN y la fosforilación. Estos eventos producen la forma transcripcionalmente activa del receptor. En

DISCUSIÓN RESULTADOS PARTE II.

este modelo, la hormona es necesariamente requerida para la activación transcripcional del receptor.

En este trabajo, se muestra por primera vez que la HRG tiene la capacidad de generar la forma transcripcionalmente activa del RP tanto en un modelo *murino* como humano y que esta transactivación es dependiente del PR ya que el antiprogestágeno RU486 inhibe totalmente la respuesta al tratamiento con el factor de crecimiento. Además, es importante destacar que estas células no son capaces de sintetizar progesterona.

Para el caso del receptor de ratón no existe información en la bibliografía que reporte estudios a este nivel. Sin embargo existe una importante cantidad de trabajos que se centran en la activación transcripcional del RP independiente de ligando tanto en aves como en humanos. Así, se sabe que el tratamiento de células tanto con 8-bromo-AMPC o ácido ocadaico como con vanadato, un inhibidor de fosfatasa de tirosina o EGF pueden inducir la activación del RP de aves (Denner et al., 1990; Zhang et al., 1994). La capacidad de un neurotransmisor como la dopamina de activar transcripcionalmente al RP de pollo ha sido también descrita (Power et al., 1991). El grupo de Nancy Weigel y colaboradores ha mostrado que, para el caso del receptor de aves, la activación del RP independiente de hormona no dependería tanto del promotor utilizado sino que sería un proceso donde la especificidad estaría dada por la maquinaria disponible en cada célula (Zhang et al., 1994). Particularmente, como los efectos debidos a estos moduladores serían indirectos por activación de quinasas no totalmente identificadas hasta el momento, no es sorprendente que el tipo de respuesta varíe entre distintos tipos celulares. Por ejemplo, tanto el grupo de Edwards como el de Horwitz reportaron la falta de capacidad de activar al RP humano que presentaron tanto el 8-bromo-AMPC como el ácido ocadaico. Es importante destacar que, para el caso del modelo humano, la estimulación de las vías de transducción de señales del AMPC produce una activación del RP provocada por el tratamiento con el antiprogestágeno RU486 que pasa a tener efectos agonistas para este receptor (Beck et al., 1992). Todos estos datos están en concordancia con el hecho de que podría existir una activación transcripcional del PR independiente de la presencia de la

DISCUSIÓN RESULTADOS PARTE II.

hormona pero dependiente de las vías de transducción de señales activadas en las distintas células. En nuestro caso, hemos descrito que la activación de la vía de transducción de señales gatillada por la HRG que involucra la presencia de los receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I, en particular al ErbB-2 y a la vía de MAPK activa, participaría en la activación transcripcional del RP independiente del tratamiento con hormona. Es importante destacar que estos hallazgos no descartan en absoluto que en esta activación independiente de hormona participen otras moléculas como las proteínas de shock térmico, los co-activadores de los receptores de hormonas esteroideas, u otras quinasas.

En lo que concierne a la HRG, no existe información relacionada con el RP pero ha sido descrita su función como activador del RE humano en células que expresan altos niveles de ErbB-2 (Pietras et al., 1995). Posteriormente se ha postulado que el ER podría ser activado por tres tipos distintos de moléculas, estradiol, EGF y AMPc; cada uno utilizaría un mecanismo diferente al requerir distintos dominios del receptor para ejercer su acción. En particular mutaciones en diferentes sitios claves de fosforilación afectarían la acción de cada uno de estos tipos de compuestos (El-Tanani et al., 1997). Relacionado con la fosforilación, el grupo de Chambon ha demostrado fehacientemente que la activación del ER a través de su dominio de activación 1 (AF-1) requiere de la fosforilación de una serina en la posición 118 que es sitio de acción de MAPK tanto *in vitro* como *in vivo* (Kato et al., 1995). En el caso del receptor de progesterona, no existen estudios que relacionen la activación independiente de hormona con la activación de las MAPK si bien se ha reportado que estas quinasas activas podrían participar exaltando los efectos producidos por progestágenos (Shen et al., 2001). En conjunto, todos estos resultados estarían reforzando la hipótesis de que una activación de receptores de hormonas esteroideas independiente de la hormona podría ser posible por mecanismos que involucren cambios conformacionales que lleven a la dimerización y la posterior unión al ADN de los receptores. Estos cambios podrían estar dados por fosforilaciones en sitios claves para cada receptor y para cada tipo de compuesto activador dependiendo que la maquinaria disponible en cada tipo celular.

MAPK activadas por HRG pueden fosforilar *in vitro* al PR.

Todos los receptores de esteroides estudiados hasta el momento son fosforilados en múltiples sitios (Orti et al., 1989; Sheridan et al., 1989; Denner et al., 1990; Bodwell et al., 1991; Denton et al., 1992; Ali et al., 1993; LeGoff et al., 1994; Zhang et al., 1995; Zhou et al., 1995). En particular el RP es una fosfoproteína (Sheridan et al., 1989; Zhang et al., 1994; 1995; 1997) cuya actividad puede ser regulada por fosforilación. Existe asimismo amplia evidencia de que la regulación de los mecanismos de señalización celulares altera la actividad y fosforilación del RP (Denner et al., 1990; Beck et al., 1992; Zhang et al., 1994; Takimoto et al., 1996). Algunos de estos cambios son debidos a alteraciones directas en la fosforilación del receptor, mientras que otras parecen afectar a proteínas asociadas (Rogatsky et al., 1998; Wagner et al., 1998; Lavinsky et al., 1998; Tremblay et al., 1999; Rowan et al., 2000).

Según el grupo de Nancy Weigel la mayoría, sino todos, de los sitios con motivos Ser-Pro en el RP humano son sitios de fosforilación. Tomado en conjunto, sus resultados indican que la fosforilación del RP es extremadamente compleja y tiene éste tiene por lo menos 14 sitios (Knotts et al., 2001). Debido a la preponderancia de los sitios dirigidos por Pro, cabe pensar que las quinasas dirigidas por prolina como las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) y/o MAPK estarían involucradas en la fosforilación de este receptor. En efecto, ha sido reportado que la Cdk2 tiene la capacidad de fosforilar *in vitro* al PR humano en por lo menos siete sitios (Zhang et al., 1997; Knotts et al., 2001) y que la caseína quinasa II lo haría en por lo menos un sitio (Zhang et al., 1994). Sin embargo existe muy poca información sobre la posible participación de las MAPK en la fosforilación del RP. Así, sólo el grupo de Kathryn Horwitz informa que una serina en la posición 294 podría ser la responsable de gatillar la maquinaria de degradación del RP. La fosforilación de este sitio sería inducible por hormona o por la activación constitutiva de MEKK1 (Lange et al., 2000). Es importante destacar que ella no observa una

DISCUSIÓN RESULTADOS PARTE II.

activación transcripcional del RP inducida solamente por la presencia de MEKK1 constitutivamente activa.

En el presente trabajo se proporciona la primera demostración de que el RP, tanto humano como murino, puede ser fosforilado *in vitro* por MAPKs activadas por HRG. Sólo existe otro trabajo en el que se reporta que RP de puede ser fosforilado *in vitro* por p42 MAPK recombinantes activas (Bagowski et al., 2001). Por lo tanto, estos hallazgos que involucran al RP de *Xenopus* y los propios proporcionan las primeras evidencias experimentales que apoyan a la hipótesis por tanto tiempo sostenida de que RP es un sustrato para MAPKs activas *in vitro*. Aún cuando no todos los receptores de hormonas esteroideas exhiben una activación independiente de ligando (Power et al., 1991; Ignar-Trowbridge et al., 1992; Rangarajan et al., 1992), activadores de quinasas pueden al menos estimular la respuesta a hormona. Es más, inhibidores de la proteína quinasa A pueden inhibir la activación dependiente de hormona tanto del RP de aves (Denner et al., 1990) como del humano (Beck et al., 1992). Por lo tanto, mientras la activación en ausencia de hormona puede no ser universal entre los miembros de la familia de receptores de esteroides, es claro que la actividad de quinasas y/o fosfatasa juega un papel importante en la modulación de la actividad de estos receptores y podría tener también una función relevante en la activación preferencial de ciertos genes como blanco específico.

En el presente trabajo se muestra que la fosforilación del receptor sería uno de los factores involucrados en la activación transcripcional del RP mediada por HRG ya que, el bloqueo de la actividad de las MAPKs impide el efecto del factor de crecimiento sobre la actividad del RP como factor de transcripción.

La disminución en los niveles proteicos y la hiperactividad transcripcional de RP humano ha sido correlacionada con la fosforilación en la serina ubicada en la posición 294 (Lange et al., 2000; Shen et al., 2001). Esto concuerda con los datos obtenidos en el presente trabajo ya que este residuo se halla fosforilado en el tratamiento con HRG y por lo tanto podría explicar los efectos del factor de crecimiento sobre la activación del RP, aún cuando no se esté en presencia de un progestágeno. Cabe destacar que en los trabajos de citados

DISCUSIÓN RESULTADOS PARTE II.

anteriormente no se observa activación transcripcional del RP debida únicamente al tratamiento con EGF o a la presencia de MEKK1 constitutivamente activa sino que estos factores provocan una potenciación de la acción del R5020.

Por otro lado, es importante considerar que los cambios en la fosforilación del RP que llevarían a un corrimiento de las bandas observadas en un western blot hacia arriba no involucrarían al residuo 294 ya que, mutantes del RP en dicha posición no alteran el corrimiento luego del tratamiento de células T47D con un progestágeno (Lange et al., 2000). Teniendo en cuenta estos resultados, estaríamos en condiciones de afirmar que el tratamiento con HRG estaría afectando a por lo menos dos sitios distintos de fosforilación ya que se ha confirmado la fosforilación del residuo 294 y el corrimiento hacia pesos moleculares mayores en ensayos de western blot.

Es importante tener en cuenta que aún cuando sólo la vía de activación de MAPK activadas por RAS ha sido estudiada en aquí, la activación de otras MAPK podría también conducir a la activación del RP. Recientemente ha sido descrito que la p38 MAPK podría contribuir a la activación transcripcional del RP humano por fosforilación de otros sitios regulatorios hasta el momento no definidos o por fosforilación de co-reguladores (Shen et al., 2001).

El estudio de las activaciones dependientes de cascadas de proteínas quinasas, hormonas y anti-hormonas permitiría predecir la inducción de fosforilaciones diferenciales de receptores de hormonas esteroideas (Bamberger et al., 1996). Estos receptores fosforilados en forma heterogénea podrían regular la actividad de diferentes genes. Los resultados aquí presentados sugieren que cambios en el estado de fosforilación celular serían importantes a la hora de determinar la actividad biológica del RP sobre promotores específicos y proporcionan importantes contribuciones para el estudio de mecanismos de resistencia a la terapia hormonal en estadios avanzados de cáncer de mama.

Conclusiones generales.

Los efectos de la progesterona en la mama son controvertidos debido a la complejidad estructural y de desarrollo de este órgano. Dependiendo del modelo experimental, del contexto celular y de la duración del tratamiento, la progesterona puede provocar efectos proliferativos o antiproliferativos en las células del epitelio mamario. Se propone que estos efectos aparentemente contradictorios de los progestágenos pueden ser explicados por la capacidad de actuar como un factor sensibilizante para las acciones de agentes secundarios. La magnitud y la duración de la señal de progesterona determinaría si actúa como un agente proliferativo o antiproliferativo. El pretratamiento con progestágenos daría el marco para aumentar la actividad de factores de crecimiento que actúen localmente a través del sinergismo entre sus vías de señalización.

Los resultados obtenidos en la primer parte del trabajo proporcionan mayor evidencia a lo postulado con anterioridad ya que la presencia del MPA provocó una potenciación de la vía de HRG al aumentar la expresión a nivel proteico del factor de crecimiento y de sus receptores así como la activación de los mismos. Además, hemos sido capaces de demostrar, por primera vez, la importancia de la interacción jerárquica entre IGF-IR y ErbB-2 en la cual IGF-IR dirige la activación de ErbB-2. Finalmente, hemos encontrado la formación de un complejo heteromérico del que forman parte estos dos receptores. Esta ha sido la primera vez que se muestra una interacción entre RTKs de distinto tipo. De esta forma, se refuerza la hipótesis de la existencia de que una red interconectada de señales estaría involucrada en dirigir el destino final de las células. La diversidad de respuestas posibles, estaría entonces asociada a la variedad de señales y efectores presentes en cada momento de la vida de una célula. Desde este punto de vista, vías de señalización aparentemente no relacionadas podrían interactuar para dar como resultado efectos distintos del cada vía posee por separado.

CONCLUSIONES GENERALES.

Siguiendo con la misma línea de razonamiento, en la segunda parte del trabajo, hemos podido demostrar que las interacciones entre las vías que activan al RP y a los RTKs se dan en ambos sentidos. Así, hemos encontrado que HRG tiene la capacidad de activar transcripcionalmente al RP por un mecanismo que involucra tanto a la presencia de ErbB-2 funcional como de las MAPK activas. Además, hemos mostrado que MAPK activadas por HRG pueden fosforilar *in vitro* al RP tanto humano como murino.

En resumen, los hallazgos aquí presentados proporcionan mayores evidencias que apoyan la hipótesis de que en células de cáncer de mama que expresan receptores de hormonas esteroideas pero son resistentes a terapias hormonales, el control del crecimiento tumoral es asumido por factores de crecimiento que son capaces de transactivar a este tipo de receptores nucleares. Un mecanismo molecular clave en esta transactivación parecería ser la fosforilación de los receptores de hormonas esteroideas por MAPK activadas por factores de crecimiento. Interacciones entre caminos de transducción de señales de MAPK y RP sugieren mecanismos por los cuales la resistencia a la terapia hormonal y la adquisición de respuesta a factores de crecimiento estarían integradas en cáncer de mama avanzado. Por lo tanto, un blanco importante a tener en cuenta al diseñar terapias para este tipo de tumores sería el diseño de estrategias que apuntaran a bloquear las acciones de los factores de crecimiento que controlan también los efectos dependientes de receptores de hormonas esteroideas.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, S., Metzger, D., Bornert, J.M. and Chambon, P. (1993) Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *Embo. J.*, **12**, 1153-1160.
- Arriza, J.L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T.M., Handelin, B.L., Housman, D.E. and Evans, R.M. (1987) Cloning of Human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, **237**, 268-275.
- Backer, J.M., Myers, M.G., Sun, X.J., Chen, D.J., Schoelson, S.E., Mivlapeix, M. and White, M.F. (1993) Association of IRS-I with the insulin receptor and phosphatidylinositol 3-kinase. *J.Biol.Chem.*, **268**, 8204-8212.
- Bacus, S., Gudkov, A., Zelnick, C., Chin, D., Stern, R., Stancovski, I., Peles, E., Ben-Baruch, N., Farbstein, H., Lupu, R., Wen, D., Sela, M. and Yarden, Y. (1993) Neu Differentiation factor (Heregulin) induces expression of intercellular adhesion molecule 1: implications for mammary tumor cells. *Cancer Res.*, **53**, 5251-5261.
- Bacus, S., Zelnick, C., Plowman, G., Yarden, Y., (1994) Expression of erbB-2 family of growth factor receptors and their ligands in breast cancers. Implications for tumor biology and clinical biology. *Am.J.Clin.Pathol.*, **102**,S13-S24.
- Bagowski, C.P., Myers, J.W. and Ferrell, J.E., Jr. (2001) The Classical progesterone receptor associates with p42MAPK and is involved in Phosphatidylinositol 3-Kinase signaling in *xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.*, **276**, 37708-37714.

- Bai, W., Rowan, B.G., Allgood, V.E., O'Malley, B.W. and Weigel, N.L. (1997) Differential phosphorylation of chicken progesterone receptor in hormone-dependent and ligand-independent activation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 10457-10463.
- Balañá, M.E., Labriola, L., Salatino, M., Movsichoff F., Peters, G., Charreau, E.H. and Elizalde P.V. (2001) Activation of ErbB-2 via a hierarchical interaction between ErbB-2 and type I insulin-like growth factor receptor in mammary tumor cells. *Oncogene*, **20**, 34-47.
- Balañá, M.E., Lupu, R., Labriola L., Charreau, E.H. and Elizalde, P.V. (1999) Interactions between progestins and heregulin (HRG) signaling pathways: HRG acts as mediator of progestins proliferative effects in mouse mammary adenocarcinomas. *Oncogene*, **18**, 6370-6379.
- Bamberger, A.M., Bamberger, C.M., Gellersen, B. and Schulte, H.M. (1996) Modulation of AP-1 activity by the human progesterone receptor in endometrial adenocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6169-6174.
- Baulida, J., Kraus, M., Alimandi, M., Di Fiore, P. and Carpenter. (1996). All erbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J.Biol.Chem.*, **271**, 5251-5257.
- Beato, M., Arnemann, G., Chalepakis, E.S. and Willmann, T. (1987) Gene regulation by steroid hormones. *J. Steroid Biochem.*, **27**, 9-14.
- Beck, C.A., Weigel, N.L. and Edwards, D.P. (1992) Effect of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding, and phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 607-620.

- Bergkvist, L., Adami, H., Persson, I., Hoover, R. and Schairerc. (1989) The risk of breast cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement . *N. Engl. J. Med.*, **321**,293-297.
- Blenis, J. (1993) Signal transduction via the MAP kinases:Proceed at your own RSK. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **90**, 5889-5892.
- Bodwell, J.E., Orti, E., Coull, J.M., Pappin, D.J., Swift, F. and Smith, L.I. (1991) Identification of the phosphoryaltion sites in the mouse glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, **266**, 7549-7555.
- Boguski, M. and McCormick, F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, **366**, 643-653.
- Boonjarantanakornkit, V., Porter Scott, M., Ribon, V., Sherman, L., Anderson, S.M., Maller, J.L., Miller, W.T. and Edwards, D.P.(2001) Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-SRC family tyrosine kinases. *Mol. Cell*, **8**, 269-280.
- Brisken, C., Park, S., Vass, T., Lyndon, J.P., O´Malley, W.B and Weinberg, R.A. (1998) A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 5076-5081.
- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for cuantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J. and Picard, D. (1996) Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo. J.*, **15**, 2174-2183.

- Burgess, T., Ross, S., Qian, Y., Brankow, D. and Hu, S. (1995) Biosynthetic processing of neu Differentiation Factor. *J.Biol.Chem.*, **270**, 19188-19196.
- Carraway, K.L. and Cantley, L.C. (1994). A neu acquaintance for erbB-3 and erbB-4: A role for receptor heterodimerization in cell signalling. *Cell*, **78**, 5-8.
- Carraway, K.I., Sliwkowski, M., Akita, R., Platko, J., Cantley, L. and Cerione, R. (1994) The erbB-3 gene product is a receptor for heregulin. *J.Biol.Chem.*, **269**, 14303-14306.
- Cato, A.C., Miksicek, R., Shultz, G.S., Arneman, J. and Beato, M. (1986) The hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus mediates progesterone induction. *Embo. J.*, **5**, 2237-2240.
- Chalbos, D. and Galtier, F. (1994) Differential effect of forms A and B of human progesterone receptor estradiol-dependent transcription. *J.Biol.Chem.*, **269**, 23007-23012.
- Chang, H., Riese, D.J.II, Gilbert, W., Stern, D.F. and Mc Mahan, U.J. (1997) Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature*, **387**, 509-512.
- Christensen, K., Estes, P.A., Oñate, S.A., Beck, C.A., DeMarzo, A., Altmann, M., Lieberman, B.A., St.John, J., Nordenn, S.K. and Edwards, D.P. (1991) Characterization and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. *Mol. Endocrinol.*, **5**, 1755-1770.
- Clark, G.M. and McGuire, W.L. (1983) Progesterone receptors and human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **3**, 157-163.

- Clark, J.H., Schrader, W.T. and O'Malley, B.W. (1992) Mechanisms of action of steroid hormones. In Wilson J.D. and Foster, D.W. (ed.), *Williams textbook of endocrinology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, pp. 35-90.
- Clemm, D.L., Sherman, I., Boonyaratanakornkit, V., Schrader, W.T., Weigel, N.L. and Edwards, D.P. (2000) Differential hormone-dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol. Endocrinol.*, **14**, 52-65.
- Colomer, R., Lupu, R., Bacus, S.S. and Gelmann, E.P. (1994) ErbB-2 antisense oligonucleotides inhibit the proliferation of breast carcinoma cells with erbB-2 oncogene amplification. *Br. J. Cancer*, **70**, 819-825.
- Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., Lyndon, J.P. and De Mayo, F.J. (2001) Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **179**, 97-103.
- Coppola, D., Ferber, A., Masahiko, M., Sell, C., D'Ambrosio, C., Rubin, R. and Baserga, R. (1994) A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4588-4595.
- Coso, O.A., Montaner, S., Fromm, C., Lacal, J.C., Prywes, R., Teramoto, H. and Gutkind, J.S. (1997) Signaling from G protein-coupled receptors to the c-jun promoter involves the MEF2 transcription factor. *J. Biol. Chem.*, **272**, 20691-20697.
- Dati, C., Antoniotti, S., Taberna, D., Perroteau, I. and De Bortoli, M. (1990) Inhibition of c-erbB-2 oncogene expression by estrogens in human breast cancer cells. *Oncogene*, **5**, 1001-1006.

- De Bortoli M., Dati, C. (1997) Hormonal regulation of type I receptor tyrosine kinase expression in the mammary gland, *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia*, **2**, 175-185.
- Degenshein G.A., Bloom, N. and Tobin, E. (1980) The value of progesterone receptor assays in the management of advanced breast cancer. *Cancer*, **46**, 2784-2793.
- Denner, L.A., Bingman, W.E., III, Green, G.L. and Weigel, N.L. (1987) Phosphorylation of the chicken progesterone receptor. *Steroid Biochem.*, **27**, 235-243.
- Denner, L.A., Weigel, N.L., Maxwell, B.L., Schrader, W.T. and O'Malley, B.W. (1990) Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science*, **250**, 1740-1743.
- Denner, L.A., Weigel, N.L., Schrader, W.T. and O'Malley, B.W. (1989) Hormone-dependent regulation of chicken progesterone receptor deoxyribonucleic acid binding and phosphorylation. *Endocrinology*, **125**, 3051-3058.
- Denton, R. R., Koszewski, N. J. and Notides, A.C. (1992) Estrogen receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **267**, 7263-7268.
- Dickson, R.B and Lippman M.E. (1987) Estrogenic regulation of growth and ptypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocrin. Rev.*, **8**, 29-43.
- Dickson, R.B and Lippman M.E. (1995) Growth factors in breast cancer. *Endocrin.Rev.*, **16**, 559-589.
- Dran, G., Luthy, I. A., Molinolo, A. A., Montecchia, F., Charreau, E. H., Dosne Pasqualini, C. and Lanari, C. (1995). Effect of medroxyprogesterone acetate

(MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.*, **35**, 173-186.

Edwards, D.P., De Marzo, A.M., Oñate, S.A., Beck, C.A., Estes, P.A. and Nordeen, S.K.(1991) Mechanisms controlling steroid receptor binding to a specific DNA sequences. *Steroids*, **56**, 271-278.

Edwards, D.P., Weigel, N.L., Nordeen, S.K. and Beck, C.A. (1993) Modulators of cellular protein phosphorylation alter the trans-activation function of human progesterone receptor and the biological activity of progesterone antagonists. *Breast Cancer Res. Treat.*, **27**, 41- 56.

El-Ashry, D., Oñate, S.A., Nordeen, S.K. and Edwards, D.P. (1989) Human progesterone receptor complexed with the antagonist RU486 binds to hormone response elements in a structurally altered form. *Mol. Endocrinol.*, **3**, 1545-1558.

Elizalde, P.V., Lanari, C., Molinolo, A.A., Guerra, F.K., Balañá, M.E., Simian, M., Iribarren, A., Charreau, E.H. (1998) Involvement of insulin-like growth factors-I and -II and their receptors in medroxyprogesterone acetate-induced growth of mouse mammary adenocarcinomas. *J. Steroid. Biochem.Molec.Bio.*, **67**, 305-317.

El-Tanani, M.K.K. and Green, C.D. (1997) Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.*, **11**, 928-936.

Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-895.

Falls, D., Rosen, K., Corfas, G., Lane, W. and Fischbach, G. (1993) ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of a neu ligand family. *Cell*, **72**, 801-815.

- Fedi, P., Pierce, J., Di Fiore, P.P., Kraus, M. (1994) Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C γ or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 492-500.
- Fides, R.J., Janes, P.W., Silversten, S.P., Sutherland, R.L., Musgrove, E.A. and Daly, R.J. (1998) Inhibition of the MAP kinase cascade blocks heregulin-induced cell cycle progression in T-47D human breast cancer cells. *Oncogene*, **16**, 2803-2813.
- Fitzpatrick, S.L., Brigtwell, J., Wittliff, J.L., Barrows, G.H. and Schultz, G.S. (1984) Epidermal growth factor binding by breast tumor biopsies and relationship to estrogen receptor and progesterin receptor levels. *Cancer Res.*, **44**, 3448-34453.
- Gasparini, G., Gullick, W., Maluta, S., Palma, P., Caffo, O., Leonardi, E., Boracchi, P., Pozza, F., Lemoine, N. and Bevilacqua, P. (1994) c-erbB-3 and c-erbB-2 protein expression in node-negative breast carcinoma : an immunocytochemical study. *Eur.J.Cancer*, **30A**, 16-22.
- Gass, E.K., Leonhardt, S.A., Nordeen, S.K. and Edwards, D.P. (1997) The Antagonists RU486 and ZK98299 Stimulate progesterone receptor binding to deoxyribonucleic acid in vitro and in vivo, but have distinct effects on receptor conformation. *Endocrinology*, **139**, 1905-1919.
- Giangrande, P.H, Pollio, G. and McDonnell, D.P. (1997) Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J.Biol. Chem.*, **272**, 32889-32900.

- Gorski, J., Toft, D., Shyamala, G., Smith, D. and Notides, A. (1968) Hormone receptor: studies on the interaction of estrogen with the uterus. *Recent Prog. Horm. Res.*, **24**, 45-80.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., Hynes, N.E. (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.*, **16**, 1647-1655.
- Gronemeyer, H., Meyer, M.E., Bocquel, M.T., Kastner, P., Turcotte, B. and Chambon, P. (1991) Progesterin receptors: isoforms and antihormone action. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **40**, 271-278.
- Groshong, S.D., Owen, G.I., Grimison, B., Schauer, I.E., Todd, M.C., Langan, T.A., Sclafani, R.A., Lange, C., Horwitz, K.B. (1997) Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27^{kip}. *Mol. Endocrinol.*, **11**, 1593-1607.
- Grunt, T.W., Saceda, M., Martin, M.B., Lupu, R., Dittrich, E., Krupitza, G., Harant, H., Huber, H., Dittrich, C. (1995) Bidirectional interactions between the estrogen receptor and the c.erbB-2 signalling pathways: heregulin inhibits estrogenic effects in breast cancer cells. *Int. J. Cancer.*, **63**, 560-567.
- Guy, P., Platko, J., Cantley, L., Cerione, R. and Carraway, K. (1994) Insect cell-expressed p180^{erbB3} possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8132-8136.
- Halachmi, S., Marden, E., Savouret, J.F., Qignon, F., Delabre, K., Milgrom, E and The, H. (1995) Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science*, **264**, 1455- 1458.

- Ham, J., Thomson, A., Needham, M., Webb, M. and Parker M. (1988) Characterization of response elements for androgen, glucocorticoids, and progestins in mouse mammary tumor virus. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 5263-5276.
- Harding, H.P., Atkins, G.B., Jaffe, A.B., Seo, W.J. and Lazar, M.A. (1997) Transcriptional activation and repression by ROR α and orphan nuclear required for cerebellar development. *Mol. Endocrinol.*, **11**, 1737-1746.
- Hartwell, L. and Kasten, M. (1994) Cell cycle control and cancer. *Science*, **266**, 1821-1828.
- Holmes, W.E., Slikowski, M.X., Akita, R.W., Henzel, W.J., Lee, J., Park, J.W. et al. (1992) Identification of heregulin a specific activator of p185 ErbB-2. *Science*, **256**, 1205-1210.
- Horwitz, K.B., McGuire, W.L., Pearson, O.H. and Segaloff, A. (1975) Preliminary response to endocrine therapy in human breast cancer: a hypothesis. *Science*, **189**, 726-727.
- Hynes, N. (1993) Amplification and overexpression of the erbB-2 gene in human tumors: its involvement in tumor development, significance as a prognostic factor, and potential as a target for cancer therapy. *Semin.Cancer Biol.*, **4**,19-96.
- Hynes, N. and Stern, D. (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochem.Biophys.Acta*, **1198**, 165-184.

- Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S.W., Washburn, T.F., McLachlan, J.A. and Korach, K.S. (1992) Coupling of dual signaling pathways: Epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4658-4662.
- Ing, N., Beekman, S., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1992) Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J. Biol. Chem.*, **267**, 17617-17623.
- Jackson, T.A., Richer, J.K., Bain, D.L., Takimoto G.S., Tung, L and Horwitz, K.B. (1997) The partial agonistic activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endo.*, **11**, 693-705.
- Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, Stumpf, W.E., Jurgbut, P.V. and DeSombre, E.R. (1968) A two-step mechanism for the interaction of the estradiol in the uterus *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 632-638.
- Kalhert, S., Nuedling, s., van Eickel, M., Vetter, H., Meyer, R. and Grohé, C. (2000) Estrogen receptor α rapidly activates the IGF-I receptor pathway. *J. Biol. Chem.*, **275**, 18447-18453.
- Kastner, P.A., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO.J.*, **9**, 1603-1614.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D. and Chambon, P. (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, **270**, 1491-1494.

- King , R. (1993) Estrogen and Progestin effects in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res.Treat.*, **27**, 3-15.
- Knotts, T.A., Orkiszewski, R.O., Cook, R.G., Edwards, D.P. and Weigel, N.L. (2001) Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation Sites. *J. Biol.Chem.*, **276**, 8475-8483.
- Kordon, E., Lanari, C., Molinolo, A., Elizalde, P., Charreau, E. and Pasqualini, C. (1991) Estrogen inhibition of MPA-induced mouse mammary tumor transplants. *Int.J.Cancer*, **49**, 900-905.
- Krane, I. and Leder, P. (1996) NDF/hereregulin induces persistence of terminal end buds and adenocarcinomas in the mammary gland of transgenic mice. *Oncogene*, **12**,1781-1788.
- Lanari C., Kordon E., Molinolo A. A., Dosne Pasqualini C. and Charreau, E. H. (1989) Mammary adenocarcinomas induced by medroxyprogesterone acetate: hormone dependence and EGF receptors of BALB/c in vivo sublines. *Int. J. Cancer*, **43**, 845-850.
- Lanari, C., Molinolo, A.A., Pasqualini, C.D. (1986) Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in Balb/c mice. *Cancer Lett.*, **33**, 215-223.
- Lange, C.A., Richer, J.K. and Horwitz, K.B. (1999) Hypothesis: progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals. *Mol. Endocrinol.*, **13**, 829-836.

- Lange, C.A., Richer, J.K., Shen, T. and Horwitz, K.B. (1998) Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31308-31316.
- Lange, C.A., Shen, T. and Horwitz, K.B. (2000) Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1032-1037.
- Lavinsky, R.M., Jepsen, K., Heinzl, T., Torchia, J., Mullen, T.M., Schiff, R., Del Rio, A., Ricote, M., Ngo, S., Gemsch, J., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K., Rosenfeld, M.G. and Rose, D.W. (1998) Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N.CoR and SMRT complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2920-2925.
- LeGoff, P., Montano, M.M., Schodin, D.J. and Katzenellenbogen, B.S. (1994) Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J. Biol. Chem.*, **269**, 4458-4466.
- Lemoine, N., Barnes, D., Hollywood, D., Hughes, C., Smith, P., Dublin, E., Prigent, S., Gullick, W. and Hurst, H. (1992) Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer. *Br.J.Cancer*, **66**, 1116-1121.
- Lessey, B.A., Alexander, P.S. and Horwitz, K.B. (1983) The subunit characterization of human breast cancer progesterone receptors: Characterization by chromatography and photoaffinity labeling. *Endocrinology*, **112**, 1267-1274.
- Lewis, G.D., Lofgren, J.A., Mc Murtrey, A.E., Nuijens, A., Fendly, B.M. and Bauer, K.D. (1996) Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: evidence for the requirement of ErbB-2 as a critical

component in mediating heregulin responsiveness. *Cancer Res.* , **56**, 1457-1465.

Lowry, O., Rsenbroigh, N., Farr, A. and Randall, R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, **193**, 262-275.

Lupu, R., Cardillo, M., Cho, C., Harris, A., Hijazi, M., Perez, C., Rosenberg, D., Yang, D. and Tang, C. (1996) The significance of heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance. *Breast Cancer Res.Treat.*, **38**, 57-66.

Lyndon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Jr., Shyamala, G., Coneely, O.M. and O'Malley, B.W. (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.*, **9**, 2266-2278.

Marchionini, M.A., Goodearl, A.D.J., Chen, M.S., Berningham-McDonogh, C., Kirk, M., Hendricks, F., Denehy, D., Misumi, D., Sudhalter, J., Kobayashi, K., Wroblewski, C., Lynch, C., Baldassare, M., Hiles, I., Davis, J.B., Hsuan, J.J., Totty, M. , Otsu, R., Mc Bury, N., Waterfield, M.D., Stroobant, P. and Gwynne, D. (1993) Glial Growth factors are alternatively spliced erbB-2 ligands expressed in the nervous system. *Nature*, **362**, 312-318.

Marte, B.M., Graus-Porta, D., Jescke, M., Favor, D., Hynes, N.E. and Taverna, D. (1995) NDF/heregulin activates MAP kinase and p70/p85 S6kinase during proliferation or differentiation of mammary epithelial cells. *Oncogene*, **10**, 167-175.

McDonnell, D.P. and Goldman, M.E. (1994) RU 486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *J.Biol.Chem.*, **269**, 11945-11949.

- McDonnell, D.P., Clemm, D.L. and Imhof, M.O. (1994) Definition of the cellular mechanisms which distinguish between hormone and antihormone activated steroid receptors. *Semin.Cancer Biol.*, **5**, 327-336.
- McDonnell, D.P., Clemm, D.L., Hermann, M.E., Goldman, M.E. and Pike, J.W. (1995) Analysis of estrogen receptor function *in vitro* reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 659-669.
- McLachlan, J.A., Nelson, K.G., Takahashi, T., Bossert, N.L., Newbold, R.R. and Korach, K.S. (1991) Estrogens and growth factors in the development, growth, function of the female reproductive tract. In Schomberg, D.W. (ed.), *Growth factors in reproduction*. Springer-Verlag, New York, pp.197-203.
- Medina, D. (1996) The mammary gland: A Unique Organ for The Study of The Development and Tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.*, **1**, 5-19.
- Meyer, D. and Birchmeier, C. (1995) Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature*, **378**, 386-390.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., De Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., and Auricchio, F. (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo. J.*, **15**, 1292-1300.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Green, S., DeFalco, A., Katjaniak, E.L., Blasi, F., Chambon, P. and Auricchio, F. (1989) Phosphorylation on tyrosine of *in vitro* synthesised human estrogen receptor activates its hormone binding. *Mol.Endocrinol.*, **3**, 1061-1069.
- Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi M., Gong W., Beato, M., Auricchio, F. (1998) Activation of the Src/p21^{ras}

/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J.*, **17**, 2008-2018.

- Mincione, G., Bianco, C., Colletta, G., Ciardello, F., Sliwkowski, M., Yarden, Y., Normando, N., Pramagiore, A., Kim, N. and Slamon, D. 1996. Enhanced expression of heregulin in c-erbB-2 and c-HA-ras transformed mouse and human mammary epithelial cells. *J.Cell.Biochem.*, **60**, 437-446.
- Modiano, J.F., Kokai, Y., Weiner, D.B., Pykett, M.J., Nowell, P.C. and Lyttle, C.R. (1991) Progesterone augments proliferation induced by epidermal growth factor in a feline mammary adenocarcinoma cell line. *J. Cell. Biochem.*, **45**, 196-206.
- Molinolo A. A., Lanari C., Charreau E. H., San Juan N. and Dosne Pasqualini C. (1987), Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J. Natl .Cancer Inst.*, **79**, 1341-1350.
- Montecchia, M.F., Lamb, C., Molinolo, A.A., Luthy, I.A., Pazos, P., Charreau, E.H., Vanzulli, S. and Lanari, C. (1999) Progesterone receptor involvement in independent tumor growth in MPA-induced murine mammary adenocarcinomas. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **68**, 11-21.
- Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lyndon, J.P. and Conneely, O.M. (2000) Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*, **289**, 1751-1754.
- Murphy, L.C., Murphy, L.J., Dubik, D., Bell, G.I., Shiu, R.P. (1988) Epidermal growth factor gene expression in human breast cancer cells: regulation of expression by progestins. *Cancer Res.*, **48**, 4555-4560.

Murphy, L.J., Sutherland, R.L., Stead, B., Murphy, L.C., Lazarus, L. (1986) Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res.*, **46**, 728-734.

Musgrove, E.A., Lee, C.S.L., Cornish, A.L., Swarbrick, A. and Sutherland, R.L. (1997) Antiprogesterone inhibition of cell cycle progression in T-47D breast cancer cells is accompanied by induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol. Endocrinol.*, **11**, 54-66.

Myers Jr, M. and White, M. (1993) The new elements of insulin signaling: insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. *Diabetes*, **42**, 643-650.

Nandi, S., Guzman, R. and Yang, J. (1995). Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: A unifying hypothesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **92**,3650-3657.

Neuenschwander, S., Schwartz, A., Wood, T., Roberts, C.Jr., Henninghausen, L. and LeRoith, D. (1996) Involution of the lactating mammary gland is inhibited by IGF system in a transgenic mouse model. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2225-2232.

Res.Treat., **35**, 293-297.

Normanno, N., Qi, C., Gullick, W., Persico, M., Yarden, Y., Wen, D., Plowman, G., Kenney, N., Johnson, G., Kim, N., Brandt, R., Martinez-Lacaci, R., Dickson, R. and Salomon, D. (1993) Expression of amphiregulin, cripto-1 and heregulin in human breast cancer cells. *Int.J.Oncol.*, **2**, 903-911.

- Nuedling, S., Kalhert, S., Löbert, K., Meyer, R., Vetter, H. and Grohé, C. (1999) Differential effects of 17beta-estradiol on mitogen-activated protein kinase pathways in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett.*, **454**, 271-276.
- O'Malley, B.W., McGuire, W.L., Kohler, P.O. and Korenman S. (1969) Studies for the mechanism of steroid hormone regulation of synthesis of specific proteins. *Recent Prog. Horm. Res.*, **25**, 105-160.
- Oñate, S.A., Tsai, S., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1995) sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, **270**, 1354-1357.
- Orr-Urtregger, A., Trakhtenbrot, L., Ben-Levi, R., Wen, G., Rechavi, G., Lonai, P. and Yarden, Y. (1993) Neural expression and chromosomal mapping of Neu Differentiation factor to 8p12-p21. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **90**, 1867-1891.
- Orti, E., Mendel, D.B., Smith, L.I. and Munck, A. (1989) Agonist dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 9728-9731.
- Osborne, C.K., Yochmowitz, M.G., Knight, W.A. and McGuire, W.L. (1980) The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of cancer. *Cancer*, **46**, 2884-2888.
- Otten, A.D., Sanders, M.M. and McKnight, G.S.(1988) The MMTV LTR promoter is induced by progesterone and dihydrotestosterone but not by estrogen. *Mol. Endocrinol.*, **11**, 14-147.
- Pandis, N., Heim, S., Bardi, G., Limon, J., Mandahl, N. and Mitelman, F. (1992) Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer. *Genes Chromosome & Cancer*, **5**, 14-20.

Parker, M.G., Webb, P., Needham, M., White, R. and Ham, J. (1987) Identification of androgen response element in mouse mammary tumor virus and the rat prostate C3 gene. *J. Cell Biochem.*, **35**, 285-292.

Peles, E., Bacus, S., Koski, R., Lu, H., Wen, D., Ogden, S., Leavy, R. and Yarden, Y. (1992) Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kDa glycoprotein that induces differentiation in mammary tumor cells. *Cell*, **69**, 205-216.

Peles, E. and Yarden, Y. (1993) Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays*, **15**, 815-824.

Pietras, R.J., Arboleda, J., Reese, D.M., Wongvipat, N., Pegram, M.D., Ramos, L., Groman, C.M., Parker, M.G., Slikowski, M.X. and Slamon, D.J. (1995) Her-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene*, **10**, 2435-2446.

Pinkas-Kramaski, R., Alroy I. and Yarden Y. (1997) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *J. Mam. Gland. Biol. Neoplasia*, **2**, 97-107 .

Pinkas-Kramaski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B., Sela, M. and Yarden, Y. (1996) Diversification of Neu Differentiation Factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.*, **15**, 2452-2467.

- Plowman, D., Green, J., Culoscou, J., Carlton, G., Rothwell, V. and Buckley, S. (1995) Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180^{erbB4}. *Nature*, **366**, 473-475.
- Power, R.F., Mani, S.K., Codina, J., Conneely, O.M. and O'Malley, B.W. (1991) Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science*, **254**, 1636-1939.
- Pratt, W.B. (1993) The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J.Biol.Chem.*, **268**, 21455-21458.
- Ram, T.G. and Ethier SP. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase recruitment by p185erbB-2 and erbB-3 is potently induced by neu differentiation factor/herregulin during mitogenesis and is constitutively elevated in growth factor-independent breast carcinoma cells with c-erbB-2 gene amplification. *Cell Growth Differ.*, **7**, 551-561.
- Ram, T.G., Kokeny, K.E., Dilts, C.A. and Ethier SP. (1995) Mitogenic activity of neu differentiation factor/herregulin mimics that of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I in human mammary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.*, **163**, 589-596.
- Rangarajan, P.N., Umesono, K. and Evans, R.M. (1992) Modulation of glucocorticoid receptor function by protein kinase A. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 1451-1457.
- Read, L.D., Keith, D., Slamon, D.J. and Katzenellenbogen, B.S. (1990) Hormonal regulation of HER-2/neu proto-oncogene messenger ribonucleic acid and p185 protein expression in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.*, **50**, 3947-3951.
- Read, L.D., Snider, C.E., Miller, J.S., Green, G.L. and Katzenellenbogen, B.S. (1988) Ligand-modulated region of progesterone receptor messenger

ribonucleic acid and protein in human breast cancer cell lines. *Mol. Endocrinol.*, **2**, 263-271.

Richer, J.K., Lange, C., Manning, N.G., Owen, G., Powell, R. and Horwitz K.B. (1998) Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31317- 31326.

Riese, D., Bermingham, Y., van Raaij, T., Buckley, S., Plowman, D. and Stern, D. (1996) Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta. *Oncogene*, **12**, 345-353.

Rogatsky, I., Logan, S.K. and Garabedian, M. J. (1998) Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2055-2055.

Rowan, B.G., Garrison, N., Weigel, N.L. and O'Malley, B.W. (2000) 8-Bromo-Cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 8720-8730.

Saceda, M., Grunt, T., Colomer, R., Lippman, M., Lupu, R. and Martin, M. (1996) Regulation of estrogen receptor concentration and activity by an erbB/HER ligand in breast carcinoma cell lines. *Endocrinology*, **137**, 4322-4330.

- Sainsbury, J.R.C., Sherbet, G.V., Farndon, J.R. and Harris A.L. (1985) Epidermal growth factor receptors and estrogen receptors in human breast cancer. *Lancet*, **1**, 364-366.
- Satorius, C.A., Melville, M.Y., Hovland, A.R., Tung, L., Takimoto, G.S. and Horwitz, K.B. (1994) A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors locate in teh unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol. Endocrinol.*, **8**, 1347-1360.
- Sarup, J.C., Rao, K.V., Fox, C.F. (1988) Decreased progesterone binding and attenuated progesterone action in cultured human breast carcinoma cells treated with epidermal growth factor. *Cancer Res.*, **48**, 5071-5078.
- Scatchard G., The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1949, **51**, 660-672.
- Seagrove, T.N., Lyndon, J.P., Hovey, R.C., Vonderhaar, B.K. and Rosen, J.M. (2000) C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development. *Mol. Endocrinol*, **14**, 359-368.
- Shen, T., Horwitz, K.B. and Lange, C.A. (2001) Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by Mitogen Activated Protein Kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6122-6131.
- Sepp-Lorenzino, L., Eberhard, I., Ma, Z., Cho, C., Serve, H., Liu, F., Rosen, N. and Lupu, R. (1996) Signal transduction pathways induced by heregulin in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Oncogene*, **12**, 1679-1687.

- Sheridan, P.L., Evans, R.M. and Horwitz, K.B. (1989) Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptors. New phosphorylated sites formed in the nuclei after hormone treatment. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6520-6528.
- Shyamala, G., Schneider, W. and Schott, W. (1990) Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology*, **126**, 2882-2889.
- Sicinsky, P., Donaher, J.L., Parker, S.B., Li, T.S., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S.Z., Bronson, R.T., Elledge, S.J. and Wienberg, R.A. (1995) Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell*, **82**, 621-630.
- Slamon, D., Clark, G., Wong, S., Levin, S., Ullrich, A. and McGuire, W. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**, 177-182.
- Smith, C.L., Oñate, S.A., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1996) CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8884-8888.
- Smith, D.F., Faber, L.E. and Toft, D.O. (1990) Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3996-4003.
- Spencer, K.S.R., Grauss-Porta, D., Leng, J., Hynes, N.E. and Klemke, R.L. (2000) ErbB-2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J. Cell. Biol.*, **148**, 385-397.

- Swantek, J.L. and Baserga, R. (1999) Prolonged activation of ERK2 by epidermal growth factor and other growth factors requires a functional insulin-like growth factor I receptor. *Endocrinology*, **140**, 3163-3169.
- Takimoto, G.S., Hovland, A.R., Tasset, D.M., Melville, M.Y., Tung, L. and Horwitz, K.B. (1996) Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J. Biol.Chem.*, **271**, 13308-13316.
- Takimoto, G.S., Tasset, D.M., Eppert, A.C. and Horwitz, K.B. (1992) Hormone-induced progesterone receptor phosphorylation consists of sequential DNA-independent and DNA-dependent stages: analysis with zinc finger mutants and the progesterone antagonist ZK98299. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3050-3054.
- Taverna, D., Antoniotti, S., Maggiora, P., Dati, C., De Bortoli, M. and Hynes N.E. (1994) ErbB-2 expression in estrogen-receptor-positive breast-tumor cells is regulated by growth-modulatory reagents. *Int. J. Cancer.*, **56**, 522-528.
- Toyoda, H., Komursaki, T., Uchida, D., Takayama, Y., Isobe, T., Okuyama, T. and Hanada, H. (1995) Epiregulin, a novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J.Biol.Chem.*, **270**, 7495-7500.
- Trachtenberg, J. and Thompson, W. (1996) Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. *Nature*, **379**, 174-177.

- Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F. and Giguere, V. (1999) Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor β through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol. Cell*, **3**, 513-519.
- Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 451-486.
- Tung, L., Mohamed, K.M., Hoeffler, J.P., Takimoto, G.S. and Horwitz, K.B. (1993) Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol. Endocrinol.*, **8**, 1256-1265.
- Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity. *Cell*, **61**, 203-212.
- Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Wen, D.X., Goldman, M.E., O'Malley, B.W. and McDonnell, D.P. (1993) Human progesterone receptor A form is a cell and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.*, **7**, 1244-1255.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of the nuclear receptors. *EMBO. J.*, **15**, 3667-3675.
- Von der Ahe, D., Janich, S., Sheidereit, C., Renkawitz, R., Scultz, G.S. and Beato, M. (1985) Glucocorticoid and progesterone receptor bind to the same sites in two hormonally regulated promoters. *Nature*, **313**, 706-709.
- Wagner, B.L., Norris, J.D., Knotts, T.A., Weigel, N.L. and McDonnell, D.P. (1998) the nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both

- ligand and 8-bromo-cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1369-1378.
- Weigel, N.L., Carter, T.H., Schrader, W.T. and O'Malley, B.W. (1992) Chicken progesterone receptor is phosphorylated by a DNA-dependent protein kinase during *in vitro* transcription assay. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 8-14.
- Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S.V., Bacus, S.S., Woy, Y., Trail, G., Hu, s., Silbiger, S.M., Benlevy, R., Koskira, W.H.S. and Yarden, Y. (1992) Neu differentiation factor: A transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell*, **69**,559-572.
- Wen, D., Suggs, S., Karunagaran, D., Liu, N., Cupples, R., Luo, Y., Janssen, A., Ben-Baruch, N., Trollinger, D., Jacobsen, V., Meng, S., Lu, H., Hu, S., Chang, D., Yang, W., Yanigahara, D., Koski, R. and Yarden, Y. (1994) Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors. *Mol.Cell.Biol.*, **14**, 1909-1919.
- Wen, D.X., Xu, Y.F., Mais, D.E., Goldman, M.E and McDonnell, D.P. (1994) The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 8356-8364.
- White, M.F. and Kahn, C.R. (1994) The insulin signaling system. *J.Biol.Chem.*, **269**, 1-4.
- Woods Ignatoski , K.M., Lapointe, A.J., Radany, E.H. and Ethier, S.P. (1999) ErbB-2 overexpression in human mammary epithelial cells confers growth factor independence. *Endocrinology*, **140**, 3615-3622.
- Yang, Y., Spitzer, E., Meyer, D., Sachs, M., Niemann, C., Hartmann, G., Weidner, K., Birchmeier, C. and Birchmeier, W. (1995) Sequential Requirement of Hepatocyte growth factor and Neuregulin in the

Morphogenesis and Differentiation of the Mammary Gland. *J.Cell.Biol.*,**131**, 215-226.

Zhang, D.X., Slikowski, M.X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J. And Godowski, P.J. (1997) Neuregulin 3 (NRG3) a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9562-9567.

Zhang, Y., Bai, W., Allgood, V.E. and Weigel, N.L. (1994) Multiple signaling pathways activate the chicken progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.*, **8**, 577-584.

Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Clement, J.P.,IV., Prendergast, P., Yip, T., Hutchens, T.W., Edwards, D.P. and Weigel, N.L. (1997) Phosphorylation of human progesterone receptor by Cyclin-Dependent Kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites *in vivo*. *Mol. Endocrinol.*, **11**, 823-832.

Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Edwards, D.P. and Weigel, N.L. (1994) Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. *J. Biol.Chem.*, **269**, 31034-31040.

Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Edwards, D.P. and Weigel, N.L. (1995) Identification of a group of ser-pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 1029-1040.

Zhou, Z.X., Kempainen, J.A. and Wilson E.M. (1995) Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 605-615.