

Tesis Doctoral

Definición de una nueva clase de complejo transcripcional: ErbB2 actúa de coactivador de Stat3 promoviendo la proliferación en tumores mamarios

Béguelin, Wendy

2010

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:

Béguelin, Wendy. (2010). Definición de una nueva clase de complejo transcripcional: ErbB2 actúa de coactivador de Stat3 promoviendo la proliferación en tumores mamarios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Béguelin, Wendy. "Definición de una nueva clase de complejo transcripcional: ErbB2 actúa de coactivador de Stat3 promoviendo la proliferación en tumores mamarios". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**DEFINICIÓN DE UNA NUEVA CLASE DE COMPLEJO
TRANSCRIPCIONAL: ErbB2 ACTÚA DE
COACTIVADOR DE STAT3 PROMOVRIENDO LA
PROLIFERACIÓN EN TUMORES MAMARIOS**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES EN EL ÁREA CIENCIAS BIOLÓGICAS

WENDY BÉGUELIN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA V. ELIZALDE

CONSEJERO DE ESTUDIOS: DR. OMAR COSO

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL

BUENOS AIRES, 2010

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral dieron origen a la siguiente publicación:

Progesterone receptor induces ErbB-2 nuclear translocation to promote breast cancer growth via a novel transcriptional effect: ErbB-2 function as coactivator of Stat3.

Béguelin W, Díaz Flaqué MC, Proietti CJ, Cayrol F, Rivas MA, Tkach M, Rosemlit C, Tocchi JM, Charreau EH, Schillaci R, Elizalde PV

Molecular and Cellular Biology, 2010. En prensa.



INDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	
Español	10
Inglés	11
INTRODUCCION	
Cáncer de mama y progesterona	14
Factores de crecimiento y sus receptores	16
Familia de receptores con actividad de tirosina quinasa	17
Familia de receptores ErbBs y sus ligandos	18
Receptores ErbBs en el núcleo celular	23
Respuestas biológicas a heregulina (HRG)	26
ErbBs, HRG y cáncer de mama	26
El receptor de progesterona	28
Mecanismos de acción del receptor de progesterona	
Efectos genómicos	30
Efectos no genómicos	31
Receptor de progesterona y cáncer de mama	32
Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción	33
Mecanismos de acción de las Stats	34
Stat3 como reguladora de la transformación celular	36
Ciclina D1 y cáncer de mama	37
OBJETIVOS	40
MATERIALES Y METODOS	
Animales	42
Tumores C4HD	42
Reactivos	42
Soluciones utilizadas para los cultivos	43
Cultivos primarios de tumores C4HD	44
Líneas celulares y tratamientos	44
Medios de cultivo y suero fetal bovino	46
Preparación de extractos proteicos totales	46
Preparación de extractos citosólicos y nucleares	47

Ensayos de <i>Western Blot</i>	47
Inmunoprecipitaciones	49
Plásmidos	49
Transfecciones transientes	50
Transfecciones con ARN de interferencia (siRNA)	51
Ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal	52
Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y re-ChIP	53
PCR	54
PCR cuantitativa en tiempo real	55
Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR en tiempo real	56
Ensayos de proliferación	57
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	58
Experimentos <i>in vivo</i>	58
Preparación del <i>pellet</i> de HRG	60
RESULTADOS	
PRIMERA PARTE	
HRG induce la translocación de ErbB2 al núcleo y su colocalización con Stat3	62
La translocación de ErbB2 y Stat3 al núcleo inducida por HRG ocurre de manera independiente una de la otra	67
HRG migra al núcleo e induce la translocación de ErbB3 y la asociación con ErbB2 en el núcleo	74
ErbB2 y Stat3 participan en el mecanismo de la expresión de ciclina D1 inducida por HRG	77
HRG induce la acción de ErbB2 como coactivador de Stat3	82
Unión del complejo transcripcional Stat3/ErbB2 en el promotor de ciclina D1	89
La localización nuclear de ErbB2 es fundamental para la proliferación de células de cáncer de mama	93
El bloqueo de la localización nuclear de ErbB2 inhibe el crecimiento <i>in vivo</i> de tumores mamarios	98

SEGUNDA PARTE

El acetato de medroxiprogesterona (MPA) induce la activación de ErbB2 y su migración hacia el núcleo	105
MPA induce la colocalización nuclear de ErbB2 y Stat3	111
La translocación de ErbB2 y Stat3 al núcleo inducida por MPA ocurre de manera independiente una de la otra	114
ErbB2 actúa como coactivador de Stat3 en un mecanismo transcripcional inducido por MPA	117
ErbB2 actúa como coactivador de Stat3 co-reclutando a PR y las histonas acetiltransferasas CBP y p300 en el promotor de ciclina D1	126
La localización nuclear de ErbB2 es fundamental para la proliferación progestágeno-dependiente de células de cáncer de mama	133
El bloqueo de la localización nuclear de ErbB2 inhibe el crecimiento <i>in vivo</i> de tumores mamarios que expresan receptores de hormonas esteroideas y ErbB2	135
DISCUSION	
Formación del complejo nuclear Stat3/ErbB2 inducida por HRG y MPA	142
Interacción nuclear entre Stat3, ErbB2, ErbB3 y HRG	144
ErbB2 transloca entero al núcleo, donde se encuentra fosforilado en los residuos tirosina 1222 y 877	148
La proteína quinasa Src funciona de intermediario entre PR y ErbB2	149
Importación nuclear de Stat3 y ErbB2: ambas deben estar fosforiladas para translocar al núcleo y para interactuar	149
Complejo transcripcional nuclear Stat3/ErbB2	151
Unión de PR al complejo transcripcional Stat3/ErbB2 en el promotor de ciclina D1	151
Formación del complejo nuclear Stat3/ErbB2 inducida por HRG	153
Acción de ErbB2 como coactivador	154
Relación de Stat3 y ErbB2 con la tumorigénesis mamaria	156
Acción de la mutante hErbB2ΔNLS versus trastuzumab	158
Implicancias terapéuticas del uso de hErbB2ΔNLS	161
REFERENCIAS	164



ABREVIATURAS

AFs: dominios de activación de la transcripción
ChIP: inmunoprecipitación de la cromatina
COX-2: ciclooxigenasa tipo II
DBD: dominio de unión al DNA
DMEM-F12: medio de Eagle modificado por Dulbecco
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
ER: retículo endoplasmático
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR: receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
HAS: *HER2 associated sequence*
HRG: heregulina
HRT: terapia de reemplazo hormonal
Ig: inmunoglobulina
IGF-I: factor de crecimiento semejante a insulina de tipo I
IGF-IR: receptor del factor de crecimiento semejante a insulina de tipo I
IP: inmunoprecipitación
IR: receptor de insulina
Jaks: *Janus activated kinases*
LBD: dominio de unión al ligando
MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos
MPA: acetato de medroxiprogesterona
NLS: señal de localización nuclear
O.N.: toda la noche
pb: pares de bases
PBS: *buffer* fosfato salino
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa
PR: receptor de progesterona
PR-A: isoforma A del receptor de progesterona
PR-B: isoforma B del receptor de progesterona
PRE: elemento respondedor a progesterona
PTEN: homólogo de fosfatasa y tensina

pY: residuo tirosina fosforilado

RTK: receptor con actividad intrínseca de tirosina quinasa

RTK-I: receptor con actividad intrínseca de tirosina quinasa tipo I

SD: desviación estándar

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SEM: media del error estándar

SFB: suero fetal bovino

SFBch: Suero fetal bovino libre de esteroides por adsorción con carbón activado o “charcolizado”

SH2: dominio *SRC homology 2*

SH3: dominio *SRC homology3*

siRNA: RNA corto de interferencia

Stat: proteína transductora de señales y activadora de la transcripción

TGF: factor de crecimiento transformante

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

WB: *Western Blot*



RESUMEN
ABSTRACT

Definición de una nueva clase de complejo transcripcional: ErbB2 actúa de coactivador de Stat3 promoviendo la proliferación en tumores mamarios

El receptor con actividad de tirosina quinasa ErbB2 y la proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 3 (Stat3) juegan un rol importante en el desarrollo del cáncer de mama. Distintas evidencias sugieren la existencia de interacciones cruzadas entre ErbB2 y Stat3. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a esta interacción en tumores mamarios permanecen poco estudiados. En este trabajo identificamos un nuevo mecanismo de interacción entre ErbB2 y Stat3 que involucra la translocación nuclear de ErbB2 y la formación de un complejo en el que ErbB2 actúa como coactivador transcripcional de Stat3. Mostramos que la formación de este complejo es inducida tanto por el ligando de los receptores ErbBs, heregulina, como por los progestágenos a través del receptor de progesterona (PR). Demostramos también que la función de ErbB2 como coactivador de Stat3 promueve la activación del promotor de ciclina D1. Cuando la formación del complejo Stat3/ErbB2 es inducida por progestágenos, encontramos al PR co-reclutado en el promotor de ciclina D1, revelando un nuevo mecanismo de acción genómico no clásico del PR. Demostramos que la presencia de ErbB2 en el núcleo celular ejerce un rol fundamental en la proliferación *in vitro* e *in vivo* en tumores mamarios. Estos hallazgos revelan una posible intervención terapéutica nueva en tumores de mama que sobreexpresan ErbB2, mediante la inhibición de la translocación nuclear de ErbB2, dado que esta estrategia es efectiva en células tumorales resistentes a las terapias anti ErbB2 convencionales.

Palabras clave: Stat3, ErbB2, HRG, receptor de progesterona, cáncer de mama.

**Defining a new class of transcriptional complex: ErbB2 acts as
coactivator of Stat3 inducing proliferation in breast tumors**

ErbB2 tyrosine kinase receptor and Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3) have been unraveled as two major players in breast cancer growth. In spite of all the accumulating evidence suggesting a crosstalk between ErbB2 and Stat3, the molecular mechanisms underlying ErbB2 and Stat3 interaction in breast tumor remain poorly explored. In this work, we identified a new mechanism of ErbB2 and Stat3 interaction, which involves ErbB2 nuclear translocation and the assembly of a complex in which ErbB2 acts as a transcriptional coactivator of Stat3. We showed that the assembly of this complex is induced by heregulin, a ligand of the ErbBs receptors, as well as by ligand bound progesterone receptor (PR). We also highlighted that ErbB2 function as Stat3 coactivator drives cyclin D1 promoter activation. When the assembly of Stat3/ErbB2 complex is induced by progestins, we found PR recruitment together with Stat3 and ErbB2 to the cyclin D1 promoter, unraveling a new nonclassical PR genomic mechanism. We found that the nuclear Stat3/ErbB-2 transcriptional complex plays a key role in *in vitro* and *in vivo* proliferation of breast tumors. Our findings reveal a novel therapeutic intervention in ErbB2-overexpressing breast tumors, by inhibition of ErbB2 nuclear translocation, since this strategy has proven effective in tumor cells which are resistant to conventional anti ErbB2 therapies.

Key words: Stat3, ErbB2, HRG, progesterone receptor, breast cancer.

A mi directora, la Dra. Patricia Elizalde, por la formación científica que me brindó y por darme la oportunidad de formarme en su equipo, por su compromiso y dedicación para llevar adelante nuestro grupo de trabajo.

Al Dr. Charreau por habernos brindado todo su apoyo desde la dirección del instituto.

Al Dr. Alfredo Molinolo, por su gran colaboración, por sus consejos y aportes al trabajo del laboratorio.

A la Dra. Claudia Lanari, por su modelo experimental utilizado en esta Tesis.

A la Agencia y al CONICET, por el sustento económico para el desarrollo de mi Tesis.

A la UBA, por haberme brindado una excelente educación desde la facultad.

A la patóloga Isabel Frahm por los análisis histopatológicos de los tumores y órganos de los ratones. A los patólogos Pablo Guzmán y Esteban Maronna por las fotos tomadas de las secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina.

A Cele, mi “laotong” del laboratorio, por su excelente disposición permanente para ayudarme en todo, pero fundamentalmente por su compañerismo, su amistad y las innumerables conversaciones y salidas extra-labo.

A Roxana, Cecilia, Franco, Rocío, Martín y Mer, por estar siempre bien dispuestos, por su amistad y constante apoyo, y porque hacen posible que el laboratorio sea un lindo lugar de trabajo. A Vicky, Roxana, Martín y Cele por sus correcciones y críticas a esta Tesis.

A Marian, mi primera mentora que me enseñó a trabajar en un laboratorio y a dar los pasos iniciales en el mundo de la investigación.

A mis recientes ex-compañeros de laboratorio Cin, Romi, Flor y Nazareno por haber sido excelentes compañeros, por su amistad y apoyo. A Cin por su constante ayuda a distancia.

A mis “vecinas” Lili, Violeta, Ana Rosa, Betina, Caro, Marianita, Agus, Deb, a los chicos de los laboratorios de Gabi Rabinovich y de Claudia Lanari y toda la gente del IBYME, por prestar, aconsejar y ayudar siempre.

A mis amigos Juan, Mari, Pauni, Luis, el mono, Romi, Mili, Ceci V., Ana, Javi, Lucas, el Turco, Monse, Juli, Petu, Ceci F., Juan (Arjona), Lara, Flor, Chuky, Martín (Rosario), Gus, Lucho, Loche, Viqui por todos los buenos momentos que compartimos y por estar siempre. A mis amigos Carla, Jay y Dani, por enseñarme a “enyoguisarme”, por su amistad y buena onda.

A mi amiga de la vida Laura, por estar siempre, en las buenas y en las malas.

A mamá y papá, por darme la oportunidad de crecer libremente, por confiar en mí y apoyarme permanentemente. A los demás integrantes de mi familia: mami, Zenón, Yuquita, Marien, Pedro, José y Victoria, y a la familia ampliada, Luis (Suegrus), Silvia, Fernando, Matías, Carla, Mer y Guido por estar siempre dispuestos a ayudar, escucharme o aconsejarme si lo necesito y por la alegría que todos tienen.

A Luis, por ser el amor de mi vida, por alentarme y apoyarme en todo lo que hago, por compartir los doctorados, por su constante asistencia de tipo académica, por nuestros proyectos.



INTRODUCCIÓN

CÁNCER DE MAMA Y PROGESTERONA

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres y la segunda a nivel mundial (sólo superada por el cáncer de pulmón). La incidencia del cáncer de mama ha ido aumentando de 1:20 mujeres en 1960 a 1:7 mujeres hoy. La *National Breast Cancer Foundation* estima que cada año, alrededor de 200.000 mujeres serán diagnosticadas con cáncer de mama y más de 40.000 morirán por esta enfermedad. Aproximadamente, 1.700 hombres serán dignosticados y 450 morirán cada año. Por su parte, el *National Cancer Institute* (NCI) estima que a una de cada ocho mujeres que viva hasta los 85 años se le diagnosticará cáncer de mama durante su vida. En Argentina, como en otros países, existe un subregistro de mortalidad por cáncer debido a aquellos casos en los cuales la causa que se registra en el informe estadístico de defunción es imprecisa, como por ejemplo “paro cardiorespiratorio”, a pesar de que el individuo haya fallecido por cáncer u otro motivo. Sin embargo, se calcula entre 15.000 y 18.000 nuevos casos de cáncer de mama por año siendo la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres de nuestro país (Matos *et al.* 2003). Dada su altísima incidencia, la investigación en cáncer de mama es considerada prioritaria.

Según datos epidemiológicos la incidencia del cáncer de mama no sólo aumenta con la edad sino que la mayor tasa de incremento ocurre durante los años reproductivos (Pike y Spicer 2000; Bernstein 2002) observándose un marcado pico de incidencia en la etapa de la premenopausia. Este aumento en la incidencia estaría causado por los efectos acumulativos provocados por la proliferación que inducen los esteroides sexuales ováricos sobre el epitelio mamario (Henderson y Feigelson 2000). Con cada sucesivo ciclo menstrual, la proliferación de las células del epitelio mamario, dirigida por los esteroides sexuales, puede resultar en la adquisición progresiva de mutaciones somáticas en el linaje celular, lo cual conduciría a la transformación y progresión neoplásica. Esta hipótesis está avalada por la observación de que una menarca tardía (Apter y Vihko 1983; Apter *et al.* 1989) o una menopausia temprana (Trichopoulos *et al.* 1972; Pike y Ross 2000) se correlacionan con una reducción del riesgo de cáncer de mama. En ambas situaciones, se minimiza la exposición del epitelio mamario a los esteroides sexuales a lo largo de la vida. De los esteroides ováricos, los estrógenos fueron considerados tradicionalmente los principales esteroides sexuales involucrados en la proliferación del epitelio mamario y por extensión en la progresión de dicho linaje al fenotipo neoplásico (Bernstein y Ross 1993; Key 1999; Henderson y Feigelson

2000). Basándose en el efecto antiproliferativo que la progesterona tiene en el endometrio, en contraposición a los estrógenos, se asumió que la progesterona ejercería similares efectos inhibitorios en el epitelio mamario y, por lo tanto, no contribuiría significativamente a la iniciación o progresión tumoral (Lydon *et al.* 2000). No obstante, con estos indicios ha sido difícil explicar por qué el índice proliferativo del epitelio mamario era más alto durante la fase luteal del ciclo menstrual dominada por la progesterona (King 1993), por qué la inclusión de progestágenos en los protocolos de terapia de reemplazo hormonal (*hormone replacement therapy*, HRT) incrementó la densidad de las células epiteliales mamarias con respecto a la administración de estrógenos solos (Hofseth *et al.* 1999; Haslam *et al.* 2002), por qué los progestágenos combinados en anticonceptivos orales podían prevenir el cáncer de ovario y endometrio pero no el de mama (Pike y Spicer 2000), o por qué un gran número de ensayos clínicos mostraron un leve pero significativo aumento en el riesgo de cáncer de mama cuando el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) fue incluido en los regímenes de HRT (Magnusson *et al.* 1999; Ross *et al.* 2000; Chlebowski *et al.* 2003). En particular, el ensayo *Women's Health Initiative Randomized Trial*, cuyo objetivo fue determinar la relación entre el uso de estrógenos y progesterona y el cáncer de mama en más de 16.000 mujeres postmenopáusicas en Estados Unidos, debió ser detenido antes de la finalización del protocolo previsto. Esta determinación se tomó debido a que las estadísticas para cáncer de mama invasivo, excedieron los límites permitidos para este efecto adverso (Chlebowski *et al.* 2003). Finalmente, los resultados del estudio clínico *The Million Women Study*, que investigaba la relación entre distintos patrones de uso de HRTs e incidencia de cáncer de mama y mortalidad en más de un millón de mujeres inglesas, permitió interpretar efectivamente que las HRTs que incluían progestágenos están asociadas a un aumento en el riesgo de cáncer de mama respecto a las que incluyen sólo estrógenos (Beral 2003).

Los efectos de la progesterona en la glándula mamaria son controversiales debido a la complejidad estructural y funcional de este órgano. Dependiendo del modelo experimental, del contexto celular y de la duración del tratamiento, la progesterona puede ejercer efectos proliferativos o antiproliferativos en el crecimiento del epitelio mamario. Se ha hipotetizado que, luego de una ronda de proliferación, el pulso inicial de progesterona actúa como un factor iniciador para las acciones de factores secundarios involucrados en vías proliferativas, de diferenciación o apoptóticas. Entonces, serían los múltiples factores secundarios que regulan el crecimiento y desarrollo de un tumor de

mama, en combinación con la progesterona, los que contribuyen con esta variedad de efectos (Lange *et al.* 1999).

El concepto primitivo que consideraba a los estrógenos inductores y a la progesterona protectora en el carcinoma mamario se encuentra actualmente y, a la luz de las explicaciones antes citadas, en proceso de revisión. Los riesgos y beneficios asociados con la progesterona y los progestágenos sintéticos requieren una mejor comprensión de su función en la biología de células de mama normales y en la desregulación que ocurre en los tumores malignos de mama.

Muchos trabajos, incluyendo los del laboratorio al cual pertenezco, demostraron que existe una interacción entre las hormonas esteroideas y las vías de señalización de los factores de crecimiento, las cuales en un principio, se describían como procesos independientes (Lange *et al.* 2000; Real *et al.* 2002; Labriola *et al.* 2003).

FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS RECEPTORES

Los factores de crecimiento constituyen un grupo de polipéptidos involucrados en la regulación de la proliferación y de la diferenciación celular. Actúan a través de receptores de membrana con actividad de tirosina o serina-treonina quinasas. La unión del factor de crecimiento a su receptor inicia una cascada de activación de quinasas intracelulares que conduce a la regulación de la síntesis del ADN por activación de factores de transcripción o bien, pueden actuar ellos mismos como factores de transcripción. Los factores de crecimiento pueden actuar como factores autocrinos (o intracrinos), paracrinos y yuxtacrinos.

Entre las neoplasias malignas, el cáncer de mama constituye un modelo extraordinariamente atractivo para el estudio de la participación de los factores de crecimiento 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 factores de crecimiento 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 la función glandular y muchas veces participa en el desarrollo del cáncer (Dickson y Lippman 1995).

La mayoría de los factores de crecimiento implicados en el desarrollo del cáncer de mama son polipéptidos mitogénicos como por ejemplo: i) factores de crecimiento

que se unen a los receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I; **ii**) factores de crecimiento semejantes a la insulina tipo I y II (IGF-I, IGF-II); **iii**) factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y **iv**) factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Dickson y Lippman 1995).

Muchas de las evidencias más convincentes que relacionan los factores de crecimiento y el cáncer han sido proporcionadas por la gran cantidad de trabajos experimentales en los que se asocian factores de crecimiento y oncogenes. En efecto, la clase I de protooncogenes codifica para factores de crecimiento, mientras que entre los oncogenes de clase II, se encuentran los que codifican para receptores de factores de crecimiento con actividad de tirosina quinasa, ampliamente relacionados con la etiología del cáncer de mama (Dickson y Lippman 1995).

Familia de receptores con actividad de tirosina quinasa

Los receptores con actividad de tirosina quinasa (*receptor tyrosine kinase*, RTK) forman una familia numerosa de receptores de membrana a los que se une la mayoría de los factores de crecimiento y la insulina. Estos receptores participan en la regulación normal 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 sus secuencias y diferentes características estructurales, se clasifican en al menos 19 subclases (Ullrich y Schlessinger 1990). De todas ellas, las de mayor interés con relación al cáncer, son al menos cuatro y se esquematizan en la figura 1: la subclase de tipo I está constituida por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ErbB1/HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4); a la subclase II pertenecen, entre otros, el receptor de insulina (IR) y el receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-IR); uno de los miembros más importantes de la subclase III es el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR A y B); mientras que a la subclase IV pertenecen los receptores de los factores de crecimiento fibroblástico (FGFR).

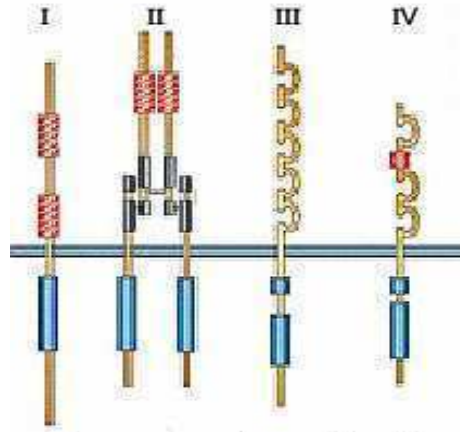


Figura 1. Familia de los RTKs. Se esquematizan los 4 subtipos más importantes. Los RTK tipo I incluyen a los ErbBs (1-4), los RTK tipo II incluyen a IR e IGF-IR, los tipo III a PDGFR (α y β), mientras que al subtipo IV pertenecen los FG-R (1-4). En azul, se esquematizan los dominios de tirosina quinasa; en rojo, los dominios ricos en cisteína y en gris, la fibronectina. Tomado de (Blume-Jensen y Hunter 2001).

La regulación alostérica de la activación del receptor y las señales de transducción que desencadena, cobra importancia por el hecho de que se encontró una gran variedad de alteraciones estructurales en oncogenes derivados de estos receptores que lleva a su activación constitutiva y a la consecuente desregulación de los mecanismos de control del crecimiento celular y las señales del receptor favoreciendo el desarrollo del cáncer.

Familia de receptores ErbBs y sus ligandos

Los receptores con actividad de tirosina quinasa tipo I (RTKs-I) o ErbBs se expresan en una gran variedad de tejidos de origen epitelial, mesenquimal y neuronal, donde ejercen sus efectos sobre la embriogénesis/desarrollo, proliferación y diferenciación. La desregulación de la expresión de estos receptores, en particular de ErbB1 y ErbB2, ha sido implicada en el desarrollo y la agresividad de numerosos tipos de cánceres humanos (Hynes y Lane 2005).

Los miembros de la familia RTKs-I comparten una estructura molecular común que incluye un dominio extracelular de unión al ligando glicosilado con dos dominios ricos en cisteína, una extensión simple transmembrana y una larga extensión citoplasmática que contiene los sitios tirosina quinasa y de autofosforilación. Los miembros de la familia de ligandos del EGF se unen al dominio extracelular de los ErbBs llevando a la formación de homo o heterodímeros. Consecuentemente, la

dimerización estimula la actividad tirosina quinasa intrínseca de los receptores disparando la autofosforilación de residuos tirosina específicos en el dominio citoplasmático. Estos residuos sirven de sitios de anclaje para moléculas que activan cascadas de señalización intracelulares. Dos de las principales vías activadas por estos receptores son la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la de fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K)/Akt. Otras proteínas efectoras importantes de la señalización de los ErbBs son: la tirosina quinasa soluble Src; la serina-treonina quinasa mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que es activada por la vía PI3K/Akt y por otros reguladores del crecimiento; y las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (Stats) que, en cáncer, han sido frecuentemente asociadas con la activación de EGFR. Por último, los efectos río abajo sobre la expresión génica (como las Stats) determinan la respuesta biológica (Olayioye *et al.* 2000). De esta manera, los receptores ErbBs activados regulan múltiples actividades celulares, y la respuesta biológica específica desencadenada depende de las interacciones cruzadas entre las vías de señalización.

Los ligandos de los RTKs-I se caracterizan por tener en su estructura un dominio semejante al factor de crecimiento epidérmico (*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 tres familias de ligandos. El primer grupo se une a EGFR e incluye a EGF, el factor transformante tipo alfa (TGF α) y anfiregulina. El segundo está formado por betacelulina, un EGF capaz de unirse a heparina (HB-EGF), y epiregulina; los tres factores de crecimiento se unen tanto a ErbB1 como a ErbB4 (Riese *et al.* 1996). Por último, la búsqueda de ligandos capaces de activar a ErbB2 llevó al aislamiento del factor de crecimiento heregulina (HRG, también denominada neuregulina, NRG, o gp30) del medio de células de cáncer de mama humano (Peles y Yarden 1993). Luego, se encontró que HRG activaba a ErbB2 de manera indirecta a través de la unión a ErbB3 o ErbB4. Se aislaron también dos factores neuronales relacionados llamados “factor de crecimiento glial” (GGF) (Goodearl *et al.* 1993) e “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* alternativo de un único gen ubicado en el cromosoma humano 8 (Orr-Urtreger *et al.* 1993) y constituyen la familia de heregulinas 1-4 cuyos receptores son ErbB3 y ErbB4. Ninguno de los ligandos de estas familias se une directamente a ErbB2. A pesar de ser

un receptor huérfano, la función principal de ErbB2 sería la de correceptor. De hecho, ErbB2 es el compañero preferido para heterodimerizar con los demás ErbBs (figura 2) (Graus-Porta *et al.* 1997; Olayioye *et al.* 2000; Marmor *et al.* 2004).

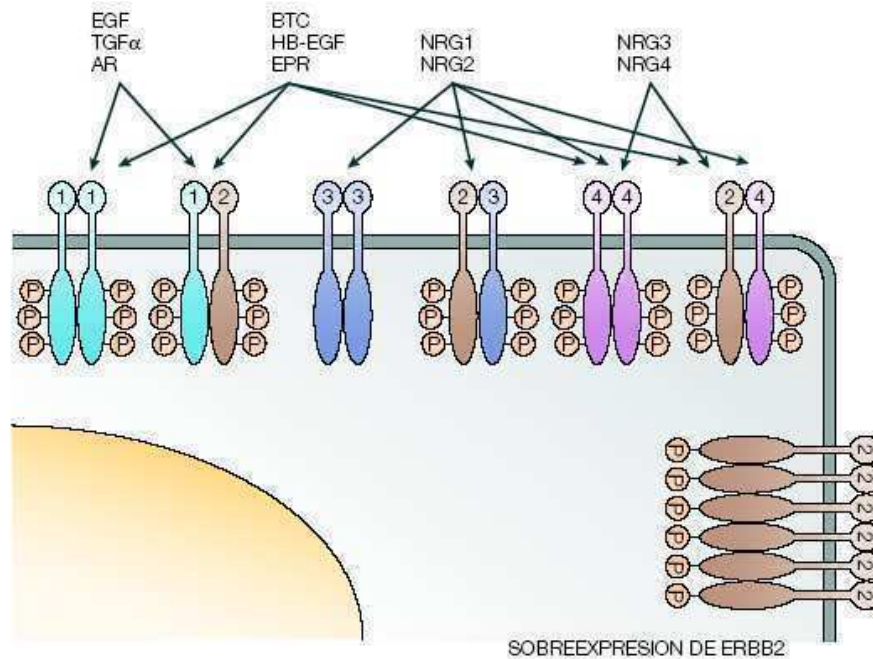


Figura 2. *Ligandos y dímeros de los ErbBs.* Los ligandos de los ErbBs son los miembros de la familia del EGF. La unión del ligando a los receptores induce la formación de homo y heterodímeros y la activación del dominio quinasa intrínseco resultando en la fosforilación de residuos tirosina específicos en el dominio citoplasmático. Estos residuos fosforilados sirven de sitios de anclaje para una variedad de proteínas. Este reclutamiento lleva a la activación de vías intracelulares de transducción. Ninguno de los ligandos se une a ErbB2 pero ErbB2 es la pareja preferida de los demás ErbBs para heterodimerizar. ErbB3 adquiere actividad de señalización sólo cuando dimeriza con otro ErbB. La sobreexpresión de ErbB2 en tumores conduce a su activación constitutiva, posiblemente debido a la alta cantidad de receptor en la membrana plasmática. AR: anfiregulina, BTC: betacelulina, HB-EGF: EGF capaz de unirse a heparina, EPR: epiregulina, NRG: neuregulina (o heregulina, HRG). Tomado de (Hynes y Lane 2005).

A pesar de que la estructura primaria está bastante conservada, cada uno de los cuatro receptores tiene rasgos funcionales únicos. El más importante es la potencia y la especificidad de sustrato de la actividad tirosina quinasa. ErbB3, a diferencia de los demás, carece de esta actividad pero es capaz de unir ATP (Guy *et al.* 1994). Las secuencias de aminoácidos linderas a los sitios de autofosforilación de cada receptor también son notablemente diferentes, ya que estas regiones determinan la identidad de las proteínas con homología *Src* 2 (SH2) o con dominios fosfotirosina de unión (PTB) que se asocian con cada receptor; esta diversidad conduce a la especificidad en la vía de

señalización (Shoelson 1997; Sudol 1998). ErbB3 es el único miembro de esta familia que posee la capacidad de unirse a la subunidad reguladora de PI3K (p85) (Carraway y Cantley 1994; Fedi *et al.* 1994).

Luego de la unión del ligando, la ruta celular de cada receptor constituye otra diferencia funcional; aunque ErbB1 sufre una rápida internalización, los otros ErbBs son internalizados lentamente y pueden ser reciclados para volver a la membrana celular sin degradación significativa del ligando endocitado (Baulida *et al.* 1996; Pinkas-Kramarski *et al.* 1996). Los diferentes patrones de expresión caracterizan a los cuatro receptores. ErbB2 es el más ampliamente expresado, mientras que ErbB3 se encuentra expresado en varios tipos de células epiteliales y ErbB4 está mayormente expresado en células nerviosas, musculares y de la glía. ErbB1 es expresado por las células del parénquima del hígado, fibroblastos y células epiteliales de todo tipo.

La región extracelular de los ErbBs consiste en cuatro dominios (I-IV) (figura 3). Los dominios I y III están involucrados en la unión al ligando, y el brazo de dimerización del dominio II promueve la interacción receptor-receptor, en la que no está involucrado el ligando (Burgess *et al.* 2003). Cuando los receptores ErbB1, ErbB3 y ErbB4 no se encuentran unidos al ligando, asumen una estructura plegada, en la que el dominio II de dimerización es bloqueada por interacciones moleculares entre los dominios II, III y IV (Cho y Leahy 2002; Ferguson *et al.* 2003). La estructura extracelular de ErbB2 es radicalmente diferente de la de los demás ErbBs, porque posee una composición fija que se asemeja al estado activado por ligando: los dominios II, III y IV no interactúan y el lazo de dimerización del dominio II se ve expuesto (figura 3) (Batra *et al.* 1995; Garrett *et al.* 2002). Esto explica por qué ErbB2 es la pareja preferida para los demás ErbBs activados y siempre está preparado para interactuar con otro receptor unido a ligando. Además, esta estructura explica por qué no se encontró ningún ligando soluble: ErbB2 posee un único subdominio de interacción, que es inaccesible para la interacción con un ligando (Hynes y Lane 2005).

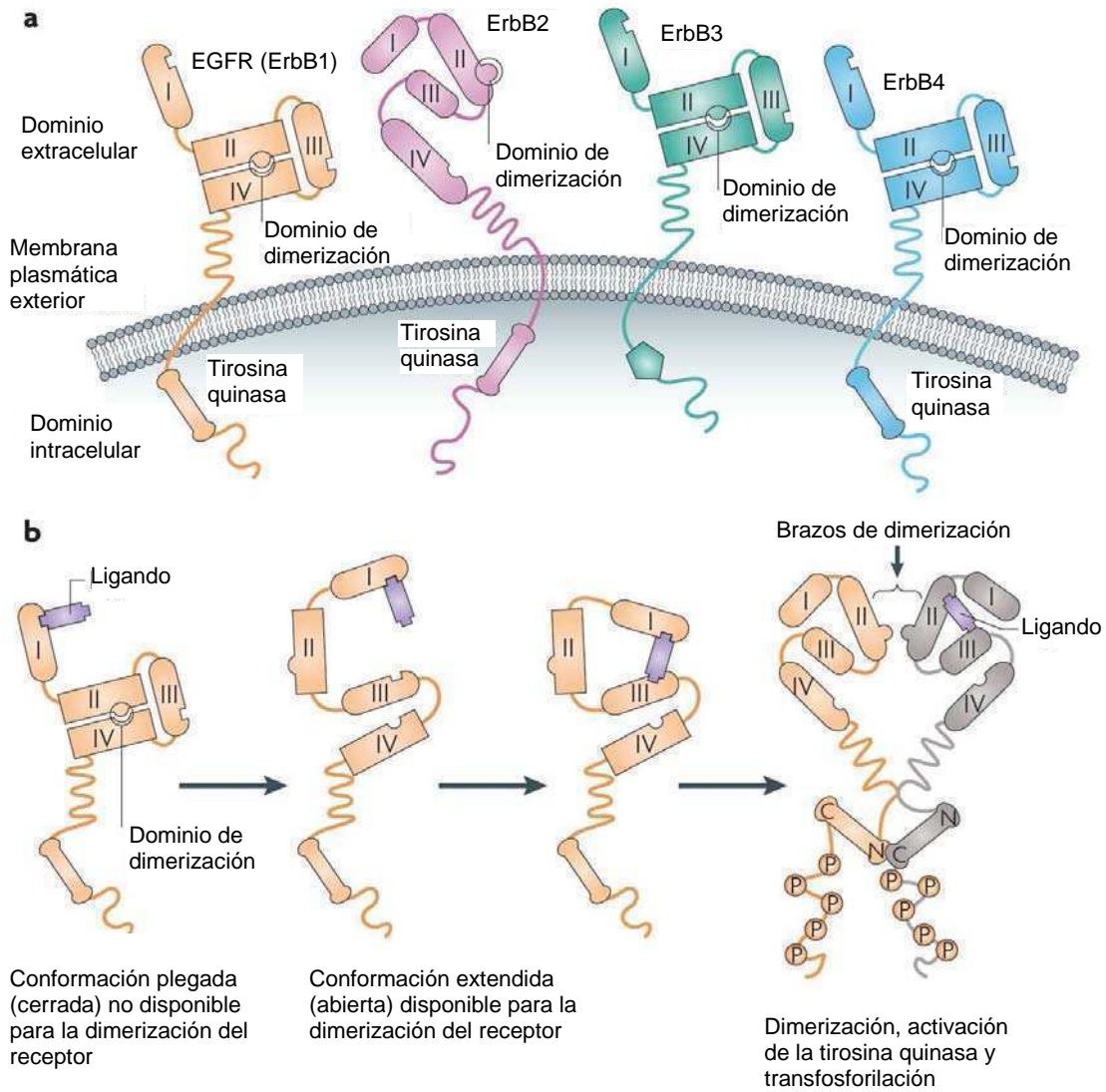


Figura 3. Estructura de los receptores ErbBs. **a.** Cada receptor está compuesto por tres dominios funcionales: un dominio extracelular donde se une el ligando; el segmento transmembrana (tipo α -hélice); y el dominio intracelular con actividad de tirosina quinasa que contiene motivos y residuos que median la interacción con moléculas de señalización intracelulares. A su vez, la región extracelular consiste en 4 dominios (I-IV). EGFR, ErbB3 y ErbB4 tienen una conformación plegada o cerrada en la que el dominio de dimerización no se encuentra disponible para interactuar con otros ErbBs en ausencia de ligando. ErbB2 tiene una conformación fija extendida que semeja el estado activado por ligando de los otros ErbBs, y está permanentemente disponible para dimerizar. **b.** Los dominios I y III de la región extracelular del receptor participan en la unión al ligando, lo que induce un cambio conformacional en su estructura plegada y expone el brazo de dimerización del dominio II. Este paso es necesario para la formación de dímeros y activación funcional de EGFR, ErbB3 y ErbB4. La interacción entre los dominios con actividad de tirosina quinasa de dos ErbBs es asimétrica: el lóbulo amino terminal de una tirosina quinasa interactúa con el lóbulo carboxi terminal de la otra. Tomado de (Baselga y Swain 2009).

Receptores ErbBs en el núcleo celular

Si bien está aceptado ampliamente que la familia de los ErbBs funcionan como iniciadores de la señalización en la membrana celular, su localización nuclear es también conocida y está bien documentada (Wells y Marti 2002; Carpenter 2003; Linggi y Carpenter 2006; Planque 2006). De los miembros de la familia de los ErbBs, EGFR (Marti *et al.* 1991; Lin *et al.* 2001), ErbB2 (Xie y Hung 1994; Wang *et al.* 2004) y ErbB3 (Offterdinger *et al.* 2002) fueron detectados en el núcleo de numerosos tipos de líneas celulares y tejidos, tanto normales como tumorales. En todos esos reportes, se encontró la forma entera del receptor, sin clivar. El mecanismo de internalización de ErbB4 desde la membrana plasmática hacia el núcleo ocurre a través de un procesamiento proteolítico secuencial que produce un dominio intracelular que luego transloca al núcleo, donde funciona como factor de transcripción (Ni *et al.* 2001; Carpenter 2003). La localización del receptor ErbB4 entero en el núcleo de células normales también fue reportada (Bueter *et al.* 2006). Asimismo, se detectó la localización nuclear de fragmentos carboxi terminales derivados de ErbB2 por truncamiento del extremo amino terminal o por sitios de inicio de la traducción alternativos en células cancerosas (Anido *et al.* 2006; Scaltriti *et al.* 2007). A diferencia de los fragmentos derivados de ErbB4, los derivados de ErbB2 retienen el dominio transmembrana, por lo tanto, su translocación nuclear debe superar la misma barrera energética con la que se enfrenta el receptor entero.

Tras la activación por estimulación con el ligando, los receptores de membrana son internalizados principalmente mediante endocitosis dependiente de clatrina, mecanismo por el cual el ErbB activado es capturado de la superficie celular por la formación de vesículas recubiertas de clatrina. También se mostró que la internalización de EGFR y otros receptores puede ocurrir por rutas diferentes, como endocitosis independiente de clatrina (Mayor y Pagano 2007). Luego de la endocitosis, las vesículas que transportan los RTKs se fusionan con los endosomas tempranos. El destino del receptor internalizado es decidido en el endosoma temprano: puede ser reciclado para volver a la superficie celular, degradado en el lisosoma, o bien translocado hacia el núcleo (figura 4) (Wang *et al.* 2010).

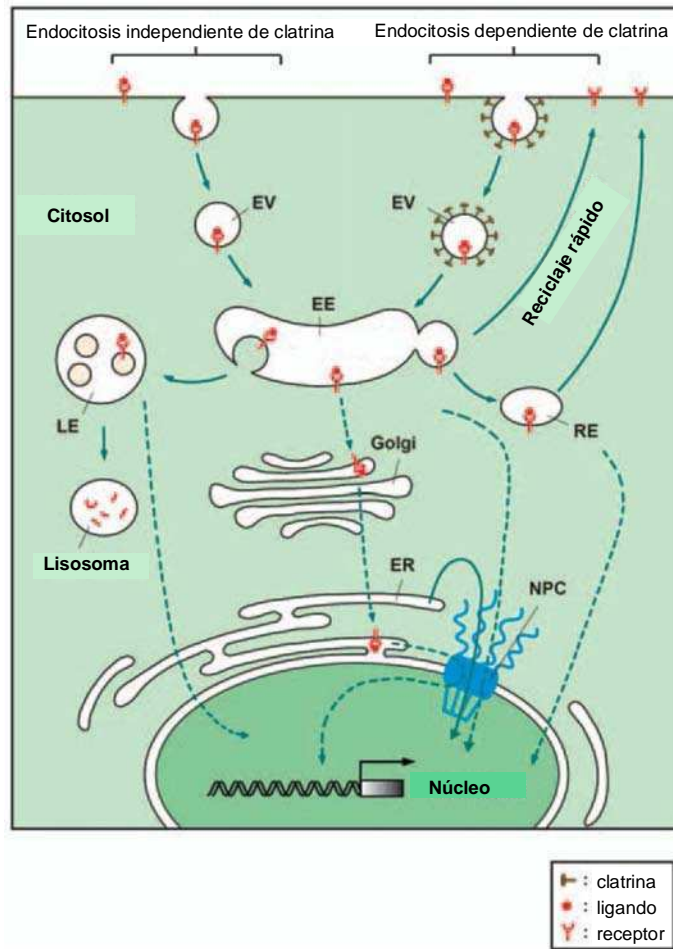


Figura 4. *Transporte nuclear de los receptores ErbBs.* Las vesículas endocíticas que transportan el receptor ErbB proveniente de la endocitosis dependiente o independiente de clatrina se fusionan con los endosomas tempranos. El receptor puede ser reciclado para volver a la superficie celular por un reciclaje rápido o a través de los endosomas de reciclaje. También puede ser degradado en el lisosoma pasando previamente por endosomas tardíos. La tercera posibilidad es que sea transportado hacia el núcleo mediante distintos mecanismos probables. Por ejemplo, el receptor puede ubicarse en el ER a través de un transporte retrógrado desde los endosomas tempranos hacia el Golgi y luego al ER. Luego, el receptor localizado en el ER es extraído hacia el citoplasma y el receptor citoplasmático es transportado hacia el núcleo a través del complejo del poro nuclear. El transporte nuclear también podría ocurrir desde las endosomas de reciclaje o desde los endosomas tardíos, pero no está estudiado. EV: vesícula endocítica, EE: endosoma temprano, LE: endosoma tardío, RE: endosoma de reciclaje, ER: retículo endoplasmático, NPC: complejo del poro nuclear. Tomado de (Wang *et al.* 2010).

Se propusieron diversos mecanismos para el transporte nuclear de proteínas de membrana, pero todos siguen bajo estudio. Estos mecanismos incluyen la actividad de chaperonas que se unen al dominio transmembrana, la translocación nuclear mediada por endosomas, y la retro-translocación mediada por la maquinaria de transporte del retículo endoplasmático (ER) (Wells y Marti 2002). Entre ellos, los dos últimos mecanismos constan de mayor cantidad de evidencias experimentales. En la

translocación nuclear mediada por endosomas, el endosoma internalizado es dirigido directamente hacia el complejo del poro nuclear por las proteínas transportadoras nucleares importinas, que reconocen la señal de localización nuclear (NLS) en los ErbBs. En el modelo de transporte nuclear mediante retro-translocación, el endosoma que transporta el ErbB se fusiona con el Golgi, y luego el receptor sufre un transporte retrógrado hacia el ER. Del ER el receptor es extraído mediante el sistema de degradación asociada al ER (ERAD), que funciona para detectar proteínas mal plegadas en el ER y enviar esas proteínas intactas hacia el citoplasma, donde son ubiquitinizadas y degradadas (Tsai *et al.* 2002). Pero en lugar de ser degradado, el ErbB es transportado hacia el núcleo a través del poro nuclear interactuando con las importinas (figura 4) (Carpenter 2003; Wang *et al.* 2010).

Cualquiera sea el mecanismo de transporte nuclear, el receptor debe poseer una señal de localización nuclear para atravesar el poro nuclear. EGFR posee una NLS tripartita, que contiene tres grupos de aminoácidos básicos (RRRHIVRKRTLRR), localizada en la región carboxi terminal intracelular, entre el dominio transmembrana y la actividad de tirosina quinasa; y esta NLS está conservada entre los miembros de la familia de los ErbBs (Hsu y Hung 2007). El grupo del Dr. Hung demostró que la NLS tanto de EGFR como de ErbB2 interactúa con la importina β (Giri *et al.* 2005; Lo *et al.* 2006). En el caso de ErbB2, demostraron que la importina β 1 colocaliza con ErbB2 en los endosomas, y que la importina β 1, ErbB2 y Nup358, una nucleoporina localizada en los filamentos citoplasmáticos del complejo del poro nuclear, forman un complejo ternario que colocaliza cerca de la envoltura nuclear (Giri *et al.* 2005). Estos estudios son consistentes con un modelo de translocación nuclear mediada por endosomas.

Se describieron diversas funciones de los ErbBs en el núcleo. Son capaces de regular una variedad de funciones celulares, como la proliferación celular, la reparación de daños al ADN, la replicación del ADN y la transcripción, tanto en tejidos normales como en células de cáncer humanas. También se los vio involucrados en la progresión del cáncer [revisado en (Wang y Hung 2009)]. En particular, se describió la función de ErbB2 como factor de transcripción sobre el promotor del gen de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), en el que se une a través de una secuencia en el promotor denominada HAS, por *HER2 associated sequence* (Wang *et al.* 2004). COX-2 es un factor importante para el desarrollo del cáncer, porque promueve la supervivencia, la proliferación, la metástasis y la angiogénesis, y su expresión está correlacionada con la de ErbB2 en tejidos de cánceres primarios (Wang *et al.* 2004).

Respuestas biológicas a heregulina (HRG)

Las respuestas biológicas a HRG dependen del tipo celular, la concentración y la identidad de la isoforma. Ciertas isoformas de HRG inducen diferenciación fenotípica de células de mama en cultivo derivadas tanto de tejidos normales como malignos (Falls *et al.* 1993). La diferenciación fenotípica incluye arresto del crecimiento, síntesis y secreción de los componentes de la leche y expresión aumentada de varias moléculas de adhesión. En la glándula mamaria, HRG estimula el desarrollo lobuloalveolar y la producción de las proteínas de la leche durante la preñez (Yang *et al.* 1995). En el sistema nervioso, 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 y Thompson 1996). Por otro lado, actúa sobre las sinapsis neuromusculares produciendo efectos más bien de diferenciación celular que proliferativos. Debido a los múltiples roles biológicos de HRG, la inactivación del gen en ratones lleva a la muerte del embrión (Meyer y Birchmeier 1995).

ErbBs, HRG y cáncer de mama

ErbB2 está críticamente involucrado en el crecimiento y diferenciación del cáncer de mama humano. La amplificación y sobreexpresión de ErbB2 encontrada en el 18-25% de los tumores de mama humanos, tiene valor pronóstico, predictivo y relevancia terapéutica. Su sobreexpresión se asocia a mal pronóstico (Slamon *et al.* 2001; Baselga y Swain 2009). La participación de ErbB2 en la carcinogénesis mamaria ha sido establecida en estudios en los cuales se alteró su expresión endógena o en experimentos de transfección que han conducido a un aumento de la tumorigénesis (Pinkas-Kramarski *et al.* 1997). La sobreexpresión dispara la activación ligando-independiente del dominio quinasa como resultado de la dimerización espontánea (figura 2). Si bien los homodímeros de ErbB2 contribuyen por sí solos a la malignización, ErbB2 cooperaría con otros ErbBs durante el desarrollo tumoral (Slamon *et al.* 2001). Contrariamente a EGFR, ErbB2 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. En el cáncer de mama metastásico, la expresión de ErbB2 está asociada con un alto índice mitótico y una respuesta clínica pobre a ciertos agentes

quimioterapéuticos (Hynes y Stern 1994). Los resultados de la Dra. Hynes demostraron que la sobreexpresión y activación de ErbB2 solo no son suficientes para promover la división de células tumorales mamarias (Holbro *et al.* 2003). Identificaron que el papel de ErbB3 es el de unir a ErbB2 activando la vía de PI3K/Akt. De esta manera, el dímero ErbB2/ErbB3 funciona como una unidad oncogénica que dirige la proliferación de células tumorales mamarias.

La sobreexpresión de EGFR y de ErbB3 ha sido asociada positivamente con alto índice de metástasis y mal pronóstico (Nicholson *et al.* 2001; Yarden 2001; Witton *et al.* 2003). Por el contrario, ErbB4 mediaría efectos antiproliferativos en cáncer de mama y su expresión se asocia con buen pronóstico (Witton *et al.* 2003).

Múltiples evidencias experimentales han demostrado que HRG está involucrada en la carcinogénesis mamaria. Se ha detectado su expresión en tumores primarios humanos (Falls *et al.* 1993; Atlas *et al.* 2003). La isoforma β de HRG y, en menor medida, la α son mitogénicas para algunas líneas de cáncer de mama humano y para líneas mamarias epiteliales no transformadas (Peles y Yarden 1993; Mincione *et al.* 1996). El bloqueo de la expresión de HRG inhibe la tumorigenicidad y las metástasis en células de cáncer de mama (Tsai *et al.* 2003).

Los receptores ErbBs se encuentran con frecuencia estimulados constitutivamente en cáncer debido a la presencia de los ligandos de la familia de EGF en los tumores, y la estimulación autocrina es un mecanismo muy conocido para promover la proliferación de células tumorales (Salomon *et al.* 1995).

Debido a la participación de ErbB2 en la tumorigénesis, se desarrollaron dos clases principales de terapias anti ErbB2: los anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular del receptor, como el trastuzumab, y pequeñas moléculas inhibidoras de tirosina quinasas, como el lapatinib, que inhibe la actividad tirosina quinasa tanto de ErbB2 como de EGFR, compitiendo con el ATP (Baselga y Norton 2002). Sin embargo, durante el proceso de desarrollo del cáncer, las células adquieren múltiples mutaciones que contribuyen a la malignidad del tumor, generando de esta manera, resistencia a las terapias dirigidas contra los ErbBs (Hynes y Lane 2005).

EL RECEPTOR DE PROGESTERONA

La progesterona difunde a través de la bicapa lipídica de una célula blanco para unirse y activar su receptor. El receptor de progesterona (PR) es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas con actividad de factores de transcripción dependientes de ligando y media los diversos efectos biológicos de la progesterona. Es una proteína modular que presenta los tres dominios estructurales característicos de los receptores nucleares: el dominio amino terminal, el dominio central de unión al ADN (DBD, por sus siglas en inglés, *DNA binding domain*) y el dominio carboxilo terminal de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés, *ligand binding domain*). Dentro de estos módulos hay por lo menos dos dominios de activación de la transcripción (AFs). El dominio de activación ligando independiente AF-1 se encuentra en el dominio amino terminal y el dominio AF-2 dependiente de ligando está presente en el LBD (figura 5). El DBD contiene dos clásicas estructuras de dedos de zinc que le permiten la unión al ADN y la interacción con ciertas proteínas. Tanto el LBD como el DBD se encuentran altamente conservados entre los miembros de la familia de receptores nucleares, mientras que el dominio amino terminal presenta una gran variabilidad en la longitud y en la secuencia (Leonhardt *et al.* 2003).

El PR se expresa en dos isoformas mediante la transcripción a partir de dos promotores presentes en el mismo gen (Kastner *et al.* 1990) o con el inicio de la traducción a partir de sitios alternativos presentes en un mismo ARN mensajero (Conneely *et al.* 1987). El receptor de progesterona B, PR-B (120 kDa), presenta en el extremo amino terminal 164 aminoácidos más que el PR-A (94 kDa). A pesar de que ambas isoformas poseen DBD y LBD similares, se ha descrito que regulan la expresión de diferentes genes, que tienen actividades transcripcionales distintas y que reclutan correguladores diferentes (Richer *et al.* 2002).

La isoforma B presenta un tercer dominio de activación de la transcripción (AF-3) en los primeros 164 aminoácidos, siendo así un activador transcripcional diez veces más fuerte que la isoforma A (figura 5) (Beato *et al.* 1996; Leonhardt *et al.* 2003; Sartorius *et al.* 2003). En determinados tipos celulares, el PR-A es capaz de actuar como dominante negativo ligando-dependiente de receptores esteroideos, como el PR-B y el receptor de estrógenos, inhibiendo la transcripción de diversos genes (Leonhardt *et al.* 2003; Sartorius *et al.* 2003).

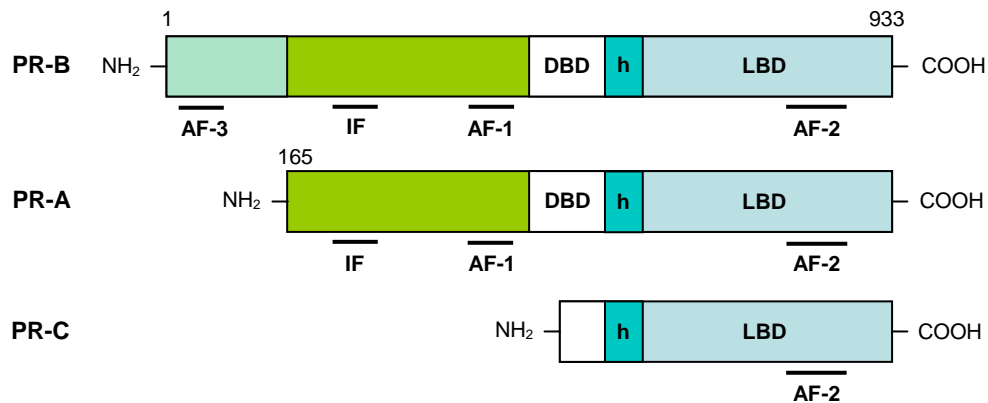


Figura 5. Esquemas de los dominios de las isoformas A, B y C del PR humano. La isoforma B posee 164 aminoácidos más que la isoforma A y en el dominio amino terminal contiene un tercer dominio de activación (AF-3) que le confiere una mayor actividad transcripcional. DBD: dominio de unión al ADN, LBD: dominio de unión al ligando, AF-1 y AF-2: dominios de activación transcripcional, IF: dominio de inhibición, h: bisagra.

En la glándula mamaria, la expresión de ambas isoformas en iguales proporciones es necesaria para su correcto desarrollo y diferenciación (Mote *et al.* 2002). Las cantidades relativas del PR-A y PR-B se encuentran alteradas en la mayoría de los tumores mamarios. Numerosos trabajos demostraron que dichas alteraciones son un evento temprano en el proceso de carcinogénesis mamaria y aumentan con el progreso de la enfermedad (Mote *et al.* 2002; Hopp *et al.* 2004).

Existe también una tercera isoforma del receptor: el PR-C, identificado en el miometrio (Condon *et al.* 2006) y placenta humana (Taylor *et al.* 2006). Se trata de una isoforma truncada en el extremo amino terminal (figura 5), con un peso molecular de 60 kDa, y permanece en el citosol de las células que lo expresan. El PR-C carece del primer dedo de zinc del DBD pero une progesterona (Wei *et al.* 1996). Poco se conoce de la función de esta isoforma, pero se postuló que se puede unir a la isoforma B reduciendo la capacidad del PR-B de transactivar otros factores de transcripción (Condon *et al.* 2006).

Mecanismos de acción del receptor de progesterona

Efectos genómicos

En ausencia de ligando, el PR se encuentra asociado a un complejo de proteínas chaperonas como las proteínas de shock térmico Hsp70 y Hsp90. En el modelo clásico, la unión de la progesterona al PR induce un cambio conformacional del receptor, su fosforilación, disociación de las proteínas chaperonas, seguido de la dimerización, translocación al núcleo, donde se fosforila nuevamente en varios residuos, y la localización en elementos respondedores a progesterona (PRE, por sus siglas en inglés) en los promotores o regiones *enhancer* de los genes blanco, para activar o silenciar la transcripción de aquellos genes que regula, lo que da como resultado la elaboración de la respuesta fisiológica de la célula blanco (figura 6).

El mecanismo por el cual los receptores de hormonas esteroideas unidos a sus ligandos afectan la velocidad de transcripción dirigida por la RNA polimerasa II involucra la interacción de los receptores con componentes del complejo de preiniciación. Esta interacción ocurre de manera directa e indirecta a través del reclutamiento secuencial de varios coactivadores. Los coactivadores constituyen un grupo diverso de moléculas que otorgan múltiples funciones estructurales y enzimáticas al promotor (Rowan y O'Malley 2000). Son reclutados al complejo PR-ligando y tienen la capacidad de facilitar el ensamblado del complejo de preiniciación y de aumentar la transactivación dependiente del receptor (figura 6) (Li *et al.* 2003).

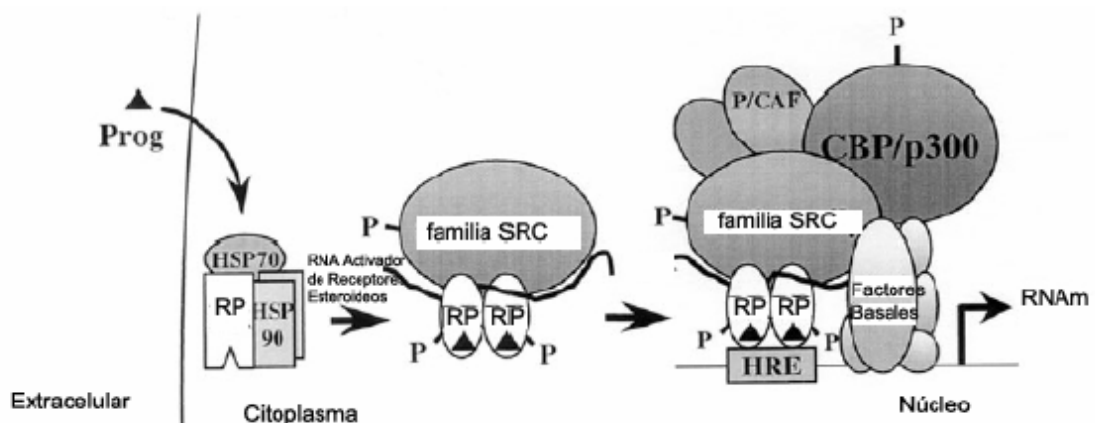


Figura 6. Modelo de acción del receptor de progesterona. El PR está presente en un complejo inactivo con proteínas chaperonas (Hsp 70 y 90). Al unirse a la hormona (Prog), el PR se fosforila y se disocia de las proteínas chaperonas. Transloca del citoplasma al núcleo, se fosforila nuevamente en varios residuos,

dimeriza y tras el reclutamiento de las proteínas necesarias, se une a los elementos respondedores a hormonas (HRE) presentes en los promotores de los genes cuya transcripción regula. SRC: coactivador de receptores de esteroides, CBP: proteína de unión al elemento respondedor de unión a cAMP (CREB), P/CAF: p300/factor de asociación a CBP. Tomado de (Rowan y O'Malley 2000).

Además de contactar directamente el ADN, el PR puede unirse a otros factores de transcripción, incluyendo a Sp1 (*specificity protein 1*), Stat5 y AP1 (*activator protein 1*) para regular promotores de genes que no poseen secuencias canónicas PRE, como p21, β -caseína y ciclina D1 (Owen *et al.* 1998; Stoecklin *et al.* 1999; Cicatiello *et al.* 2004), en un llamado mecanismo “genómico no clásico”. En cualquier caso, para activar la transcripción de los genes blanco, el PR activado por su ligando recluta las enzimas remodeladoras de la cromatina y el aparato transcripcional de la RNA polimerasa II. Paradójicamente, muchos de los genes blanco del PR involucrados en el ciclo celular o la proliferación, no contienen PREs canónicos en sus regiones promotoras y por lo tanto estarían regulados por estos mecanismos no clásicos del PR independientes de su unión directa al ADN (Faivre *et al.* 2008). El PR puede también mediar la transcripción y/o represión de genes de manera independiente de ligando (Jacobsen *et al.* 2002; Buser *et al.* 2007).

El PR presenta un nivel basal de fosforilación que aumenta sensiblemente en presencia del ligando. Numerosos trabajos demostraron que su fosforilación es un importante mecanismo de regulación de su función. En particular, la fosforilación inducida por ligando en la serina 294 está mediada por acción de p42/p44 MAPKs, siendo necesaria para su actividad transcripcional y la posterior exportación nuclear, ubiquitinación y degradación citoplasmática, demostrando la participación de las MAPKs tanto en la estabilidad como en la funcionalidad del receptor (Lange *et al.* 2000; Shen *et al.* 2001; Qiu y Lange 2003).

Efectos no genómicos

La regulación transcripcional mediada por el PR abarca varios niveles de complejidad y mecanismos intrincados involucrando acciones genómicas (efectos transcripcionales directos) y efectos rápidos o no genómicos. Estos últimos fueron descubiertos a partir del hallazgo de vías de regulación génica mediadas por el PR pero que no son dependientes de la unión del receptor al ADN. Auricchio y colaboradores

demonstraron por primera vez que los progestágenos activan en forma rápida la vía Src/p21^{ras}/MAPKs a través del PR clásico ubicado en el citosol o cercano a la membrana plasmática, en células de carcinoma mamario T47D (Migliaccio *et al.* 1998). Luego se demostró que la activación de la tirosina quinasa c-Src por el PR ocurre en forma indirecta, mediante la interacción de dos dominios presentes en el dominio amino terminal del PR con el LBD del receptor de estrógenos (Ballare *et al.* 2003). A su vez, este último interactúa con c-Src mediante la unión de los dominios SH2 de la quinasa y el residuo tirosina 537 del receptor de estrógenos. Sin embargo, los trabajos de Edwards y colaboradores determinaron una interacción directa entre el PR y la familia de quinasas Src (Boonyaratanakornkit *et al.* 2001). La presencia del sitio rico en prolinas, PPPPLPPR, presente entre los aminoácidos 421-428 del dominio amino terminal del PR le permite interactuar con dominios SH3 de proteínas de la familia Src activando en forma rápida la vía Src/MAPKs luego del tratamiento con progesterona. Tras la unión del ligando al PR o receptor de estrógenos, la interacción proteína-proteína con c-Src, libera una conformación inhibitoria intermolecular permitiendo la auto-activación de c-Src. c-Src activa inicia la cascada de transducción de señales de Ras/Raf/MAPK (Migliaccio *et al.* 1998; Boonyaratanakornkit *et al.* 2001). Esta activación ocurre fuera del núcleo y sería inducida sólo por la isoforma B del PR debido a la distribución principalmente nuclear que presenta la isoforma A (Boonyaratanakornkit *et al.* 2007). Las discrepancias observadas podrían explicarse por la formación de diferentes complejos dependiendo de la presencia de diversas moléculas adaptadoras y transductoras de señales (Lange 2004). La isoforma B del PR, pero no la A, además de activar rápidamente la señalización en el citosol (Boonyaratanakornkit *et al.* 2001), media las acciones proliferativas de los progestágenos (Faivre y Lange 2007) y es la isoforma clave requerida para el desarrollo de la glándula mamaria (Mulac-Jericevic *et al.* 2003).

Receptor de progesterona y cáncer de mama

A pesar de los significativos avances logrados con respecto a la funcionalidad y estructura del PR *in vitro*, el progreso con respecto a la respuesta fisiológica atribuible a este receptor nuclear ha estado bastante retrasado debido a la superposición con las funciones de los estrógenos, muchas de las cuales dependen de la activación del PR. Los experimentos realizados utilizando ratones *knock-out* y *knock-in* del PR

demonstraron que la señal proliferativa de la progesterona no sólo es esencial en la morfogénesis y función normal de la glándula mamaria, sino también en el aumento de incidencia de tumores mamarios (Ismail *et al.* 2003). En estos experimentos, se observó que ratones normales para la expresión de PR pero que poseían una alta cantidad de progesterona circulante, tenían una mayor incidencia de tumores mamarios, al ser tratados con el carcinógeno dimetil-benzantraceno (DMBA), en comparación a los ratones *knock-out* del PR. Este estudio no sólo manifestó la importancia de la progesterona como un mitógeno endócrino mamario, sino también avaló las conclusiones obtenidas de aquellos estudios en los que se discute la relación riesgo-beneficio asociada a los regímenes de HRTs post-menopáusicos que incluyen a la progesterona.

Los progestágenos son mitogénicos para células de cáncer de mama y las protegen de la apoptosis (Moore *et al.* 2000; Faivre y Lange 2007). A pesar de que estos estudios aportan conocimientos sobre las ventajas proliferativas que confieren los progestágenos a los tumores de mama humanos, no están claros los mecanismos por los cuales los progestágenos median la proliferación.

En cuanto a la participación de los efectos no genómicos de los progestágenos en la regulación del desarrollo del cáncer de mama, permanece muy poco investigada. Los trabajos pioneros de Auricchio y Edwards mencionados anteriormente abrieron el camino a la exploración en este campo.

PROTEÍNAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN (STATs)

Existen numerosas evidencias que demuestran que la convergencia entre las vías de señalización de los progestágenos y de los factores de crecimiento media los efectos proliferativos de los progestágenos en las células tumorales mamarias (Lange *et al.* 1998; Migliaccio *et al.* 1998; Balana *et al.* 1999; Balana *et al.* 2001; Boonyaratanakornkit *et al.* 2001; Labriola *et al.* 2003; Salatino *et al.* 2004). Los miembros de la familia de proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (Stats) han sido involucrados en las interacciones entre las vías de las hormonas esteroideas y de los factores de crecimiento. Dicho tipo de regulación podría

constituir un mecanismo adecuado para que proteínas de amplia expresión resulten en funciones fisiológicas específicas en tipos celulares individuales.

Se han identificado 7 genes codificantes para Stats en mamíferos: Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b y Stat6 (Bromberg y Darnell 2000). Además, reacciones de *splicing* alternativo o de proteólisis generan formas adicionales de Stat1 (Stat1 α o p91 y Stat1 β o p84) y Stat3 (Stat3 α y Stat3 β). Las proteínas resultantes contienen entre 750 y 850 aminoácidos y pesan 93 kDa. La estructura de sus 6 dominios es altamente homóloga y conservada (figura 7).

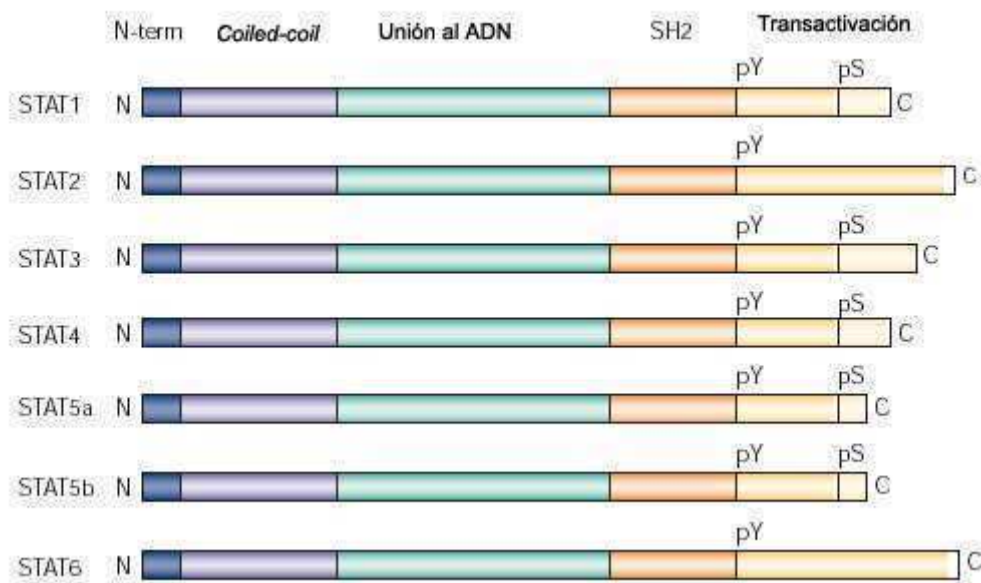


Figura 7. Representación esquemática de los dominios estructurales de los miembros de la familia de proteínas Stats. El dominio amino (N) terminal está involucrado en las interacciones proteína-proteína. El dominio de unión al ADN hace contacto directo con sitios consenso TT(N4-6)AA en los promotores de los genes regulados. La interacción entre el dominio SH2 de un monómero y el residuo fosfotirosina (pY) de otro media la formación del dímero activo. El dominio de transactivación está involucrado en la activación transcripcional de los genes blanco a través de interacciones con correguladores. El dominio carboxi terminal contiene un sitio de fosforilación en serina que estimula la activación transcripcional en algunos miembros de la familia. Tomado de (Yu y Jove 2004).

Mecanismos de acción de las Stats

Las Stats funcionan como moléculas señalizadoras en el citoplasma y como factores de transcripción luego de su translocación al núcleo (Bromberg y Darnell 2000; Yu y Jove 2004). La unión de factores de crecimiento (Silvennoinen *et al.* 1993;

Olayioye *et al.* 1999; Ren y Schaefer 2002) o de citoquinas (péptidos solubles que estimulan distintas respuestas de células que participan en la inmunidad y la inflamación) a sus receptores resulta en la activación de la actividad tirosina quinasa intrínseca del receptor o de las quinasas intracelulares asociadas al receptor, como quinasas de la familia de Janus (Jaks) o de Src (Darnell *et al.* 1994; Taga y Kishimoto 1997). Estas quinasas fosforilan las colas citoplasmáticas de los receptores en residuos tirosina específicos, que proveen sitios de anclaje para el reclutamiento de monómeros de Stats por sus dominios SH2. Las Stats reclutadas son fosforiladas en residuos tirosina específicos en el dominio carboxi terminal y forman homo o heterodímeros activos por interacción recíproca a través del residuo fosfotirosina y del dominio SH2, que deben ser mutuamente compatibles. Las Stats pueden también ser fosforiladas en serina en el dominio de transactivación. Las Stats fosforiladas dimerizan y translocan al núcleo, donde a través de su dominio de unión al ADN, reconocen su secuencia específica en el ADN y regulan la transcripción génica (figura 8). Debido a que las Stats pueden conservar la habilidad de unirse a la misma secuencia altamente conservada, hay una notable superposición en el sitio de reconocimiento en el ADN entre Stat1, Stat3 y Stat5 (Decker y Kovarik 2000).

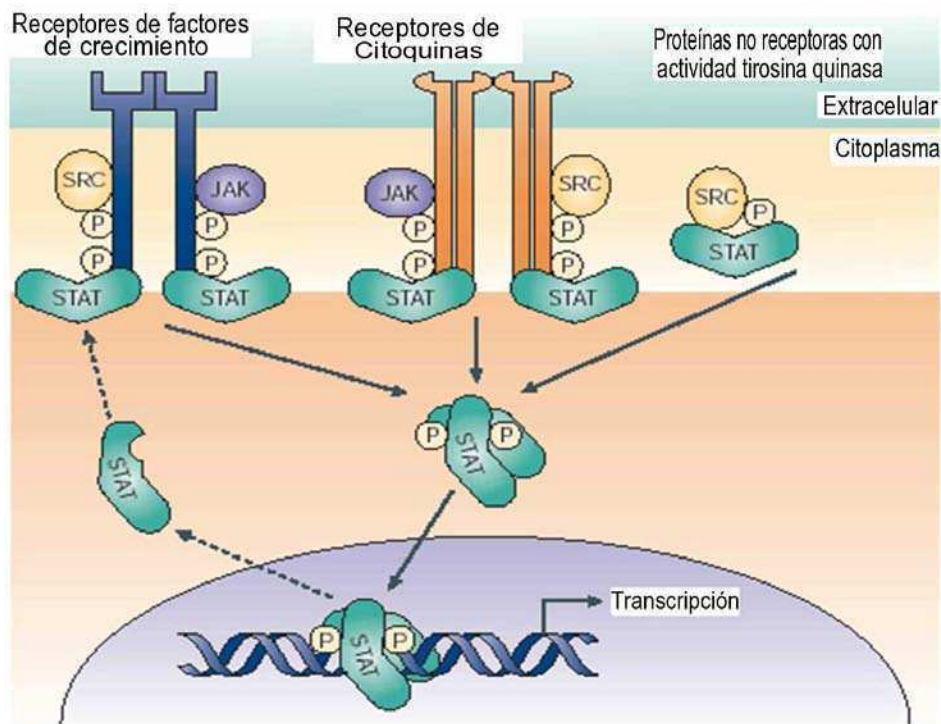


Figura 8. Vías de señalización que convergen en la activación de las Stats. La unión de factores de crecimiento o de citoquinas a sus receptores resulta en la activación de la actividad tirosina quinasa del receptor o de las quinasas Jaks o Src. Las Stats fosforiladas dimerizan, translocan al núcleo y se unen al

ADN resultando en la transcripción génica. Dependiendo del contexto celular y de las condiciones de crecimiento de las células, la activación de las Stats puede producir proliferación, diferenciación o apoptosis. Las flechas discontinuas indican el reciclaje de las Stats desde el núcleo hacia el citoplasma. Tomado de (Yu y Jove 2004).

El patrón de activación de las Stats suele ser específico del ligando y del tipo celular. Además, su actividad está finamente regulada en términos de la duración e intensidad por varias familias de proteínas (Shuai 2000). Dado que la actividad de las Stats está regulada por varias modificaciones post-traduccionales y por interacciones proteína-proteína, estos factores de transcripción son capaces de integrar señales de múltiples redes de señalización. Debido a la gran variedad de ligandos y factores de crecimiento capaces de activarlas, las Stats están involucradas en un gran espectro de eventos celulares incluyendo diferenciación, proliferación, apoptosis, angiogénesis y respuesta inmune (Ren y Schaefer 2002; Silva 2004).

Stat3 como reguladora de la transformación celular

Stat3 regula una serie de vías importantes en la tumorigénesis. Se han encontrado sitios de unión de Stat3 en los promotores de genes cuyos productos están involucrados en la progresión del ciclo celular y la apoptosis (c-fos, c-Myc, ciclina D1) (Bromberg *et al.* 1999; Leslie *et al.* 2006) y en la angiogénesis tumoral (VEGF) (Niu *et al.* 2002). Se probó además que Stat3 participa en los procesos de invasión y metástasis y evasión tumoral del sistema inmune (Grandis *et al.*, 2000; Yu y Jove, 2004; Wang *et al.*, 2004). Los mecanismos a través de los cuales las Stats promueven eventos protumorigénicos constituyen un área de activa investigación. La fosforilación de las Stats está finamente regulada y perturbar el delicado balance de las Stats activas en las células podría predisponer a la malignización mediante la desregulación de la apoptosis o la proliferación.

Se ha encontrado activación constitutiva y persistente de Stat3 en una gran variedad de tumores humanos, entre ellos de mama, y en líneas celulares establecidas a partir de tumores humanos (Bowman y Jove 1999). En particular, Stat3 está constitutivamente activa en el 69% de cánceres de mama (Dolled-Filhart *et al.* 2003), en el 82% de cánceres de próstata (Mora *et al.* 2002), en el 82% al 100% de carcinomas de cabeza y cuello (Nagpal *et al.* 2002) y en el 71% de carcinomas nasofaríngeos (Hsiao *et al.* 2003). Además, se ha demostrado que Stat3 es requerida para la transformación de

los fibroblastos NIH 3T3 por una serie de oncogenes (Bromberg *et al.* 1998) y para la proliferación tumoral. De hecho, una forma mutante constitutivamente activa de Stat3, Stat3-C, (que dimeriza espontáneamente por puentes cisteína-cisteína en vez de por interacciones fosfotirosina-SH2) es suficiente para inducir la formación tumoral en ratones *nude* cuando se inoculan células transfectadas con Stat3-C (Bromberg *et al.* 1999). Tales hallazgos reafirman la concepción de Stat3 como un mediador en el proceso de transformación maligna.

Los efectos de Stat3 activa son muy diferentes según el tipo celular. En particular, Stat3 puede ser una señal de muerte para las células epiteliales secretoras de la mama normal (Watson 2001) en comparación con los efectos opuestos de Stat3 en carcinomas mamarios. Una de las razones de estos efectos paradójicos puede deberse a que, mientras que la activación de las Stats es un proceso transiente y modulado finamente en células normales, la sobreexpresión o activación persistente de tirosina quinasas en cáncer puede provocar la activación constitutiva de las Stats. De hecho, hasta ahora, no se han reportado mutaciones naturales de Stat3 que resulten en su activación persistente. Por lo cual, es probable que la generalizada activación de Stat3 en líneas celulares de cáncer y en tejidos sea debido a un malfuncionamiento de los eventos de señalización río arriba de Stat3. Esto produce cambios permanentes en la expresión de genes que controlan procesos biológicos fundamentales, que pueden estar desregulados en células cancerosas y cambiar el fenotipo celular (Yu y Jove 2004).

CICLINA D1 Y CÁNCER DE MAMA

Ciclina D1 pertenece a la familia de ciclinas tipo D que regulan la progresión del ciclo celular en G1-S (Quelle *et al.* 1993). Ciclina D1 actúa mediante la activación de quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) que fosforilan e inactivan la proteína retinoblastoma. Sin embargo, algunos hallazgos indican que ciclina D1 podría promover la progresión del ciclo celular a través de mecanismos independientes de Cdk, como la interacción y modulación de la actividad de factores de transcripción (Arnold y Papanikolaou 2005). Ciclina D1 es un conocido oncogen que se encuentra amplificado y/o sobreexpresado en una gran proporción de cánceres humanos, incluyendo cáncer de colon, linfoma, melanoma, cáncer de próstata y cáncer de mama (Ewen y Lamb 2004). Específicamente ciclina D1 es uno de los genes más comúnmente sobreexpresados en

cáncer de mama humano (hasta el 50% de adenocarcinomas mamarios) (Arnold y Papanikolaou 2005). La actividad oncogénica de ciclina D1 en la glándula mamaria fue confirmada por modelos en ratones modificados genéticamente, donde la sobreexpresión de ciclina D1 provocó el desarrollo de carcinomas mamarios (Wang *et al.* 1994), mientras que la ablación de ciclina D1 resultó en la resistencia al cáncer de mama inducido por varios oncogenes en ratones (Yu *et al.* 2001).

En células epiteliales mamarias la expresión de ciclina D1 es inducida por estrógenos y progesterona (Sutherland *et al.* 1998), actuando a través del receptor de estrógenos (α y β) y el PR (A y B). La amplificación del gen de ciclina D1 se encuentra sólo en una minoría de cánceres de mama que sobreexpresan ciclina D1, indicando que la activación transcripcional patogénica de este gen por factores como el PR o el receptor de estrógenos podría ser un mecanismo importante para inducir su sobreexpresión.

Experimentos de silenciamiento de ciclina D1 en células de cáncer de mama confirmaron la correlación que existe entre los niveles de expresión de ciclina D1 y la proliferación celular, sugiriendo a ciclina D1 como un blanco potencialmente terapéutico para el cáncer de mama (Arnold y Papanikolaou 2005; Grillo *et al.* 2006).

Por todo lo expuesto, se desprende que tanto ErbB2, Stat3, el receptor de progesterona y ciclina D1 son moléculas claves en el desarrollo del cáncer de mama. Por este motivo decidimos estudiar su relación en esta enfermedad. Los Resultados de esta Tesis se presentan divididos en dos partes: estudiamos la existencia, la funcionalidad y la relevancia biológica de la interacción nuclear entre Stat3 y ErbB2 en células de cáncer de mama inducida por heregulina en la Primera Parte, e inducida por progestágenos en la Segunda Parte.



OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo fue **estudiar la existencia, la funcionalidad y la relevancia biológica de la interacción nuclear entre Stat3 y ErbB2 inducida por heregulina y por progestágenos en células de cáncer de mama.**

Los **objetivos específicos** propuestos fueron:

Objetivo 1: evaluar la capacidad de heregulina y progestágenos de inducir la localización de ErbB2 en el núcleo de células de cáncer de mama y su interacción con Stat3.

Objetivo 2: evaluar la capacidad de heregulina y progestágenos de promover la formación de un complejo transcripcional en el promotor de ciclina D1, compuesto por Stat3 y ErbB2, capaz de regular la expresión de ciclina D1.

Objetivo 3: estudiar si ErbB2 actúa de coactivador transcripcional de Stat3 en células de cáncer de mama.

Objetivo 4: explorar la importancia del complejo transcripcional nuclear Stat3/ErbB2 en la proliferación de células de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* inducida por heregulina y por progestágenos.



MATERIALES
Y
MÉTODOS

Animales

Se utilizaron hembras vírgenes de las cepas BALB/c y NIH (S)-*nude* de dos meses de edad criadas en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Las hembras provenían de reproductores sanos y fueron criadas en un ambiente controlado y de entrada restringida, con agua y comida *ad libitum*, con doce horas de luz y doce de oscuridad. Todos los estudios se realizaron de acuerdo a los estándares de cuidado de animales de laboratorio del NIH y fueron, a su vez, aprobados por el comité de ética del Instituto.

Tumores C4HD

Se utilizó el adenocarcinoma mamario murino C4HD perteneciente al modelo experimental desarrollado por la Dra. Lanari (Lanari *et al.* 1986). Los tumores se originaron en ratones hembra vírgenes de la cepa BALB/c tratados con 40 mg del progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) cada 3 meses durante 1 año y han sido mantenidos por pasajes singeneicos en ratones tratados con MPA (Lanari *et al.* 1986). El MPA se administra en forma de *depot* (40 mg) en el flanco contralateral al inóculo tumoral. El adenocarcinoma mamario C4HD es de histología ductal, con muy baja capacidad metastásica, de crecimiento hormono-dependiente, requiriendo MPA para proliferar tanto *in vivo* como *in vitro* (Molinolo *et al.* 1987). En cuanto a la expresión de receptores, el tumor C4HD expresa receptores de progesterona y de estrógeno, expresa altos niveles de ErbB2 y ErbB3, bajos niveles de ErbB4 y carece de receptores de glucocorticoides y de EGF (Balana *et al.* 1999; Labriola *et al.* 2003).

Reactivos

La heregulina (HRG)1 β 1 recombinante humana utilizada en los medios de cultivo fue de R&D Systems. Esta HRG no es la proteína recombinante entera sino el dominio EGF de 8 kDa. Se preparó una solución madre de 500 μ g/ml disolviendo la HRG liofilizada en PBS, y se utilizó en una concentración de 40 ng/ml. Solamente para el experimento de coimmunoprecipitación de ErbB2 y HRG, se empleó para estimular las células la HRG1 β 1 de Thermo Scientific, que pesa 44 kDa porque se trata de la proteína entera. En este caso se utilizó esa HRG para poder detectarla por *Western Blot* en el peso de 44 kDa.

El acetato de medroxiprogesterona, MPA (6 α -metil-17 α -hidroxi-acetato-progesterona) que se utilizó en los medios de cultivo fue de Sigma. Se preparó una

solución madre 10 mM (1000X de la solución de uso: 10 nM) en etanol absoluto, para su posterior dilución en medio de cultivo. La concentración final de etanol no excedió el 0,1 % v/v y no afectó ni el crecimiento ni la morfología celular (Dran *et al.* 1995). En los tratamientos *in vivo*, se utilizó MPA (Medrosterona, Gador) en forma de depot (40 mg/ratón) gentilmente donado por laboratorios Gador.

El antagonista del receptor de progesterona, RU486 (mifepristona), fue comprado a Sigma y se utilizó en una concentración de 10 nM disuelto en etanol. Para bloquear la activación de la quinasa Src se empleó 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(tbutyl) pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2) de Calbiochem, en una concentración de 10 μ M, disuelto 1/2000 en DMSO. Para bloquear la activación de ErbB2 se utilizó tirfostina AG825 de Calbiochem disuelto en DMSO, en una concentración de 100 μ M para tratamientos por tiempos cortos y 10 μ M para tratamientos por tiempos mayores a 24 hs. Para bloquear la activación de Stat3 por medio de la inhibición de las quinasas Jak1, Jak2 y Jak3, se utilizó Jak inhibitor I (piridona 6, 2-(1,1-Dimethylethyl)-9-fluoro-3,6-dihidro-7H-benz[h]-imidaz[4,5-f]isoquinolin-7-one) de Calbiochem, disuelto en DMSO, en una concentración de 10 μ M para tratamientos por tiempos cortos y 1 μ M para tratamientos por tiempos mayores a 24 hs. Se realizaron los controles pertinentes para verificar que el DMSO (1/2000) no modificó la fosforilación de Src, ni de ErbB-2, ni de Stat3 inducidas por MPA o HRG.

El anticuerpo monoclonal humanizado contra ErbB2, trastuzumab, utilizado en el experimento *in vivo* fue Herceptin® de Genentech. Se preparó una solución de 20 mg/ml en PBS para inyectar 100 μ l (=400 μ g) por ratón.

Soluciones utilizadas para los cultivos

Buffer fosfato salino (PBS): Na Cl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; Na₂HPO₄ 1,44 g/l; KH₂PO₄ 0,24 g/l.

Solución enzimática para disgregar los tumores: tripsina (Invitrogen) 0,25% p/v; colagenasa tipo II (Invitrogen) 0,25% p/v o tipo IV (Sigma) (AE: 485 U/mg); albúmina sérica bovina (Sigma) 0,5% p/v; buffer fosfato salino (PBS). Se esterilizó por filtración.

Solución de tripsina-EDTA: para obtener células en suspensión a partir de los cultivos primarios o para el repique de las líneas celulares, se utilizó una solución de tripsina (Invitrogen) 0,25% p/v más EDTA 0,02% p/v en PBS. Se esterilizó por filtración.

Cultivos primarios de tumores C4HD

Para realizar los cultivos primarios de células epiteliales, los tumores C4HD se extirparon de los ratones en flujo laminar aproximadamente a los 30 días de haber sido inoculados. Luego de una disgregación mecánica primero y enzimática después (2 ml de solución enzimática por tumor), agitando durante 40 minutos a 37°C y agregando al final DMEM-F12 + 10% de suero fetal bovino (SFB), se obtuvo una suspensión compuesta por una población de estirpe epitelial y otra fibroblástica, que se separaron según la técnica de Pandis y colaboradores (Pandis *et al.* 1992) con algunas modificaciones. Brevemente, 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. Para comenzar la purificación, las células obtenidas luego de la disgregación se centrifugaron a 400 x g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en una solución de DMEM-F12 + SFB 2 % v/v dejando sedimentar durante 20 minutos, el sedimento constituye la fracción enriquecida en células epiteliales que se encuentran habitualmente en agregados. El sobrenadante se descartó luego de cada decantación. Este procedimiento se repitió varias veces, aproximadamente 10, hasta que el sobrenadante se tornó traslúcido. En la última decantación, las células epiteliales se resuspendieron en DMEM-F12 + SFB 10 % v/v y se sembraron en placas de cultivo. Las células epiteliales de los cultivos primarios mantuvieron las características del tumor parental en cuanto a expresión de receptores y crecimiento progestágeno dependiente (Balana *et al.* 1999).

Los cultivos primarios de células epiteliales se dejaron adherir durante 48 hs en DMEM-F12 + SFB 10% v/v luego de lo cual se reemplazó por DMEM-F12 + SFB charcolizado (ch) 2,5% v/v + MPA 10 nM dejando a las células proliferar por otras 48 hs. Este medio de cultivo se cambió luego por DMEM-F12 para ayunar las células y se dejó 48 hs más. Los tratamientos de las células epiteliales C4HD se realizaron en DMEM-F12.

Líneas celulares y tratamientos

Las líneas celulares de cáncer de mama humano T47D, MCF-7, BT-474, JIMT-1 y SK-BR-3 fueron adquiridas de la *American Type Culture Collection*. La línea celular T47D expresa niveles muy altos de PR y altos de ErbB2. Las células BT-474 y SK-BR-3 sobreexpresan fuertes niveles de ErbB2 y expresan muy bajos niveles o carecen de

PR, respectivamente. Las células BT-474 expresan bajos niveles de los demás receptores ErbBs, mientras que las SK-BR-3 expresan, además, muy altos niveles de EGFR. La línea JIMT-1 expresa altos niveles de ErbB2, no expresa PR y es resistente al tratamiento con trastuzumab; y las células MCF-7 expresan bajos niveles de ErbB2 y de PR, y altos niveles de receptor de estrógenos.

La línea celular T47D-Y, que no expresa PR (Sartorius *et al.* 1994), fue donada por la Dra. Horwitz (University of Colorado, Denver, CO, USA) y se obtuvo mediante clonación por dilución límite a partir de la línea T47D (Keydar *et al.* 1979). La línea celular T47D-Y-PR-B es el resultado de la transfección estable de las células T47D-Y con la isoforma B del PR (Sartorius *et al.* 1994), y fue también donada por la Dra. Horwitz. La línea T47D-Y-PR-BmPro, donada por la Dra. C. Lange (University of Minnesota Cancer Center, Minneapolis, MN, USA) se obtuvo por transfección estable de las células T47D-Y con una mutante de la isoforma B del PR que tiene las tres prolinas 422, 423 y 427, ubicadas en el dominio rico en prolinas del PR, convertidas a alanina. Este dominio del receptor fue definido como absolutamente requerido para su interacción con todos los dominios SH3, impidiendo por lo tanto la interacción con Src y la consecuente activación rápida de cascadas de señalización (Boonyaratanakornkit *et al.* 2001; Carnevale *et al.* 2007). La línea celular T47D-Y-C587A-PR, donada también por la Dra. Lange, se logró transfectando establemente las células T47D-Y con una mutante de la isoforma B del PR que contiene una mutación puntual en una cisteína conservada en el primer dedo de zinc del dominio de unión al ADN (Tung *et al.* 1993). Esta mutante no es capaz de unirse al ADN ni de reclutarse a otros factores de transcripción unidos al ADN, pero es totalmente hábil para inducir la activación de Src, p42/44 MAPKs y Akt en respuesta a progestágenos (Boonyaratanakornkit *et al.* 2001; Carnevale *et al.* 2007).

La línea celular T47D-Y y las derivadas de ella fueron cultivadas en las mismas condiciones que la línea T47D. Para mantener las líneas T47D-Y-PR-B, T47D-Y-PR-BmPro y T47D-Y-C587A-PR se agregó al medio de cultivo el antibiótico análogo de la neomicina G418 (500 µg/ml, Sigma).

Las células T47D, T47D-Y y sus derivadas y las líneas MCF-7 y JIMT-1 se mantuvieron por repiques sucesivos una vez llegadas al 80-90% de confluencia aproximadamente. En cambio, las células SK-BR-3 y BT-474 se repicaban al llegar al 50% de confluencia. Para repicarlas, las células se enjuagaron con solución de tripsina-EDTA estéril y se incubaron durante 2-10 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 400 x g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en medio suplementado con 10% SFB. Finalmente, se sembraron en las placas correspondientes.

Las líneas celulares se ayunaron durante 48 hs y los experimentos se llevaron a cabo en el medio respectivo de cada tipo celular sin suero, excepto en el caso de la línea BT-474, que se suplementó con SFBch 1%. En los casos en los que se utilizó inhibidores, los mismos fueron preincubados durante 90 minutos antes del tratamiento con HRG o MPA y luego se mantuvieron en el medio de cultivo junto con el mitógeno.

Medios de cultivo y suero fetal bovino

Para el cultivo de células epiteliales C4HD y de las líneas celulares MCF-7, JIMT-1, T47D, T47D-Y y sus derivadas, se utilizó DMEM-F12 (*Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12*, 1:1) (Sigma) sin rojo fenol con el agregado de sulfato de gentamicina en una concentración de 50 mg/l y bicarbonato de sodio 1,2 g/l. En el caso de la línea celular SK-BR-3, se utilizó el medio Mc Coy's 5A (Sigma) y para la línea BT-474, RPMI 1640 (Invitrogen). Todos los medios de cultivo se prepararon según las instrucciones del fabricante con agua hexadestilada. Se esterilizaron por presión negativa utilizando filtros de acetato de celulosa de 0,22 µm de poro (Corning).

El suero fetal bovino (SFB) fue adquirido en Gen S.A. y se deplementó calentándolo a 56°C durante 30 minutos. Para obtener el SFB adsorbido de hormonas esteroideas o “charcolizado” (SFBch), se incubó el SFB ya deplementado con 5% p/v 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% p/v de carbón activado, se lo incubó durante toda la noche (O.N.) a 4°C con agitación y se realizaron centrifugaciones sucesivas hasta eliminar completamente el carbón. Una vez diluido al 10% v/v en el medio de cultivo, se esterilizó por filtración.

Preparación de extractos proteicos totales

Las células tratadas como se indica en cada experimento, se recolectaron de las placas de cultivo utilizando un *scraper* y se homogeneizaron en presencia del buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 10% v/v, NP-40 1% v/v, MgCl₂ 1 mM, SDS, 0,1% v/v, e inhibidores de

proteasas y fosfatasas: PMSF 0,4 mM, NaF 25 mM, leupeptina 5 µg/ml, pepstatina 5 µg/ml, aprotinina 5 µg/ml, espermina 0,15 mM, espermidina 0,5 mM, β-glicerofosfato 10 mM). El lisado celular se completó mediante ruptura física con una jeringa 25G (Terumo) en frío. El homogenato celular se centrifugó a 13400 x g a 4°C durante 30 minutos. Se descartó el *pellet* y el contenido proteico del sobrenadante fue determinado por ensayos de Bradford (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de extractos citosólicos y nucleares

Las células C4HD o T47D tratadas como se indica en cada experimento, fueron recolectadas de las placas de cultivo utilizando un *scraper*. Se utilizó el kit NE-PER para la obtención de las fracciones nucleares y citoplasmáticas según las indicaciones del fabricante (Pierce Biotechnology). La cuantificación proteica fue determinada por ensayos de Bradford (BioRad).

Ensayos de Western Blot

Los extractos proteicos se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturalizante con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). El extracto proteico (25 a 50 µg de proteínas) se diluyó en buffer de siembra 3X (Tris-HCl 60 mM [pH 6,8], SDS 2% p/v, glicerol 10% v/v, 0,7 M 2-βmercaptoetanol y azul de bromofenol 0,1% p/v) y se hirvió durante 5 minutos. Las muestras se corrieron en geles de 7,5-15% acrilamida-bisacrilamida según el peso molecular de la proteína a revelar. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0,2 µm, BioRad) y se bloquearon O.N. a 4°C con leche descremada 5% p/v o BSA 5% o 3% p/v, según el caso, en PBS+tween 20 0,1% v/v. Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos diluidos en PBS+tween 20 0,1% v/v durante 2 hs a temperatura ambiente con agitación o bien O.N. con BSA 5% o 1% p/v con agitación, según el anticuerpo:

Stat3 policlonal de conejo (C-20, Santa Cruz Biotechnology) 1/15000

Fosfotirosina Stat3 (Y705) monoclonal de ratón (B-7, Santa Cruz Biotechnology) 1/1000

ErbB2 policlonal de conejo (C-18, Santa Cruz Biotechnology) 1/2000, reconoce el extremo carboxi terminal de ErbB2

ErbB2 monoclonal de ratón (9G6, Santa Cruz Biotechnology) 1/1000, reconoce el extremo amino terminal de ErbB2

Fosfotirosina ErbB2 (Y877) policlonal de conejo (Cell Signaling) 1/500
Fosfotirosina ErbB2 (Y1221/1222) policlonal de conejo (Cell Signaling) 1/1000
Ciclina D1 policlonal de conejo (Thermo Scientific) 1/2000 para células humanas, 1/50000 para células murinas
Jak1 policlonal de conejo (HR-785, Santa Cruz Biotechnology) 1/1000
Fosfotirosina Jak1 (Y1022/1023) policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology) 1/700
Jak2 policlonal de conejo (C-20, Santa Cruz Biotechnology) 1/1200
Fosfotirosina Jak2 (Y1007/1008) policlonal de conejo (Cell Signaling) 1/1200
ErbB3 policlonal de conejo (C-17, Santa Cruz Biotechnology) 1/500
HRG monoclonal de ratón (Ab-1, Thermo Scientific) 1/500
Fosfotirosina total monoclonal de ratón (PY-99, Santa Cruz Biotechnology) 1/200
Src monoclonal de conejo (36D10, Cell Signaling) 1/8000
Fosfotirosina Src (Y416) policlonal de conejo (Cell Signaling) 1/4000
p42/p44 MAPK policlonal de conejo (C-14, Santa Cruz Biotechnology) 1/2000
Fosfo p42/p44 MAPK monoclonal de ratón (E-4, Santa Cruz Biotechnology) 1/3000
PR monoclonal de ratón (Ab-7, Thermo Scientific) 1/700
Fosfoserina 294 PR monoclonal de ratón (Affinity BioReagents) 1/1000
Akt policlonal de conejo (Cell Signaling) 1/2000
Fosfoserina 473 Akt policlonal de conejo (Cell Signaling) 1/2000
Actina monoclonal de ratón (Ab-5, Thermo Scientific) 1/15000
 β tubulina monoclonal de ratón (Sigma) 1/70000
Histona H3 policlonal de conejo (Abcam) 1/5000
GFP policlonal de conejo (Abcam) 1/5000

Luego de 3 lavados de 10 minutos en PBS+tween 20, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) anti ratón, anti conejo o anti cabra, todos de Vector Laboratories. Las membranas se revelaron utilizando el reactivo de quimioluminiscencia ECL plus (General Electric) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la primera revelada, las membranas se incubaron 30 minutos a 50°C con solución de *stripping* (2- β mercaptoetanol 100 mM, SDS 2% v/v, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7) en agitación para extraer los anticuerpos unidos a la misma. Luego de dos lavados con PBS+tween, las membranas se bloquearon O.N. en leche 5% p/v y se incubaron al día siguiente con el anticuerpo contra la proteína total correspondiente.

Análisis estadístico

Las bandas obtenidas se scanearon, y se midió la densidad de cada una con el programa Image J (National Institutes of Health, USA). Las formas fosforiladas de las proteínas fueron normalizadas con sus respectivas proteínas totales. En los casos en que se evaluaron niveles de expresión, las bandas de la proteína en cuestión se normalizaron con las bandas de actina o β tubulina corrida en el mismo gel. La significancia de las diferencias de intensidad entre dos tratamientos se analizó realizando un “t test” de muestras apareadas.

Inmunoprecipitaciones

A partir de extractos nucleares obtenidos de los cultivos de células C4HD o T47D al final de cada tratamiento, se inmunoprecipitó ErbB2, Stat3 o ErbB3 (C-18, C-20 y C-17, respectivamente, de Santa Cruz Biotechnology) o IgG de conejo (Sigma) como control negativo, para determinar por co-inmunoprecipitación el efecto del tratamiento sobre la formación de un complejo multimérico. Doscientos cincuenta μg de proteína se inmunoprecipitaron con 2 μg del anticuerpo correspondiente incubando 2 hs a 4°C con agitación, y los inmunocomplejos se capturaron agregando bolitas de agarosa conjugadas a proteína A (Santa Cruz Biotechnology), agitando 1 hora más. Para capturar las partículas de agarosa, la suspensión se centrifugó 10 minutos a 13400 x g. El *pellet* se lavó tres veces con buffer de extracción, se hirvió 5 minutos en buffer de siembra y luego de una breve centrifugación se sembró el inmunoprecipitado en un gel siguiendo el protocolo de *Western Blot* previamente descrito. Después de la primera revelada de las formas fosforiladas de las proteínas, las membranas se sometieron a *stripping*. Luego, las membranas se revelaron con los anticuerpos contra las proteínas totales.

Plásmidos

La construcción del promotor de ciclina D1 humano de 1745 pares de bases de longitud ubicado río arriba del gen de la luciferasa (-1745 ciclina D1-luc), el plásmido vacío pA3 Luc y las construcciones truncadas en las posiciones -963, -261 y -141 fueron donadas por el Dr. R. Pestell (Northwestern University Medical School, Chicago, IL). Estas construcciones fueron generadas por cortes del promotor de 1745 pb de manera de excluir regiones secuenciales del extremo 5' del promotor. La construcción -963 ciclina D1-luc excluye un sitio GAS (-984), el vector -261 ciclina

D1-luc excluye tres sitios GAS (-984, -568 y -475), y la construcción -141 ciclina D1-luc excluye cuatro sitios GAS (-984, -568, -475 y -239). El plásmido Δ GAS2/3/4 ciclina D1-luc fue un obsequio de la Dra J. Bromberg (The Rockefeller University, New York, NY) y fue generado por mutagénesis dirigida, por la cual los sitios GAS -568, -475 y -239 fueron mutados de TTN₅AA a AAN₅AA. El plásmido reportero de luciferasa que contiene cuatro copias del sitio de unión a Stat3 de alta afinidad “m67” (p4xm67-tk-luc) y el plásmido vacío pTATA-tk-Luc fueron donados por el Dr J. Darnell (The Rockefeller University, New York, NY). El plásmido de expresión de luciferasa *Renilla* RL-CMV fue comprado a Promega. El vector de expresión de la forma dominante negativa de Stat3, Stat3Y705F, posee una mutación puntual en el codón 705, una sustitución de la tirosina por fenilalanina, que provoca la reducción de la fosforilación en tirosina de la proteína Stat3 salvaje endógena y por lo tanto inhibe la dimerización y la unión de Stat3 al ADN (Bromberg *et al.* 1998; Bromberg *et al.* 1999; Li y Shaw 2002). Este vector, al igual que el plásmido vacío pcDNA3.1, fueron provistos por el Dr. J. Darnell. El vector de expresión de ErbB2 salvaje humano (hErbB2WT) y su plásmido vacío pMe18SM fueron un obsequio del Dr. T. Yamamoto (Universidad de Tokio, Japón) (Akiyama *et al.* 1991). La mutante de ErbB2 humano etiquetada con GFP, incapaz de translocar al núcleo porque tiene delecionada la secuencia de localización nuclear (aminoácidos 676-KRRQQKIRKYTMRR-689) (hErbB2 Δ NLS) (Giri *et al.* 2005) fue donada por el Dr. M.C. Hung (The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX). El vector vacío pEGFP-N1 fue comprado a Becton Dickinson Biosciences.

Transfecciones transientes

En los experimentos en los que se estudió la capacidad de HRG o MPA de inducir la actividad transcripcional de Stat3, células C4HD y T47D fueron transfectadas transientemente durante 48 o 24 hs, respectivamente, con 1 μ g/ml del plásmido reportero -1745 ciclina D1-luc o las construcciones truncadas o con 1 μ g/ml del vector 4xm67-tk-luc y cotransfectadas con 10 ng/ml de RL-CMV utilizado para corregir variaciones internas en las eficiencias de transfección. Como control, las células fueron transfectadas con 1 μ g/ml de pA3 Luc o pTATA-tk-Luc. En los experimentos indicados, las células se cotransfectaron con 2 μ g/ml de Stat3Y705F. Las cantidades totales de ADN transfectado fueron estandarizadas agregando el plásmido vacío pcDNA3.1. En los experimentos en los que se evaluó el rol de ErbB2 en la actividad

transcripcional de Stat3, las células fueron cotransfectadas con 0,5, 1 o 2 $\mu\text{g/ml}$ de hErbB2WT o hErbB2 ΔNLS . Las cantidades totales de ADN fueron estandarizadas agregando los plásmidos vacíos pMe18SM y pEGFP-N1. Cuando estos vectores fueron cotransfectados con p4xm67-tk-luc, se utilizaron 50 a 400 ng/ml en lugar de 0,5 a 2 $\mu\text{g/ml}$. Después de las 24-48 hs de transfección, las células fueron ayunadas durante 24 hs en DMEM-F12 y se trataron o no con HRG o MPA por 24 hs.

Las células C4HD fueron transfectadas en DMEM-F12 + SFBch 2,5% v/v + MPA 10nM, y las células T47D fueron transfectadas en DMEM-F12 + SFB 10% v/v con el reactivo de transfección Fugene HD (Roche Biochemicals), siguiendo las indicaciones del fabricante. La eficiencia de transfección fue evaluada utilizando el vector de expresión pEGFP-N1 y determinada por el porcentaje de células que exhibieron la expresión de GFP 4 días después de la transfección, que varió entre el 60 y 70%.

En los casos de los ensayos de actividad del gen reportero, las células fueron lavadas con PBS, lisadas con la solución *Passive Lysis Buffer* (Promega) y con un ciclo de congelado-descongelado en nitrógeno líquido. La actividad luciferasa fue determinada empleando el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y con un luminómetro 20n/20 (Turner Bio Systems). La actividad luciferasa se informó como veces de inducción de la razón entre la actividad *Firefly* luciferasa y la actividad *Renilla* luciferasa con respecto al grupo control. Se realizaron triplicados para cada tratamiento. Las diferencias entre los grupos experimentales fueron analizadas por ANOVA seguida del test de Tukey.

Transfecciones con ARN de interferencia (siRNA)

Los siRNAs dirigidos contra ErbB2, Stat3 y PR fueron sintetizados por Dharmacon. Las secuencias de siRNAs fueron las siguientes:

siRNA contra ErbB2: 5'GAUGGUGCUUACUCAUGA3', diseñada para silenciar específicamente ErbB2 murino y no humano.

siRNA contra Stat3 murino: 5'-GGUCAAAUUUCCUGAGUUGUU-3'

siRNA contra Stat3 humano: 5'-GAGCAGAGAUGUGGGAAUGUU-3'

siRNA contra PR murino: 5'-AUAGGCGAGACUACAGACGUU-3'

Como siRNA control, se utilizó un siRNA no silenciador, que no corresponde a ninguna secuencia conocida de genes de mamíferos, también comprado a Dharmacon.

Las células fueron transfectadas durante 72 hs con 25 a 100 nM de siRNAs, según el experimento, con el reactivo de transfección DharmaFECT (Dharmacon) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para los experimentos de cotransfección de siRNAs con plásmidos, se utilizaron 25 nM de siRNAs más 2 µg del vector de expresión, y se empleó el reactivo de transfección DharmaFECT Duo (Dharmacon) según las instrucciones del fabricante.

Ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células C4HD y T47D crecidas sobre cubreobjetos fueron transfectadas o no, según el experimento, y luego incubadas en DMEM-F12 con los tratamientos que se indican en cada ensayo. Las células fueron fijadas y permeabilizadas en metanol a -20°C y luego bloqueadas con PBS + BSA 1% a temperatura ambiente durante 30 minutos. La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo en PBS + BSA 1% O.N. a 4°C, utilizando una dilución del anticuerpo de 1/100. Los anticuerpos empleados fueron los siguientes:

Stat3 monoclonal de ratón (124H6, Cell Signaling)

ErbB2 policlonal de conejo (C-18, Santa Cruz Biotechnology)

ErbB2 monoclonal de ratón (F-11, Santa Cruz Biotechnology), reconoce el receptor murino y no el humano

ErbB2 monoclonal de ratón (9G6, Santa Cruz Biotechnology), reconoce el extremo amino terminal de ErbB2

ErbB3 policlonal de conejo (C-17, Santa Cruz Biotechnology)

HRG policlonal de conejo (C-20, Santa Cruz Biotechnology)

Luego de 3 lavados de 10 minutos con PBS + BSA 1%, los cubreobjetos con células fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos. Para detectar ErbB2 (C-18), ErbB3 y HRG, se utilizó un anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen); y para detectar Stat3 y ErbB2 (F-11) se empleó un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con rodamina (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Los controles negativos se realizaron incubando las células con PBS + BSA 1% en lugar del anticuerpo primario o, en los casos en que utilizó el anticuerpo ErbB2 (C-18), se incubó junto con el péptido competitivo 5X (Santa Cruz Biotechnology), seguido de la incubación con los anticuerpos secundarios. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) (Sigma) utilizado

en una dilución de 2 ng/ml. Cuando las células C4HD fueron transfectadas con hErbB2 Δ NLS, la proteína fluorescente verde de este vector de expresión fue visualizada por la imagen fluorescente directa. Para cada tratamiento se analizaron entre 100 y 200 células, y alrededor del 80% mostró el mismo patrón de localización celular de las proteínas visualizadas. Las fotos que se muestran en los Resultados ilustran algunas células representativas de las examinadas. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments), cuyo límite de resolución es de 300 nm.

Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y re-ChIP

Se sembraron 3 millones de células por placa de 100 mm de diámetro, se transfectaron o no, según el experimento, se mantuvieron en el medio de ayuno correspondiente a cada tipo celular durante 48 a 72 hs y se trataron o no con HRG o MPA. Se realizó un *crosslinking* incubando las células con formaldehído en una concentración final de 1% durante 10 minutos a 37°C, y la reacción se detuvo agregando glicina en una concentración final de 140 mM. Luego las células se lavaron con PBS frío dos veces, se recolectaron de las placas de cultivo en 1,5 ml de PBS con inhibidores de proteasas (descritos previamente) utilizando un *scraper*, y fueron precipitadas por centrifugación y resuspendidas en 1 ml de buffer hipotónico (HEPES 20 mM [pH 7,9], EDTA 1 mM, EGTA 1 mM). Se centrifugó 1 minuto a 16000 x g para obtener los núcleos en el *pellet*, que se resuspendió en 300 μ l de buffer de lisis (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM [pH 8,1]). Después de la lisis los extractos celulares fueron sonicados en hielo con un sonicador Fisher Scientific, modelo 500. Recibieron 4 a 6 pulsos de 10 segundos al 20% de potencia del sonicador. Se centrifugaron durante 10 minutos a 16000 x g a 4°C, el sobrenadante se diluyó 10 veces con buffer de inmunoprecipitación (Triton X-100 1,1%, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM [pH 8,1], NaCl 167 mM) y la cuantificación de proteínas fue determinada por un ensayo de Bradford (BioRad). Trescientos μ g de proteína fueron preclareados con 40 μ l de bolitas de agarosa conjugadas a proteína A o G, según el anticuerpo a utilizar, bloqueadas con ADN de esperma de salmón (Millipore). Dos por ciento de esta cromatina se reservó como “*input*” (ADN total) y se procesó luego junto con los inmunoprecipitados en el paso de reversión del *crosslinking* (más adelante). La cromatina remanente fue incubada O.N. a 4°C con 4 μ g de anticuerpo específico o con

IgG de conejo o ratón como control negativo (Sigma). Los anticuerpos utilizados fueron: ErbB2 (C-18), Stat3 (C-20), PR (H-190), los tres comprados a Santa Cruz Biotechnology; CBP/KAT3A (ab2832) de Abcam, y p300 (clon RW128), acetil histona H3 (06-599) y acetil histona H4 (06-866), los tres de Millipore. El complejo proteína-ADN-anticuerpo fue precipitado incubando durante 2 hs a 4°C con 80 µl de bolitas de agarosa conjugadas a proteína A o G, según corresponda, bloqueadas con ADN de esperma de salmón (Millipore). Las partículas de agarosa asociadas al complejo fueron precipitadas por una centrifugación de 1 minuto a 4000 x g. Se lavaron con dos buffers de lavado diferentes de alta concentración salina (SDS 0,1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM [pH 8,1], NaCl 150 mM, y el otro buffer: SDS 0,1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM [pH 8,1], NaCl 500 mM), luego con un tercer buffer de lavado de baja concentración salina (LiCl 0,25 M, NP-40 1%, deoxicolato 1%, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM [pH 8,1]), y dos lavados con Tris-EDTA (TE). El complejo proteína-ADN se obtuvo extrayendo las partículas de agarosa con 400 µl de buffer de elución (SDS 1%, NaHCO₃ 0,1 M). La reversión del *crosslinking* del complejo proteína-ADN se realizó incubando con NaCl 0,2 M a 65°C O.N. Las proteínas de las muestras fueron digeridas por incubación con 50 µg de proteinasa K durante 1 hora a 45°C. El ADN se extrajo con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol, 1,25 volúmenes de AcNH₄ y 20 µg de glucógeno durante 30 minutos a -70°C. El ADN fue precipitado por una centrifugación de 10 minutos a 16000 x g y resuspendido en 10 µl de H₂O hexadestilada libre de DNAsas (Promega). Para cada PCR se utilizaron 2 µl. Los controles “*input*” se usaron en una dilución de 1/10.

Para los ensayos de re-ChIP, se utilizaron 700 µg de cromatina y 8 µg de anticuerpo para la primera incubación. Los inmunocomplejos fueron eluidos del ChIP primario incubándolos con ditioneitol (DTT) 10 mM a 37°C durante 30 minutos. Luego se diluyeron 40 veces con buffer de inmunoprecipitación y se re-inmunoprecipitaron con 8 µg del segundo anticuerpo, incubando O.N. a 4°C. El re-ChIP de los sobrenadantes se llevó a cabo de manera análoga a la del ChIP primario.

PCR

Para algunos experimentos, el ADN obtenido del ChIP fue amplificado por PCR convencional en un termociclador BioRad. Los *primers* utilizados para amplificar una región del promotor de ciclina D1 murino que contiene 4 sitios GAS (-971, -874, -852 y

-706) fueron: 5'-GGGGGAACACCACCCTC-3' y 5'-GCAACAGCTCAAGATGGTGGCC-3' (como se describió en Cancer Res. 2006 Mar 1;66(5): 2544-52); los pares de *primers* 5'-GCACCAAAGAGACAGAAC-3' y 5'-TTAACCGGGAGAAACACACC-3', y 5'-AACTTGCACAGGGGTTGTGT-3' y 5'-GAGACCACGAGAAGGGGTGACTG-3' fueron diseñados para amplificar dos regiones del promotor de ciclina D1 humano que contienen un sitio GAS (-984) y dos sitios GAS (-568 y -475), respectivamente; y los *primers* 5'-GATGCCCCCATGTTTGTGAT-3' y 5'-GGTCATGAGCCCTTCCACAAT-3' se diseñaron para amplificar una región codificante del gen de GAPDH murino y humano, como control negativo. El diseño de *primers* se realizó con el software "Primer premier" (Premier Biosoft International). El programa de PCR para los *primers* de ciclina D1 fue: 3 minutos a 96°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 40 segundos a 58°C y 40 segundos a 72°C. Para los *primers* de GAPDH el programa fue el mismo pero con una temperatura de hibridación de 60°C.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2% en buffer TBE conteniendo bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz UV (Pharmacia Biotech) y se compararon con un marcador de fragmentos de ADN de número de pb conocido. Para algunos casos, los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 8% y para visualizar las bandas se tiñeron los geles con plata (Switzer, 1979).

Las bandas obtenidas se scanearon, y se midió la densidad de cada una con el programa Image J (National Institutes of Health, USA). Las bandas obtenidas con los *primers* para ciclina D1 se normalizaron con las bandas obtenidas del "input" (ADN total) correspondiente. La significancia de las diferencias de intensidad entre dos tratamientos se analizó realizando un "t test" de muestras apareadas.

PCR cuantitativa en tiempo real

El ADN obtenido de los ensayos de ChIP y re-ChIP fue amplificado por reacciones de PCR en tiempo real, que se realizaron con el equipo detector ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) utilizando *SYBR green PCR master mix* de Applied Biosystems. Los *primers* 5'-TTCCGGTGGTCTGGTTCCT-3' y 5'-GAGACACGATAGGCTCCTTCCTAA-3' se diseñaron para amplificar una región del promotor de ciclina D1 murino que contiene 2 sitios GAS (-971 y -874); 5'-GGAACCTTCGGTGGTCTTGTC-3' y 5'-GAATGGAAAGCTGAGAAACAGTGA-

3' se diseñaron para amplificar una región del promotor de ciclina D1 humano que contiene el sitio GAS -984. Estos *primers* se diseñaron con el software "Primer Express" (Applied Biosystems). Los *primers* utilizados para amplificar la región del promotor de ciclina D1 humano que contiene el sitio de inicio de la transcripción, el sitio GAS -27 y el elemento iniciador (Inr) (amplicón "-50") fueron: 5'-CGGGCTTTGATCTTTGCTTA-3' y 5'-ACTCCCCTGTAGTCCGTGTG-3'; y para amplificar la región que se transcribe del gen de ciclina D1 (+8000 en el intrón 4) los *primers* empleados fueron: 5'-TGCCACACACCAGTGAAGTTT-3' y 5'-ACAGCCAGAAGCTCCAAAAA-3'. Ambos pares de *primers* fueron tomados del trabajo de I. Eto (Eto 2000). El programa de PCR en tiempo real fue: 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Los números de los ejes de las ordenadas de los histogramas de ChIP y re-ChIP se calcularon dividiendo los números arbitrarios obtenidos para cada muestra en la PCR cuantitativa por el "input" (ADN total), estableciendo en 1 los valores de las muestras sin tratar o inmunoprecipitadas con IgG, según el gráfico, y determinando las veces de incremento de ADN inmunoprecipitado relativo a ese punto. La significancia de las diferencias entre dos tratamientos se analizó realizando un "t test" de muestras apareadas.

Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR en tiempo real

El ARN total fue aislado de las células C4HD crecidas en placas de 6 hoyos previamente transfectadas o no, según el experimento, ayunadas durante 48 y tratadas o no con MPA, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó por espectrofotometría y 1 µg de ARN se sometió a transcripción reversa mediante el uso de la enzima retrotranscriptasa SuperScript III de Invitrogen, según las indicaciones del fabricante.

El ADNc obtenido fue amplificado por PCR en tiempo real. Los *primers* utilizados para amplificar el ADNc de ciclina D1 murino fueron: 5'-CGCCCTCCGTATCTTACT-3' y 5'-CGCACTTCTGCTCCTCAC-3'. Los *primers* que se usaron para amplificar el ADNc de GAPDH murino como control de normalización fueron: 5'-CCAGAACATCATCCCTGCAT-3', 5'-G TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'. Las condiciones de ciclado de la PCR y el diseño de *primers* fueron tal como se describió en la sección anterior. Las veces de inducción de la expresión del ARNm de ciclina D1 se calcularon dividiendo los números arbitrarios obtenidos para cada muestra en la PCR cuantitativa por las cantidades obtenidas del control interno GAPDH,

estableciendo en 1 los valores de las muestras sin tratar y determinando las veces de incremento de ARNm relativo a las muestras sin tratar. La significancia de las diferencias entre dos tratamientos se analizó realizando un “t test” de muestras apareadas.

Ensayos de proliferación

Para realizar los ensayos de proliferación con las células C4HD, se repicaron las células creciendo en DMEM-F12 + SFBch 2,5% v/v + MPA 10 nM y se sembraron 4×10^4 células por hoyo en placas de 96 hoyos de fondo plano. Las células repicadas se dejaron adherir durante 24 hs en DMEM-F12 + SFB 10% v/v. Dicho medio fue luego reemplazado por medio de transfección suplementado con los diferentes siRNAs y vectores de expresión. Luego de 72 hs, las células se incubaron durante 48 hs con DMEM-F12 con o sin HRG o MPA. Para los ensayos de proliferación con las células BT-474, SK-BR-3 y JIMT-1, se sembraron 10^4 células por hoyo en placas de 96 hoyos. Se dejaron adherir durante 24 hs en el medio de cultivo correspondiente a cada línea (como se describió en la sección “Medios de cultivo”) y luego se reemplazó por medio de transfección suplementado con el plásmido pcDNA3.1 o hErbB2 Δ NLS. Después de 24 hs, las células se incubaron durante 24 hs más con medio de ayuno correspondiente a cada línea con o sin HRG y en presencia o ausencia de 10 μ g/ml de trastuzumab. Todos los ensayos se realizaron por octuplicado. Se empleó el método de incorporación de timidina tritiada para evaluar la síntesis de ADN como medida de la proliferación celular. Durante las últimas 24 hs de incubación de todos los tipos celulares, se aplicó un pulso de 1 μ Ci de timidina tritiada (NEN, actividad específica: 20 Ci/mmol) en cada hoyo. Los cultivos se tripsinizaron (50 μ l/hoyo) y se cosecharon en un cosechador de células Nunc. La radioactividad incorporada se midió en un contador beta de centelleo líquido (Tri-Carb2800TR, Perkin Elmer) durante 1 minuto por métodos estándar de centelleo líquido. Previamente se demostró que la incorporación de timidina tritiada se correlaciona con el número de células (Dran *et al.* 1995) siendo de este modo, un método apropiado para medir proliferación celular. La incorporación de timidina tritiada se muestra como cuentas por minuto (cpm).

Análisis estadístico

En cada experimento individual se promediaron los octuplicados, se calcularon las $\text{cpm} \pm \text{SD}$ (desviación estándar) y se evaluó la significancia estadística mediante un test de ANOVA. Para la comparación de distintos tratamientos entre sí, se usó el test de Tukey después del ANOVA.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Células C4HD fueron transfectadas con los plásmidos y cotransfectadas o no, según el experimento, con siRNAs. Luego fueron tratadas o no con HRG o MPA durante 48 hs. Se cosecharon para su análisis por citometría de flujo en PBS + EDTA 1% y se fijaron en etanol 70% por 24 hs a 4°C. Se lavaron 2 veces con PBS, seguido de digestión del ARN (RNasa A 50 U/ml) y tinción con ioduro de propidio (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se analizaron en un citómetro FACScan (Becton Dickinson Biosciences). Se indica el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G_0/G_1 , S y G_2/M). El análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando el programa Modfit LT (Becton Dickinson Biosciences).

Experimentos *in vivo*

Células C4HD o JIMT-1 fueron transfectadas con los plásmidos y cotransfectadas o no, según el experimento, con siRNAs. Luego de 48-72 hs de transfección se reemplazó el medio de transfección por PBS+EDTA 1mM que se mantuvo durante 30 minutos para obtener las células en suspensión. Después de una breve centrifugación, las células fueron resuspendidas en DMEM-F12. Un millón de células C4HD y 4×10^6 células JIMT-1 de cada grupo experimental fue inyectado subcutáneamente (s.c.) en ratones hembras vírgenes NIH (S)-*nude* para los experimentos de la Primera Parte de Resultados y en ratones de la cepa BALB/c para los experimentos *in vivo* de la Segunda Parte de Resultados. Simultáneamente, los ratones fueron inyectados s.c. con un *depot* de 40 mg de MPA en el flanco de la región tóraco-ventral opuesto al inóculo de células para los experimentos de la Segunda Parte de Resultados, o bien se les implantó s.c. y con ayuda de un trócar, un *pellet* de liberación lenta de 5 μg de HRG (ver descripción más adelante) en el mismo flanco del inóculo de células para los experimentos de la Primera Parte de Resultados. Los animales que recibieron células JIMT-1 permanecieron sin tratar. Para los experimentos con las células JIMT-1 de la Primera Parte de Resultados, cuando los tumores xenógrafos desarrollados a partir de las células

transfectadas con el plásmido vacío alcanzaron un volumen medio de 40 mm³, los animales fueron divididos al azar en tres grupos experimentales. Un grupo recibió dos inyecciones semanales de trastuzumab en dosis de 20 mg/kg (400 µg por ratón); otro grupo fue inyectado dos veces por semana con dosis iguales de IgG humana, y el tercer grupo permaneció sin tratar. La IgG humana se obtuvo a partir de sangre de donantes sanos mediante tres precipitaciones sucesivas con NH₄SO₄, y luego se dializó O.N. contra un volumen 1000 veces mayor de PBS.

Los tumores de todos los experimentos fueron medidos tres veces por semana con un calibre vernier. El volumen tumoral (mm³) fue calculado como $(L \times A^2)/2$, donde L=largo (mm) y A=ancho (mm). La tasa de crecimiento tumoral fue determinada como la pendiente de la curva de crecimiento, utilizando el *software* GraphPad Prism. Cuando los animales fueron sacrificados, se extrajeron los tumores y se dividió cada tumor en dos porciones: una fue congelada a -70°C para luego preparar extractos proteicos para los ensayos de *Western Blot*, y la otra fue fijada en PBS + formaldehído 10% para enviar a la patóloga Isabel Frahm (Sanatorio Mater Dei, Buenos Aires), quien la fijó en parafina y tiñó las secciones histológicas con hematoxilina-eosina para los análisis histopatológicos. En el caso de los experimentos del segundo protocolo experimental de la Segunda Parte de Resultados, los tumores se dividieron en cuatro porciones: dos porciones fueron destinadas para los análisis recién descritos, otro trozo se utilizó para evaluar el contenido de fluorescencia por citometría de flujo, y con el cuarto se prepararon extractos celulares para ensayos de CHIP. Para todos los experimentos *in vivo* también se extrajeron y fijaron ejemplares de pulmón, ganglios, corazón, hígado y páncreas para el examen histológico (evaluación de presencia de metástasis y toxicidad).

Para preparar extractos proteicos a partir de los tumores para los ensayos de *Western Blot*, los tumores fueron digeridos mecánicamente primero con tijeras y luego con un homogenizador (Ultra-Turrax, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik) en buffer de extracción con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Recibieron 2 pulsos de 15 segundos al 50% de potencia del homogenizador. Los extractos fueron centrifugados durante 45 minutos a 218000 x g a 4°C y se utilizó el sobrenadante para realizar los ensayos de *Western Blot* como se describió más arriba. Para evaluar el contenido de fluorescencia por citometría de flujo, los tumores fueron digeridos primero mecánicamente con tijeras y luego enzimáticamente con la solución descrita en la sección “Soluciones utilizadas para los cultivos”, agitando durante 40 minutos a 37°C y

se frenó la reacción con DMEM-F12 + 10% de suero fetal bovino (SFB). El homogenizado se filtró utilizando una malla plástica y el filtrado se centrifugó durante 5 minutos a 450 x g. El *pellet* se resuspendió en PBS y se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 en PBS para analizar la fluorescencia en el citómetro de flujo (Becton Dickinson Biosciences). Para los ensayos de ChIP, los tumores fueron digeridos mecánicamente primero con tijeras y luego con el homogenizador en PBS con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Recibieron 5 a 7 pulsos de 15 segundos al 50% de potencia del homogenizador. Se realizó un *crosslinking* incubando el homogenato con formaldehído en una concentración final de 1%, agitando durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando glicina en una concentración final de 140 mM. Luego se centrifugó durante 4 minutos a 800 x g a 4°C. El *pellet* se lavó con PBS frío dos veces y se resuspendió en 1 ml de buffer hipotónico. El procedimiento que se realizó a continuación fue como se describió en la sección “Ensayos de ChIP” para las células provenientes de cultivo.

Análisis estadístico

Los volúmenes tumorales se calcularon en $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$ (media del error estándar) y se evaluó la significancia estadística mediante un test de ANOVA seguido de un test de Tukey para la comparación entre distintos grupos. Las curvas de crecimiento tumoral se calcularon en $\text{mm}^3/\text{día} \pm \text{SEM}$; se realizó un análisis de regresión lineal y las pendientes se compararon utilizando un test de ANOVA seguido de un test de paralelismo para evaluar la significancia estadística de las diferencias.

Preparación del *pellet* de HRG

Para desarrollar el *pellet* de liberación lenta de HRG nos basamos en trabajos previos de otros autores (Silberstein y Daniel 1987; Jones *et al.* 1996). Se mezclaron 20 a 25 mg de albúmina sérica bovina (Sigma) con 100 μg de HRG1 β 1 liofilizada (R&D Systems). Por otro lado, el copolímero de acetato de etileno (“Elvax” 40W, obsequio de Simko S.A.) se disolvió en diclorometano, 20% p/v. La mezcla de BSA+HRG fue disuelta en 125 μl de Elvax+diclorometano, luego fue congelada en nitrógeno líquido y se secó al vacío. El *pellet* de Elvax seco fue comprimido con pinzas y se cortó con bisturí en 20 trozos que se pesaron, de manera que cada uno contenía 5 μg de HRG y pesaba 1 mg. Como control, el *pellet* de Elvax se preparó con BSA sola.



RESULTADOS PRIMERA PARTE

HRG induce la translocación de ErbB2 al núcleo y su colocalización con Stat3

En nuestro laboratorio hemos demostrado que el factor de crecimiento HRG induce una fuerte activación del receptor tirosina quinasa ErbB2 en células epiteliales del tumor mamario murino C4HD y en la línea celular de cáncer de mama humano T47D (Balana *et al.* 1999). También demostramos que HRG estimula la activación de Stat3 en ambos tipos celulares mediante un mecanismo que involucra la función de ErbB2 como receptor tirosina quinasa de membrana (Proietti *et al.* 2009).

Teniendo en cuenta los hallazgos de Hung y colaboradores sobre la localización nuclear de ErbB2 y su función como regulador transcripcional (Wang *et al.* 2004), y considerando que Stat3 es un factor de transcripción, evaluamos si la interacción citosólica entre ErbB2 y Stat3 inducida por HRG que identificamos previamente (Proietti *et al.* 2009), ocurre también a nivel nuclear.

En primer lugar, evaluamos la localización celular de ErbB2 modulada por HRG1 β 1. Ensayos de fraccionamiento subcelular y *Western Blot* mostraron que el tratamiento de las células C4HD y T47D con HRG durante una hora resultó en una fuerte localización nuclear de ErbB2. Estos resultados muestran la localización nuclear de la proteína entera dado que, por un lado, el peso molecular de ErbB2 nuclear observado en el *Western Blot* (185 kDa) es igual al de ErbB2 presente en el extracto celular total, y, por otro lado, un anticuerpo anti la región carboxi terminal y otro contra la amino terminal de ErbB2 reconocieron a la proteína en el extracto nuclear (figura 9 A y B, primer y segundo panel). Este es el primer trabajo que muestra la migración nuclear de ErbB2 endógeno inducida por ligando.

En trabajos previos mostramos que HRG induce la fosforilación de uno de los principales sitios de autofosforilación de ErbB2, la tirosina 1222 (la Y1222 de la proteína humana corresponde al sitio ortólogo Y1272 en la proteína murina) y de un sitio diferente a los de autofosforilación, el residuo tirosina 877 (Y927 en la proteína murina) (Proietti *et al.* 2009), localizado en el lazo de activación del dominio quinasa de ErbB2 (Xu *et al.* 2007). En este trabajo estudiamos el estado de activación de ErbB2 nuclear evaluando la fosforilación de los residuos Y1222/1272 y Y877/927. Ensayos de *Western Blot* mostraron altos niveles de fosforilación de ErbB2 nuclear en ambos residuos en las células C4HD y T47D (figura 9 A y B, tercer y cuarto panel). La preincubación de las células con el inhibidor específico de la actividad tirosina quinasa de ErbB2, AG825, que impide la fosforilación de ErbB2 en Y1222/1272 y Y877/927

inducida por HRG (figura 9 C), inhibió significativamente la localización de ErbB2 en el núcleo, mostrando que la activación de ErbB2 es un requisito absoluto en este proceso (figura 9 A y B, tercer y cuarto panel). Estos resultados concuerdan con hallazgos previos en modelos de activación constitutiva de ErbB2 (Wang *et al.* 2004). También se detectó la presencia de ErbB2 en la fracción citosólica luego de la estimulación con HRG, sugiriendo que el factor de crecimiento indujo la translocación de ErbB2 desde la membrana plasmática (fracción celular que no se muestra en la figura) hacia el citosol y luego al núcleo, siendo más abundante en la fracción nuclear al cabo de una hora de tratamiento (figura 9 A y B, primer y segundo panel). Los niveles de fosforilación de ErbB2 en Y1222/1272 y Y877/927 inducidos por HRG fueron significativamente menores en la fracción citosólica que en la nuclear (figura 9 A y B, tercer y cuarto panel).

Por otro lado, Stat3 fue detectada solamente en la fracción citosólica en las células C4HD y T47D sin tratar, y el tratamiento con HRG por una hora indujo una fuerte translocación nuclear (figura 9 A y B, quinto panel).

En un trabajo reciente de nuestro laboratorio nos focalizamos en los efectos del tratamiento por tiempos cortos con HRG sobre el estado de fosforilación de Stat3, y observamos un pico en los niveles de fosforilación del residuo tirosina 705 a los 10 minutos de tratamiento (Proietti *et al.* 2009). En la figura 9 D se observa que Stat3 nuclear se encuentra fuertemente fosforilada en Y705 luego de una hora de estimulación con HRG. Extractos celulares totales corridos en paralelo muestran que la fosforilación de Stat3 en Y705 ya es evidente a los 10 minutos de tratamiento con HRG. Sin embargo, se detectaron muy bajos niveles de fosforilación en Y705 al cabo de 30 minutos de tratamiento con HRG, mientras que en la fracción nuclear Stat3 se encuentra notablemente fosforilada a ese tiempo (figura 9 D). Estos resultados indican que al utilizar extractos celulares totales y, probablemente debido a la baja contribución de las proteínas nucleares en el extracto total sembrado, en nuestro estudio previo (Proietti *et al.* 2009) se perdió el hecho de que Stat3 se encuentre fosforilada en el compartimiento nuclear de células tratadas con HRG durante 30 minutos.

Está ampliamente reportado que la fosforilación de Stat3 en tirosina 705 es un requisito para la migración de Stat3 hacia el núcleo (Darnell 1997; Bromberg y Darnell 2000). Consistentemente, la preincubación de las células C4HD y T47D con AG825, que previene la fosforilación de Stat3 inducida por HRG (Proietti *et al.* 2009), resultó en una inhibición de la localización nuclear de Stat3 (figura 9 A y B, quinto panel). No se

detectaron niveles significativos de fosforilación de Stat3 en Y705 en la fracción citosólica tras el tratamiento con HRG durante 1 hora (figura 9 A y B, sexto panel).

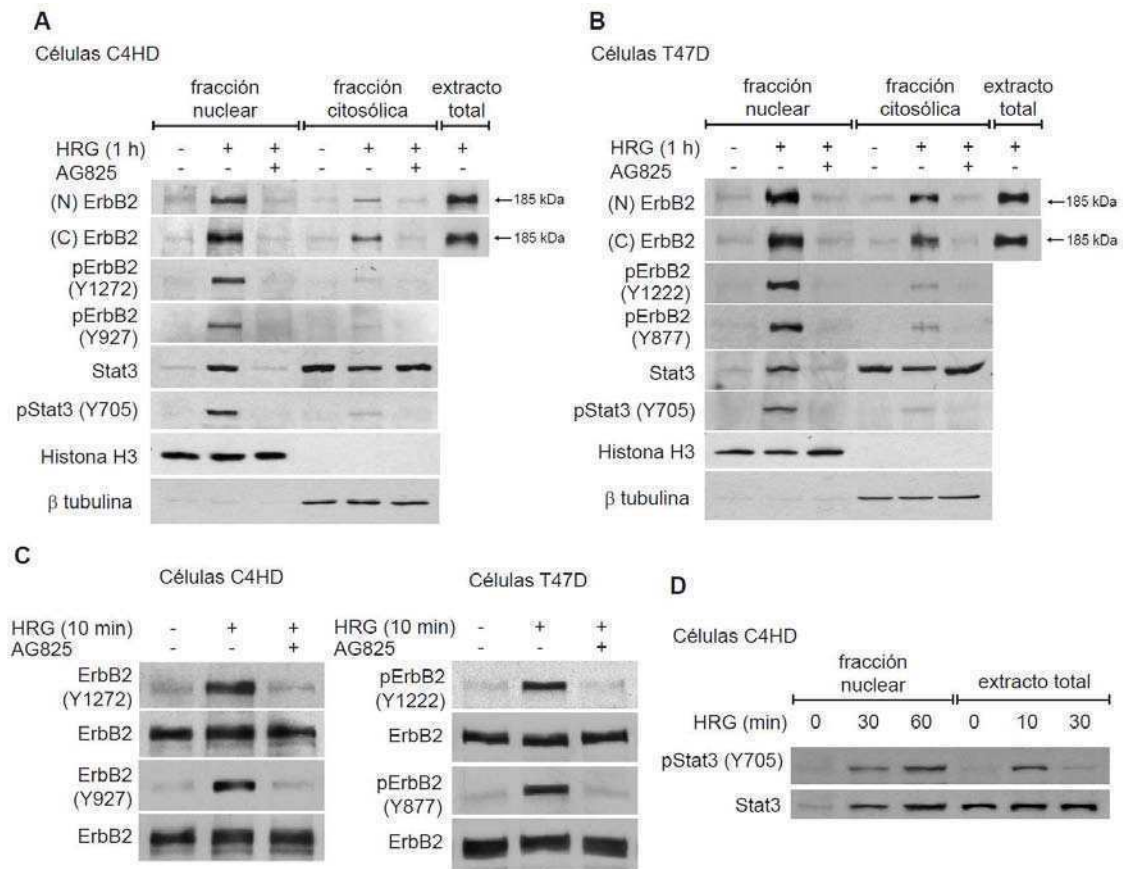


Figura 9. HRG induce la fosforilación y translocación nuclear de ErbB2 y de Stat3. Células C4HD (A) y T47D (B) fueron pretratadas o no con AG825 100 μ M y luego tratadas o no con HRG 40 ng/ml durante 1 h. Se prepararon fracciones citosólicas y nucleares. Cincuenta μ g de proteínas de los extractos nucleares y 25 μ g de los extractos citosólicos fueron analizados por *Western Blot* (WB). La membrana revelada con fosfo tiosina (pY) 1272/1222 ErbB2 fue sometida a *stripping* y luego revelada con un anticuerpo que reconoce la región amino (N) terminal de ErbB2; la revelada con pY927/877, fue luego revelada con un anticuerpo que reconoce la región carboxi (C) terminal de ErbB2, y la revelada con pY705 Stat3, se reveló después del *stripping* con un anticuerpo anti Stat3 total. Extractos celulares totales fueron corridos en paralelo. Para controlar la eficiencia del fraccionamiento subcelular se reveló con un anticuerpo anti histona H3, marcador nuclear, y uno anti β tubulina, marcador citosólico. Los WB mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes. La densitometría de las bandas de pErbB2, ErbB2, pStat3 y Stat3 de la fracción nuclear normalizada con histona H3 en A y B mostró un aumento significativo de las fosfoproteínas y ErbB2 y Stat3 en las células tratadas con HRG comparando con las no tratadas, y una disminución causada por el AG825 con respecto a las tratadas con HRG ($p < 0,001$). C. WB de extractos totales de células C4HD y T47D mostrando que el AG825 100 μ M efectivamente inhibió la fosforilación de ErbB2 en los residuos pY1272/1222 y pY927/877 inducida por HRG. Las membranas reveladas con los fosfo anticuerpos fueron sometidas a *stripping* y luego reveladas con el anticuerpo contra ErbB2 total. D. Células C4HD se trataron con HRG 40 ng/ml por los tiempos indicados y luego se realizaron fracciones nucleares y extractos proteicos totales. Cincuenta μ g de proteínas de los extractos nucleares y 25 μ g de los extractos

totales fueron analizados por WB. La membrana revelada con pY705 Stat3 se reveló después del *stripping* con un anticuerpo anti Stat3 total. Los experimentos mostrados en **C** y **D** son representativos de tres. La densitometría de pErbB2 normalizada con ErbB2 en **C** mostró un aumento significativo de la fosforilación en las células tratadas con HRG comparando con las no tratadas, y una disminución de la fosforilación causada por el AG852 con respecto a las tratadas con HRG ($p < 0,001$).

A continuación evaluamos si el tratamiento con HRG induce la colocalización de Stat3 y ErbB2 en el compartimiento nuclear mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Consistente con nuestros estudios de fraccionamiento subcelular y *Western Blot*, en ausencia de HRG, la mayor parte de ErbB2 se localizó en la membrana plasmática de las células C4HD y T47D (figura 10 A y B, primera fila, primera columna). Luego del tratamiento con HRG durante 30 y 60 minutos, se detectó una leve tinción de ErbB2 en el citosol y una clara localización de ErbB2 en el núcleo, visualizada como un patrón punteado, que corresponde a grandes acumulaciones de ErbB2 concentrado en focos (figura 10 A y B, segunda y tercera fila, primera columna). La inhibición de la fosforilación de ErbB2 con el inhibidor farmacológico AG825 resultó en un bloqueo de la translocación nuclear de ErbB2 en ambos tipos celulares (figura 10 A y B, cuarta fila, primera columna).

Por otro lado, Stat3 se encontró difusamente localizada en el citosol de las células C4HD y T47D sin tratar (figura 10 A y B, primera fila, segunda columna). La estimulación con HRG por 30 y 60 minutos provocó una marcada translocación de Stat3 hacia el núcleo (figura 10 A y B, segunda y tercera fila, segunda columna), que fue inhibida por el pretratamiento de las células con AG825 (figura 10 A y B, cuarta fila, segunda columna), consistente con el hecho de que ErbB2 juega un rol como inductor río arriba de la fosforilación de Stat3 [(Proietti *et al.* 2009) y figura 9 A y B].

Estos resultados también muestran que el tratamiento de ambos tipos celulares con HRG durante 30 y 60 minutos resultó en una notable colocalización nuclear de ErbB2 y Stat3, evidenciada por los focos amarillos en las imágenes superpuestas (figura 10 A y B, segunda y tercera fila, tercera columna y recuadros). Resulta interesante destacar que parte de ErbB2 nuclear no colocalizó con Stat3 y viceversa, y que no se observó colocalización de ErbB2 y Stat3 en el citoplasma tras el tratamiento con HRG por 30 a 60 minutos. Teniendo en cuenta el bajo nivel de fosforilación citosólica de ambas proteínas (figura 9 A y B), estos hallazgos sugieren que ErbB2 y Stat3 sólo colocalizan cuando ambas están fuertemente fosforiladas. Esto está de acuerdo con nuestros resultados previos donde se muestra que luego del tratamiento con HRG durante 10

minutos, Stat3 y ErbB2 se encuentran en el citoplasma, altamente fosforiladas y notablemente colocalizadas (Proietti *et al.* 2009). En estos estudios se analizaron aproximadamente 100 a 200 células para cada tratamiento y alrededor del 80% mostró el mismo patrón de localización celular de Stat3 y ErbB2. En las figuras 10 A y B se muestran algunas células representativas de las examinadas.

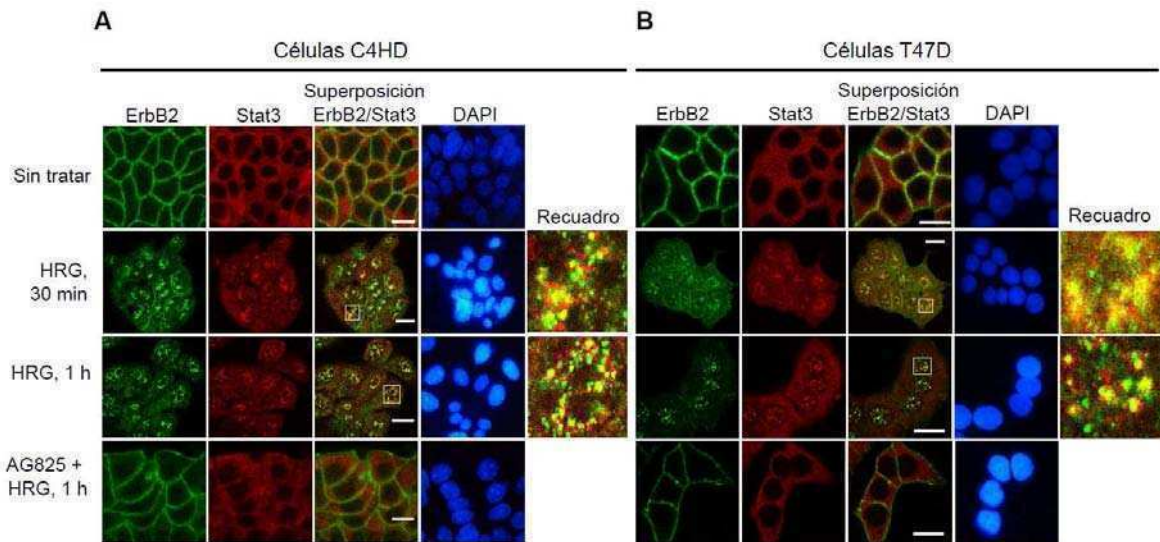


Figura 10. HRG induce la colocalización nuclear de ErbB2 y Stat3. Células C4HD (A) y T47D (B) fueron pretratadas o no con AG825 100 μ M, luego tratadas con HRG 40 ng/ml durante los tiempos indicados y por último, fueron fijadas en metanol. ErbB2 fue localizado utilizando un anticuerpo policlonal de conejo seguido de la incubación con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (verde). Stat3 fue identificada con un anticuerpo monoclonal de ratón seguido de la incubación con un segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con rodamina (rojo). En cada fila se muestran las mismas células y las imágenes en los paneles de la tercera columna están formadas por superposición de las imágenes de los otros dos paneles de la izquierda en la misma fila. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). HRG indujo colocalización de Stat3 y ErbB2, evidenciada por el color amarillo (colocalización de las tinciones roja y verde) en el núcleo celular. Las áreas recuadradas se muestran en detalle en los recuadros de la derecha. Experimentos controles demostraron que no hay reactividad cruzada entre los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y anti IgG de ratón, ni marca detectable con los segundos anticuerpos solos (datos no mostrados). Estas imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes. Barras de escala: 10 μ m.

La asociación física entre ErbB2 y Stat3 en el compartimiento nuclear fue examinada mediante experimentos de coimmunoprecipitación. Extractos proteicos nucleares de células C4HD tratadas o no con HRG durante una hora fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti ErbB2 y se realizó el *Western Blot* con anticuerpos anti Stat3. Se inmunoprecipitó IgG como control de especificidad. La figura 11 A muestra que el tratamiento con HRG indujo una asociación entre las formas totales

y fosforiladas de ErbB2 y Stat3 en el núcleo. Cuando los extractos proteicos nucleares fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti Stat3, HRG también indujo la interacción entre las formas totales y fosforiladas de ErbB2 y Stat3 (figura 11 B).

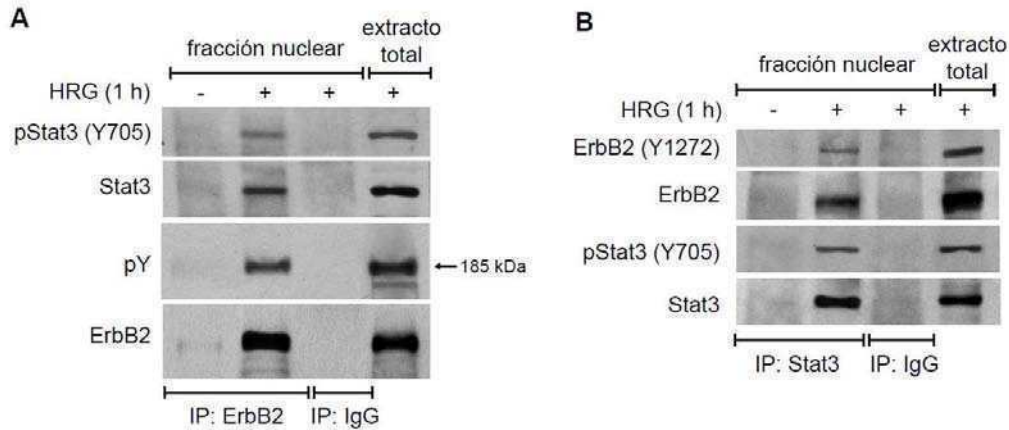


Figura 11. HRG induce la asociación física entre ErbB2 y Stat3 en el núcleo. Doscientos cincuenta µg de proteína de extractos nucleares de células C4HD tratadas o no con HRG 40 ng/ml por 1 h se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti ErbB2 (A) o anti Stat3 (B) o con inmunoglobulina G (IgG) de conejo como control de especificidad. Los inmunocomplejos se analizaron por WB con los anticuerpos anti fosfo-proteínas indicados. Las membranas fueron luego sometidas a *stripping* y reveladas con los anticuerpos contra las proteínas totales. Extractos celulares totales fueron corridos en paralelo. Este experimento fue repetido tres veces con resultados similares. IP: inmunoprecipitación.

La translocación de ErbB2 y Stat3 al núcleo inducida por HRG ocurre de manera independiente una de la otra

Con el propósito de estudiar si la inhibición de la localización de ErbB2 en el núcleo afecta la translocación nuclear de Stat3, desarrollamos una estrategia de reconstitución de ErbB2. Células C4HD fueron transfectadas con RNAs cortos de interferencia (siRNAs) dirigidos contra el producto génico de ErbB2, diseñados para silenciar selectivamente la expresión de ErbB2 murino. Las células fueron cotransfectadas en combinación con un vector de expresión de ErbB2 humano salvaje (*wild-type*, WT), denominado hErbB2WT, o con un vector de expresión de una mutante de ErbB2 humano incapaz de translocar al núcleo porque tiene deletado el dominio de localización nuclear (*nuclear localization domain*, NLS), denominado hErbB2ΔNLS (Giri *et al.* 2005). La transfección de las células con 25 nM de siRNAs resultó en un 80% de silenciamiento de la expresión de la proteína ErbB2 (figura 12 A). Se evaluaron

también mayores concentraciones de siRNAs (50 y 100 nM) sin un aumento significativo de los niveles de silenciamiento de la expresión de la proteína (figura 12 A). Como control de especificidad, células T47D fueron transfectadas con los siRNAs contra ErbB2 murino, sin tener efecto sobre la expresión de ErbB2 humano (figura 12 B). Para reconstituir la expresión de ErbB2, células C4HD fueron cotransfectadas con distintas cantidades de los plásmidos hErbB2WT o hErbB2 Δ NLS. La transfección con 2 μ g de vector fue suficiente para alcanzar los niveles de expresión de ErbB2 endógeno de ratón (figura 12 C). Por lo tanto, los siguientes experimentos fueron realizados en células C4HD en las que la expresión de ErbB2 endógeno murino fue silenciado con 25 nM de siRNAs de ErbB2 y la expresión de ErbB2 humano fue reconstituida transflectando con 2 μ g de los vectores de expresión hErbB2WT o hErbB2 Δ NLS. Como control, las células fueron transfectadas con una secuencia de siRNA que no está dirigida contra algún producto génico conocido (siRNA Control) y cotransfectadas con el plásmido vacío del hErbB2WT (pMe18SM) o del hErbB2 Δ NLS (pEGFP-N1).

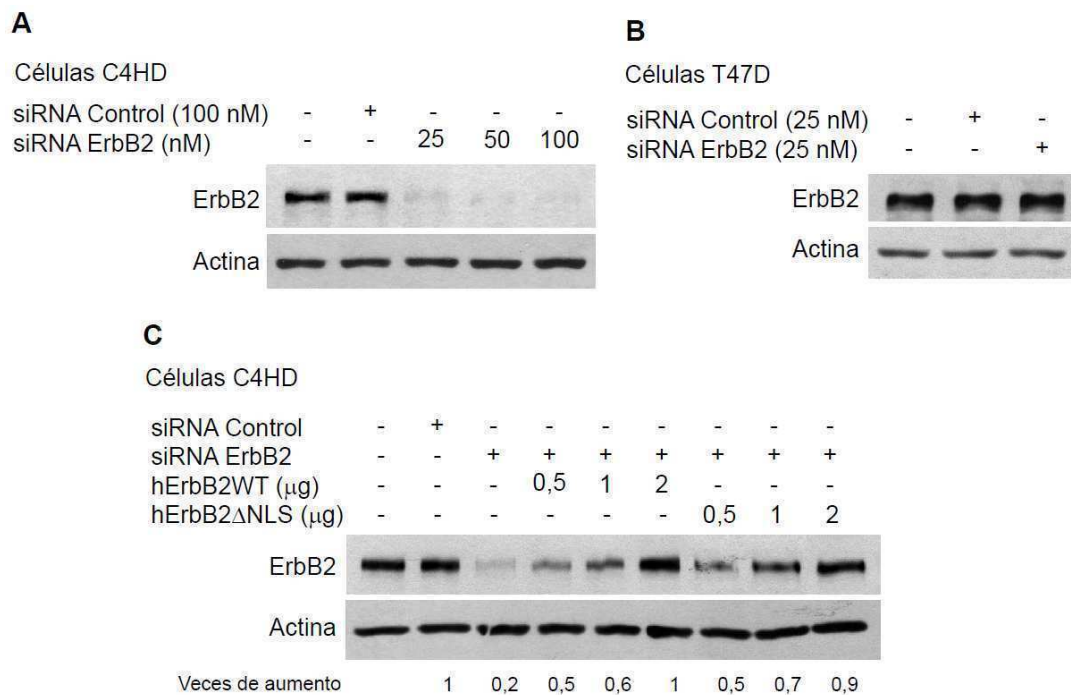


Figura 12. Estrategia de reconstitución de ErbB2. **A.** Células C4HD fueron transfectadas durante 72 hs con las cantidades indicadas de RNAs de interferencia (siRNAs) dirigidos contra ErbB2 murino o con siRNA control como control de especificidad. Los extractos proteicos se analizaron por WB utilizando un anticuerpo contra ErbB2 y uno contra actina como control de carga y de especificidad del silenciamiento. La densitometría de las bandas mostró un silenciamiento de ErbB2 del 80-90% ($p < 0,001$). **B.** Control de especificidad de los siRNAs contra ErbB2 de ratón. Extractos proteicos de células humanas T47D transfectadas con 25 nM de siRNA contra ErbB2 o siRNA Control se sometieron a WB con anticuerpos

contra ErbB2 y actina. C. Células C4HD fueron transfectadas con los siRNAs de ErbB2 o control, y cotransfectadas con las cantidades indicadas de los plásmidos de expresión hErbB2WT o hErbB2 Δ NLS durante 72 hs. La cantidad total de ADN transfectado fue estandarizada agregando los plásmidos vacíos pMe18SM o pEGFP-N1. Se muestran los resultados de la densitometría de las bandas de ErbB2 normalizadas con las de actina, expresada como veces de aumento respecto al control sin silenciar de la segunda calle. Los experimentos se repitieron entre tres y cuatro veces con resultados similares. La densitometría de las bandas de ErbB2 normalizadas con actina mostró una disminución significativa de ErbB2 en las células transfectadas con siRNA contra ErbB2 en A y C comparando con las transfectadas con siRNA control, y un aumento de ErbB2 causado por la cotransfección con 1 y 2 μ g de hErbB2WT y hErbB2 Δ NLS comparando con las transfectadas con siRNA ErbB2 ($p < 0,001$).

El tratamiento con HRG durante 10 minutos resultó en niveles de fosforilación de hErbB2 Δ NLS en Y1222/1272 y Y877/927 comparables con los que presentaron hErbB2WT y la proteína endógena (figura 13, primer y tercer panel). De manera similar, hErbB2 Δ NLS fue capaz de inducir la fosforilación de Stat3 en Y705 en respuesta al tratamiento con HRG (figura 13, quinto panel). Estos resultados indican que hErbB2 Δ NLS conserva su actividad de tirosina quinasa intrínseca intacta, como ya fue descrito por Hung y colaboradores (Giri *et al.* 2005), y además identifican su rol como activador río arriba de la fosforilación de Stat3 inducida por HRG. También se describió que esta mutante de ErbB2 mantiene su capacidad de activar la vía de las MAPK (Giri *et al.* 2005).

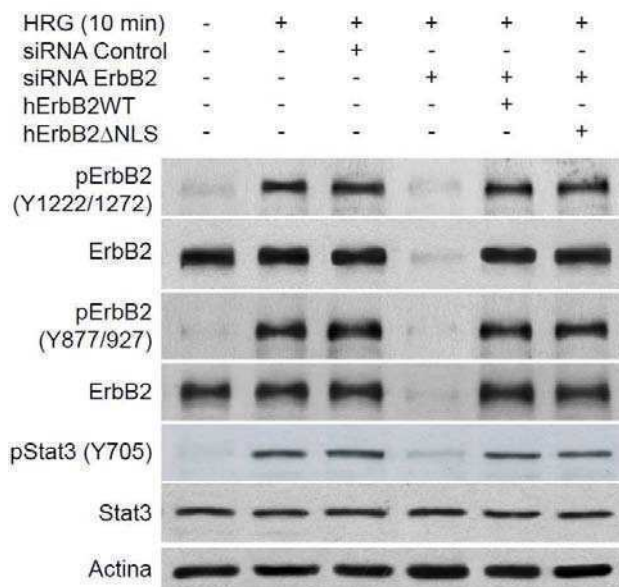


Figura 13. La mutante hErbB2 Δ NLS induce la fosforilación de Stat3 en respuesta a HRG. Células C4HD fueron transfectadas con 25 nM de siRNAs contra ErbB2 murino o siRNA control y cotransfectadas con 2 μ g/ml de hErbB2WT, hErbB2 Δ NLS o plásmido vacío durante 72 hs, y después de 24 hs de ayuno fueron tratadas con HRG 40 ng/ml durante 10 min. Los extractos proteicos fueron analizados por WB con anticuerpos anti fosfo tirosina de ErbB2 y de Stat3, y después del *stripping* las membranas fueron reveladas con anticuerpos contra las proteínas totales. Se muestra actina como control de carga y de especificidad de los tratamientos. El experimento es representativo de tres que se realizaron.

Consistente con los primeros trabajos del laboratorio de Hung donde identificaron el dominio de localización nuclear de ErbB2 y diseñaron y describieron la mutante hErbB2 Δ NLS (Giri *et al.* 2005), nuestros estudios de microscopía confocal en células C4HD reconstituidas con hErbB2 Δ NLS evidenciaron que, luego del tratamiento con HRG, la mutante de ErbB2, que está etiquetada con la proteína fluorescente verde (GFP), migró desde la membrana plasmática hacia el citosol, pero no fue capaz de translocar al núcleo (figura 14, primera columna). Sin embargo, en estas células se detectó una clara migración de Stat3 desde el citosol hacia el núcleo inducida por HRG (figura 14, segunda columna). Esto indicaría que la migración de Stat3 al núcleo mediada por HRG ocurre independientemente de la translocación nuclear de ErbB2.

Células C4HD+siRNA ErbB2+hErbB2 Δ NLS

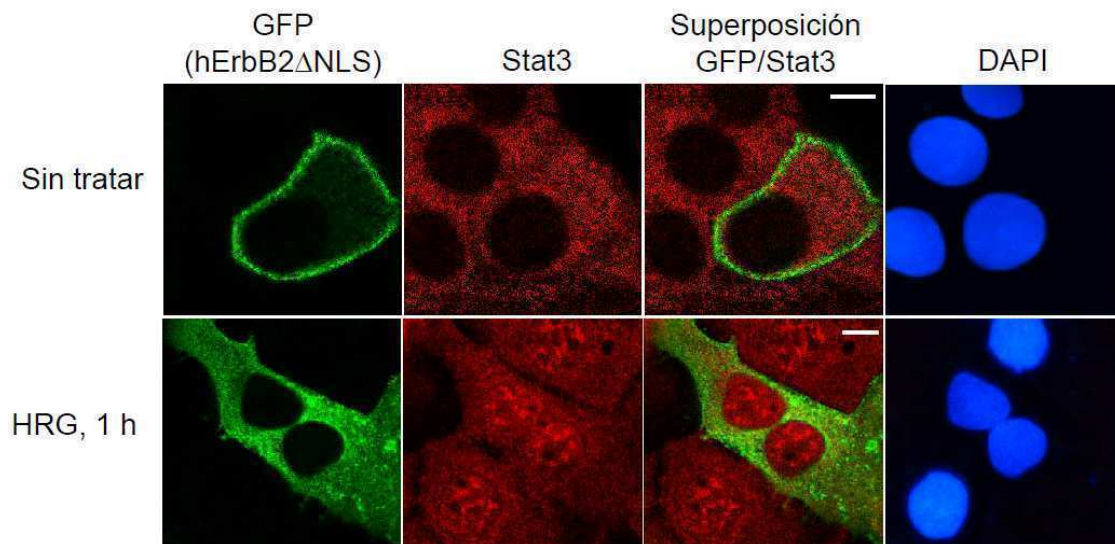


Figura 14. La importación nuclear de Stat3 inducida por HRG es independiente de la migración nuclear de ErbB2. Células C4HD fueron cotransfectadas con 25 nM de siRNAs contra ErbB2 murino y con 2 μ g/ml de hErbB2 Δ NLS durante 72 hs; después de 24 hs de ayuno fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml durante 1 h y por último, fueron fijadas en metanol. La proteína fluorescente verde (GFP) del vector hErbB2 Δ NLS fue visualizada por fluorescencia directa. Stat3 fue identificada con un anticuerpo monoclonal de ratón seguido de la incubación con un segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con rodamina (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Barras de escala: 10 μ m.

La imagen superpuesta de las células tratadas con HRG (figura 14, tercera columna) refuerza nuestros hallazgos que indican que la fosforilación tanto de ErbB2 como de Stat3 es necesaria para que ambas proteínas colocalicen. Entonces, a pesar de que las dos proteínas están presentes en el citoplasma tras la estimulación con HRG

durante una hora, sólo hErbB2 Δ NLS se encuentra fosforilada, ya que la fracción de Stat3 que permanece en el citoplasma a la hora de tratamiento con HRG, no está fosforilada, como se muestra en la figura 9 A.

Una vez caracterizada la mutante hErbB2 Δ NLS como un receptor ErbB2 que mantiene sus funciones citoplasmáticas y de membrana intactas pero es incapaz de migrar hacia el núcleo, estudiamos los efectos de hErbB2 Δ NLS sobre la localización subcelular de ErbB2 endógeno de células C4HD utilizando microscopía confocal. Células C4HD fueron transfectadas con hErbB2 Δ NLS pero en este caso no se silenció la expresión de ErbB2 endógeno con siRNAs. hErbB2 Δ NLS fue visualizada por fluorescencia verde directa, ya que está etiquetada con GFP, y ErbB2 endógeno fue identificado utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente ErbB2 murino y no el humano. En la figura 15 se observan dos poblaciones distintas de ErbB2: la que corresponde a la mutante hErbB2 Δ NLS (verde) y la de ErbB2 endógeno de ratón (rojo). Nuevamente el tratamiento con HRG indujo una migración de hErbB2 Δ NLS hacia el citoplasma pero no al núcleo de las células que expresan ErbB2 endógeno (figura 15, primera columna). Interesantemente, la expresión de hErbB2 Δ NLS inhibió la translocación nuclear de ErbB2 endógeno murino (figura 15, fila inferior, células señaladas con las flechas continuas). La imagen superpuesta de la figura 15 (fila inferior, tercera columna) muestra la marcada diferencia de la localización subcelular de ErbB2 endógeno en respuesta a HRG entre células C4HD transfectadas con hErbB2 Δ NLS (señaladas con flechas continuas) y células sin transfectar (flecha discontinua). En el primer caso, tanto hErbB2 Δ NLS como el endógeno murino permanecieron en el citoplasma tras el tratamiento con HRG y colocalizan fuertemente. En el segundo, se detectó una clara migración del ErbB2 murino hacia el núcleo en ausencia de hErbB2 Δ NLS. Estos resultados indican que hErbB2 Δ NLS funciona como un inhibidor dominante negativo de la translocación nuclear de ErbB2 endógeno.

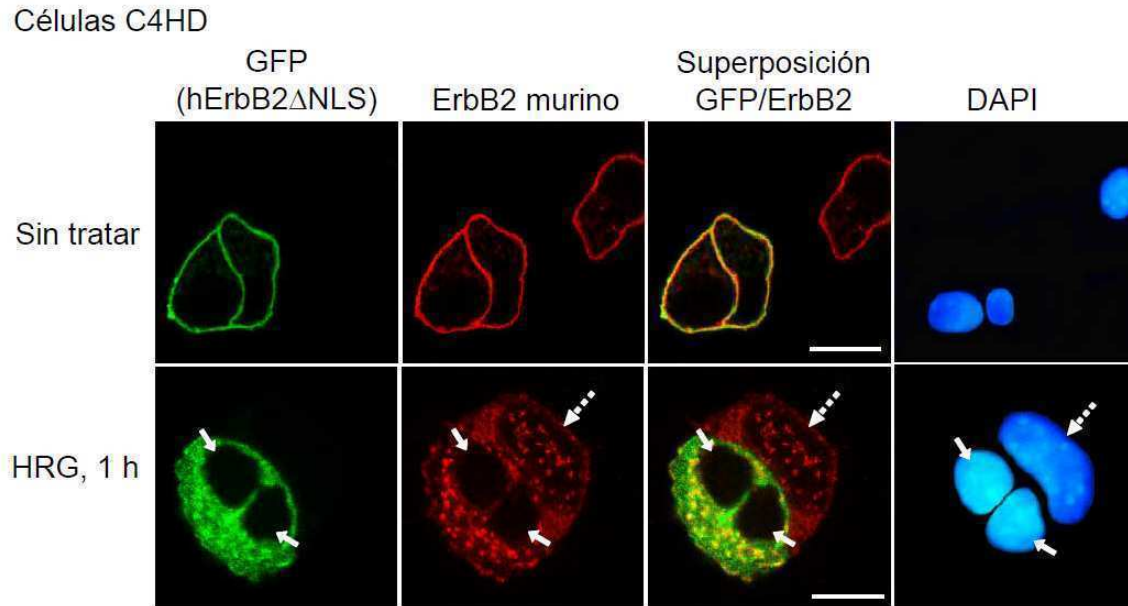


Figura 15. La mutante *hErbB2 Δ NLS* funciona como un inhibidor dominante negativo de la translocación nuclear de *ErbB2* endógeno. Células C4HD que conservan la expresión endógena de *ErbB2* fueron transfectadas con 2 μ g/ml de *hErbB2 Δ NLS* durante 72 hs; después de 24 hs de ayuno fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml durante 1 h, y fijadas en metanol. La GFP del vector *hErbB2 Δ NLS* fue visualizada por fluorescencia directa. *ErbB2* endógeno de ratón fue identificado con un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce el receptor murino y no el humano (F-11, de Santa Cruz Biotechnology), seguido de la incubación con un segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con rodamina (rojo). Flechas continuas: células transfectadas con *hErbB2 Δ NLS*; flecha discontinua: célula que no tomó el vector. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Barras de escala: 10 μ m.

Con el objetivo de evaluar si la inhibición de la translocación nuclear de Stat3 afecta la de *ErbB2*, nos basamos en hallazgos recientes de nuestro laboratorio en los que mostramos que Jak1 y Jak2 participan en el mecanismo de activación de Stat3 inducida por HRG y que, en este mecanismo, *ErbB2* actúa de manera jerárquica río arriba de las quinasas Jaks (Proietti *et al.* 2009). En línea con nuestros resultados previos, células C4HD que fueron pretratadas con un inhibidor farmacológico de las quinasas Jaks y luego tratadas con HRG durante 10 minutos, mostraron una inhibición en la fosforilación en tirosina de Jak1, Jak2 y Stat3, sin afectar la activación de *ErbB2* (figura 16).

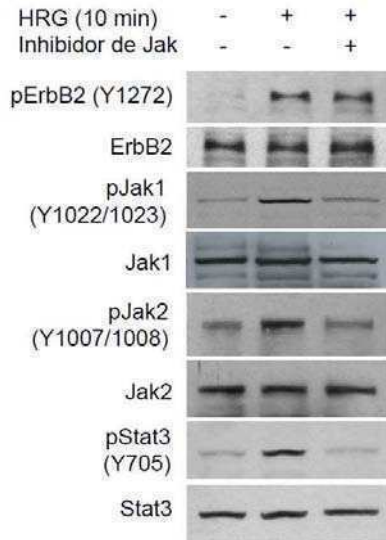


Figura 16. *Jak1* y *Jak2* participan del mecanismo de activación de *Stat3* inducida por *HRG*. Células C4HD fueron pretratadas o no con 10 μ M del inhibidor de Jak antes del tratamiento con *HRG* 40 ng/ml por 10 min. Los extractos proteicos fueron analizados por WB con anticuerpos anti fosfo tirosina de ErbB2, Jak1, Jak2 y Stat3, y después del *stripping* las membranas fueron reveladas con anticuerpos contra las proteínas totales. Este experimento fue repetido tres veces con resultados similares. La densitometría de las bandas de las fosfo-proteínas normalizadas con las proteínas totales mostró un aumento significativo de la fosforilación de ErbB2, Jaks y Stat3 en las células tratadas con *HRG* comparando con las no tratadas, y una disminución de la fosforilación de Jaks y Stat3 causada por el inhibidor de Jak con respecto a las células tratadas con *HRG* ($p < 0,01$).

La figura 17, panel inferior, muestra que la inhibición de la fosforilación de Stat3 en Y705 previno la translocación de Stat3 hacia el núcleo inducida por *HRG*. Sin embargo, la localización nuclear de ErbB2 inducida por *HRG* no se vio afectada en las células pretratadas con el inhibidor de Jaks, indicando que la migración nuclear de ErbB2 mediada por *HRG* puede ocurrir independientemente de la localización subcelular de Stat3.

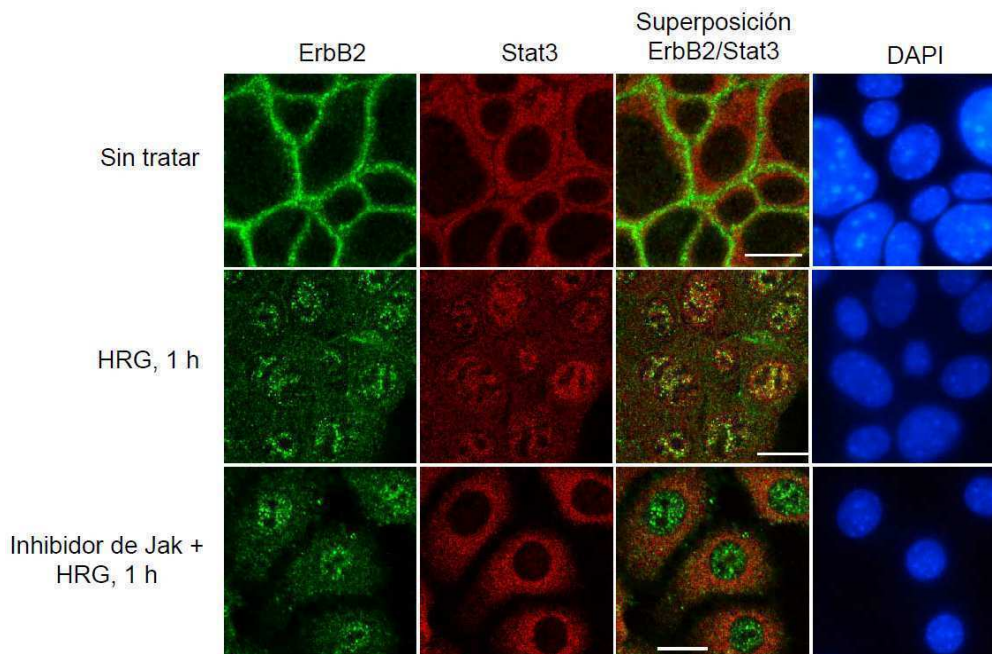


Figura 17. La importación nuclear de ErbB2 mediada por *HRG* es independiente de la translocación nuclear de *Stat3*. Células C4HD fueron pretratadas o no con 10 μ M del inhibidor de Jak, luego tratadas con *HRG* 40 ng/ml por 1 h, y fijadas en metanol. ErbB2 y Stat3 fueron localizados como en la figura 10. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Estas imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Barras de escala: 10 μ m.

HRG migra al núcleo e induce la translocación de ErbB3 y la asociación con ErbB2 en el núcleo

Como se explicó en la introducción, HRG es el ligando de ErbB3 y ErbB4. ErbB2 es un receptor huérfano, y su función principal es la de correceptor, siendo el compañero preferido para heterodimerizar con los demás ErbBs. Si bien ErbB4 tiene mayor afinidad por HRG que ErbB3, el heterodímero ErbB2/ErbB3 tiene mayor afinidad que cualquiera de las moléculas por separado (Alimandi *et al.* 1995; Pinkas-Kramarski *et al.* 1996). Teniendo en cuenta estos antecedentes y que, como describimos en un trabajo previo del laboratorio, las células T47D expresan altos niveles de ErbB3 (Proietti *et al.* 2009), se evaluó la interacción entre ErbB2, ErbB3 y HRG en estas células.

Ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal mostraron que en células creciendo sin suero y en ausencia de HRG exógena, la mayor proporción de ErbB3 se encuentra en la membrana plasmática, colocalizando en algunos puntos con ErbB2 que, como se mostró en la figura 10 B, también se localiza en la membrana (figura 18, primera fila). El tratamiento con HRG durante una hora indujo una fuerte translocación de ErbB3 y ErbB2 al núcleo (figura 18, segunda fila). La estimulación resultó en una significativa colocalización nuclear de ErbB2 y ErbB3, evidenciada por los focos amarillos en las imágenes superpuestas (figura 18, segunda fila, recuadro). También se observó una moderada colocalización de ErbB2 y ErbB3 en el citoplasma. Estos experimentos fueron realizados con un anticuerpo monoclonal anti ErbB2 hecho en ratón que reconoce la porción amino terminal del receptor, y en los mostrados en la figura 10 B se utilizó un anticuerpo policlonal hecho en conejo dirigido contra la porción carboxi terminal de ErbB2. Ambos anticuerpos, dirigidos contra los dos extremos del receptor, reconocieron ErbB2 nuclear en células estimuladas con HRG, demostrando una vez más que bajo estas condiciones el receptor no se cliva, sino que se transloca entero al núcleo.

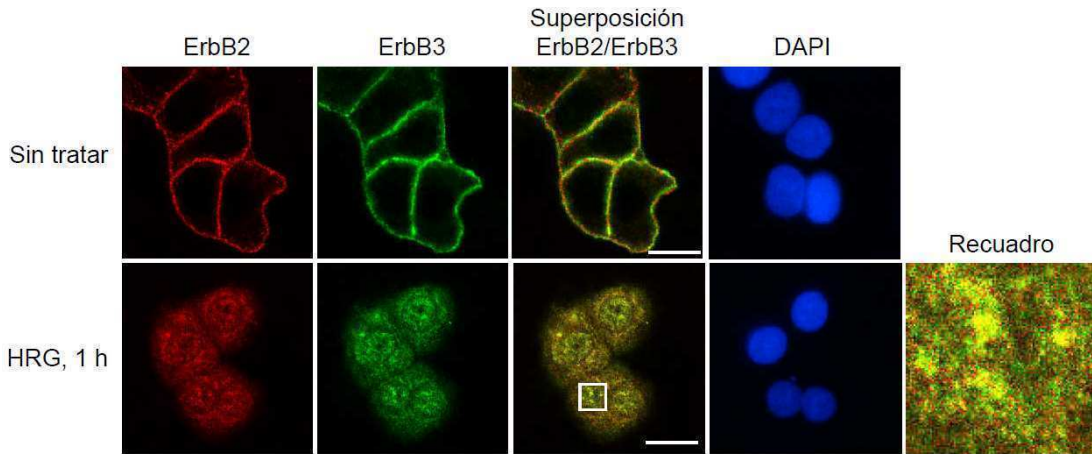


Figura 18. HRG induce la colocalización nuclear de ErbB2 y ErbB3. Células T47D fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml por 1 h y fijadas en metanol. ErbB2 fue localizado utilizando un anticuerpo monoclonal hecho en ratón seguido de la incubación con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con rodamina (rojo). ErbB3 fue identificado con un anticuerpo policlonal de conejo seguido de la incubación con un segundo anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). HRG indujo colocalización de ErbB2 y ErbB3, evidenciada por el color amarillo, en el citosol y núcleo celular. El área recuadrada se muestra en detalle en el recuadro de la derecha. Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Barras de escala: 10 μ m.

Por otro lado, se encontraron mínimos niveles de HRG endógena, casi indetectables, en el citosol de las células T47D sin tratar (figura 19, primera fila). El tratamiento de las células con HRG exógena durante una hora resultó en su localización nuclear además de la de ErbB2, y en una muy fuerte colocalización nuclear, casi total, de ambas moléculas (figura 19, segunda fila, recuadro).

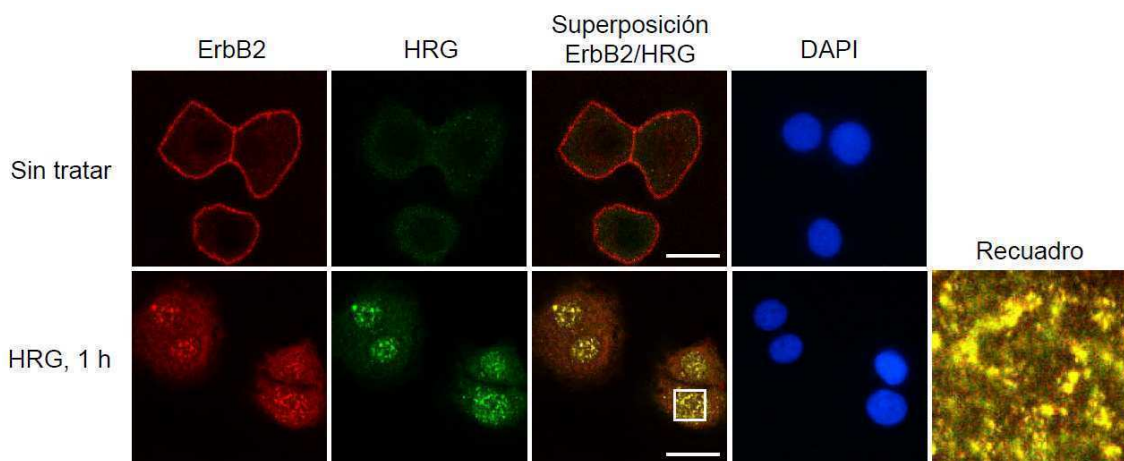


Figura 19. HRG migra al núcleo y colocaliza con ErbB2. Células T47D fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml por 1 h y fijadas en metanol. ErbB2 fue localizado como en la figura 18. HRG fue identificada con un anticuerpo policlonal de conejo seguido de la incubación con un segundo anticuerpo anti IgG de conejo

conjugado con Alexa 488 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). HRG y ErbB2 colocalizaron en el núcleo, evidenciado por el color amarillo. El área recuadrada se muestra en detalle en el recuadro de la derecha. Imágenes representativas de cuatro experimentos independientes. Barras de escala: 10 μ m.

Para corroborar si existe una asociación física entre ErbB2, ErbB3 y HRG en el compartimiento nuclear, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación. Extractos proteicos nucleares de células T47D tratadas o no con HRG durante una hora fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti ErbB2 y se realizó el *Western Blot* con anticuerpos anti ErbB3 y anti HRG. Se inmunoprecipitó IgG como control de especificidad. La figura 20 A muestra que el tratamiento con HRG indujo una asociación entre ErbB2 y ErbB3 (primer panel) y entre ErbB2 y HRG (segundo panel) en el núcleo. Cuando los extractos proteicos nucleares fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti ErbB3, HRG también indujo la interacción entre ErbB3 y ErbB2 (figura 20 B, primer panel). Resulta interesante mostrar que en estos extractos nucleares también se encontró una asociación entre ErbB3 y Stat3 en células estimuladas con HRG (figura 20 B, segundo panel). Estos resultados y los mostrados en las figuras anteriores, sugieren que el estímulo con HRG induce la formación de heterodímeros ErbB2/ErbB3 que translocan al compartimiento nuclear junto con el ligando, donde interactúan con Stat3 para formar complejos nucleares.

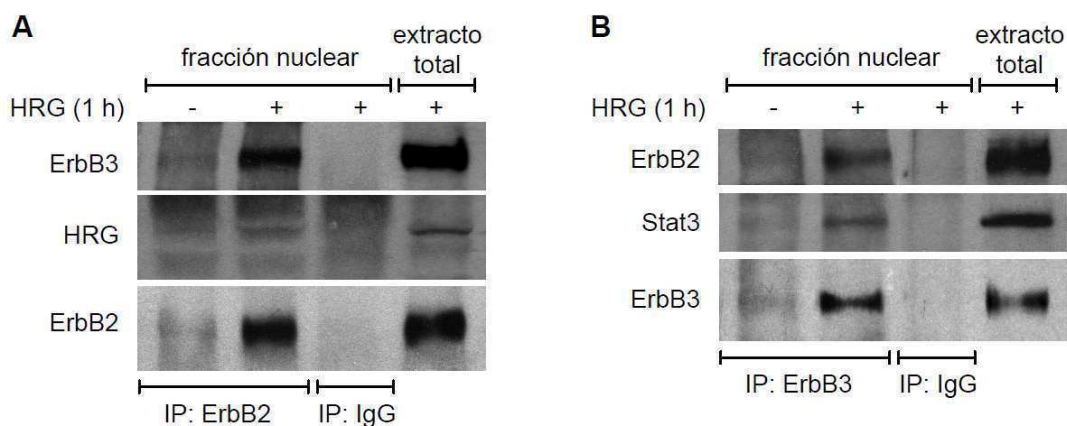


Figura 20. Asociación física entre ErbB2, ErbB3 y HRG en el núcleo. Doscientos cincuenta μ g de proteína de extractos nucleares de células T47D tratadas o no con HRG 40 ng/ml por 1 h se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti ErbB2 (A) o anti ErbB3 (B) o con IgG de conejo como control de especificidad. Los inmunocomplejos se analizaron por WB con los anticuerpos indicados. Diez por ciento de los extractos inmunoprecipitados fueron revelados con los mismos anticuerpos con los que se inmunoprecipitó para controlar la eficiencia de la técnica. Este experimento se repitió tres veces con resultados similares. IP: inmunoprecipitación.

ErbB2 y Stat3 participan en el mecanismo de la expresión de ciclina D1 inducida por HRG

A continuación nos propusimos estudiar las consecuencias biológicas de la interacción entre Stat3 y ErbB2 en el núcleo. Por un lado, a pesar de que la función de Stat3 como factor de transcripción es ampliamente conocida, los coactivadores que modulan su actividad transcripcional permanecen poco estudiados. Por otro lado, los primeros hallazgos de Hung y colaboradores mostraron el rol de ErbB2 como factor de transcripción describiendo su unión a secuencias específicas en el ADN, denominadas HAS (por *HER-2 associated sequence*), pero la capacidad de ErbB2 de actuar como coactivador transcripcional permanece completamente desconocida. Por lo tanto, postulamos la hipótesis de que ErbB2 podría modular el crecimiento del cáncer de mama actuando como coactivador de Stat3. A través de búsquedas bibliográficas y estudios *in silico* utilizando un *software* con bases de datos (MatInspector, <http://www.genomatix.de>), identificamos genes vinculados al cáncer que contuvieran en sus promotores elementos respondedores a Stat3 pero no sitios HAS. Encontramos al gen de ciclina D1 como un buen candidato a analizar porque contiene sitios de unión a Stat3 pero no a ErbB2 en su promotor proximal. Ciclina D1 es un gen particularmente atractivo porque su rol en el crecimiento del cáncer de mama y la capacidad de HRG de inducir su expresión en líneas celulares de cáncer de mama, han sido bien reportados (Fiddes *et al.* 1998; Neve *et al.* 2002; Ostrander *et al.* 2007; Yang *et al.* 2008).

Primero se evaluó la modulación de la expresión de la proteína ciclina D1 por HRG en cultivos primarios de células epiteliales del tumor C4HD, mediante ensayos de *Western Blot*. El tratamiento con HRG desde 6 hasta 48 hs indujo la expresión de ciclina D1, observándose el máximo nivel de expresión a las 48 hs (3 veces) y declinando a las 72 hs (figura 21 A).

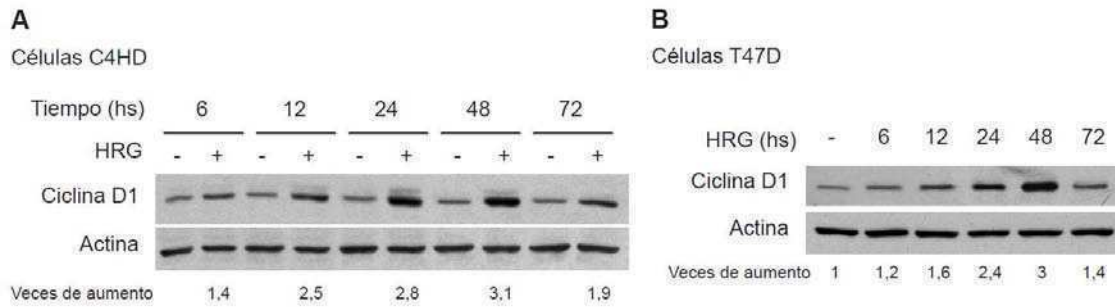


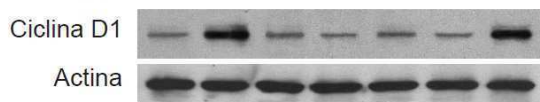
Figura 21. HRG induce la expresión de la proteína ciclina D1. Células C4HD (A) o T47D (B) fueron tratadas con HRG 40 ng/ml durante los tiempos indicados. Los extractos proteicos se analizaron por WB utilizando un anticuerpo contra ciclina D1 y uno contra actina como control de carga y de especificidad del tratamiento. Se muestran los resultados de la densitometría de las bandas de ciclina D1 normalizadas con las de actina, expresada como veces de aumento de la proteína por el tratamiento con HRG respecto al control sin tratar. Los experimentos se repitieron cuatro veces con resultados similares. La densitometría mostró un aumento significativo de ciclina D1 en las células tratadas con HRG por 12 ($p < 0,01$), 24 y 48 hs ($p < 0,001$) comparando con las no tratadas.

En células de cáncer de mama y próstata se ha demostrado que la activación del promotor de ciclina D1 es estimulada por formas de Stat3 y ErbB2 constitutivamente activas (Leslie *et al.* 2006; Casimiro *et al.* 2007). Entonces nos propusimos determinar la participación de ErbB2 y Stat3 en la regulación positiva de la expresión de ciclina D1 por HRG. La inhibición de la activación de ErbB2 inducida por HRG utilizando el inhibidor farmacológico AG825 o el silenciamiento de la expresión de ErbB2 con siRNAs inhibieron significativamente la expresión de ciclina D1 mediada por HRG (figura 22 A). El bloqueo de la activación de Stat3 con el inhibidor farmacológico de las quinasas Jaks o el silenciamiento de la expresión de Stat3 también impidieron el aumento de los niveles de expresión de ciclina D1 inducido por HRG. El panel de la derecha de la figura 22 A muestra que el siRNA contra Stat3 efectivamente silenció en un 90% la expresión de Stat3. Estos resultados muestran que ciclina D1 es un gen cuya expresión es regulada por HRG a través de un mecanismo dependiente de ErbB2 y Stat3. También encontramos que HRG modula positivamente la expresión de la proteína ciclina D1 en células T47D vía ErbB2 y Stat3 (figura 21 B y 22 B).

A

Células C4HD

HRG (48 hs)	-	+	+	+	+	+	+
AG825	-	-	+	-	-	-	-
siRNA ErbB2	-	-	-	+	-	-	-
Inhibidor de Jak	-	-	-	-	+	-	-
siRNA Stat3	-	-	-	-	-	+	-
siRNA Control	-	-	-	-	-	-	+

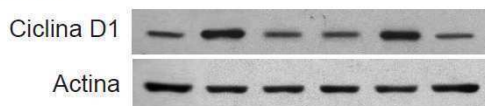


Veces de aumento 1 3,1 1,1 0,9 1,2 0,8 3

**B**

Células T47D

HRG (48 hs)	-	+	+	+	+	+
AG825	-	-	+	-	-	-
Inhibidor de Jak	-	-	-	+	-	-
siRNA Control	-	-	-	-	+	-
siRNA Stat3	-	-	-	-	-	+



Veces de aumento 1 3 1,8 1,7 2,9 0,9



Figura 22. La expresión de ciclina D1 es inducida por HRG a través de un mecanismo dependiente de ErbB2 y Stat3. Células C4HD (**A**) o T47D (**B**) fueron transfectadas o no con 25 nM de siRNAs contra ErbB2, Stat3 o control durante 72 hs; después de 24 hs de ayuno fueron preincubadas o no con AG825 10 μ M o con el inhibidor de Jak 1 μ M, y luego tratadas con HRG 40 ng/ml durante 48 hs. Los niveles de expresión de ciclina D1 fueron analizados por WB a partir de los extractos proteicos. Se reveló actina como control de carga y de especificidad de los tratamientos. Se muestran los resultados de la densitometría de las bandas de ciclina D1 normalizadas con las de actina, como veces de aumento respecto al control sin tratar de la primera calle. La densitometría mostró una disminución significativa de ciclina D1 en las células transfectadas con siRNA ErbB2, siRNA Stat3 y las pretratadas con los inhibidores de Jak y ErbB2, comparando con las transfectadas con siRNA Control ($p < 0,001$). A la derecha se muestran los WB de extractos de células C4HD (**A**) o T47D (**B**) transfectadas con 25 nM de siRNAs contra Stat3 o control durante 72 hs, para controlar la eficiencia del silenciamiento de Stat3 con los siRNAs, que fue de un 90% ($p < 0,001$).

Luego se evaluó si HRG regula la activación transcripcional del promotor de ciclina D1 mediante la inducción de la unión de Stat3 a sus elementos respondedores. Células C4HD y T47D fueron transfectadas con una construcción del promotor de ciclina D1 humano de 1745 pares de bases de longitud, ubicado río arriba del gen de la luciferasa. Este promotor (esquemático en la figura 23 A) contiene sitios de unión a Stat3, denominados sitios GAS (por *gamma interferon activating site*, de secuencia TTN₅AA), en las posiciones -984, -568, -475, -239, -68 y -27, y fue descrito

previamente por Bromberg y colaboradores (Leslie *et al.* 2006). El tratamiento con HRG resultó en un aumento de la activación del promotor de ciclina D1 de 3 a 4 veces en ambos tipos celulares, que fue inhibido de manera concentración-dependiente por la cotransfección con un vector de expresión de una forma dominante negativa de Stat3, Stat3Y705F (figura 23 B y C). Esta mutante posee una mutación puntual en el codón 705, una sustitución de tirosina por fenilalanina, que provoca la reducción de la fosforilación en tirosina de la proteína Stat3 salvaje endógena y por lo tanto inhibe la dimerización y la unión de Stat3 al ADN (Bromberg *et al.* 1998; Bromberg *et al.* 1999; Li y Shaw 2002).

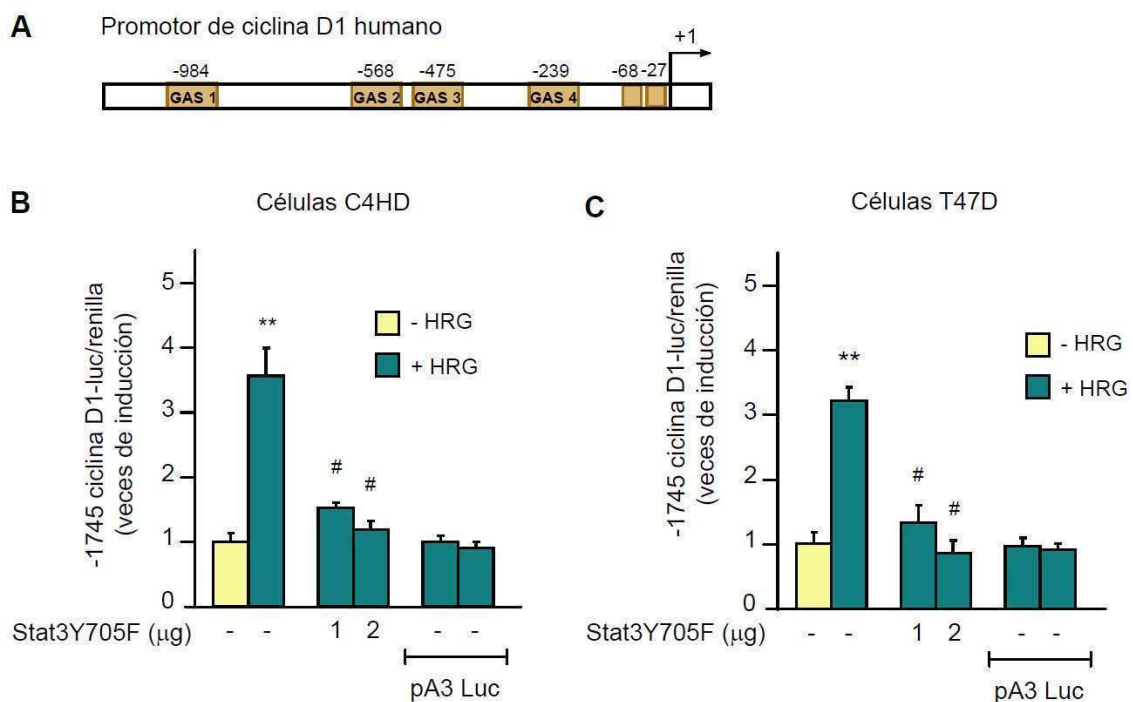


Figura 23. HRG induce la activación del promotor de ciclina D1 vía la unión de Stat3 a sus elementos respondedores. **A.** Esquema del promotor de ciclina D1 humano. Los rectángulos marrones representan los sitios de unión a Stat3 (sitios GAS). Se muestra como “+1” el sitio de inicio de la transcripción. Células C4HD (**B**) o T47D (**C**) fueron transfectadas durante 48 o 24 hs, respectivamente, con 1 µg/ml de la construcción del promotor de ciclina D1 humano de 1745 pb de longitud ubicado río arriba del gen de la luciferasa, junto con 10 ng/ml de luciferasa *Renilla* (utilizado para corregir variaciones internas en las eficiencias de transfección) y con las cantidades indicadas del vector de expresión de Stat3Y705F. La cantidad total de ADN transfectado fue estandarizada agregando el plásmido vacío pcDNA3.1. Como control se transfectó con 1 µg/ml del vector reportero pA3 Luc que carece del promotor de ciclina D1. Luego de 24 hs de ayuno, las células transfectadas fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml durante 24 hs. Los resultados están presentados como veces de inducción de actividad luciferasa respecto a la de las células sin tratar creciendo en DMEM+F12 (primera barra). Los datos presentados representan la media de seis experimentos independientes para cada tipo celular ± SEM. ** vs sin HRG (primera barra), # vs tratado con HRG (segunda barra): p<0,001.

Para demostrar más exhaustivamente que HRG activa al promotor de ciclina D1 a través de la unión de Stat3 a las secuencias GAS, células C4HD fueron transfectadas con distintas construcciones del promotor de ciclina D1 truncado en las posiciones -963, -261 y -141, en las que se excluyeron uno, tres o cuatro sitios GAS, respectivamente (figura 24 A). Sorpresivamente, la capacidad de HRG de inducir la activación transcripcional del promotor de ciclina D1 disminuyó significativamente cuando fue eliminado el sitio de unión a Stat3 en la posición -984, y no se encontró un efecto inhibitorio adicional por la pérdida del resto de los sitios GAS (figura 24 B). Para evaluar si solamente el sitio GAS en la posición -984 es necesario para la actividad transcripcional de Stat3 en el promotor de ciclina D1, células C4HD fueron transfectadas con una construcción generada por mutagénesis dirigida, en la que los sitios GAS -568, -475 y -239 fueron mutados de TTN₅AA a AAN₅AA, denominada Δ GAS2/3/4 (Leslie *et al.* 2006). Al utilizar este vector reportero en el que el sitio GAS -984 permanece intacto, se obtuvo que HRG tampoco fue capaz de activar al promotor de ciclina D1 a través de Stat3 (figura 24 B), de manera que los demás sitios GAS -568, -475 y -239, o al menos alguno de ellos, también son necesarios para la actividad transcripcional de Stat3 en el promotor de ciclina D1.

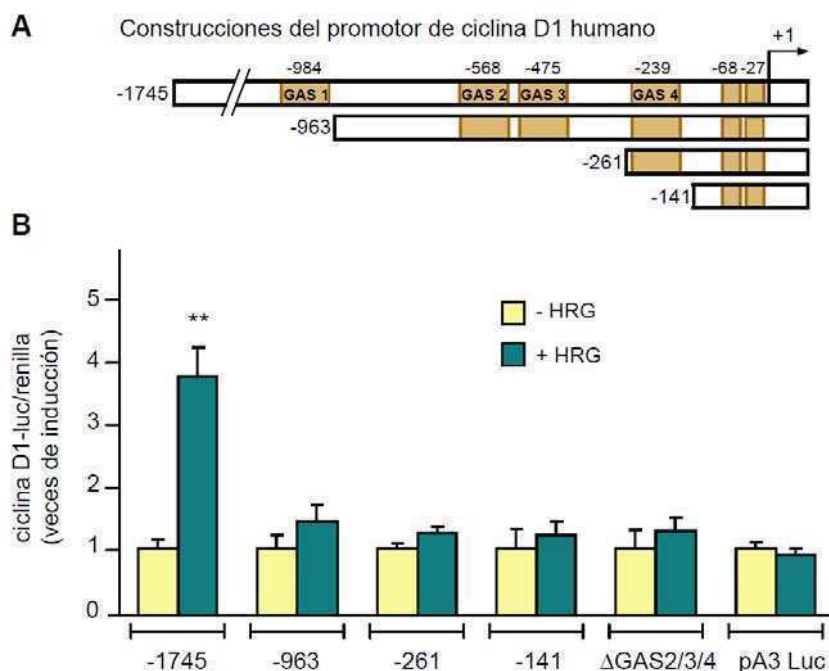


Figura 24. Los sitios GAS son necesarios para la activación HRG-dependiente del promotor de ciclina D1. A. Esquemas de la construcción del promotor de ciclina D1 humano de 1745 pb de longitud ubicado río arriba del gen de la luciferasa y de las construcciones truncadas del promotor en las posiciones -963, -

261 y -141. Los rectángulos marrones representan los sitios GAS. **B.** Células C4HD fueron transfectadas como en la figura 23, con 1 µg/ml del plásmido reportero -1745 ciclina D1-luc o las construcciones truncadas, junto con 10 ng/ml de luciferasa *Renilla*. Los tratamientos y la presentación de datos se realizó como en la figura 23. Los datos representan las media de tres experimentos ± SEM. ** vs sin tratar (primera barra), # vs tratado con HRG (segunda barra): p<0,001.

HRG induce la acción de ErbB2 como coactivador de Stat3

El siguiente objetivo fue evaluar específicamente si ErbB2 actúa como coactivador transcripcional de Stat3 en el mecanismo de la activación del promotor de ciclina D1 inducida por HRG. Células C4HD fueron transfectadas con la construcción del promotor proximal de ciclina D1 de 1745 pares de bases (pb) río arriba del gen de la luciferasa y se cotransfectaron con cantidades crecientes del vector de expresión de ErbB2 salvaje (hErbB2WT) o con la mutante de ErbB2 incapaz de translocar al núcleo (hErbB2ΔNLS). Como se muestra en la figura 25 A, la sobreexpresión de hErbB2WT aumentó fuertemente y de manera concentración-dependiente la activación transcripcional del promotor de ciclina D1 inducida por HRG. En ausencia de HRG, la sobreexpresión de ErbB2 no provocó una modulación de los niveles basales de transcripción. Cuando las células fueron transfectadas con 0,5 a 2 µg de hErbB2ΔNLS, HRG no fue capaz de inducir la activación del promotor de ciclina D1 (figura 25 A). Este hallazgo es consistente con la función de ErbB2ΔNLS como inhibidor dominante negativo de la migración nuclear del receptor endógeno, tal como identificamos en este trabajo (figura 15). En estas condiciones, Stat3 se encuentra activa en el núcleo, ya que, como se mostró en la figura 14, su migración es independiente de la de ErbB2, pero no es capaz de activar la transcripción de ciclina D1 si ErbB2 no está disponible en el núcleo, revelando una función de ErbB2 como coactivador, necesaria para la actividad transcripcional de Stat3.

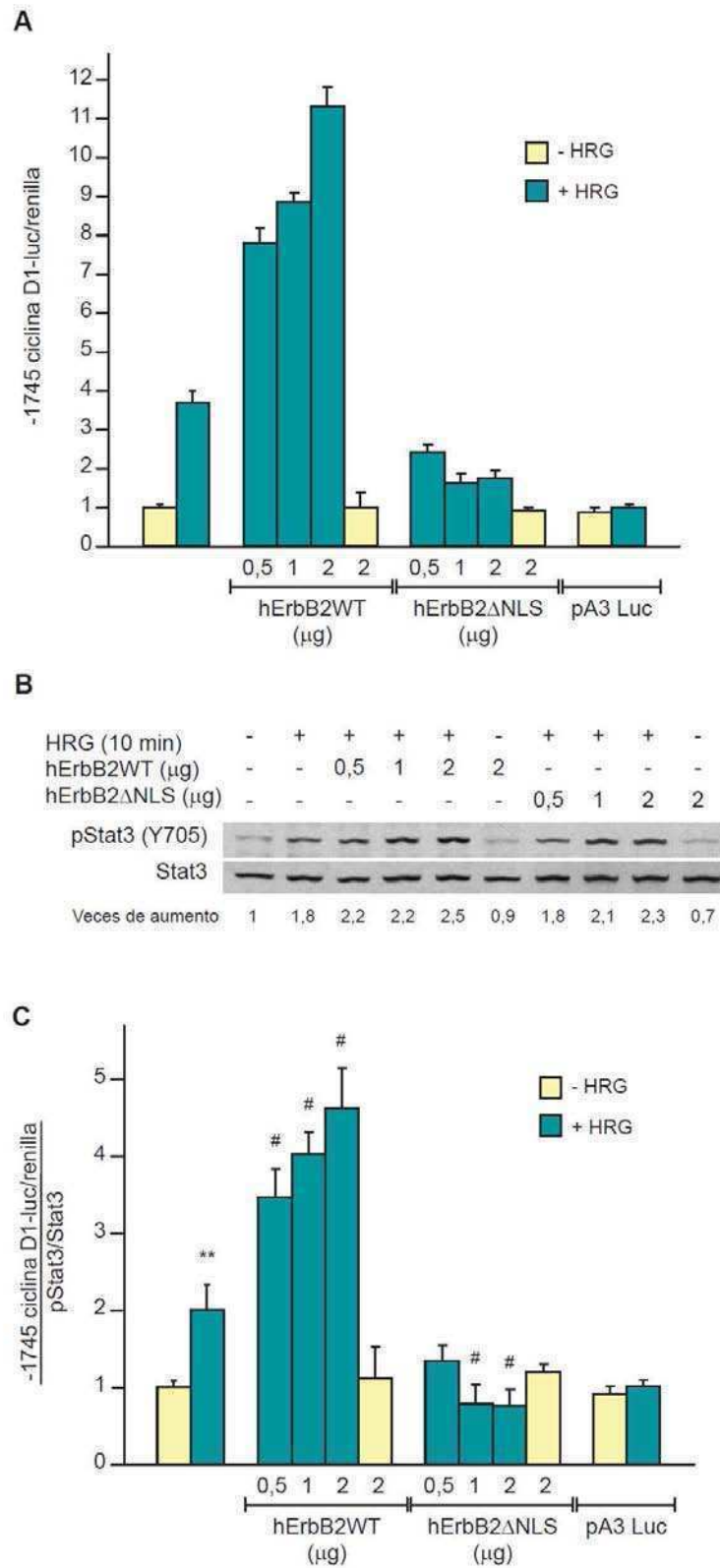


Figura 25. *ErbB2* actúa de coactivador de *Stat3* en el promotor de ciclina *D1*. **A.** Células C4HD fueron transfectadas durante 48 hs con 1 µg/ml del plásmido reportero -1745 ciclina D1-luc o pA3 Luc y cotransfectadas con 10 ng/ml de luciferasa *Renilla* y con las cantidades indicadas de los plásmidos de expresión hErbB2WT o hErbB2ΔNLS. La cantidad total de ADN transfectado fue estandarizada agregando los plásmidos vacíos pMe18SM o pEGFP-N1. Luego de 24 hs de ayuno, las células fueron

tratadas o no con HRG 40 ng/ml durante 24 hs. Los resultados están presentados como veces de inducción de actividad luciferasa respecto a la de las células sin tratar (primera barra). **B.** En paralelo, células C4HD fueron transfectadas con las cantidades indicadas de hErbB2WT o hErbB2 Δ NLS, llevando a la misma cantidad total de ADN con los plásmidos vacíos pMe18SM o pEGFP-N1. Después de 24 hs de ayuno fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml durante 10 min. Los extractos proteicos fueron analizados por WB con un anticuerpo anti pY705Stat3, y después del *stripping* la membrana fue revelada con un anticuerpo contra Stat3. Se muestran los resultados de la densitometría de las bandas de pStat3 normalizadas con las de Stat3, como veces de aumento respecto al control sin tratar de la primera calle. **C.** Las unidades relativas de actividad luciferasa obtenidas en **A** fueron divididas por los resultados de la densitometría mostrada en **B**, y los resultados se muestran como veces de inducción de actividad relativa del promotor de ciclina D1 respecto a la de las células sin tratar (primera barra). Los datos presentados representan la media de cinco experimentos independientes \pm SEM. ** vs sin HRG (primera barra), # vs tratado con HRG (segunda barra): $p < 0,001$.

En este trabajo se está definiendo una nueva clase de complejo transcripcional en el que el factor de transcripción (Stat3) es un blanco río abajo de su coactivador putativo (ErbB2). Es decir, el tratamiento con HRG induce la activación de ErbB2 en la membrana plasmática, lo que provoca la fosforilación y posterior translocación nuclear de Stat3. Pero esto no es suficiente para que Stat3 actúe de factor de transcripción, sino que es necesario que ErbB2 también transloque al núcleo para ser utilizado por Stat3 como coactivador. Dada la naturaleza de este complejo transcripcional, es de esperar que la transfección de las células con hErbB2WT resulte en una mayor cantidad de Stat3 activa y por lo tanto disponible en el núcleo (junto con ErbB2) para aumentar la transcripción de ciclina D1. Para independizarnos de la activación transcripcional del promotor de ciclina D1 dada por el aumento de Stat3 activa en el núcleo, se evaluaron los niveles de fosforilación de Stat3 en tirosina 705, como medida de su activación. En paralelo con los ensayos de actividad luciferasa se realizaron extractos proteicos de células transfectadas de la misma manera y fueron sometidos a ensayos de *Western Blot*. La transfección de las células C4HD con cantidades crecientes de hErbB2WT o hErbB2 Δ NLS resultó en un aumento concentración-dependiente en los niveles de fosforilación de Stat3 en Y705 tras la estimulación con HRG (figura 25 B). Para normalizar por esta modulación en los niveles de activación de Stat3, las unidades de actividad luciferasa obtenidas en la figura 25 A fueron divididas por los valores de la densitometría de las bandas de fosfo Stat3/Stat3 total de la figura 25 B y se obtuvo el gráfico mostrado en la figura 25 C. Los resultados muestran que la inducción de la actividad transcripcional de Stat3 en el promotor de ciclina D1 no fue debida a un aumento de los niveles de fosforilación de Stat3 en Y705, sino a la colaboración de

ErbB2 en la actividad transcripcional de Stat3 inducida por HRG. Estos hallazgos sugieren una nueva función de ErbB2 como coactivador transcripcional de Stat3.

Además de los ensayos de actividad luciferasa con el plásmido reportero que contiene el promotor de ciclina D1, se evaluaron los niveles de expresión proteica de ciclina D1 en células C4HD transfectadas con cantidades crecientes de hErbB2 Δ NLS. La figura 26 muestra que los niveles de expresión de la proteína ciclina D1 inducida por HRG fueron reducidos significativamente y concentración-dependiente en las células que expresan hErbB2 Δ NLS, en comparación con las células transfectadas con el plásmido vacío. Estos resultados junto con los anteriores, demuestran que la expresión de ciclina D1 inducida por HRG está regulada por un complejo nuclear compuesto por Stat3 y ErbB2, en el que ErbB2 actuaría de coactivador del factor de transcripción Stat3.

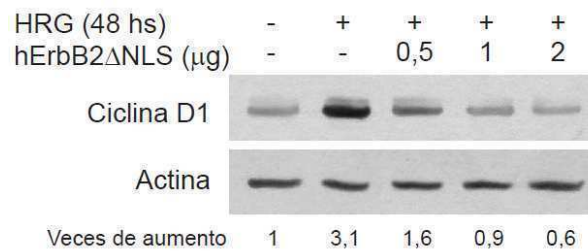


Figura 26. La localización de ErbB2 en el núcleo celular es necesaria para la expresión proteica de ciclina D1 inducida por HRG. Células C4HD fueron transfectadas por 48 hs con las cantidades indicadas de hErbB2 Δ NLS, llevando a la misma cantidad total de ADN con el plásmido vacío pEGFP-N1. Luego de 24 hs de ayuno, las células fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml durante 48 hs. Los niveles de expresión de ciclina D1 fueron analizados por WB a partir de los extractos proteicos. Se reveló actina como control de carga y de especificidad de los tratamientos. Se muestran los resultados de la densitometría de las bandas de ciclina D1 normalizadas con las de actina, como veces de aumento respecto al control sin tratar de la primera calle. La densitometría mostró una disminución significativa de ciclina D1 en las células transfectadas con 0,5, 1 y 2 μ g de hErbB2 Δ NLS, con respecto a las transfectadas solamente con plásmido vacío y tratadas con HRG (segunda calle) ($p < 0,001$).

Para explorar más profundamente la función de ErbB2 como coactivador de Stat3, aprovechamos el modelo desarrollado de silenciamiento y reconstitución de ErbB2 en las células C4HD cotransfectadas con el vector reportero ciclina D1-luciferasa. En primer lugar, encontramos que el silenciamiento de la expresión de ErbB2 con siRNAs resultó en un bloqueo de la activación transcripcional del promotor de ciclina D1 inducida por HRG (figura 27 A). La reconstitución de la expresión de ErbB2 salvaje

restauró la capacidad de HRG de estimular la activación del promotor de ciclina D1. Por el contrario, la transfección de las células con distintas cantidades de hErbB2 Δ NLS no fue capaz de restituir la actividad transcripcional de Stat3 dependiente de HRG en el promotor de ciclina D1 (figura 27). El análisis de los datos se realizó como en la figura 25 y se presenta como en esa figura, para normalizar de acuerdo a los niveles de activación de Stat3.

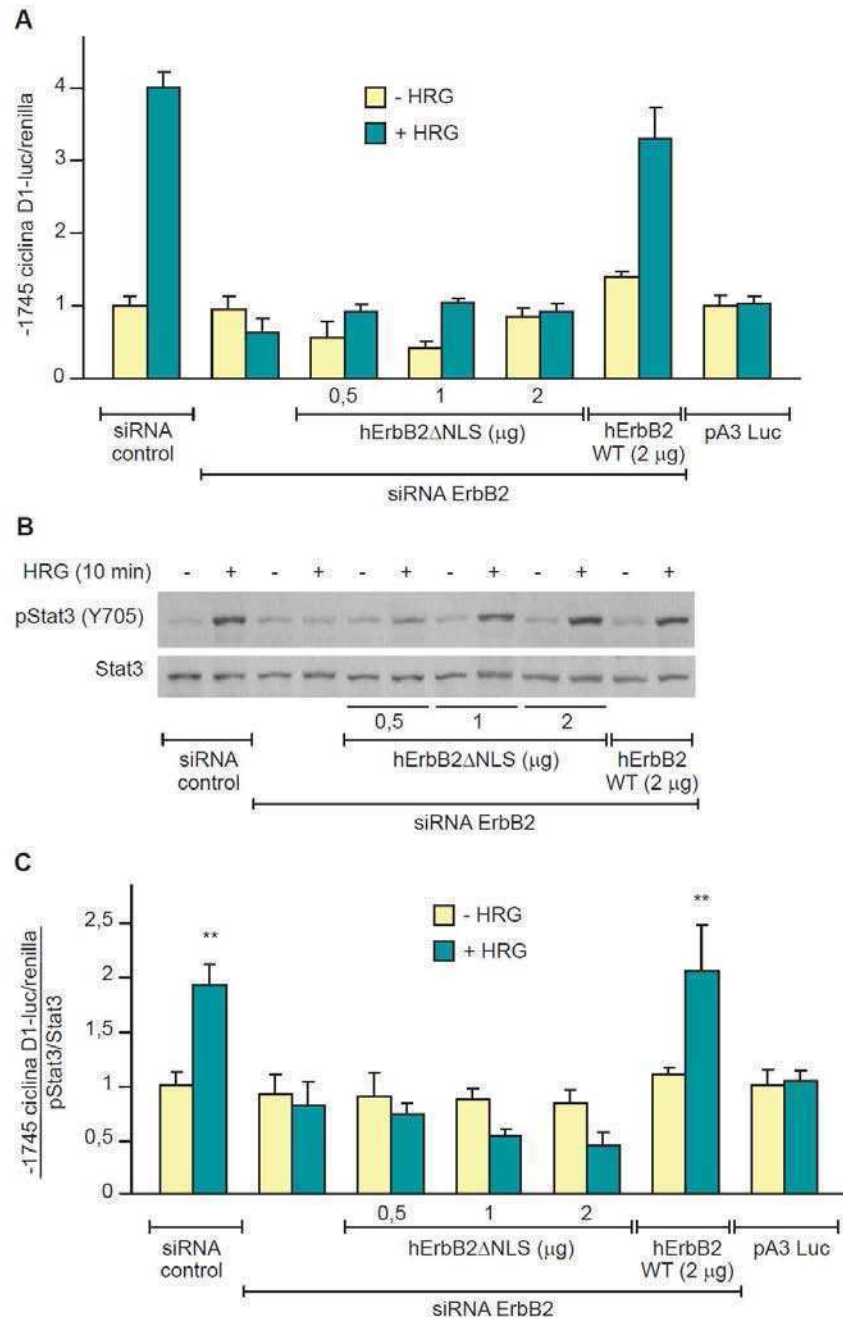


Figura 27. ErbB2 actúa de coactivador de Stat3 en el promotor de ciclina D1 de células que no expresan ErbB2 endógeno. A. Células C4HD fueron transfectadas durante 72 hs con 1 μ g/ml del plásmido reportero

-1745 ciclina D1-luc o pA3 Luc, con 10 ng/ml de luciferasa *Renilla* y cotransfectadas con las cantidades indicadas de los plásmidos de expresión hErbB2WT o hErbB2ΔNLS, junto con 25 nM de siRNAs contra ErbB2 o control. La cantidad total de ADN transfectado fue estandarizada agregando el plásmido vacío pEGFP-N1. Luego de 24 hs de ayuno, las células fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml durante 24 hs. Los resultados se presentan como en la figura 25 A. **B.** En paralelo, células C4HD fueron transfectadas con las cantidades indicadas de hErbB2WT o hErbB2ΔNLS, llevando a la misma cantidad total de ADN con el plásmido pEGFP-N1, y cotransfectadas con 25 nM de siRNAs contra ErbB2 o control. Después de 24 hs de ayuno fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml durante 10 min. Los extractos proteicos fueron analizados por WB como en la figura 25 B. **C.** Las unidades de actividad luciferasa mostradas en **A** fueron divididas por los resultados de la densitometría obtenida en **B**, y los resultados se muestran como en la figura 25 C. Los datos representan la media de tres experimentos independientes \pm SEM. ** vs sin HRG: $p < 0,001$.

Con el propósito de confirmar que el rol de ErbB2 como coactivador de Stat3 no está restringido al promotor de ciclina D1 o a un tipo celular en particular, células T47D y C4HD fueron transfectadas con un plásmido reportero de luciferasa que contiene cuatro copias del sitio de unión a Stat3 de alta afinidad “m67”, denominado p4xm67-tk-luc (Bromberg *et al.* 1999). La cotransfección con cantidades crecientes de hErbB2WT provocó un fuerte aumento y de manera concentración-dependiente de la actividad transcripcional de Stat3 inducida por HRG en este promotor (figura 28 A y B). Nuevamente, los datos de esta figura están presentados como en la figura 25.

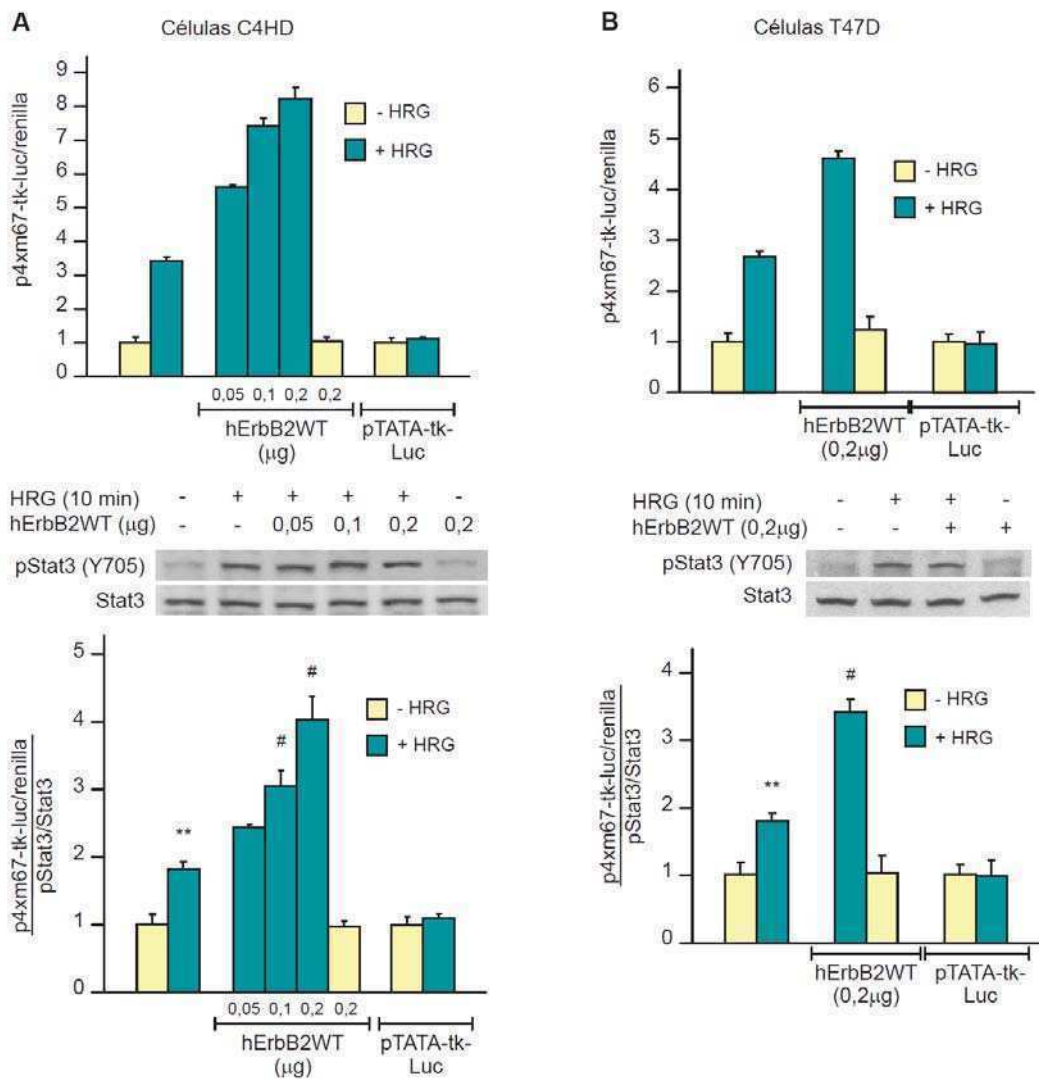


Figura 28. El rol de ErbB2 como coactivador de Stat3 no está restringido al promotor de ciclina D1. Células C4HD (A) o T47D (B) fueron transfectadas durante 48 o 24 hs, respectivamente, con 1 µg/ml de un plásmido reportero de luciferasa que contiene cuatro copias del sitio de unión a Stat3 de alta afinidad “m67” (p4xm67-tk-luc) o con un vector reportero pTATA-tk-Luc que carece de la inserción m67, como control. Las células se cotransfectaron junto con 10 ng/ml de luciferasa *Renilla* y con las cantidades indicadas del vector de expresión hErbB2WT. La cantidad total de ADN transfectado fue estandarizada agregando el plásmido vacío pMe18SM. Luego de 24 hs de ayuno, las células fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml durante 24 hs. Los resultados se presentan como en la figura 25 A. En los paneles del medio se muestran los resultados de los WB de los extractos proteicos de las células transfectadas con hErbB2WT o el vector vacío pMe18SM, en los que se evaluaron los niveles de pStat3 y Stat3 total como en la figura 25 B. Los histogramas de los paneles inferiores muestran el resultado de la división de la actividad luciferasa por la densitometría de los niveles de pStat3/Stat3, tal como se realizó en la figura 25 C. Los datos representan la media de tres experimentos independientes ± SEM. ** vs sin HRG (primera barra), # vs tratado con HRG (segunda barra): p<0,001.

Unión del complejo transcripcional Stat3/ErbB2 en el promotor de ciclina D1

Con el objetivo de explorar la asociación específica de Stat3 y ErbB2 con la cromatina en un contexto de células vivas, utilizamos la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Primero se evaluó la capacidad de HRG de reclutar ambas proteínas al promotor de ciclina D1 murino en células C4HD. Las células fueron tratadas o no con HRG y luego del *crosslinking* se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti Stat3, anti ErbB2 o anti IgG como control de especificidad. Para la PCR se empleó un par de *primers* que flanquea los sitios GAS -971, -874 y -852 del promotor de ciclina D1 murino, representados con flechas rojas en el esquema de la figura 29 A. El estímulo con HRG desde 30 minutos hasta 2 horas indujo una asociación significativa y específica tanto de Stat3 como de ErbB2 nuclear a los sitios de unión a Stat3 del promotor de ciclina D1 de ratón, siendo la máxima asociación a los 60 minutos de tratamiento (figura 29 A). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los experimentos de microscopía confocal, en los que se detectó una fuerte colocalización nuclear de ambas proteínas tras la estimulación con HRG durante una hora (figura 10 A). Resulta interesante destacar que la unión de Stat3 y ErbB2 al promotor de ciclina D1 ocurre al mismo tiempo; se observa una cinética similar a los tiempos estudiados, sugiriendo que estas proteínas actúan juntas en el proceso de activación de la transcripción de ciclina D1.

También se evaluó si HRG induce la unión de Stat3 y ErbB2 al promotor de ciclina D1 humano, utilizando células T47D y dos pares de *primers* distintos para la PCR: un par flanquea el sitio GAS -984 y el segundo par flanquea los sitios -568 y -475, representados con flechas rojas en el esquema de la figura 29 B. El tratamiento con HRG durante una hora resultó en la unión de Stat3 y ErbB2 a las dos regiones con sitios GAS evaluadas (figura 29 B). Como se espera de una interacción específica de Stat3 y ErbB2 con el promotor de ciclina D1, el análisis mediante PCR utilizando *primers* que amplifican una región codificante del gen de GAPDH, no mostró una asociación de las proteínas con este gen (figura 29 A y B, paneles inferiores).

Para validar y cuantificar estos resultados, los productos de ChIP provenientes de células C4HD y T47D fueron sometidos a ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real. Se diseñó un par de *primers* que flanquea los sitios GAS -971 y -874 del promotor de ciclina D1 murino y otro par que flanquea el sitio GAS -984 del promotor humano, representados con flechas verdes discontinuas en los esquemas de la figura 29 A y B. El

tratamiento de ambos tipos celulares con HRG durante una hora provocó un incremento de 4 a 5 veces de la unión de Stat3, y de 3 a 4 veces de la unión de ErbB2 a los sitios GAS del promotor de ciclina D1, con respecto a las células sin tratar (figura 29 C y D).

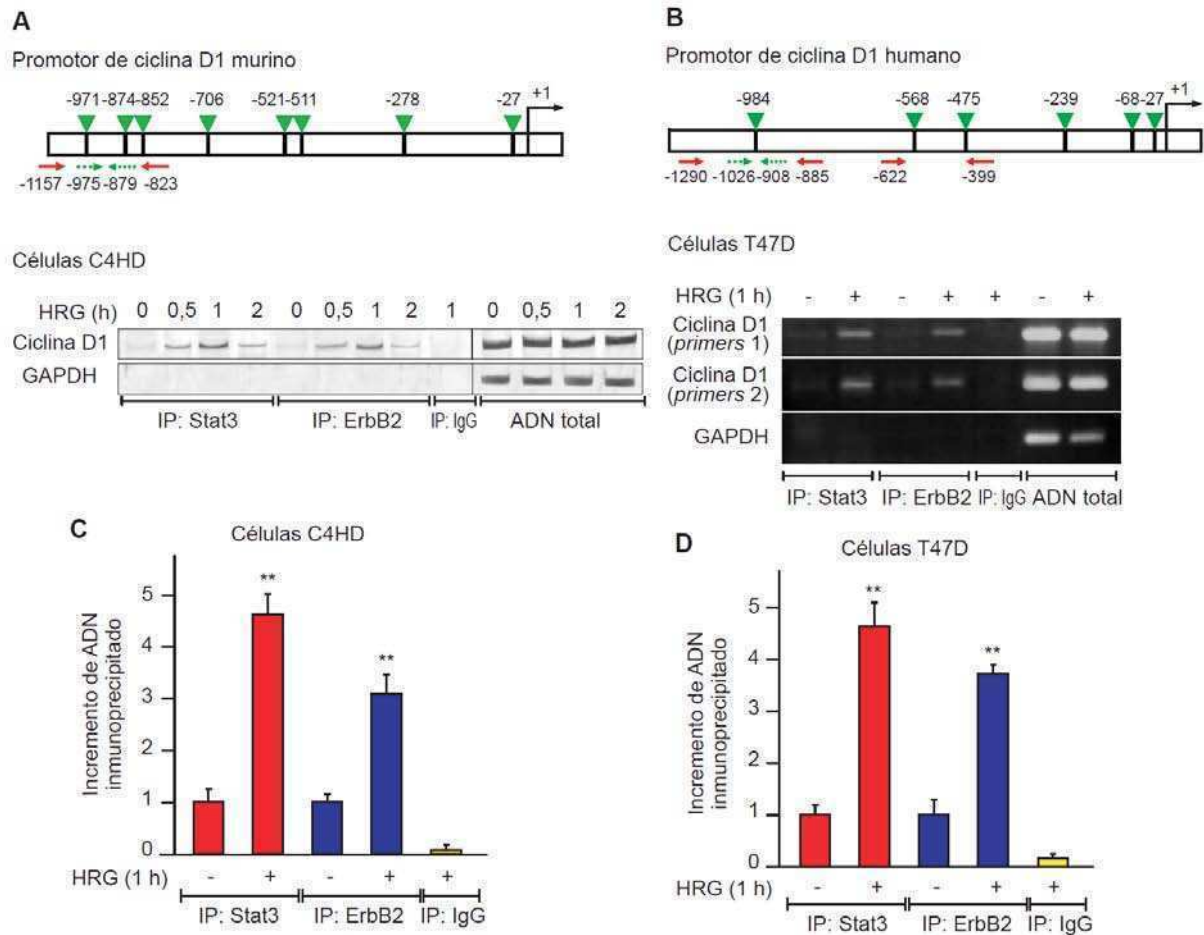


Figura 29. HRG induce el reclutamiento de Stat3 y ErbB2 al promotor de ciclina D1. Paneles superiores: esquemas de los promotores de ciclina D1 murino (A) y humano (B). Los triángulos verdes representan los sitios GAS; las flechas rojas representan los *primers* utilizados para la PCR convencional, y las flechas verdes discontinuas, los *primers* utilizados para la PCR cuantitativa en tiempo real (las secuencias de los *primers* están detalladas en los Materiales y Métodos). Bajo las flechas se indican las posiciones de los extremos 5' de los *primers forward* y *reverse*. Se ensayó la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) sobre extractos de células C4HD (A) y T47D (B). Las células fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml por los tiempos indicados y se prepararon las cromatinas, como se describe en Materiales y Métodos, para inmunoprecipitar Stat3, ErbB2 o IgG de conejo como control de especificidad. El ADN inmunoprecipitado y el total (como control de carga) se amplificó mediante PCR. A, panel inferior: los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida 8% y para visualizar las bandas se tiñeron los geles con plata. B, panel inferior: los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa 2% con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz UV. Las bandas correspondientes a ciclina D1 obtenidas por ambos métodos se densitometraron y se normalizaron con las bandas obtenidas del ADN total correspondiente, obteniendo un aumento significativo del reclutamiento de Stat3 y ErbB2 en las células estimuladas durante 1 h ($p < 0,001$). C y D. Los productos de ChIP provenientes de células C4HD (C) y T47D (D) tratadas con HRG durante 1 h, fueron sometidos a ensayos

de PCR cuantitativa en tiempo real. Los números arbitrarios obtenidos para cada muestra fueron divididos por los obtenidos para el ADN total sin inmunoprecipitar para cada tratamiento, estableciendo en 1 los valores de las muestras sin tratar, y determinando las veces de incremento de ADN inmunoprecipitado relativo a ese punto. Los resultados representan la media de cuatro experimentos independientes \pm SEM. ** vs sin tratar: $p < 0,001$.

Con los resultados de la figura 29 mostramos que tanto Stat3 como ErbB2 son capaces de unirse al promotor de ciclina D1 y esta ocupación se ve incrementada en células tratadas con HRG. Evaluamos a continuación si HRG induce una asociación simultánea de ambas proteínas en el promotor del gen de ciclina D1, mediante ensayos de ChIP secuencial o re-ChIP. Para esto, las cromatinas provenientes de células C4HD y T47D tratadas o no con HRG por una hora, fueron primero inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti Stat3, y el complejo cromatina/proteína eluido asociado a Stat3 fue re-inmunoprecipitado con un anticuerpo anti ErbB2. Como control de especificidad de los anticuerpos se inmunoprecipitó las dos veces con IgG. El análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando los mismos *primers* de la figura 29 C y D para células murinas y humanas, respectivamente, evidenció que Stat3 y ErbB2 co-ocupan los sitios GAS del promotor de ciclina D1, y el estímulo con HRG aumentó 4 veces la unión simultánea de ambas proteínas en los dos tipos celulares, con respecto a las células sin tratar (figura 30 A y B).

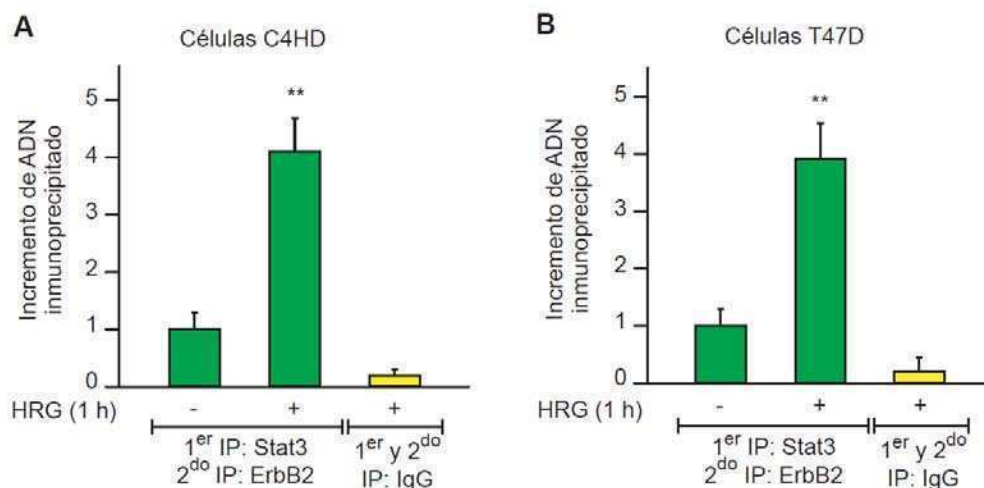


Figura 30. HRG induce la asociación simultánea de Stat3 y ErbB2 en el promotor de ciclina D1. Las cromatinas de células C4HD (A) y T47D (B) tratadas o no con HRG 40 ng/ml por 1 h fueron primero inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti Stat3 y luego re-inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti ErbB2, o se utilizó las dos veces una IgG de conejo como control de especificidad. El ADN se amplificó por PCR en tiempo real utilizando los *primers* esquematizados con flechas verdes discontinuas en la figura 29. Los números obtenidos para cada muestra fueron divididos por los obtenidos para el ADN total,

estableciendo en 1 los valores de las muestras sin tratar, y determinando las veces de incremento de ADN inmunoprecipitado relativo a ese punto. Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes \pm SEM. ** vs sin tratar: $p < 0,001$.

Con el propósito de corroborar estos resultados en otras líneas celulares de cáncer de mama humano, se repitió el ensayo de re-ChIP en las células BT-474 y MCF-7. Los experimentos de re-ChIP seguidos de la cuantificación de los productos por PCR en tiempo real demostraron que el tratamiento con HRG en las células BT-474 indujo un aumento de 8 veces en la unión simultánea de Stat3 y ErbB2 en los sitios GAS del promotor de ciclina D1 (figura 31 A), y en las células MCF-7 este aumento fue de 2 veces con respecto a las células sin tratar (figura 31 B).

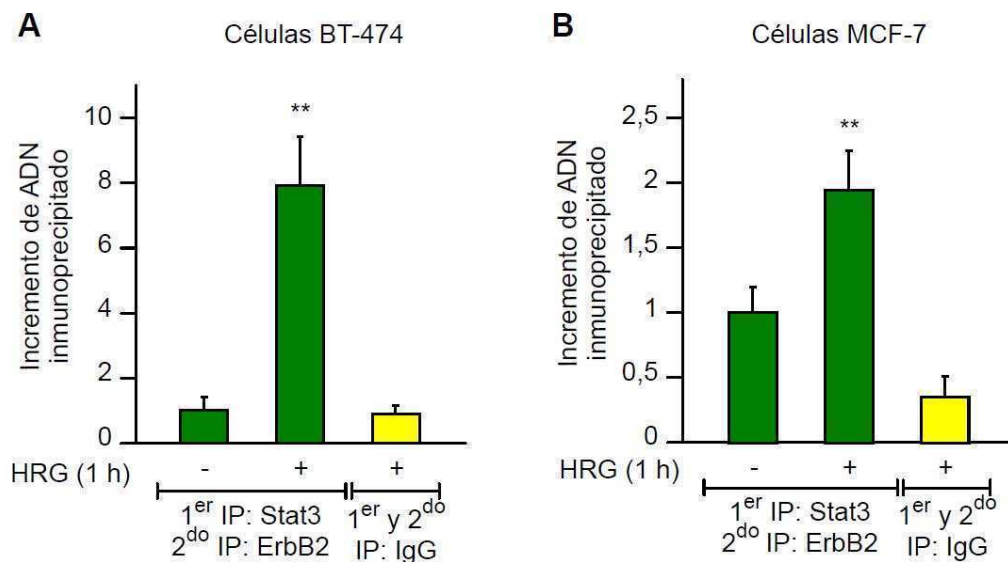


Figura 31. HRG induce el co-reclutamiento de Stat3 y ErbB2 al promotor de ciclina D1 de distintas líneas celulares de cáncer de mama humano. Se repitió el experimento de re-ChIP mostrado en la figura 30, con cromatina proveniente de células BT-474 (A) y MCF-7 (B) tratadas o no por 1 h con HRG 40 ng/ml. Los resultados se muestran como en la figura 30, y representan la media de dos experimentos independientes \pm SEM. ** vs sin tratar: $p < 0,001$.

Hipotetizamos que la unión del complejo Stat3/ErbB2 en el promotor de ciclina D1 resultaría en un aumento en la expresión de ciclina D1. Para poner a prueba esta hipótesis, se evaluaron los niveles de expresión proteica de ciclina D1 inducida por HRG en las distintas líneas celulares de cáncer de mama humano. Los ensayos de *Western Blot* de la figura 32 muestran que el tratamiento con HRG durante 48 hs indujo la expresión de la proteína ciclina D1 en las tres líneas celulares.

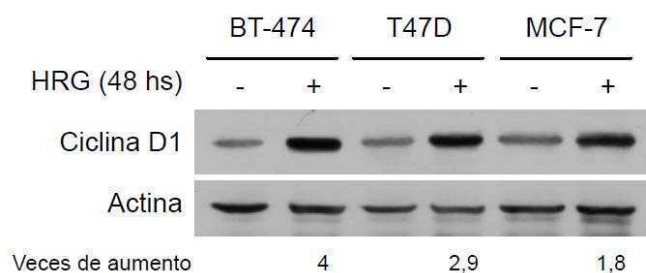


Figura 32. La expresión de ciclina D1 es inducida por HRG en distintas líneas celulares de cáncer de mama humano. Células BT-474, T47D y MCF-7 fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml durante 48 hs. Los niveles de expresión de ciclina D1 fueron analizados por WB a partir de los extractos proteicos. Se reveló actina como control de carga y de especificidad del tratamiento. Se muestran los resultados de la densitometría de las bandas de ciclina D1 normalizadas con las de actina, expresada como veces de aumento de la proteína por el tratamiento con HRG respecto al control sin tratar de cada línea celular. Este experimento fue repetido tres veces con resultados similares. La densitometría mostró un aumento significativo de ciclina D1 en las células tratadas con HRG comparando con las no tratadas ($p < 0,001$).

La localización nuclear de ErbB2 es fundamental para la proliferación de células de cáncer de mama

Ciclina D1 es una proteína clave para la progresión del ciclo celular, en particular para la transición de la fase G1 a S. Para investigar la correlación entre la proliferación celular y la translocación nuclear de ErbB2 y consiguiente asociación del complejo Stat3/ErbB2 inducida por HRG, se evaluó la respuesta proliferativa a HRG *in vitro* de células C4HD que expresan la mutante de ErbB2 incapaz de translocar al núcleo, hErbB2 Δ NLS. Se empleó el método de incorporación de timidina tritiada para evaluar la síntesis de ADN como medida de la proliferación celular. Tal como se reportó en trabajos previos del laboratorio (Labriola *et al.* 2003), HRG fue capaz de inducir una respuesta proliferativa en las células C4HD, que fue bloqueada en células cuya expresión de ErbB2 fue silenciada con siRNAs (figura 33). Cuando se reconstituyó la expresión de ErbB2 con hErbB2WT, se recuperó la respuesta proliferativa a HRG. Por el contrario, las células reconstituidas con hErbB2 Δ NLS fueron insensibles al estímulo con HRG (figura 33). Como encontramos que la mutante hErbB2 Δ NLS actúa de inhibidor dominante negativo de la translocación nuclear del receptor endógeno, nos preguntamos si la transfección con hErbB2 Δ NLS en células C4HD que expresan ErbB2 endógeno, afectaría la proliferación inducida por HRG. Bajo estas condiciones, la respuesta a HRG también fue nula (figura 33). Caracterizamos entonces la función de

hErbB2 Δ NLS como inhibidor dominante negativo de los efectos proliferativos del receptor ErbB2 endógeno en estas células de cáncer de mama.

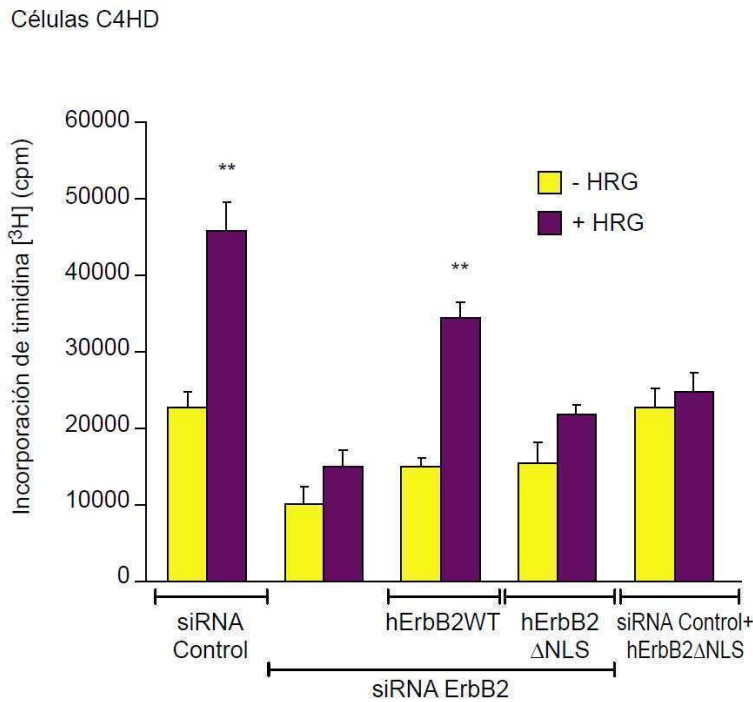


Figura 33. La localización nuclear de ErbB2 es fundamental para la proliferación in vitro de células C4HD. La expresión endógena de ErbB2 fue silenciada transfectando células C4HD durante 72 hs con siRNAs contra ErbB2 25 nM y se reconstituyó la expresión de hErbB2WT o hErbB2 Δ NLS cotransfectando con 2 μ g del plásmido. Como control, y para que todas las células tengan las misma cantidad de siRNA y plásmido, se transfectó con siRNA control 25 nM y con 2 μ g del plásmido vacío pMe18SM. Después de 24 hs de ayuno fueron tratadas con HRG 40 ng/ml durante 48 hs o permanecieron sin tratar. El ensayo de incorporación de timidina tritiada se utilizó como una medida de la síntesis de ADN. Los datos se presentan como la media de las cuentas por minuto \pm SD de octuplicados. ** vs sin HRG: $p < 0,001$. Se muestra un experimento representativo de tres.

Para ratificar estos hallazgos, se evaluó la proliferación por distribución del ciclo celular mediante ensayos de citometría de flujo de células teñidas con yoduro de propidio. La figura 34 A muestra que más del 50% de las células C4HD transfectadas con siRNA control se encontraron en las fases S y G2/M del ciclo celular al estimular con HRG, mientras que la mayoría de las células reconstituidas con hErbB2 Δ NLS quedaron arrestadas en G0/G1 tras el tratamiento con HRG. Cuando se mantuvo la expresión de ErbB2 endógeno, la mayoría de las células transfectadas con hErbB2 Δ NLS tampoco mostró una progresión del ciclo celular en respuesta a HRG

(figura 34 B). En conjunto, estos resultados revelan una correlación directa entre la localización de ErbB2 en el núcleo y la proliferación celular HRG-dependiente.

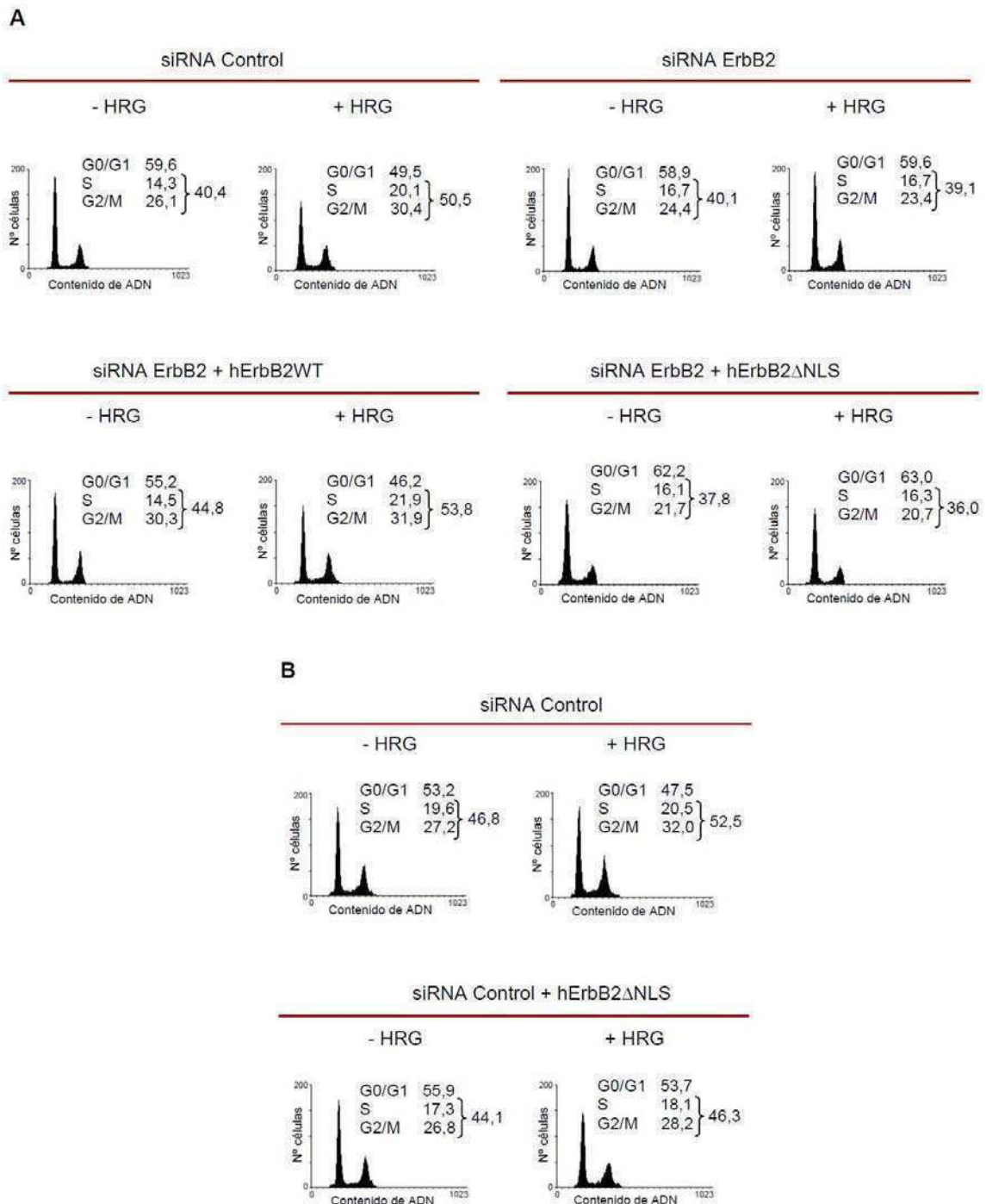


Figura 34. Proliferación de células C4HD que expresan hErbB2ΔNLS medida por distribución del ciclo celular. Células C4HD fueron transfectadas y tratadas tal como se describió en la figura 33. Luego, fueron teñidas con ioduro de propidio y se analizó su distribución en el ciclo celular por citometría de flujo. Están indicados los porcentajes de células totales en cada fase del ciclo celular. Estos experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

Actualmente, una de las terapias más ampliamente utilizadas en la clínica para tratar pacientes con cáncer de mama que sobreexpresa ErbB2, es el anticuerpo monoclonal humanizado contra ErbB2, trastuzumab (también conocido como Herceptin). Sin embargo, muchos pacientes desarrollan resistencia al trastuzumab. A pesar de la alta afinidad que posee el anticuerpo por el receptor y de la relativamente baja toxicidad que se ha observado en los pacientes, aproximadamente el 70% de los pacientes con cáncer de mama que sobreexpresa ErbB2 no responde al tratamiento con trastuzumab. Esto se debe a la resistencia al trastuzumab que el tumor posee *a priori* o bien por el desarrollo de la resistencia causada por el tratamiento (Kute *et al.* 2004).

En el presente trabajo, la inhibición de la localización de ErbB2 en el núcleo resultó ser una estrategia efectiva para inhibir la proliferación celular dependiente de HRG en células C4HD. Con el propósito de confirmar estos resultados en otras líneas celulares de cáncer de mama humano, y para comparar los efectos antiproliferativos del trastuzumab con los de la mutante hErbB2 Δ NLS, se evaluó la respuesta proliferativa de células que sobreexpresan ErbB2 y que, por lo tanto, son buenas candidatas para el tratamiento con trastuzumab. Células BT-474 transfectadas con un plásmido vacío (pcDNA3.1) mostraron una respuesta proliferativa al estímulo con HRG, medida por incorporación de timidina tritiada (figura 35 A). La transfección de estas células con hErbB2 Δ NLS anuló la respuesta a HRG, e incluso inhibió la proliferación basal. En cambio, el tratamiento con trastuzumab inhibió la proliferación basal, pero la dependiente de HRG fue inhibida parcialmente, la cual siguió siendo significativa con respecto a las células tratadas con trastuzumab y sin HRG (figura 35 A). En las células SK-BR-3 que también sobreexpresan fuertemente ErbB2, HRG indujo una fuerte respuesta proliferativa, que fue totalmente bloqueada por la transfección con hErbB2 Δ NLS (figura 35 B). La transfección con esta mutante incluso inhibió la proliferación basal. El tratamiento con trastuzumab de las células SK-BR-3 transfectadas con un plásmido vacío inhibió la proliferación basal y la inducida por HRG, pero la respuesta proliferativa a HRG siguió siendo significativa (figura 35 B). La línea celular JIMT-1 fue establecida a partir de células de cáncer de mama de una paciente que era clínicamente resistente a trastuzumab (Rennstam *et al.* 2007). La figura 35 C muestra que HRG indujo la proliferación de esta línea celular. La transfección de las células JIMT-1 con hErbB2 Δ NLS no sólo previno la respuesta proliferativa a HRG, sino que además provocó una significativa inhibición de la proliferación basal. Como era de esperar, el tratamiento con trastuzumab no afectó la proliferación de las células

JIMT-1 (figura 35 C). En conjunto, estos resultados muestran que la inhibición de la translocación de ErbB2 hacia el núcleo utilizando la mutante hErbB2 Δ NLS, resultó ser una estrategia más efectiva que el tratamiento con trastuzumab para inhibir la proliferación celular.

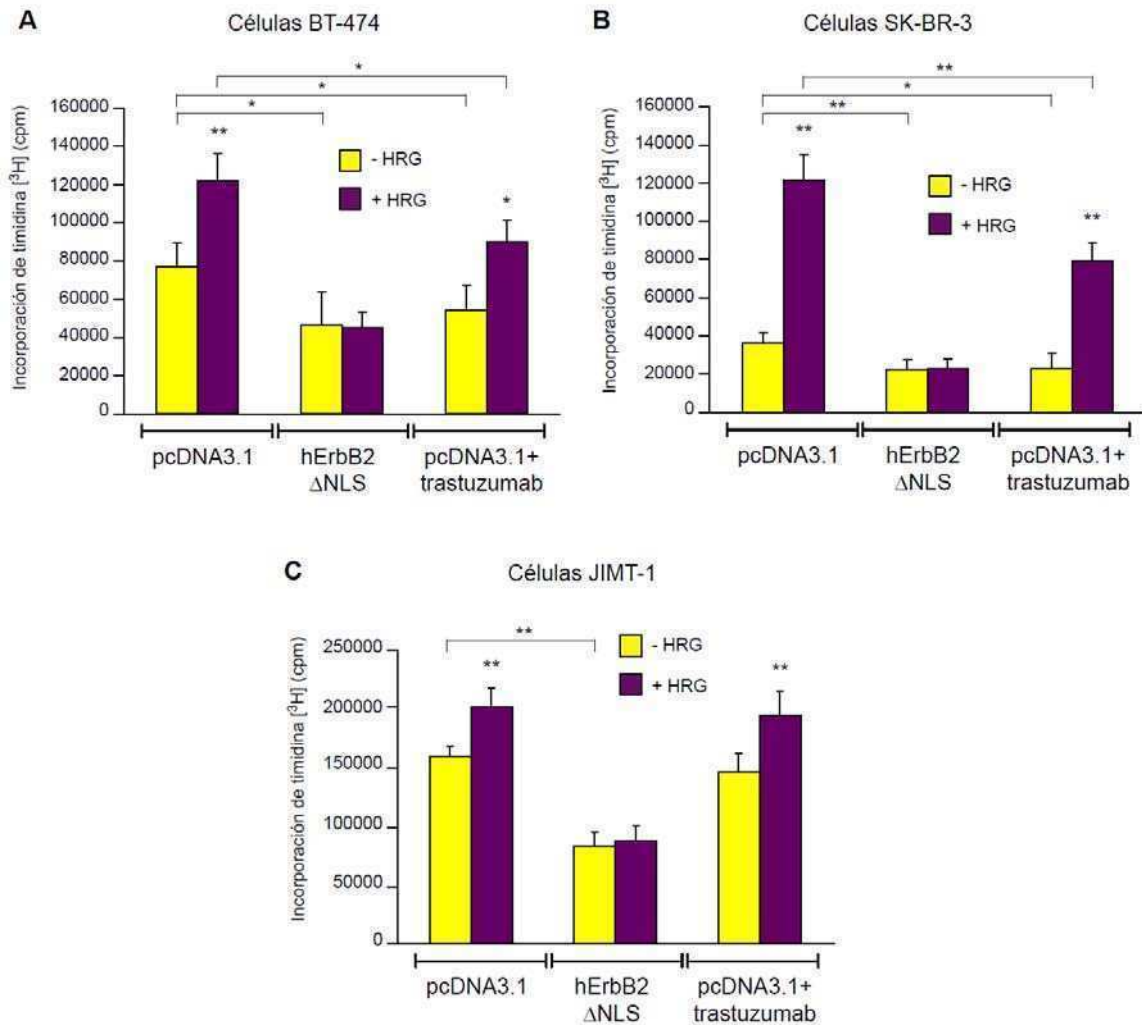


Figura 35. La inhibición de la translocación de ErbB2 al núcleo es más efectiva que el tratamiento con trastuzumab para inhibir la proliferación de células de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB2. Células BT-474 (A), SK-BR-3 (B) y JIMT-1 (C) fueron transfectadas durante 24 hs con 2 μ g del plásmido vacío pcDNA3.1 o hErbB2 Δ NLS. Después de 24 hs de ayuno fueron tratadas o no con HRG 40 ng/ml y en presencia o ausencia de 10 μ g/ml de trastuzumab durante 24 hs. El ensayo de incorporación de timidina tritiada se utilizó como una medida de la síntesis de ADN. Los datos se presentan como la media de las cuentas por minuto \pm SD de octuplicados. ** vs sin HRG o vs grupo indicado: p < 0,001; * vs sin HRG o vs grupo indicado: p < 0,01. Se muestra un experimento representativo de tres.

El bloqueo de la localización nuclear de ErbB2 inhibe el crecimiento *in vivo* de tumores mamarios

Como reportamos previamente (Labriola *et al.* 2003) y como muestra la figura 33, el factor de crecimiento HRG induce la proliferación de las células C4HD *in vitro*. Para establecer un modelo *in vivo* de crecimiento dependiente de HRG del tumor C4HD, desarrollamos un *pellet* de liberación lenta de HRG para inocular en ratones. El *pellet* fue elaborado encapsulando una mezcla de HRG liofilizada con seroalbúmina bovina (BSA) en un copolímero de acetato de etileno (“Elvax”) disuelto previamente en diclorometano. Como control, el *pellet* se preparó con BSA sola. Una vez comprobada la eficacia del *pellet* de HRG para promover el desarrollo de tumores *in vivo* a partir de células C4HD (resultados no mostrados), nos planteamos evaluar si la localización nuclear de ErbB2 inducida por HRG es también necesaria para el crecimiento de adenocarcinomas *in vivo*.

Cultivos primarios de células epiteliales C4HD fueron transfectados con el plásmido vacío pcDNA3.1 o con el vector de expresión de hErbB2 Δ NLS. Un millón de células fue inyectado subcutáneamente en la región tóraco-ventral de ratones hembras vírgenes NIH (S)-*nude*. A la vez, se les implantó de manera subcutánea y con ayuda de un trócar, los *pellets* de liberación lenta de HRG (conteniendo 5 μ g de HRG cada uno) o los de BSA sola en el mismo flanco donde se inocularon las células. Los ratones se separaron en tres grupos experimentales de 6 animales cada uno: un grupo control recibió el *pellet* de BSA y las células C4HD transfectadas con el plásmido vacío; otro grupo recibió el *pellet* de HRG y células transfectadas con plásmido vacío, y el tercer grupo recibió el *pellet* de HRG y células transfectadas con hErbB2 Δ NLS. Solamente los ratones que fueron implantados con el *pellet* de HRG desarrollaron adenocarcinomas mamarios. Los animales del grupo control que recibieron un *pellet* sin el factor de crecimiento no mostraron tumores durante el tiempo evaluado. Todos los tumores mamarios examinados fueron adenocarcinomas infiltrantes y no se observó presencia de metástasis. Todos los ratones del grupo que recibió el *pellet* de HRG y células transfectadas con plásmido vacío desarrollaron tumores que fueron palpables a la semana de la inoculación. Por el contrario, sólo 3 de los 6 animales del grupo inyectado con células transfectadas con hErbB2 Δ NLS desarrollaron tumores. Como se muestra en la figura 36, la expresión del vector hErbB2 Δ NLS en las células C4HD inhibió en un 83,8% el crecimiento tumoral inducido por HRG ($p < 0,001$). La media del tamaño

tumoral y la tasa de crecimiento de los tumores desarrollados a partir de las células transfectadas con hErbB2 Δ NLS fueron significativamente menores que aquellas de los tumores con plásmido vacío (tabla 1 y figura 36).

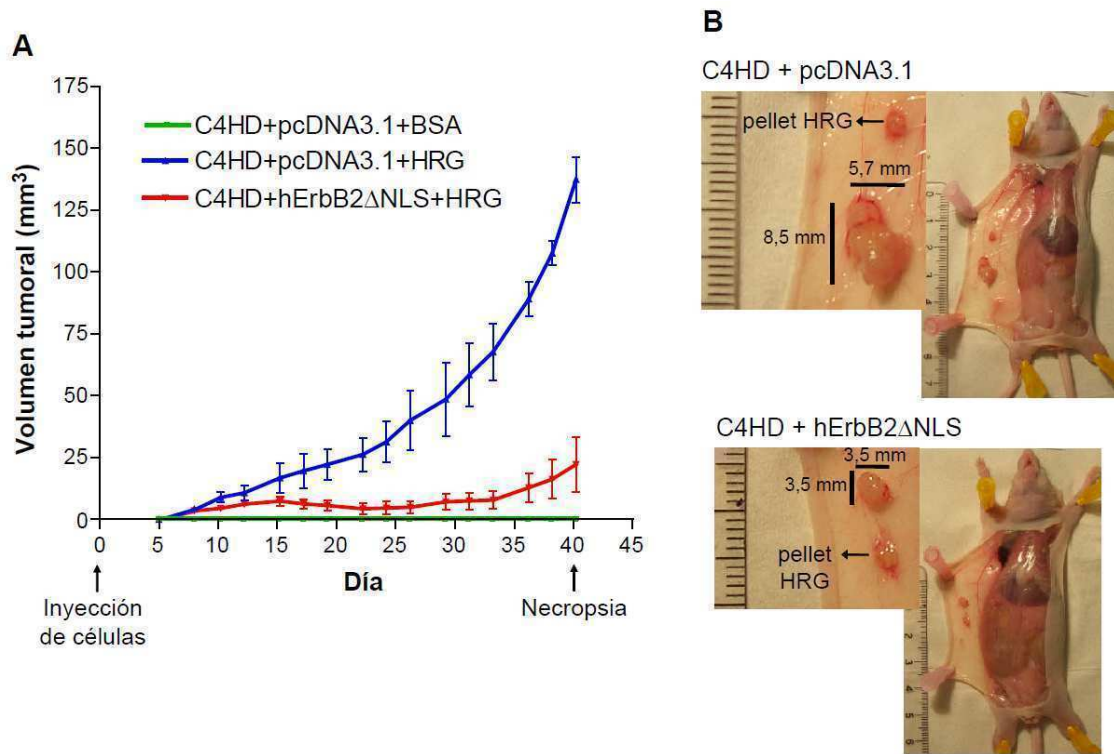


Figura 36. El bloqueo de la localización nuclear de ErbB2 inhibe el crecimiento in vivo HRG-dependiente de tumores mamarios C4HD. **A.** Células C4HD fueron transfectadas por 48 hs con el plásmido vacío pcDNA3.1 o con hErbB2 Δ NLS. Un millón de células fue inyectado s.c. en la región tóraco-ventral de ratones hembras vírgenes NIH (S)-nude. A la vez, se les implantó s.c. *pellets* de HRG (5 μ g cada uno) o de BSA sola en el mismo flanco donde se inocularon las células. Los ratones se separaron en tres grupos experimentales de 6 animales cada uno: un grupo recibió el *pellet* de BSA y las células C4HD transfectadas con pcDNA3.1; otro grupo recibió el *pellet* de HRG y células transfectadas con pcDNA3.1, y el tercer grupo recibió el *pellet* de HRG y células transfectadas con hErbB2 Δ NLS. Los volúmenes tumorales fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos. Cada punto representa el volumen tumoral medio \pm SEM de 6 tumores para todos los grupos experimentales excepto para C4HD+ hErbB2 Δ NLS+HRG que contenía 3 tumores. **B.** Fotografías representativas de tumores provenientes de células transfectadas con pcDNA3.1 o con hErbB2 Δ NLS, desarrollados con HRG. En los recuadros de la izquierda se muestran los tumores detallados con sus medidas correspondientes.

Tabla 1. Crecimiento de los tumores C4HD

Grupo experimental	Media del volumen tumoral (mm ³) ± SEM	Tasa de crecimiento (mm ³ /día) ± SEM
C4HD+pcDNA3.1+HRG	137,4 ± 9,2	3,1 ± 0,2
C4HD+hErbB2ΔNLS+HRG	22,2 ± 11,2 *	0,37 ± 0,08 *

Los volúmenes tumorales fueron calculados al día 40 post-inyección de células, como $(L \times A^2)/2$, donde L=largo (mm) y A=ancho (mm). Las tasas de crecimiento tumoral fueron determinadas como las pendientes de las curvas de crecimiento. * $p < 0,001$ con respecto a C4HD+pcDNA3.1+HRG.

Al día 40 post-inyección, los animales fueron sacrificados y los tumores extraídos. Los análisis histopatológicos revelaron que los tumores de los ratones que recibieron las células transfectadas con hErbB2ΔNLS mostraron un grado histológico de II, con 3 a 5 mitosis por 10 campos de alta resolución (HPF), mientras que los tumores del grupo experimental que recibió las células transfectadas con el plásmido vacío presentaron un grado histológico de III con más de 7 mitosis por 10 HPF, con muy escasa formación de túbulos y un acentuado pleomorfismo celular (figura 37 A). Todos los tumores de este último grupo presentaron además infiltración de la neoplasia en planos musculares, mientras que los tumores desarrollados a partir de células transfectadas con hErbB2ΔNLS, no exhibieron infiltración muscular. Se examinó también el estado de activación de ErbB2, Stat3 y Akt en ejemplares de extractos tumorales de ambos grupos experimentales. La fosforilación de Akt se evaluó como cascada de señalización clásicamente activada por ErbB2. Los niveles de fosforilación de ErbB2, Stat3 y Akt en los tumores desarrollados a partir de células transfectadas con el plásmido vacío fueron similares a los provenientes de células con hErbB2ΔNLS (figura 37 B). Esto indica que durante el desarrollo tumoral, la mutante hErbB2ΔNLS provocó una inhibición del crecimiento manteniendo sus funciones citoplasmáticas y de membrana intactas.

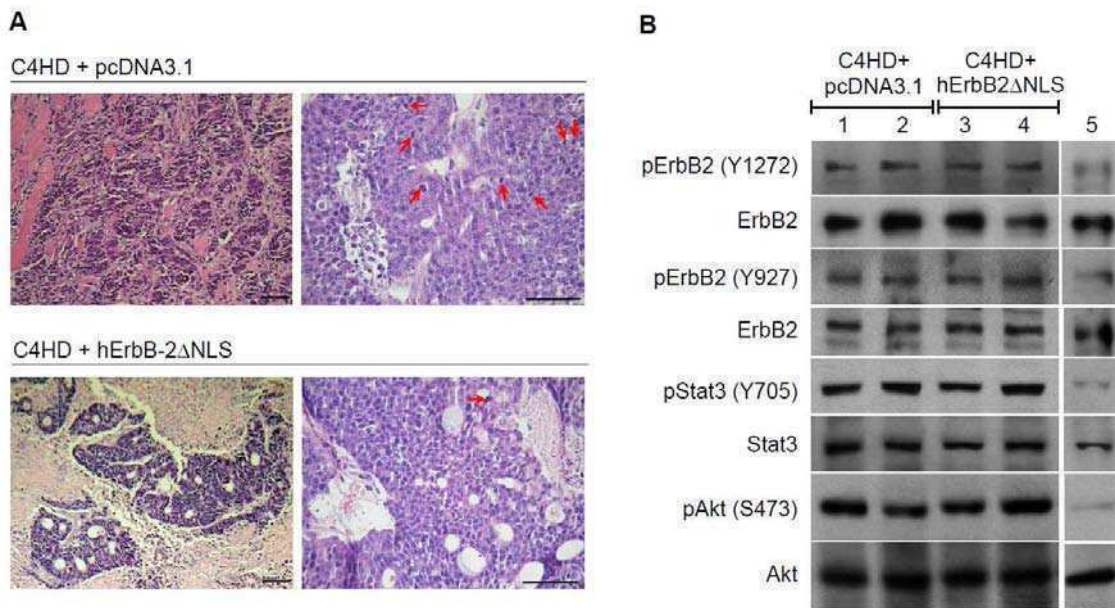


Figura 37. Exámenes histopatológicos y moleculares de los tumores mamarios C4HD. Al día 40 post-inyección, los animales fueron sacrificados y los tumores extraídos. **A.** Secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina. En las fotografías representativas superiores se aprecia una neoplasia epitelial maligna de grado III compuesta predominantemente por brotes sólidos, algunos interconectados, pleomorfismo celular moderado a acentuado, sin formación de túbulos; la lesión infiltra en planos musculares. En las fotografías inferiores se observa una neoplasia epitelial maligna de grado II, con pleomorfismo celular moderado a acentuado, áreas de necrosis y con formación de túbulos. En las fotografías de la derecha se indican las mitosis con flechas rojas. Barras de escala: 100 μ m. **B.** Con los tumores C4HD se realizaron extractos proteicos y 25 μ g fueron analizados por WB. Las membranas reveladas con los anticuerpos contra las formas fosforiladas de las proteínas, fueron luego sometidas a *stripping* y reveladas con anticuerpos contra las proteínas totales. Se muestra el resultado de dos tumores representativos de cada grupo. En la calle 5 se sembró un extracto total de células C4HD provenientes de cultivo celular, sin tratar con HRG, como control del estado de fosforilación de las proteínas. El WB se repitió tres veces con resultados similares.

Las células humanas JIMT-1, resistentes a trastuzumab, son capaces de crecer y desarrollar tumores xenotransplantados en ratones *nude* (Rennstam *et al.* 2007). El siguiente objetivo fue entonces evaluar la importancia del rol de ErbB2 nuclear en los tumores xenotransplantados establecidos a partir de esta línea celular, y comparar los efectos del trastuzumab con los de la mutante hErbB2 Δ NLS en el crecimiento tumoral. Para esto, células JIMT-1 creciendo en cultivo fueron transfectadas con el plásmido vacío pcDNA3.1 o con el vector de expresión de hErbB2 Δ NLS. Cuatro millones de células fueron inyectadas subcutáneamente en la región tóraco-ventral de ratones hembras vírgenes NIH (S)-*nude*. Cuando los tumores xenotransplantados desarrollados a partir de las células transfectadas con el plásmido vacío alcanzaron un volumen medio

de 40 mm^3 , los animales fueron divididos al azar en tres grupos experimentales de 8 ratones cada uno. Un grupo recibió dos inyecciones semanales de trastuzumab en dosis de 20 mg/kg ; otro grupo fue inyectado dos veces por semana con dosis iguales de IgG humana, y el tercer grupo permaneció sin tratar. Todos los ratones de estos últimos tres grupos desarrollaron tumores que fueron palpables a los 4 días de la inoculación. Por el contrario, sólo 2 de los 8 animales del grupo inyectado con células transfectadas con hErbB2 Δ NLS desarrollaron tumores que fueron palpables recién a partir del día 40 post-inyección. La expresión del vector hErbB2 Δ NLS en las células JIMT-1 provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 97% ($p < 0,001$) (figura 38 y tabla 2). Como era de esperar, el tratamiento de los ratones con trastuzumab no inhibió significativamente el crecimiento tumoral (tabla 2 y figura 38).

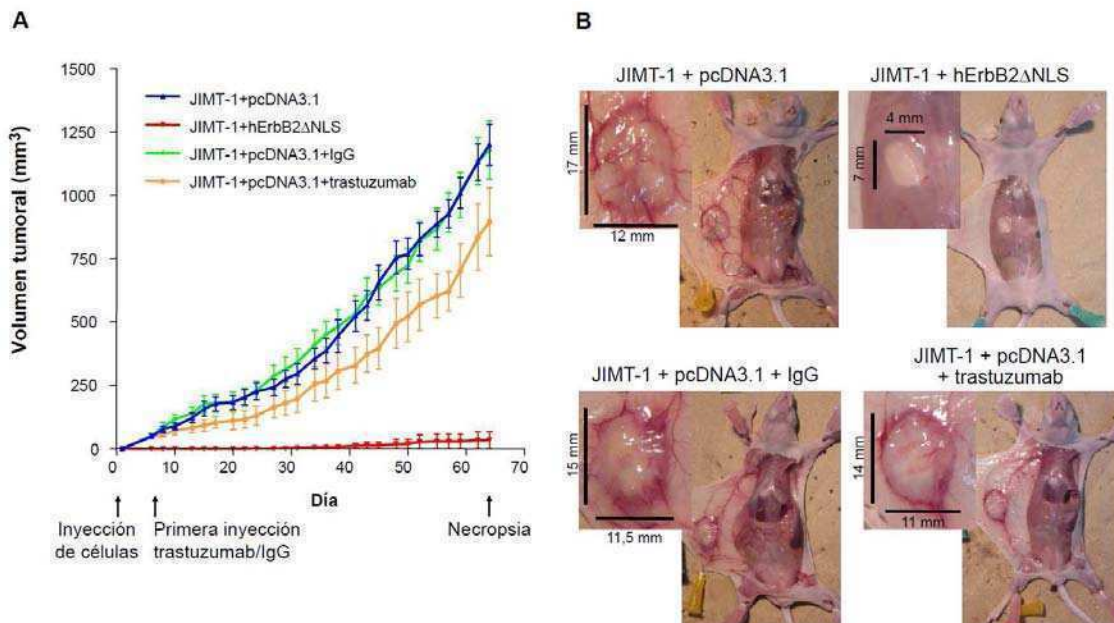


Figura 38. El bloqueo de la localización nuclear de ErbB2 inhibe el crecimiento in vivo de tumores xenotransplantados JIMT-1. Células JIMT-1 fueron transfectadas durante 48 hs con el plásmido vacío pcDNA3.1 o con hErbB2 Δ NLS. Cuatro millones de células fueron inyectadas s.c. en la región tóracoventral de ratones hembras vírgenes NIH (S)-nude. Cuando los tumores desarrollados a partir de las células transfectadas con pcDNA3.1 alcanzaron un volumen medio de 40 mm^3 , los animales fueron divididos al azar en tres grupos experimentales de 8 ratones cada uno. Un grupo recibió 2 inyecciones semanales de 20 mg/kg de trastuzumab ($400 \mu\text{g}$ por ratón); otro grupo fue inyectado 2 veces por semana con dosis iguales de IgG humana, y el tercer grupo permaneció sin tratar. Cada punto representa el volumen tumoral medio \pm SEM de 8 tumores para todos los grupos experimentales excepto para JIMT-1+hErbB2 Δ NLS que contenía sólo 2 tumores. **B.** Fotografías representativas de tumores xenotransplantados desarrollados de los cuatro grupos experimentales. En los recuadros de la izquierda se muestran los tumores detallados con sus medidas correspondientes.

Tabla 2. Crecimiento de los tumores xenotransplantados JIMT-1

Grupo experimental	Media del volumen tumoral (mm ³) ± SEM	Tasa de crecimiento (mm ³ /día) ± SEM
JIMT-1+pcDNA3.1	1199,6 ± 81,2	18,64 ± 0,57
JIMT-1+hErbB2ΔNLS	33,4 ± 31 *	0,59 ± 0,15 *
JIMT-1+pcDNA3.1+IgG	1177,9 ± 99,5	17,93 ± 0,65
JIMT-1+pcDNA3.1+trastuzumab	894,4 ± 124,7	12,96 ± 0,71

Los volúmenes tumorales y las tasas de crecimiento tumoral fueron calculados al día 64 post-inyección de células, como se describió en la tabla 1. * p<0,001 con respecto a JIMT-1+pcDNA3.1.

Los análisis histopatológicos de ejemplares de pulmón, ganglios, corazón, hígado y páncreas provenientes de ratones utilizados para los dos experimentos de las figuras 36 y 38, revelaron que no se desarrollaron metástasis y tampoco se observó toxicidad en ningún órgano (resultados no mostrados). Asimismo, no se observó pérdida de peso en ningún animal.

En conjunto, estos dos experimentos *in vivo* muestran que ErbB2 juega un rol en el núcleo celular que es fundamental para el crecimiento de tumores mamarios.



**RESULTADOS
SEGUNDA PARTE**

El acetato de medroxiprogesterona (MPA) induce la activación de ErbB2 y su migración hacia el núcleo

En trabajos anteriores del laboratorio se demostró que el tratamiento prolongado con el progestágeno sintético MPA en las células C4HD provoca un aumento de los niveles de expresión de ErbB2, así como la estimulación de la fosforilación en tirosina de ErbB2 (Balana *et al.* 1999). En este trabajo evaluamos los efectos sobre ErbB2 del tratamiento con MPA por tiempos cortos. La estimulación de las células C4HD con MPA indujo la fosforilación de ErbB2 en el sitio de autofosforilación Y1272 y en el residuo Y927, desde los 5 minutos, con un pico de fosforilación a los 30 minutos y declinando hacia las 2 horas de tratamiento (figura 39 A). Los efectos estimulatorios de MPA sobre la fosforilación de ErbB2 fueron inhibidos por la pre-incubación con el antagonista del receptor de progesterona RU486, y por el silenciamiento de la expresión del gen del PR con siRNAs (figura 39 A). El panel inferior de la figura 39 A muestra que el siRNA contra PR efectivamente silenció en un 70% la expresión de PR. En la línea celular de cáncer de mama humano T47D, también se observó la activación de ErbB2 inducida por MPA, con una cinética de fosforilación similar a la de las células murinas (figura 39 B). Para explorar más exhaustivamente el rol del PR, se repitieron los experimentos en la línea celular T47D-Y, derivada de la línea T47D, que no expresa PR. Encontramos que en estas células, MPA no tuvo efecto sobre la fosforilación de ErbB2 en ninguno de los residuos evaluados. Sin embargo, en las células T47D-Y transfectadas establemente con la isoforma B del PR (T47D-Y-PR-B), el tratamiento con MPA indujo una fuerte fosforilación de ErbB2 en ambos residuos (figura 39 B). Estos resultados indican que MPA regula la activación de ErbB2 actuando a través del receptor clásico de progesterona.

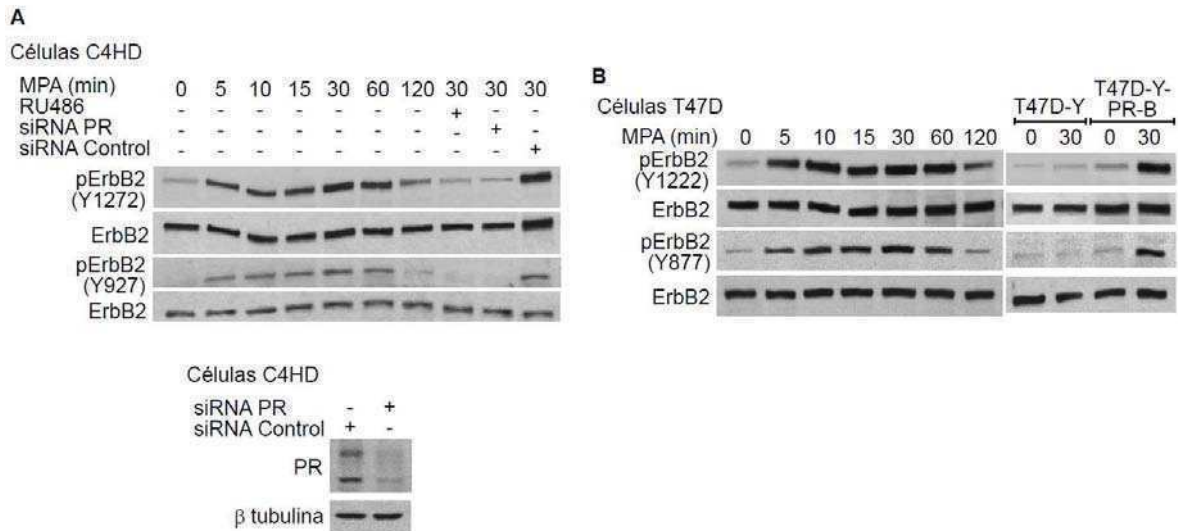


Figura 39. MPA induce la fosforilación de ErbB2 a través del receptor clásico de progesterona. **A.** Células C4HD fueron transfectadas durante 72 hs con 25 nM de RNAs de interferencia (siRNAs) dirigidos contra PR o con siRNA control como control de especificidad, o bien fueron pretratadas con RU486 10 nM y luego tratadas con MPA 10 nM durante los tiempos indicados. Se prepararon extractos celulares que se analizaron por *Western Blot* (WB) utilizando anticuerpos contra las formas fosforiladas en tirosina (pY) de ErbB2 en los residuos 1272 y 927. Las membranas fueron luego sometidas a *stripping* y reveladas con un anticuerpo contra ErbB2. Los WB mostrados son representativos de cinco experimentos. En el panel inferior se muestran los WB de extractos de células C4HD transfectadas con 25 nM de siRNAs contra PR o control durante 72 hs, para controlar la eficiencia del silenciamiento de PR con los siRNAs, que fue de un 70% ($p < 0,001$). **B.** Células T47D, T47D-Y y T47D-Y-PR-B fueron tratadas con MPA 10 nM durante los tiempos indicados. Los extractos proteicos se analizaron por WB como en **A**. Los experimentos mostrados fueron repetidos tres veces con resultados similares. La densitometría de pErbB2 normalizada con ErbB2 en **A** y **B** mostró un aumento significativo de la fosforilación en las células C4HD, T47D y T47D-Y-PR-B tratadas con MPA por 5 a 60 min comparando con las no tratadas, y una disminución de la fosforilación en las células C4HD causada por el RU486 y siRNA PR con respecto a las transfectadas con siRNA Control ($p < 0,001$).

La activación de la proteína quinasa Src por progestágenos en células de tumores mamarios está bien estudiada, incluso en el modelo tumoral murino C4HD (Migliaccio *et al.* 1998; Boonyaratanakornkit *et al.* 2001; Proietti *et al.* 2005). Por otro lado, trabajos de nuestro laboratorio y de otros grupos han mostrado que Src actúa como un efector río arriba de ErbB2 (Guo *et al.* 2006; Xu *et al.* 2007; Proietti *et al.* 2009; Rivas *et al.* 2010). Por lo tanto, hipotetizamos que Src estaría involucrada en la fosforilación de ErbB2 inducida por MPA. La figura 40 muestra que la inhibición de la actividad de Src utilizando el inhibidor farmacológico PP2, impidió la fosforilación de ErbB2 inducida por MPA en los residuos Y1272/1222 y Y927/877 de las células C4HD (figura 40 A) y T47D (figura 40 B). Para confirmar la participación de Src en la activación de ErbB2

mediada por los efectos rápidos (no genómicos) del PR unido a su ligando, se utilizó la línea celular T47D-Y transflectada establemente con una mutante de la isoforma B del PR (T47D-Y-PR-BmPro). Esta mutante tiene las tres prolinas 422, 423 y 427, ubicadas en el dominio rico en prolinas del PR, reemplazadas por alanina. Este dominio del receptor fue definido como absolutamente requerido para su interacción con Src y la consecuente activación de cascadas de señalización (Boonyaratanakornkit *et al.* 2001; Carnevale *et al.* 2007), de manera que esta mutante es incapaz de activar las vías rápidas de señalización, incluyendo a Src. Consistente con los hallazgos previos del laboratorio en los que se demostró que Src activada por progestágenos actúa como un activador río arriba de ErbB2 (Proietti *et al.* 2009), no se observó la fosforilación de ErbB2 en tirosina en respuesta a MPA en las células T47D-Y-PR-BmPro (figura 40 C). Por otro lado, repetimos los experimentos en células T47D-Y transflectadas establemente con una mutante de la isoforma B del PR que contiene una mutación puntual en una cisteína conservada en el primer dedo de zinc del dominio de unión al ADN (T47D-Y-C587A-PR) (Tung *et al.* 1993). Esta mutante no es capaz de unirse al ADN pero es totalmente hábil para inducir la activación de Src, p42/44 MAPKs y Akt en respuesta a progestágenos (Boonyaratanakornkit *et al.* 2001; Carnevale *et al.* 2007). En la figura 40 C se muestra que en estas células, contrariamente a lo observado en las T47D-Y-PR-BmPro, MPA fue capaz de inducir una fuerte fosforilación de ErbB2 en los dos residuos evaluados.

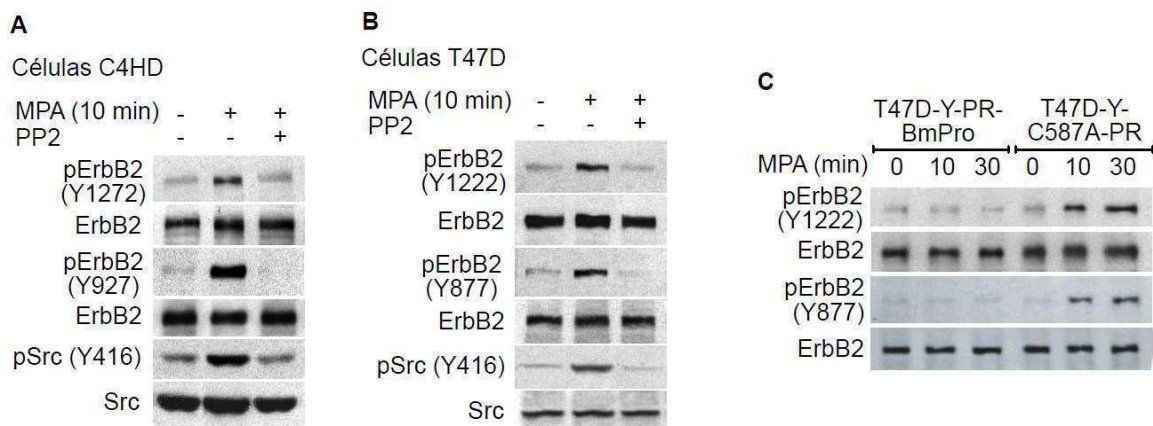
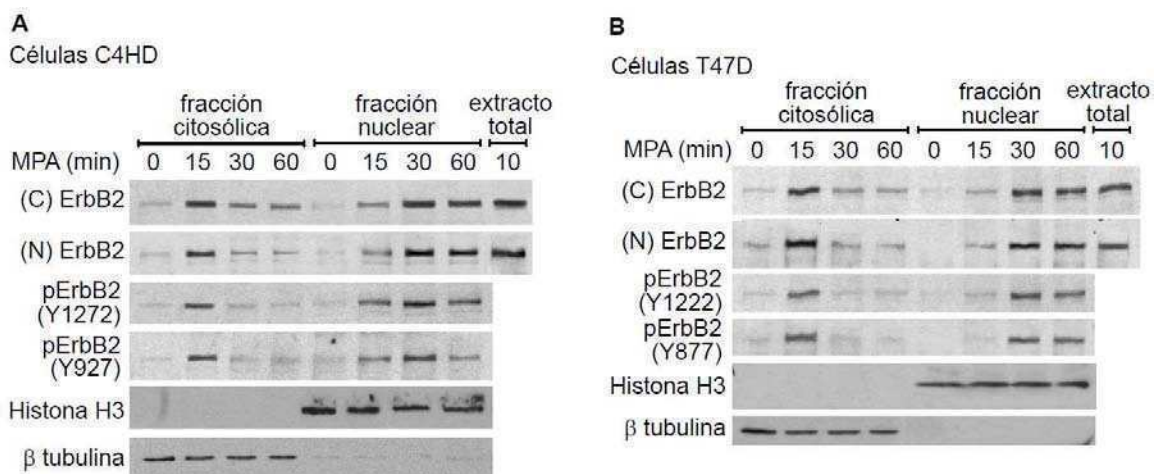


Figura 40. *Src* media la activación de ErbB2 inducida por MPA. Células C4HD (A) y T47D (B) fueron preincubadas en presencia o ausencia de PP2 10 μ M y luego tratadas o no con MPA 10 nM durante 10 min. Se realizaron extractos celulares que fueron analizados por WB utilizando anticuerpos contra las fosfo proteínas indicadas. Las membranas se revelaron después del *stripping* con anticuerpos contra las proteínas totales. C. Células T47D-Y-PR-BmPro y T47D-Y-C587A-PR fueron tratadas con MPA 10 nM por los tiempos indicados. Los extractos proteicos se analizaron por WB como en la figura 39. Los WB mostrados

son representativos de entre tres y cuatro que se hicieron con resultados similares. La densitometría de las bandas de las fosfo-proteínas normalizadas con las proteínas totales en **A** y **B** mostró un aumento significativo de la fosforilación de ErbB2 y Src en las células tratadas con MPA comparando con las no tratadas, y una disminución de la fosforilación causada por PP2 con respecto a las tratadas con MPA ($p < 0,001$). La densitometría de pErbB2 normalizada con ErbB2 en **C** mostró un aumento significativo de la fosforilación en las células T47D-Y-C587A-PR tratadas con MPA comparando con las no tratadas ($p < 0,001$).

A continuación se evaluó si el estímulo con MPA puede modular la localización celular de ErbB2. Ensayos de fraccionamiento subcelular y *Western Blot* utilizando un anticuerpo dirigido contra la región carboxi terminal y otro contra la amino terminal de ErbB2, mostraron que el tratamiento de células C4HD y T47D con MPA desde 15 hasta 60 minutos indujo una fuerte localización del receptor entero en el núcleo, observándose un máximo de localización nuclear a los 30 y 60 minutos (figura 41 A y B, primer y segundo panel). La fracción nuclear de ambos tipos celulares presentó también a estos tiempos altos niveles de fosforilación de ErbB2 en los residuos Y1222/1272 y Y877/927 (figura 41 A y B, tercer y cuarto panel). A los 15 minutos de tratamiento se detectó un aumento de la localización y fosforilación de ErbB2 en el compartimiento nuclear, pero fundamentalmente en el citosol, sugiriendo que el progestágeno indujo una activación y translocación de ErbB2 desde la membrana plasmática (fracción celular que no se muestra en la figura) hacia el citosol y luego hacia el núcleo. La preincubación de las células con el inhibidor específico de la actividad tirosina quinasa de ErbB2, AG825, que impide la fosforilación de ErbB2 inducida por MPA en Y1222/1272 y Y877/927 (figura 41 C y D, paneles inferiores), inhibió por completo la migración de ErbB2 al núcleo, mostrando que la activación de ErbB2 es necesaria para su localización nuclear (figura 41 C y D).



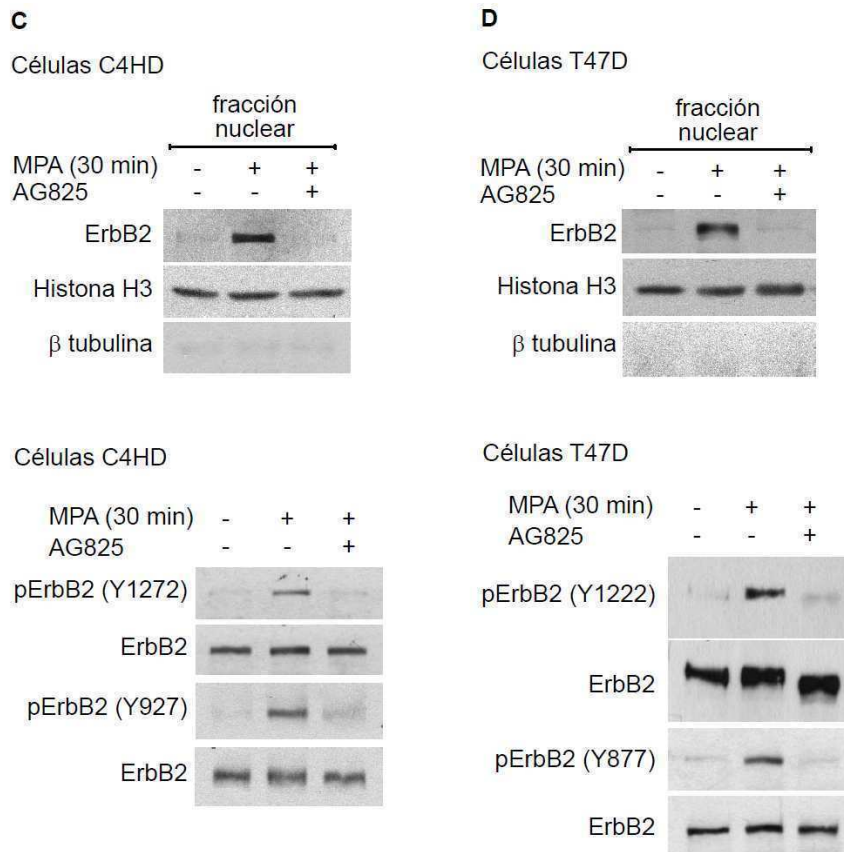
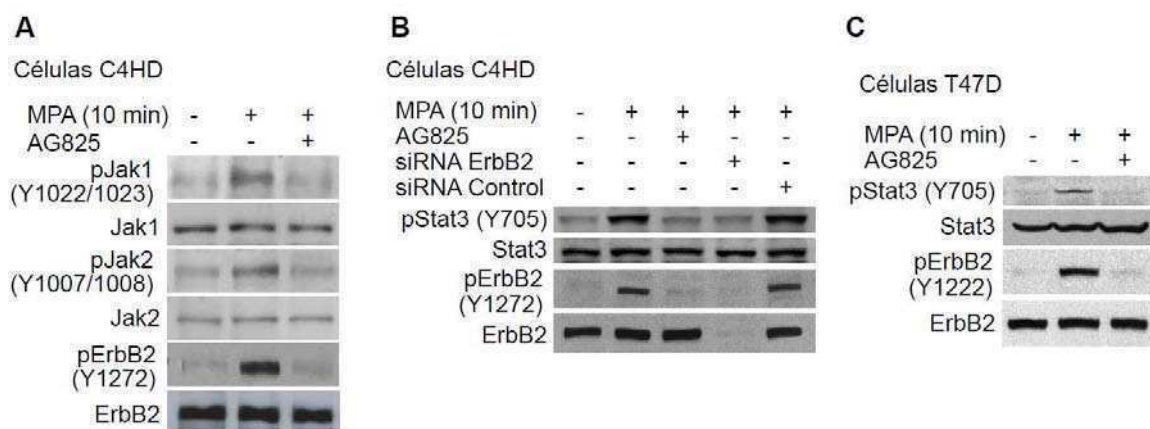


Figura 41. MPA induce la migración nuclear de ErbB2. Células C4HD (A) y T47D (B) fueron tratadas con MPA 10 nM durante los tiempos indicados. Se prepararon fracciones citosólicas y nucleares. Cincuenta μ g de proteínas de los extractos nucleares y 25 μ g de los extractos citosólicos fueron analizados por WB. La membrana revelada con pY1272/1222 ErbB2 fue sometida a *stripping* y luego revelada con un anticuerpo anti el carboxi (C) terminal de ErbB2, y la revelada con pY927/877, fue luego revelada con un anticuerpo anti la región amino (N) terminal de ErbB2. Extractos celulares totales fueron corridos en paralelo. C y D. WB de extractos nucleares (en los paneles superiores) o totales (en los paneles inferiores) de células C4HD (C) y T47D (D) preincubadas con AG825 100 μ M y tratadas con MPA 10 nM por 30 min, mostrando que el AG825 inhibió la fosforilación de ErbB2 en los residuos pY1272/1222 y pY927/877 inducida por MPA (paneles inferiores) y la translocación nuclear de ErbB2 (paneles superiores). Las membranas reveladas con los fosfo anticuerpos fueron sometidas a *stripping* y luego reveladas con el anticuerpo contra ErbB2 total. Para controlar la eficiencia de los fraccionamientos subcelulares se reveló con un anticuerpo anti histona H3, marcador nuclear, y uno anti β tubulina, marcador citosólico. Los WB mostrados en las figuras A a D son representativos de cinco a seis experimentos independientes. La densitometría de las bandas de pErbB2 y ErbB2 de la fracción nuclear normalizada con histona H3 en A y B mostró un aumento significativo de pErbB2 y ErbB2 en las células tratadas con MPA 30 min comparando con las no tratadas ($p < 0,001$). La densitometría de pErbB2 normalizada con ErbB2 en C y D, paneles inferiores, mostró un aumento significativo de la fosforilación en las células tratadas con MPA con respecto a las no tratadas, y una disminución causada por el AG825 con respecto a las tratadas con MPA ($p < 0,001$).

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que MPA induce la fosforilación de Stat3 en el residuo tirosina 705 a través de un vía de señalización

dependiente de las proteínas quinasas Jaks y Src en cáncer de mama (Proietti *et al.* 2005). En el presente trabajo evaluamos si ErbB2 está también involucrado en la activación de Stat3 vía MPA. Primero evaluamos el efecto del bloqueo de la activación de ErbB2 sobre la activación de las quinasas Jaks. La figura 42 A muestra que la inhibición de la activación de ErbB2 utilizando AG825 afectó la fosforilación de Jak1 y Jak2 inducida por MPA en las células C4HD. El bloqueo de la activación de ErbB2 y el silenciamiento de su expresión utilizando siRNAs contra ErbB2 murino, inhibieron la fosforilación de Stat3 inducida por MPA (figura 42 B). En la línea celular T47D se obtuvieron resultados similares (figura 42 C). Estos hallazgos evidencian que ErbB2 también participa de la activación de Stat3 inducida por el tratamiento con MPA, y que actúa de manera jerárquica río arriba de las quinasas Jaks en este mecanismo.

Estudiamos luego la cinética de translocación nuclear de Stat3 inducida por MPA, con el fin de evaluar si ErbB2 y Stat3 están presentes simultáneamente en el núcleo celular. Ensayos de fraccionamientos subcelular mostraron que Stat3 se encuentra solamente en la fracción citosólica de las células C4HD y T47D sin tratar. El tratamiento con MPA por 30 y 60 minutos indujo una fuerte translocación nuclear de Stat3, la cual se encontró fosforilada en Y705 (figura 42 D y E). Como se explicó anteriormente, la fosforilación de Stat3 en tirosina 705 es imprescindible para su localización en el núcleo. Consistentemente, la inhibición de la fosforilación de Stat3 por el bloqueo de la activación de ErbB2 mediante la preincubación de las células C4HD y T47D con AG825, previno la migración nuclear de Stat3 (figura 42 D y E).



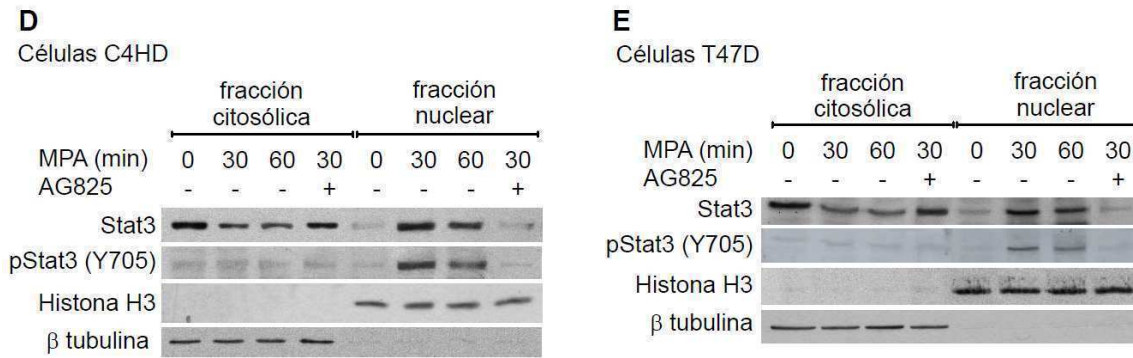


Figura 42. MPA induce la activación y migración nuclear de Stat3 vía ErbB2. Células C4HD (A, B y D) y T47D (C y E) fueron preincubadas con AG825 100 μ M y tratadas con MPA 10 nM durante los tiempos indicados. Se prepararon extractos totales (A, B y C) y fracciones citosólicas y nucleares (D y E), que fueron analizados por WB utilizando anticuerpos contra las fosfo proteínas indicadas. Las membranas se revelaron después del *stripping* con anticuerpos contra las proteínas totales. Para controlar la eficiencia de los fraccionamientos subcelulares se reveló con un anticuerpo anti histona H3 y uno anti β tubulina. Los experimentos se repitieron tres a cuatro veces con resultados similares. La densitometría de las bandas de las fosfo-proteínas normalizadas con las proteínas totales en A, B y C mostró un aumento significativo de la fosforilación de ErbB2, Jaks y Stat3 en las células tratadas con MPA comparando con las no tratadas, y una disminución de la fosforilación causada por AG825 con respecto a las tratadas con MPA ($p < 0,001$). El siRNA ErbB2 inhibió significativamente la fosforilación de Stat3 con respecto al siRNA Control ($p < 0,001$). La densitometría de las bandas de pStat3 y Stat3 de la fracción nuclear normalizada con histona H3 en D y E mostró un aumento significativo de pStat3 y Stat3 en las células tratadas con MPA 30 min comparando con las no tratadas, y una disminución causada por el AG825 con respecto a las tratadas con MPA ($p < 0,001$).

MPA induce la colocalización nuclear de ErbB2 y Stat3

Mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal se evaluó si el tratamiento con MPA induce la colocalización de Stat3 y ErbB2 en el compartimiento nuclear. En ausencia de MPA la mayor parte de ErbB2 se encontró localizada en la membrana citoplasmática de las células C4HD y T47D, y Stat3 se encontró principalmente en el citoplasma (figura 43 A, primera fila). De acuerdo con los resultados de los experimentos de fraccionamiento subcelular, el tratamiento de ambos tipos celulares con MPA durante 30 minutos resultó en una marcada translocación de las dos proteínas hacia el núcleo y una consecuente colocalización, evidenciada por los focos amarillos en las imágenes superpuestas (figura 43 A, segunda fila). La preincubación de las células con el inhibidor de ErbB2, AG825, previno completamente la translocación nuclear de ErbB2 y Stat3 inducida por MPA (figura 43 A, tercera fila),

consistente con el hecho de que ErbB2 juega un rol como inductor río arriba de la fosforilación de Stat3 dependiente de MPA. Como era de esperar, el pretratamiento de las células C4HD y T47D con el antiprogéstágeno RU486, anuló la capacidad de MPA de inducir la migración de ErbB2 y Stat3 hacia el núcleo (figura 43 A, cuarta fila).

Para evidenciar más profundamente que la activación de ErbB2 mediada por los efectos rápidos, “no genómicos” del PR unido a su ligando, induce la translocación del receptor tirosina quinasa hacia el núcleo, se exploró la distribución intracelular de ErbB2 en las células T47D-Y-PR-BmPro y en las T47D-Y-C587A-PR. Al tratar con MPA las células que expresan la mutante de PR incapaz de activar las vías de señalización (T47D-Y-PR-BmPro), se observó que ErbB2 permaneció en la membrana citoplasmática, mientras que en las células que expresan la mutante de PR incapaz de unirse al ADN (T47D-Y-C587A-PR), se detectó una clara localización de ErbB2 en el núcleo inducida por MPA (figura 43 B).

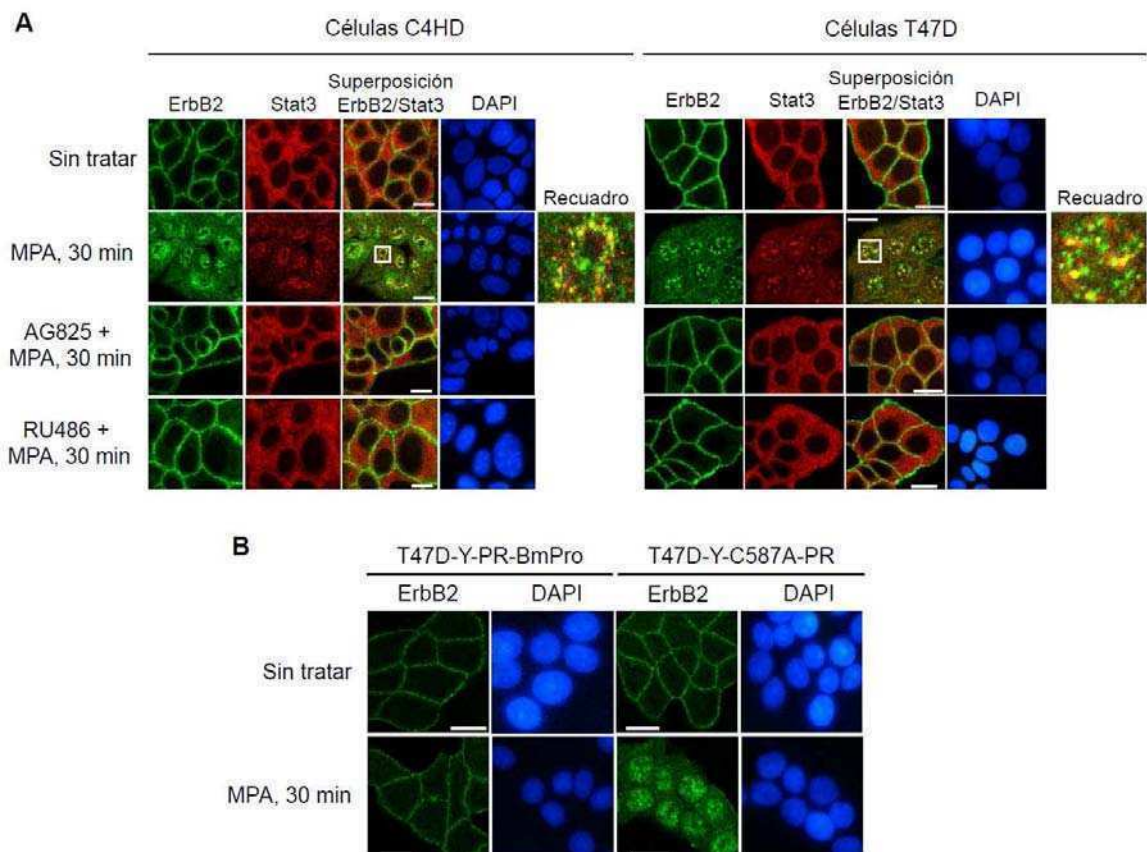


Figura 43. MPA induce la colocalización nuclear de ErbB2 y Stat3. **A.** Células C4HD y T47D fueron pretratadas o no con AG825 100 μ M o con RU486 10 nM y luego tratadas con MPA 10 nM durante 30 min y por último, fueron fijadas en metanol. ErbB2 fue localizado utilizando un anticuerpo policlonal de conejo seguido de la incubación con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con Alexa 488

(verde). Stat3 fue identificada con un anticuerpo monoclonal de ratón seguido de la incubación con un segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con rodamina (rojo). En cada fila se muestran las mismas células y las imágenes en los paneles de la tercera columna están formadas por superposición de las imágenes de los otros dos paneles de la izquierda en la misma fila. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). MPA indujo colocalización de Stat3 y ErbB2, evidenciada por el color amarillo (colocalización de las tinciones roja y verde) en el núcleo celular. Las áreas recuadradas se muestran en detalle en los recuadros de la derecha. Estas imágenes son representativas de cinco experimentos. **B.** Células T47D-Y-PR-BmPro y T47D-Y-C587A-PR fueron tratadas con MPA 10 nM por 30 min y fijadas en metanol. ErbB2 fue localizado utilizando los mismos anticuerpos que en **A.** Imágenes representativas de dos experimentos independientes. Barras de escala: 10 μ m.

La asociación entre ErbB2 y Stat3 en el núcleo de las células C4HD inducida por MPA fue corroborada por ensayos de coimmunoprecipitación de extractos nucleares. La figura 44 A muestra que el tratamiento con MPA por 30 minutos indujo una asociación entre las formas totales y fosforiladas de ErbB2 y Stat3 evaluada en extractos nucleares inmunoprecipitados con un anticuerpo anti ErbB2. En la coimmunoprecipitación inversa, cuando los extractos proteicos nucleares fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti Stat3, también se observó una interacción entre las formas totales y fosforiladas de ErbB2 y Stat3 inducida por MPA (figura 44 B).

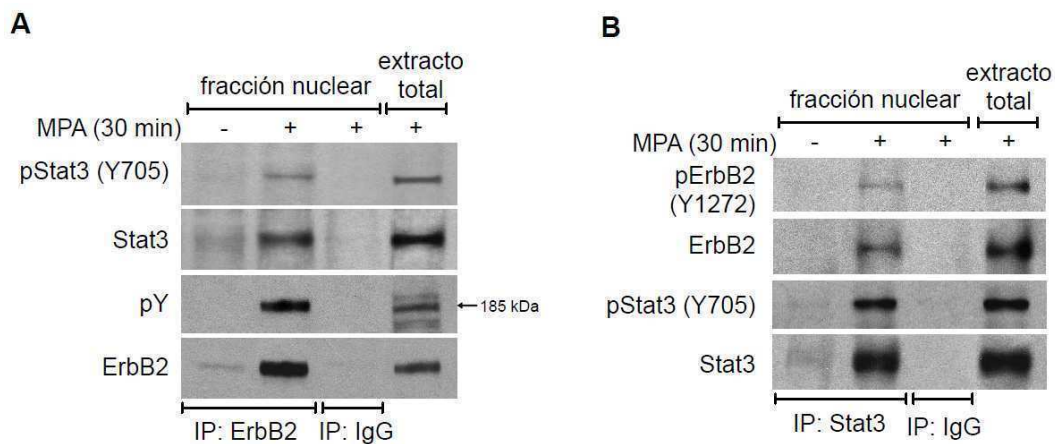


Figura 44. MPA induce la asociación física entre ErbB2 y Stat3 en el núcleo. Dosecientos cincuenta μ g de proteína de extractos nucleares de células C4HD tratadas o no con MPA 10 nM por 30 min se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti ErbB2 (**A**) o anti Stat3 (**B**) o con IgG de conejo como control de especificidad. Los inmunocomplejos se analizaron por WB con los anticuerpos anti fosfo-proteínas indicados. Las membranas fueron luego sometidas a *stripping* y reveladas con los anticuerpos contra las proteínas totales. Extractos celulares totales fueron corridos en paralelo. Este experimento fue repetido tres veces con resultados similares. IP: inmunoprecipitación.

La translocación de ErbB2 y Stat3 al núcleo inducida por MPA ocurre de manera independiente una de la otra

Para evaluar si la inhibición de la localización de ErbB2 en el núcleo afecta la translocación nuclear de Stat3 inducida por MPA, utilizamos el modelo de reconstitución de ErbB2 desarrollado en la Primera Parte de los Resultados. Primero caracterizamos la respuesta a MPA de la mutante de ErbB2 incapaz de translocar al núcleo (hErbB2 Δ NLS). La figura 45 muestra que en las células C4HD cuya expresión de ErbB2 se reconstituyó con la mutante hErbB2 Δ NLS, los niveles de fosforilación de ErbB2 en Y1222 y Y877 inducida por MPA fueron comparables a los niveles de fosforilación del receptor endógeno y de las células reconstituidas con hErbB2WT. Para comprobar que la reconstitución con la mutante hErbB2 Δ NLS fue efectiva, se reveló la membrana con un anticuerpo anti GFP, y se visualizó la señal a la altura del peso molecular de ErbB2 (figura 45, quinto panel). Demostramos que hErbB2 Δ NLS activado por progestágenos retiene sus funciones citoplasmáticas y de membrana intactas porque, al igual que la forma salvaje, fue capaz de inducir la activación de p42/p44 MAPKs y la fosforilación en Y705 de Stat3 (figura 45, sexto y octavo panel).

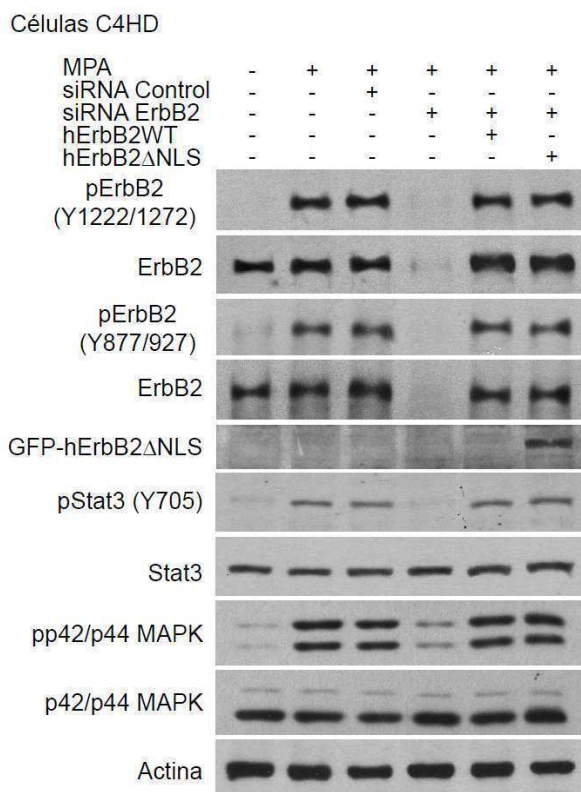


Figura 45. La mutante hErbB2 Δ NLS induce la fosforilación de Stat3 en respuesta a MPA. Células C4HD fueron transfectadas con 25 nM de siRNAs contra ErbB2 murino o siRNA control y cotransfectadas con 2 μ g/ml de hErbB2WT, hErbB2 Δ NLS o plásmido vacío durante 72 hs, y después de 24 hs de ayuno fueron tratadas con MPA 10 nM durante 10 min para evaluar la fosforilación de ErbB2 y Stat3, y durante 2 min para evaluar la fosforilación de las MAPK. Los extractos proteicos fueron analizados por WB con los anticuerpos anti fosfo-proteínas indicados. Las membranas fueron luego sometidas a *stripping* y reveladas con los anticuerpos contra las proteínas totales. Se reveló con un anticuerpo contra GFP para comprobar la eficiencia de la reconstitución con hErbB2 Δ NLS. Se muestra actina como control de carga y de especificidad de los tratamientos. El experimento es representativo de tres que se realizaron.

Ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal en células C4HD reconstituidas con hErbB2 Δ NLS mostraron que el tratamiento con MPA por 30 minutos provocó la migración de la mutante de ErbB2 desde la membrana citoplasmática hacia el citosol, pero no al núcleo (figura 46, primera columna). Sin embargo, en estas células se detectó una clara translocación nuclear de Stat3 inducida por MPA (figura 46, segunda columna), lo que indica que la migración de Stat3 al núcleo mediada por MPA ocurre independientemente de la translocación de ErbB2.

Células C4HD+siRNA ErbB2+hErbB2 Δ NLS

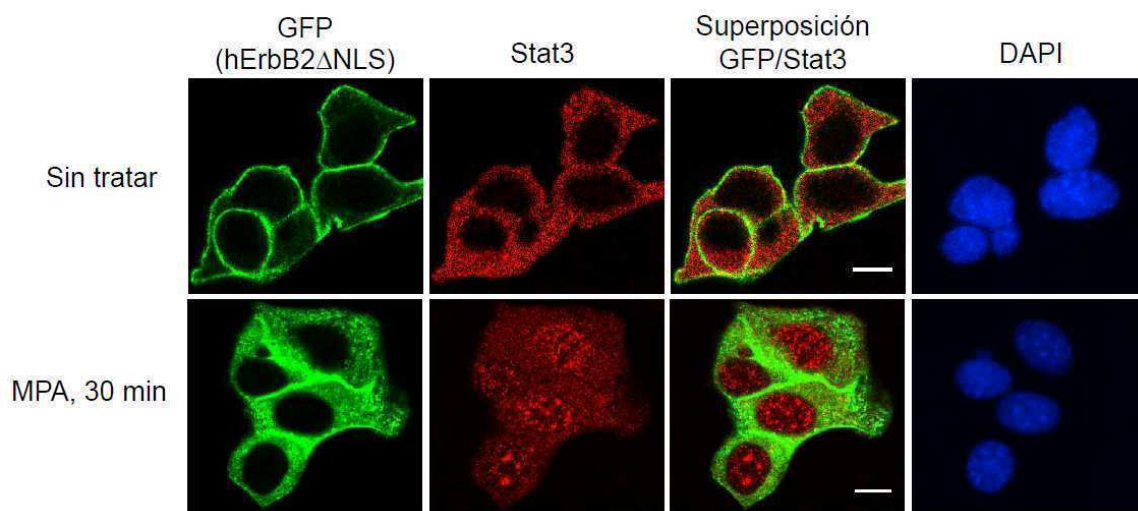


Figura 46. La importación nuclear de Stat3 inducida por MPA es independiente de la migración nuclear de ErbB2. Células C4HD fueron cotransfectadas con 25 nM de siRNAs contra ErbB2 murino y con 2 μ g/ml de hErbB2 Δ NLS durante 72 hs; después de 24 hs de ayuno fueron tratadas o no con MPA 10 nM durante 30 min y fijadas en metanol. La GFP del vector hErbB2 Δ NLS fue visualizada por fluorescencia directa. Stat3 fue identificada con un anticuerpo monoclonal de ratón seguido de la incubación con un segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con rodamina (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Imágenes representativas de cuatro experimentos independientes. Barras de escala: 10 μ m.

Con el propósito de estudiar si la función de hErbB2 Δ NLS como inhibidor dominante negativo de la translocación nuclear de ErbB2 endógeno, descrita en la Primera Parte de los Resultados, también ocurre al estimular con MPA, células C4HD que conservan la expresión endógena de ErbB2 fueron transfectadas con hErbB2 Δ NLS. La figura 47 muestra que la presencia de hErbB2 Δ NLS previno la translocación nuclear del receptor endógeno inducida por MPA (células señaladas con las flechas continuas), mientras que en las células que no incorporaron la mutante, MPA indujo la localización

del receptor endógeno en el núcleo (células señaladas con las flechas discontinuas), revelando la función de hErbB2 Δ NLS como inhibidor dominante negativo de la migración de ErbB2 endógeno hacia el núcleo, en un mecanismo gatillado por progestágenos.

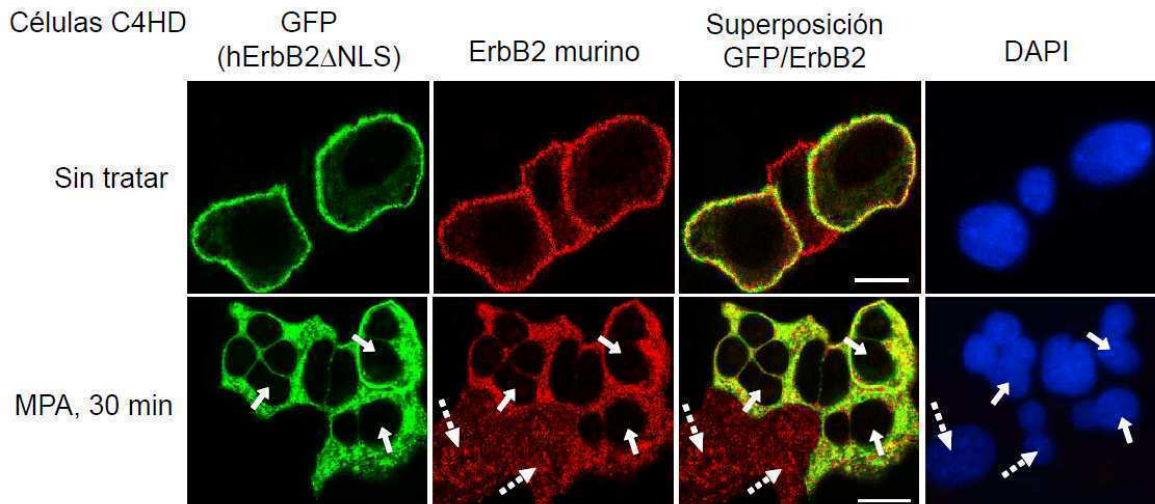


Figura 47. La mutante hErbB2 Δ NLS funciona como un inhibidor dominante negativo de la translocación nuclear de ErbB2 endógeno inducida por MPA. Células C4HD reteniendo la expresión endógena de ErbB2 fueron transfectadas con 2 μ g/ml de hErbB2 Δ NLS durante 72 hs; después de 24 hs de ayuno fueron tratadas o no con MPA 10 nM durante 30 min, y fijadas en metanol. La GFP del vector hErbB2 Δ NLS fue visualizada por fluorescencia directa. ErbB2 endógeno de ratón fue identificado con un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce el receptor murino y no el humano (F-11, de Santa Cruz Biotechnology), seguido de la incubación con un segundo anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con rodamina (rojo). Flechas continuas: células transfectadas con hErbB2 Δ NLS; flechas discontinuas: células que no tomaron el vector. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Barras de escala: 10 μ m.

El siguiente objetivo fue explorar si la importación nuclear de ErbB2 mediada por MPA depende de la localización subcelular de Stat3. La inhibición de la activación de las proteínas quinasas Jaks inducida por MPA utilizando un inhibidor farmacológico, resultó en el bloqueo de la fosforilación de Stat3, sin afectar la activación de ErbB2 dependiente de MPA (figura 48 A). Al evaluar los efectos de la inhibición de la fosforilación de Stat3 sobre la localización subcelular de Stat3 y ErbB2 por microscopía confocal, se obtuvo como resultado que a pesar de que la translocación de Stat3 hacia el núcleo fue impedida, la migración de ErbB2 inducida por MPA no se vio afectada (figura 48 B).

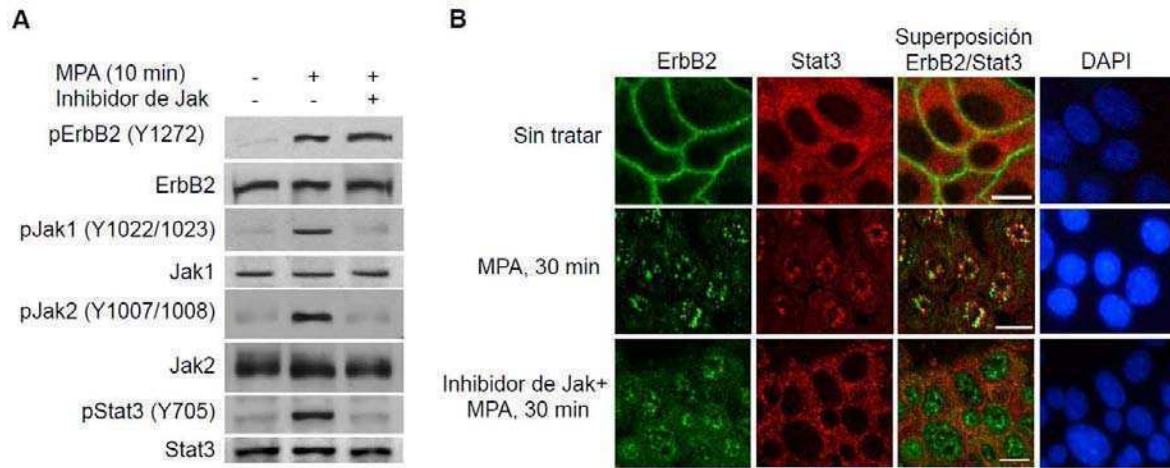


Figura 48. La migración nuclear de ErbB2 inducida por MPA es independiente de la localización subcelular de Stat3. Células C4HD fueron pretratadas o no con 10 μ M del inhibidor de Jak antes del tratamiento con MPA 10 nM por los tiempos indicados. **A.** Los extractos proteicos fueron analizados por WB con anticuerpos anti fosfo tirosina de ErbB2, Jak1, Jak2 y Stat3, y después del *stripping* las membranas fueron reveladas con anticuerpos contra las proteínas totales. La densitometría de las bandas de las fosfoproteínas normalizadas con las proteínas totales mostró un aumento significativo de la fosforilación de ErbB2, Jaks y Stat3 en las células tratadas con MPA comparando con las no tratadas, y una disminución de la fosforilación de Jaks y Stat3 causada por el inhibidor de Jak con respecto a las tratadas con MPA ($p < 0,001$). **B.** Las células fueron fijadas en metanol y ErbB2 y Stat3 fueron localizados como en la figura 43. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Estas imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Barras de escala: 10 μ m.

ErbB2 actúa como coactivador de Stat3 en un mecanismo transcripcional inducido por MPA

A continuación nos propusimos poner a prueba la hipótesis de la acción de ErbB2 como coactivador transcripcional de Stat3, planteada en la Primera Parte de los Resultados, pero esta vez a través de un mecanismo indirecto, gatillado por el receptor de progesterona unido a su ligando. Para eso, estudiamos primero la regulación de la expresión de ciclina D1 por progestágenos que, como se explicó previamente, es un gen vinculado al cáncer que contiene sitios de unión a Stat3 pero no a ErbB2 en su promotor proximal. La inducción del gen de ciclina D1 por progestágenos ya ha sido demostrada en líneas celulares de cáncer de mama humano (Musgrove *et al.* 1993; Sutherland y Musgrove 2004; Faivre *et al.* 2005; Saitoh *et al.* 2005; Boonyaratanakornkit *et al.* 2007). Resulta importante destacar que la región proximal de 2 kb del promotor de ciclina D1 no contiene sitios de unión a PR canónicos (PREs). Esto hace que el

promotor de ciclina D1 sea un modelo ideal para investigar si los progestágenos regulan la expresión génica a través de la unión de un complejo transcripcional no clásico entre Stat3 y ErbB2, e independiente de la unión de PR a sus sitios PREs. La figura 49 A muestra que el tratamiento con MPA desde 6 hasta 48 hs indujo la expresión proteica de ciclina D1 en las células C4HD, siendo el máximo nivel de expresión a las 24 y 48 hs (3 veces) y declinando a las 72 hs. La preincubación con el antagonista de PR, RU486, y el silenciamiento de la expresión de PR, bloquearon los efectos del tratamiento con MPA (figura 49 B). Para determinar la participación de ErbB2 y Stat3 en la regulación positiva de la expresión de ciclina D1 por MPA, se inhibió la activación de ErbB2 y Stat3 inducida por MPA utilizando AG825 o el inhibidor de las quinasas Jaks, respectivamente, y por otro lado se silenció la expresión de las proteínas con siRNAs. Cada una de estas estrategias utilizadas inhibió significativamente la expresión de ciclina D1 mediada por MPA en las células C4HD (figura 49 B). En las células T47D, MPA también modula positivamente la expresión de la proteína ciclina D1 vía ErbB2 y Stat3 (figura 49 C).

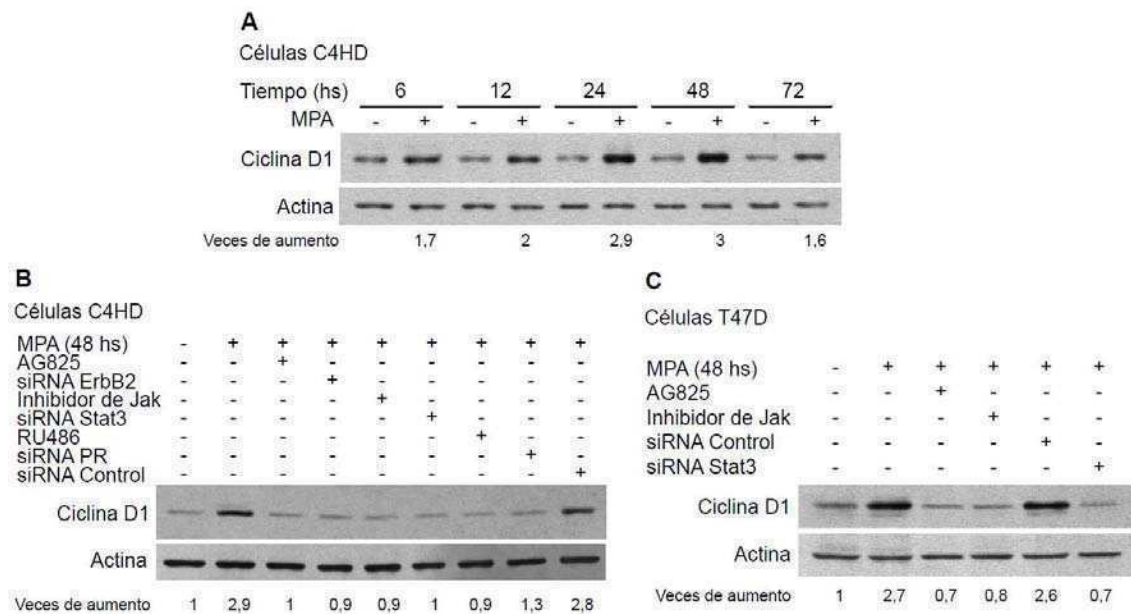


Figura 49. La expresión de la proteína ciclina D1 es inducida por MPA a través de un mecanismo dependiente de ErbB2 y Stat3. **A.** Células C4HD fueron tratadas con MPA 10 nM durante los tiempos indicados. Los extractos proteicos se analizaron por WB utilizando un anticuerpo contra ciclina D1 y uno contra actina. **B y C.** Células C4HD (**B**) o T47D (**C**) fueron transfectadas o no con 25 nM de siRNAs contra ErbB2, Stat3, PR o control durante 72 hs; después de 24 hs de ayuno fueron preincubadas o no con AG825 10 µM, con el inhibidor de Jak 1 µM, o con RU486 10 nM y luego tratadas con MPA 10 nM durante 48 hs. Los niveles de expresión de ciclina D1 fueron analizados por WB a partir de los extractos proteicos. Se reveló actina como control de carga y de especificidad de los tratamientos. Se muestran los

resultados de la densitometría de las bandas de ciclina D1 normalizadas con las de actina, como veces de aumento respecto al control sin tratar. Los experimentos se repitieron entre tres y cuatro veces con resultados similares. La densitometría mostró un aumento significativo de ciclina D1 en las células tratadas con MPA por 12, 24 y 48 hs comparando con las no tratadas, y una disminución significativa en las células transfectadas con siRNA ErbB2, siRNA Stat3, siRNA PR y las pretratadas con RU486 y con los inhibidores de Jak y ErbB2, comparando con las transfectadas con siRNA Control ($p < 0,001$).

Los niveles de ciclina D1 pueden ser regulados por cambios en la estabilidad de la proteína (Musgrove 2006). Con el propósito de corroborar que se trata de una regulación transcripcional, examinamos los niveles de ARN mensajero de ciclina D1 por transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real. La estimulación de células C4HD con MPA indujo la expresión de ARNm de ciclina D1 de manera dependiente del tiempo de tratamiento, con un nivel máximo de expresión a las 18 hs (entre 3 y 4 veces) y volviendo a los niveles basales a las 48 hs (figura 50 A). El silenciamiento de la expresión de ErbB2, Stat3 o PR utilizando siRNAs bloqueó la capacidad del progestágeno de inducir la expresión de ARNm de ciclina D1 (figura 50 B).

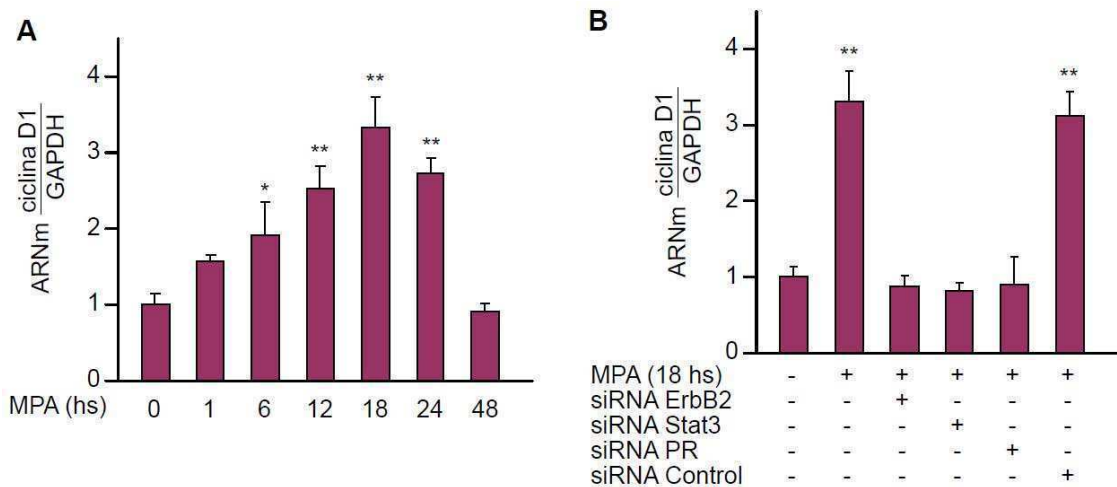


Figura 50. MPA induce la expresión del ARNm de ciclina D1 vía ErbB2 y Stat3. Células C4HD fueron tratadas con MPA 10 nM durante los tiempos indicados (A) o fueron transfectadas con 25 nM de siRNAs contra ErbB2, Stat3, PR o control durante 72 hs y luego tratadas con MPA 10 nM durante 18 hs (B). Se extrajo el ARN y luego de la retrotranscripción, el ADNc se amplificó por PCR en tiempo real. Las veces de inducción de la expresión del ARNm se calcularon dividiendo los números arbitrarios obtenidos para el ARNm de ciclina D1 de cada muestra en la PCR cuantitativa por las cantidades obtenidas del control interno GAPDH, estableciendo en 1 el valor de la muestra sin tratar y determinando las veces de incremento del ARNm relativo a la muestra sin tratar. Los datos representan la media de tres experimentos independientes \pm SEM. * vs sin tratar: $p < 0,01$; ** vs sin tratar: $p < 0,001$.

De manera similar a los resultados obtenidos con el tratamiento con HRG en la Primera Parte de los Resultados, estos hallazgos muestran que ErbB2 y Stat3 desempeñan un rol clave en el mecanismo de la expresión de ciclina D1 inducida por MPA.

Luego se evaluó si MPA regula la activación transcripcional del promotor de ciclina D1 mediante la inducción de la unión de Stat3 a sus elementos respondedores. Células C4HD y T47D fueron transfectadas con la construcción del promotor de ciclina D1 humano de 1745 pb de longitud, que contiene seis sitios de unión a Stat3, ubicado río arriba del gen de la luciferasa (en la figura 51 A se repite el esquema presentado en la figura 24 de Primera Parte de los Resultados). El tratamiento con MPA resultó en un aumento de la activación del promotor de ciclina D1 de 3 veces en ambos tipos celulares, que fue inhibido tanto por el pretratamiento con el antiprogéstágeno RU486 como por la cotransfección con la mutante dominante negativa de Stat3, Stat3Y705F (figura 51 B y C). Cuando las células C4HD fueron transfectadas con las construcciones del promotor de ciclina D1 truncado en distintas posiciones que excluyen uno, tres o cuatro sitios GAS (figura 51 A), la capacidad de MPA de inducir la activación transcripcional del promotor de ciclina D1 disminuyó significativamente (figura 51 B).

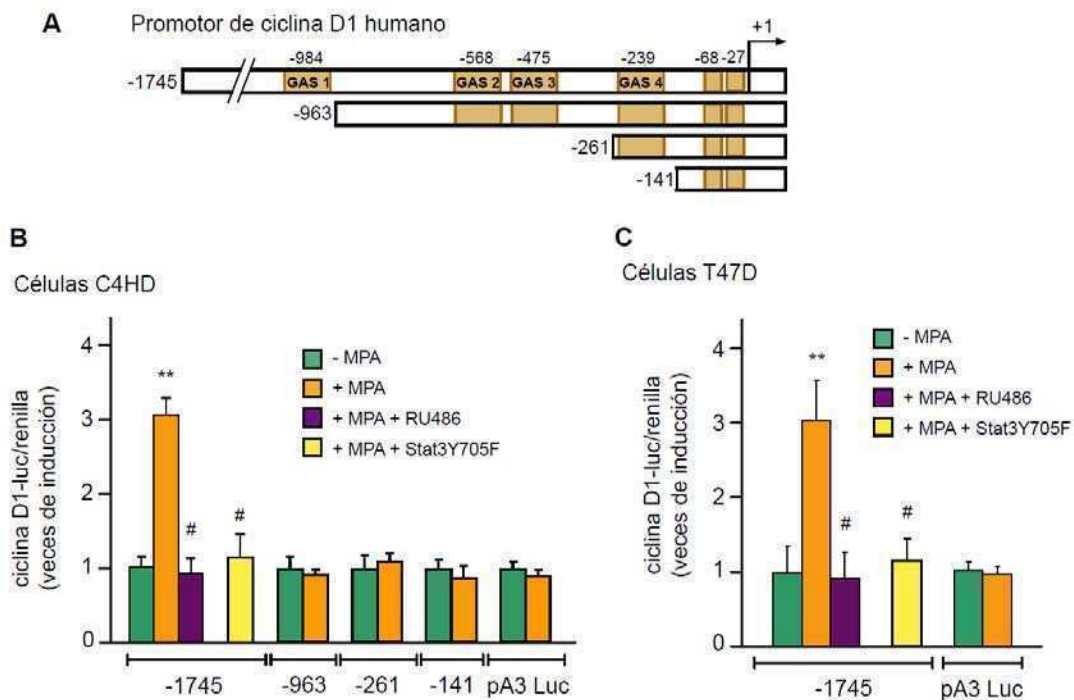


Figura 51. MPA induce la activación del promotor de ciclina D1 a través de la unión de Stat3 a sus elementos respondedores. A. Esquemas de la construcción del promotor de ciclina D1 humano de 1745 pb

de longitud ubicado río arriba del gen de la luciferasa y de las construcciones truncadas del promotor en las posiciones -963, -261 y -141. Los rectángulos marrones representan los sitios GAS. Se muestra como “+1” el sitio de inicio de la transcripción. Células C4HD (B) o T47D (C) fueron transfectadas durante 48 o 24 hs, respectivamente, con 1 µg/ml del plásmido reportero -1745 ciclina D1-luc o las construcciones truncadas, junto con 10 ng/ml de luciferasa *Renilla* (utilizado para corregir variaciones internas en las eficiencias de transfección) y con 2 µg/ml del vector de expresión de Stat3Y705F. La cantidad total de ADN transfectado fue estandarizada agregando el plásmido vacío pcDNA3.1. Como control se transfectó con 1 µg/ml del vector reportero pA3 Luc que carece del promotor de ciclina D1. Luego de 24 hs de ayuno, las células transfectadas fueron preincubadas o no con RU486 10 nM y tratadas o no con MPA 10 nM durante 24 hs. Los resultados están presentados como veces de inducción de actividad luciferasa respecto a la de las células sin tratar (primera barra). Los datos presentados representan la media de cuatro experimentos independientes para cada tipo celular ± SEM. ** vs sin MPA (primera barra), # vs tratado con MPA (segunda barra): p<0,001.

Para evaluar concretamente si ErbB2 actúa como coactivador transcripcional de Stat3 en el mecanismo de activación del promotor de ciclina D1 inducida por MPA, células C4HD fueron transfectadas con la construcción del promotor proximal de ciclina D1 de 1745 pb río arriba del gen de la luciferasa y se cotransfectaron con el vector de expresión de ErbB2 salvaje (hErbB2WT) o con cantidades crecientes de la mutante de ErbB2 incapaz de translocar al núcleo (hErbB2ΔNLS). Como se muestra en la figura 52 A, la sobreexpresión de hErbB2WT aumentó fuertemente la activación transcripcional del promotor de ciclina D1 inducida por MPA, pero no en ausencia del estímulo. Cuando las células fueron transfectadas con cantidades crecientes de hErbB2ΔNLS, MPA no fue capaz de inducir la activación del promotor de ciclina D1 (figura 52 A), reafirmando su función como inhibidor dominante negativo de la migración nuclear del receptor endógeno. Tal como se explicó en la Primera Parte de los Resultados, debido a la naturaleza del complejo transcripcional compuesto por Stat3 como factor de transcripción y ErbB2 como coactivador, resulta necesario evaluar los niveles de activación de Stat3 en células que sobreexpresan ErbB2 o hErbB2ΔNLS para normalizar los valores obtenidos en los ensayos de actividad del gen reportero por la modulación en los niveles de activación de Stat3, y de esta manera independizarnos de la activación transcripcional del promotor de ciclina D1 dada por el aumento de Stat3 activa en el núcleo. Como medida de activación de Stat3 se evaluaron sus niveles de fosforilación en tirosina 705. La transfección con hErbB2WT o con cantidades crecientes de hErbB2ΔNLS resultó en un aumento concentración-dependiente en los niveles de fosforilación de Stat3 en Y705 tras la estimulación con MPA (figura 52 B). El histograma de la figura 52 C es el resultado de la división de las unidades de

actividad luciferasa obtenidas en la figura 52 A por los valores de la densitometría de las bandas de fosfo Stat3/Stat3 total de la figura 52 B. Nuevamente, los resultados muestran que la inducción de la actividad transcripcional de Stat3 en el promotor de ciclina D1 no fue debida a un aumento de los niveles de fosforilación de Stat3 en Y705, sino a la colaboración de ErbB2 en la actividad transcripcional de Stat3 inducida por MPA.

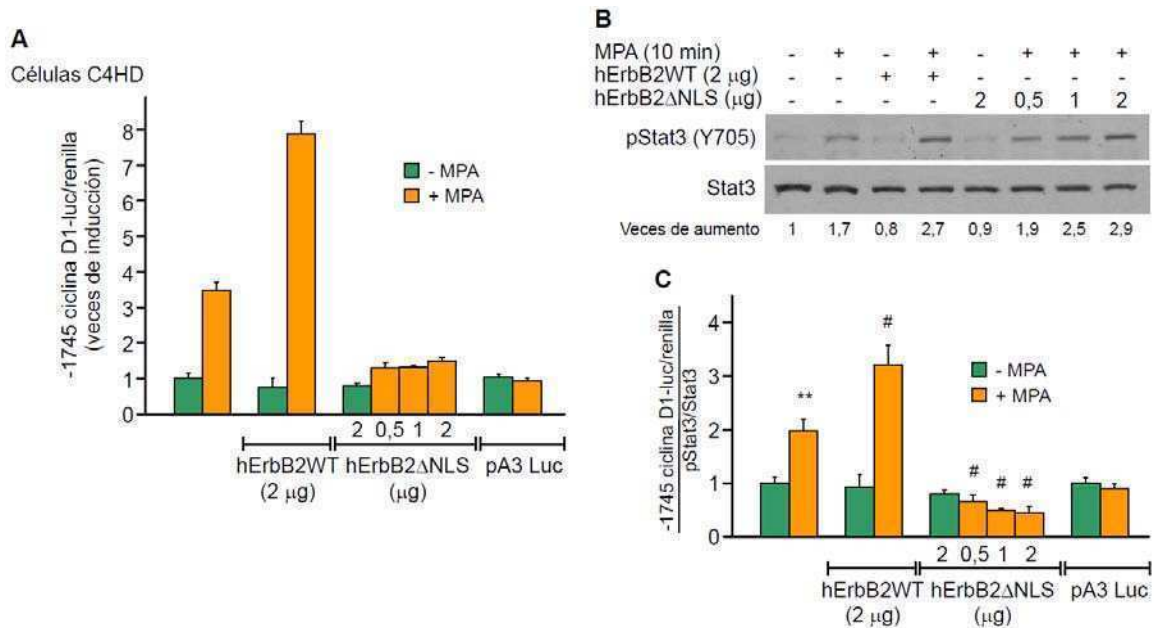


Figura 52. *ErbB2* actúa de coactivador de *Stat3* en el promotor de ciclina *D1*. **A.** Células C4HD fueron transfectadas durante 48 hs con 1 µg/ml del plásmido reportero -1745 ciclina D1-luc o pA3 Luc y cotransfectadas con 10 ng/ml de luciferasa *Renilla* y con las cantidades indicadas de los plásmidos de expresión hErbB2WT o hErbB2ΔNLS. La cantidad total de ADN transfectado fue estandarizada agregando el plásmido vacío pEGFP-N1. Luego de 24 hs de ayuno, las células fueron tratadas o no con MPA 10 nM durante 24 hs. Los resultados están presentados como veces de inducción de actividad luciferasa respecto a la de las células sin tratar (primera barra). **B.** En paralelo, células C4HD fueron transfectadas con las cantidades indicadas de hErbB2WT o hErbB2ΔNLS, llevando a la misma cantidad total de ADN con el plásmido vacío pEGFP-N1. Después de 24 hs de ayuno fueron tratadas o no con MPA 10 nM durante 10 min. Los extractos proteicos fueron analizados por WB con un anticuerpo anti pY705Stat3, y después del *stripping* la membrana fue revelada con un anticuerpo contra Stat3. Se muestran los resultados de la densitometría de las bandas de pStat3 normalizadas con las de Stat3, como veces de aumento respecto al control sin tratar de la primera calle. **C.** Las unidades relativas de actividad luciferasa obtenidas en **A** fueron divididas por los resultados de la densitometría mostrada en **B**, y los resultados se muestran como veces de inducción de actividad relativa del promotor de ciclina D1 respecto a la de las células sin tratar (primera barra). Los datos presentados representan la media de tres experimentos independientes ± SEM. ** vs sin MPA (primera barra), # vs tratado con MPA (segunda barra): p<0,001.

Examinamos los efectos de la mutante hErbB2 Δ NLS sobre la expresión de ciclina D1 endógena inducida por progestágenos, evaluando los niveles de expresión de la proteína y del ARNm de ciclina D1 en células C4HD transfectadas con cantidades crecientes de hErbB2 Δ NLS. La figura 53 muestra que los niveles de expresión de la proteína (A) y el ARNm (B) de ciclina D1 inducida por MPA fueron reducidos significativamente y de manera concentración-dependiente en las células que expresan hErbB2 Δ NLS, en comparación con las células transfectadas con el plásmido vacío. Estos resultados junto con los anteriores, demuestran que la expresión de ciclina D1 inducida por progestágenos está regulada por un complejo nuclear compuesto por Stat3 y ErbB2.

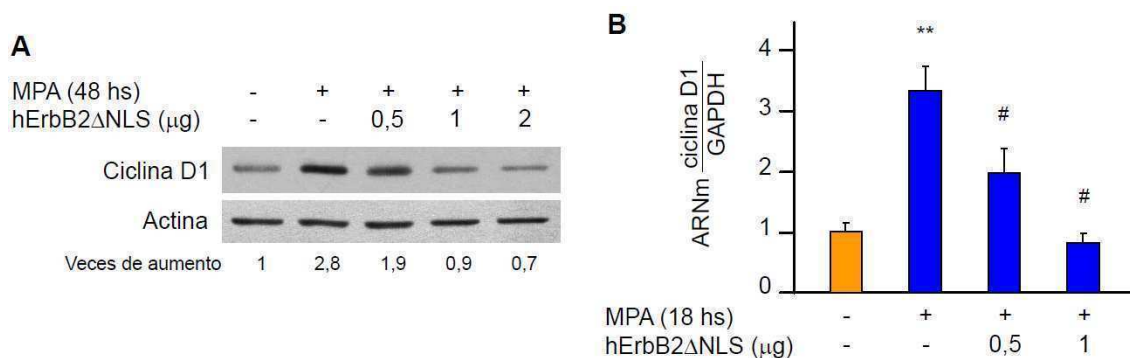


Figura 53. La localización de ErbB2 en el núcleo celular es necesaria para la expresión de ciclina D1 inducida por MPA. Células C4HD fueron transfectadas por 48 hs con las cantidades indicadas de hErbB2 Δ NLS, llevando a la misma cantidad total de ADN con el plásmido vacío pEGFP-N1. Luego de 24 hs de ayuno, las células fueron tratadas o no con MPA 10 nM durante los tiempos indicados. **A.** Los niveles de expresión de ciclina D1 fueron analizados por WB a partir de los extractos proteicos. Se reveló actina como control de carga y de especificidad de los tratamientos. Se muestran los resultados de la densitometría de las bandas de ciclina D1 normalizadas con las de actina, como veces de aumento respecto al control sin tratar de la primera calle. El WB mostrado es representativo de tres que se hicieron con resultados similares. La densitometría mostró una disminución significativa de ciclina D1 en las células transfectadas con 0,5, 1 y 2 μ g de hErbB2 Δ NLS, con respecto a las transfectadas solamente con plásmido vacío y tratadas con MPA (segunda calle) ($p < 0,001$). **B.** El ADNc sintetizado a partir del ARN, se amplificó por PCR en tiempo real. Las veces de inducción de la expresión del ARNm de ciclina D1 se calcularon y se muestran como en la figura 50, respecto al ARNm de GAPDH. Los datos representan la media de tres experimentos independientes \pm SEM. ** vs sin tratar (primera barra), # vs tratado con MPA (segunda barra): $p < 0,001$.

La función de ErbB2 como coactivador transcripcional de Stat3 en un escenario promovido por la unión de MPA al receptor de progesterona fue también estudiada en células C4HD reconstituidas con hErbB2 Δ NLS o hErbB2WT. En células cuyo ErbB2

endógeno fue silenciado con siRNAs, la expresión de hErbB2WT pero no la de hErbB2 Δ NLS, fue capaz de restituir la actividad transcripcional de Stat3 dependiente de MPA en el promotor de ciclina D1 (figura 54). El análisis de los datos se realizó como en la figura 52 y se presenta como en esa figura.

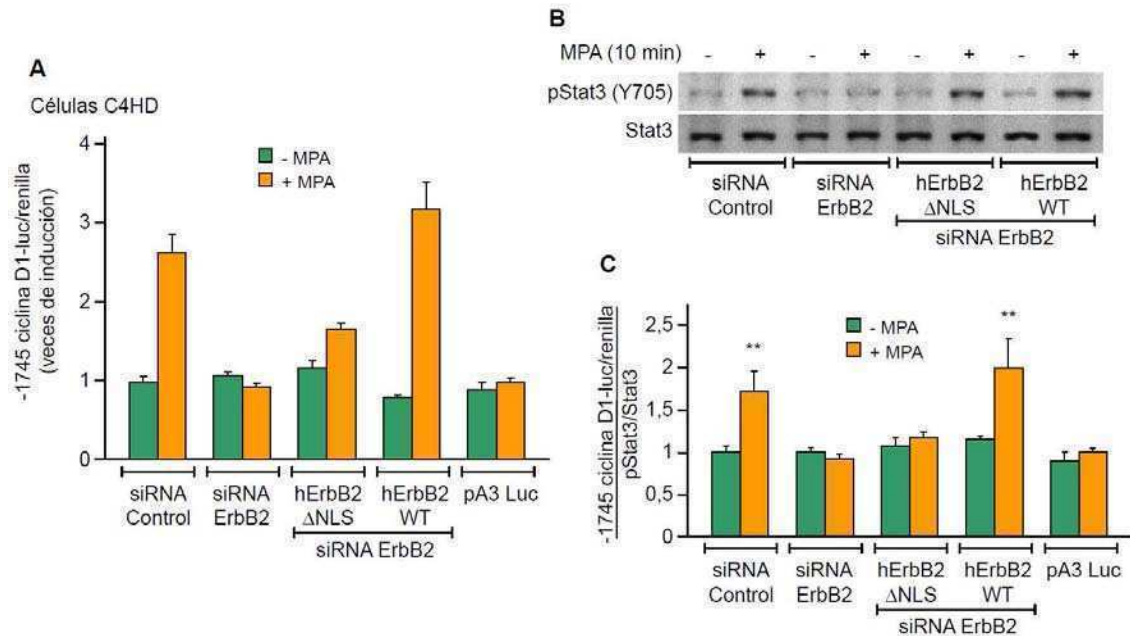


Figura 54. *ErbB2* actúa de coactivador de *Stat3* en el promotor de ciclina D1 de células que no expresan *ErbB2* endógeno. **A.** Células C4HD fueron transfectadas durante 72 hs con 1 μ g/ml del plásmido reportero -1745 ciclina D1-luc o pA3 Luc, con 10 ng/ml de luciferasa *Renilla* y cotransfectadas con 2 μ g/ml de los plásmidos hErbB2WT, hErbB2 Δ NLS o pEGFP-N1, junto con 25 nM de siRNAs contra ErbB2 o control. Luego de 24 hs de ayuno, las células fueron tratadas o no con MPA 10 nM durante 24 hs. Los resultados están presentados como en la figura 52 A. **B.** En paralelo, células C4HD fueron transfectadas con 2 μ g/ml de hErbB2WT, hErbB2 Δ NLS o pEGFP-N1, y cotransfectadas con 25 nM de siRNAs contra ErbB2 o control. Después de 24 hs de ayuno fueron tratadas o no con MPA 10 nM durante 10 min. Los extractos proteicos fueron analizados por WB como en la figura 52 B. **C.** Las unidades de actividad luciferasa mostradas en **A** fueron divididas por los resultados de la densitometría obtenida en **B**, y los resultados se muestran como en la figura 52 C. Los datos representan la media de tres experimentos independientes \pm SEM. ** vs sin MPA: $p < 0,001$.

Para extender el nuevo rol de ErbB2 nuclear propuesto en este trabajo a un promotor distinto del de ciclina D1, células C4HD y T47D fueron transfectadas con el plásmido p4xm67-tk-luc, que contiene sitios de unión de alta afinidad a Stat3. La actividad transcripcional de Stat3 inducida por MPA que se midió utilizando este reportero aumentó significativamente por la cotransfección con hErbB2WT (figura 55 A y B). Los datos de esta figura están presentados como en la figura 52.

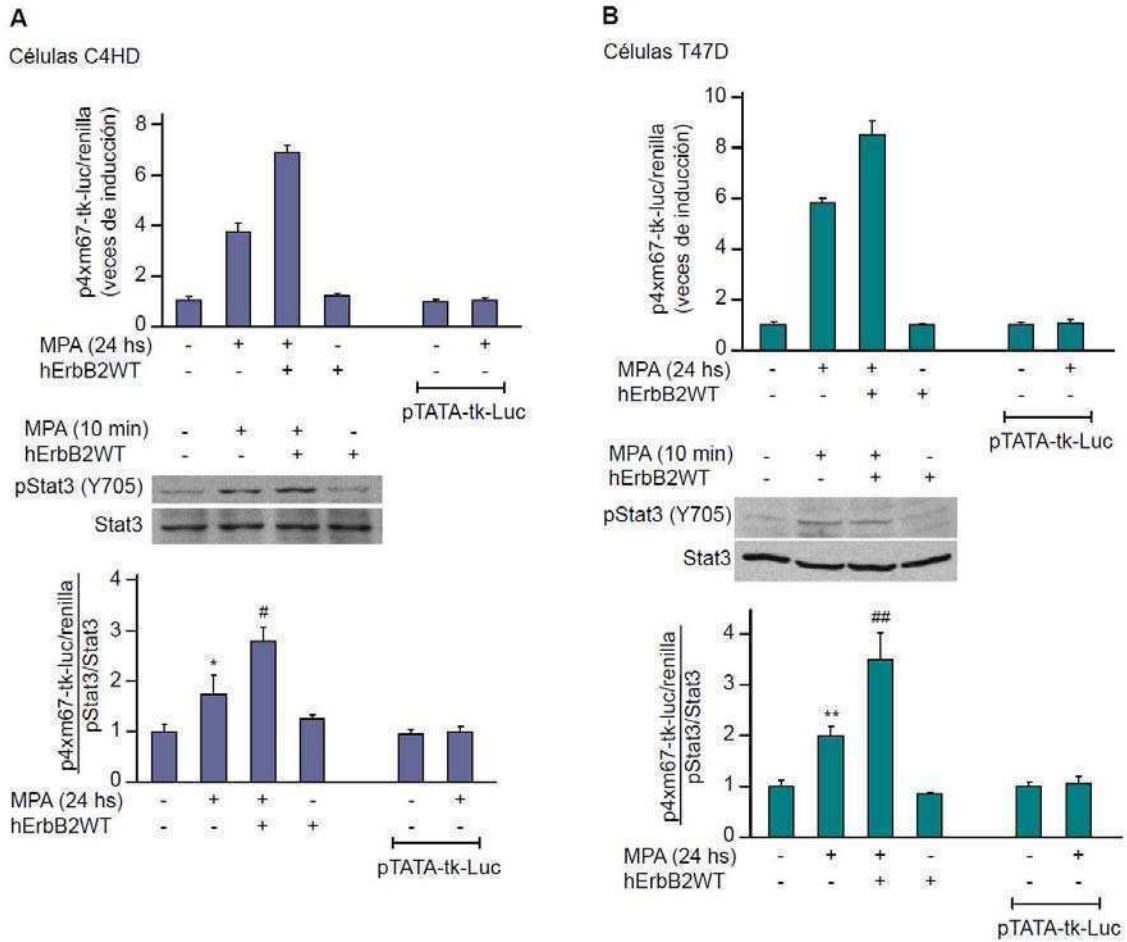


Figura 55. El rol de ErbB2 como coactivador de Stat3 no está restringido al promotor de ciclina D1. Células C4HD (A) o T47D (B) fueron transfectadas durante 48 o 24 hs, respectivamente, con 1 $\mu\text{g/ml}$ de un plásmido reportero de luciferasa que contiene cuatro copias del sitio de unión a Stat3 de alta afinidad “m67” (p4xm67-tk-luc) o con un vector reportero pTATA-tk-Luc que carece de la inserción m67, como control. Las células se cotransfectaron junto con 10 ng/ml de luciferasa *Renilla* y con 400 ng/ml del vector hErbB2WT o pMe18SM. Luego de 24 hs de ayuno, las células fueron tratadas o no con MPA 10 nM durante 24 hs. Los resultados están presentados como en la figura 52 A. En los paneles del medio se muestran los resultados de los WB de los extractos proteicos de las células transfectadas con hErbB2WT o el vector vacío pMe18SM, en los que se evaluó pStat3 y Stat3 total como en la figura 52 B. Los histogramas de los paneles inferiores muestran el resultado de la división de la actividad luciferasa por la densitometría de los niveles de pStat3/Stat3, tal como se realizó en la figura 52 C. Los datos representan la media de tres experimentos independientes \pm SEM. * vs sin tratar (primera barra), # vs tratado con MPA (segunda barra): $p < 0,01$; ** vs sin tratar (primera barra), ## vs tratado con MPA (segunda barra): $p < 0,001$.

ErbB2 actúa como coactivador de Stat3 co-reclutando a PR y las histonas acetiltransferasas CBP y p300 en el promotor de ciclina D1

Con el objetivo de evaluar la asociación de Stat3 y ErbB2 inducida por MPA en el promotor de ciclina D1 endógeno en células vivas, empleamos la técnica de ChIP. Utilizando *primers* que flanquean los sitios GAS -971 y -874 del promotor de ciclina D1 murino, encontramos que MPA indujo una unión significativa y específica tanto de Stat3 como de ErbB2 luego de 30 minutos de tratamiento, en células C4HD (figura 56 A). Trabajos de otros autores han demostrado que PR induce la expresión de genes que no contienen PREs en sus promotores, mediante mecanismos transcripcionales no clásicos, a través de la unión de PR a otros factores de transcripción en los promotores de dichos genes (Owen *et al.* 1998; Cicatiello *et al.* 2004; Faivre *et al.* 2008). Nuestra identificación del complejo transcripcional Stat3/ErbB2 inducido por progestágenos nos hizo hipotetizar que PR es reclutado junto con Stat3 y ErbB2 en el promotor de ciclina D1. Para evaluar si PR también forma parte de ese complejo nuclear, se realizó un ChIP inmunoprecipitando con un anticuerpo anti PR, y la PCR en tiempo real se llevó a cabo con los mismos *primers* utilizados anteriormente. La figura 56 A muestra que el tratamiento con MPA durante 30 minutos indujo también la asociación de PR a los sitios de unión de Stat3 en el promotor de ciclina D1 de ratón, revelando que en este mecanismo, PR forma parte del complejo nuclear Stat3/ErbB2.

Además encontramos que MPA causó un importante aumento del reclutamiento de Stat3, ErbB2 y PR en el promotor de ciclina D1 humano en las células T47D, utilizando un par de *primers* que flanquea el sitio GAS -984 (figura 56 B).

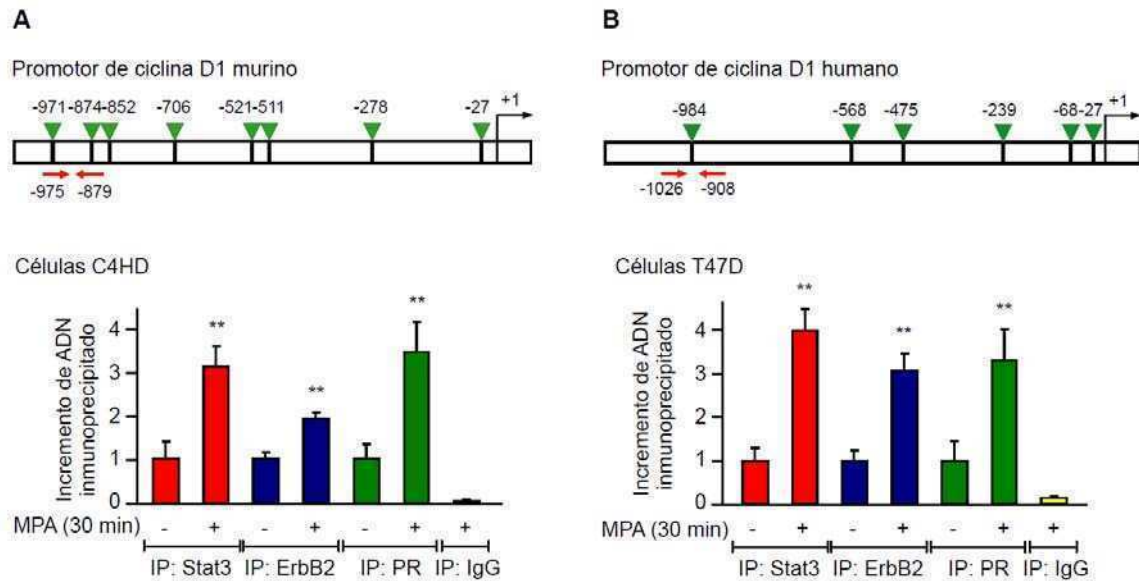


Figura 56. MPA induce el reclutamiento de Stat3, ErbB2 y PR al promotor de ciclina D1. Paneles superiores: esquemas de los promotores de ciclina D1 murino (A) y humano (B). Los triángulos verdes representan los sitios GAS; las flechas rojas representan los *primers* utilizados para la PCR cuantitativa en tiempo real (las secuencias de los *primers* están detalladas en los Materiales y Métodos). Se ensayó la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) sobre extractos de células C4HD (A) y T47D (B). Las células fueron tratadas o no con MPA 10 nM por 30 min y se prepararon las cromatinas, como se describe en Materiales y Métodos, para inmunoprecipitar Stat3, ErbB2, PR o IgG de conejo como control de especificidad. El ADN inmunoprecipitado y el total (como control de carga) se amplificó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los valores arbitrarios obtenidos para cada muestra fueron divididos por los obtenidos para el ADN total sin inmunoprecipitar para cada tratamiento, estableciendo en 1 los valores de las muestras sin tratar, y determinando las veces de incremento de ADN inmunoprecipitado relativo a ese punto. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes \pm SEM. ** vs sin tratar: $p < 0,001$.

Evaluamos a continuación si MPA es capaz de inducir una asociación simultánea de Stat3 con ErbB2 y de Stat3 con PR en el promotor del gen de ciclina D1, mediante ensayos de re-ChIP. Las cromatinas provenientes de células C4HD y T47D tratadas o no con MPA por 30 minutos, fueron primero inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti Stat3, y luego fueron re-inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti ErbB2 o uno anti PR. El análisis por PCR cuantitativa en tiempo real evidenció que el estímulo con MPA aumentó significativamente la unión simultánea tanto de Stat3 y ErbB2 como de Stat3 y PR en los sitios GAS del promotor de ciclina D1 en las células C4HD y T47D (figura 57 A y B). Del mismo modo, mediante experimentos de re-ChIP, inmunoprecipitando primero con un anticuerpo anti PR y re-inmunoprecipitando después con un anticuerpo anti ErbB2, y viceversa, encontramos que MPA indujo la co-ocupación de ErbB2 y PR

simultáneamente en el sitio GAS -984 del promotor de ciclina D1 de células T47D (figura 57 B). Estos hallazgos evidencian claramente que los progestágenos inducen la formación de un complejo transcripcional ternario entre Stat3, ErbB2 y PR en los sitios GAS del promotor de ciclina D1 de células de cáncer de mama.

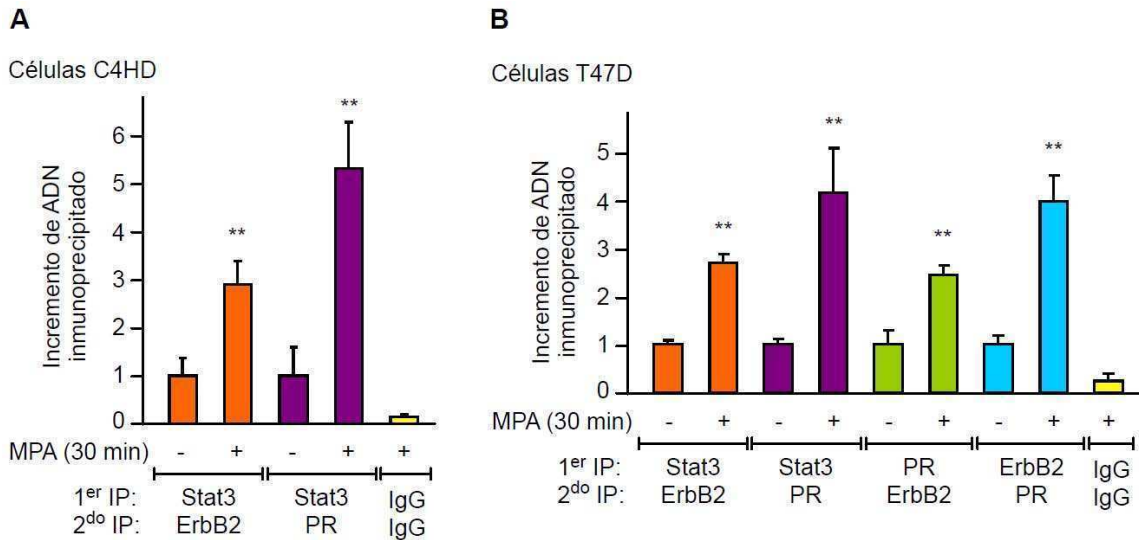


Figura 57. MPA induce la asociación simultánea de Stat3, ErbB2 y PR en el promotor de ciclina D1. Las cromatinas de células C4HD (A) y T47D (B) tratadas o no con MPA 10 nM por 30 min fueron primero inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti Stat3, anti ErbB2 o anti PR y luego re-inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti ErbB2 o anti PR, o se utilizó las dos veces una IgG de conejo como control de especificidad. El ADN se amplificó por PCR en tiempo real utilizando los *primers* esquematizados con flechas rojas en la figura 56. Los valores obtenidos para cada muestra fueron divididos por los obtenidos para el ADN total, estableciendo en 1 los valores de las muestras sin tratar, y determinando las veces de incremento de ADN inmunoprecipitado relativo a ese punto. Los datos mostrados son la media de dos a tres experimentos independientes \pm SEM. ** vs sin tratar: $p < 0,001$.

El siguiente objetivo fue estudiar si la unión de PR a Stat3 es necesaria para la formación del complejo transcripcional Stat3/ErbB2 en dos sitios distintos que contienen secuencias GAS del promotor de ciclina D1 humano. Analizamos la formación del complejo utilizando la técnica de ChIP seguida de PCR en tiempo real con *primers* que flanquean tres regiones distintas del gen de ciclina D1: el sitio GAS -984 estudiado en las figuras anteriores; otro amplicón, denominado “-50”, cubre el sitio de inicio de la transcripción, abarcando el sitio GAS -27 y el elemento iniciador (Inr, equivalente a la TATA *box*); y el tercer amplicón, denominado “+8000”, fue ubicado unas 8000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (figura 58 A). Este último amplicón se utilizó como un control negativo interno de la unión de factores de

transcripción y coactivadores, como se describió en trabajos previos (Eeckhoute *et al.* 2006). En primer lugar, evaluamos el reclutamiento de Stat3, ErbB2 y PR en el sitio de inicio de la transcripción (-50) en las células T47D. Conforme a lo observado en el sitio -984, MPA indujo la unión de las tres proteínas al sitio -50, pero el reclutamiento de ErbB2 y PR fue menor que el obtenido en el sitio -984 (figura 58 B). La asociación dependiente de MPA de las tres proteínas en este sitio se le puede atribuir a la presencia del sitio GAS en la posición -27.

Para evaluar la importancia de PR en la formación del complejo nuclear Stat3/ErbB2, trabajamos con la línea celular T47D-Y transfectada establemente con la mutante de PR incapaz de unirse al ADN pero con capacidad de activar las vías de señalización (T47D-Y-C587A-PR). En el trabajo original que describe esta mutante se reportó que C587A-PR tampoco es capaz de unirse a otros factores de transcripción unidos al ADN, ya que el mecanismo por el cual PR actúa unido a otro factor de transcripción y no directamente al ADN requiere que las dos proteínas involucradas, la unida directamente al ADN y la asociada, posean un dominio de unión al ADN (Tung *et al.* 1993). Esto se debe a que, además de su función de unir al ADN, el dominio de unión al ADN de los receptores esteroideos está implicado en la mediación de ciertas interacciones proteína-proteína (Kumar y Thompson 1999). Como era de esperar de acuerdo a estos antecedentes, el tratamiento de las células T47D-Y-C587A-PR con MPA por 30 minutos no fue capaz de inducir el reclutamiento de PR al sitio GAS -984 ni al sitio -50 (figura 58 C). En estas células, ErbB2 tampoco se asoció a estos sitios tras el tratamiento con MPA. Sin embargo, el reclutamiento de Stat3 aumentó significativamente en presencia de MPA en ambos sitios (figura 58 C).

Para analizar si es necesario el reclutamiento de ErbB2 a los sitios GAS del promotor de ciclina D1 para que PR se una a Stat3, células T47D fueron transfectadas transientemente con la mutante hErbB2 Δ NLS. En esta situación, ErbB2 no se encuentra en el promotor de ciclina D1 porque no es capaz de translocar al núcleo en presencia de la mutante dominante negativa (figura 58 D). De manera similar a los hallazgos obtenidos con las células T47D-Y-C587A-PR, el tratamiento con MPA provocó un aumento de la unión de Stat3 pero no de PR en los sitios -984 y -50. El reclutamiento de Stat3 en el promotor de ciclina D1 independientemente de la localización nuclear de ErbB2 es consistente con nuestro hallazgo de que la translocación de Stat3 al núcleo inducida por MPA no depende de la migración nuclear de ErbB2 (figura 46). En conjunto, estos resultados indican que el reclutamiento de Stat3 en los sitios -984 y -50

no depende de la presencia de PR ni de ErbB2, pero PR y ErbB2 dependen uno del otro para asociarse a Stat3 en estos sitios.

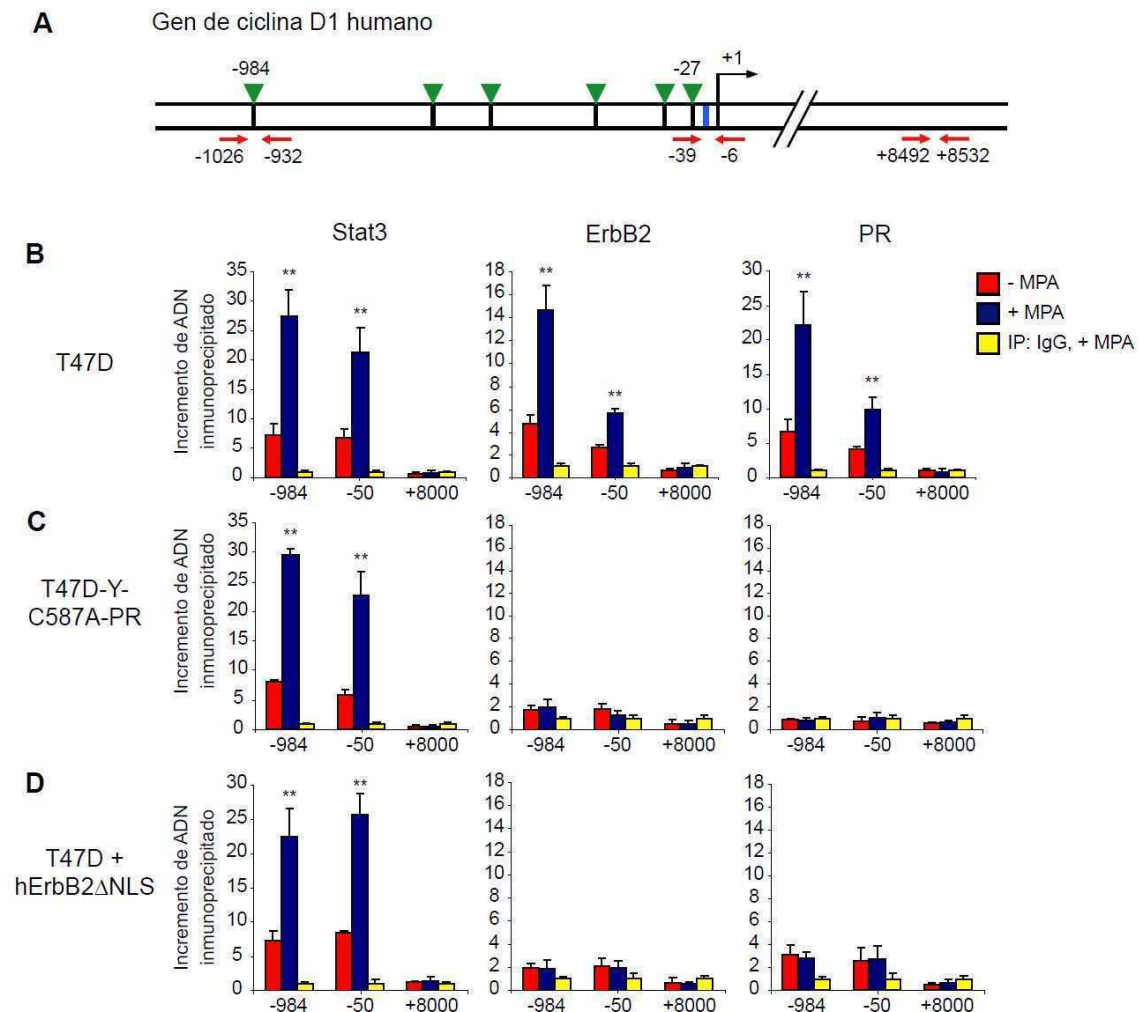


Figura 58. La presencia de ErbB2 y PR funcionales en el núcleo celular es necesaria para que se forme el complejo Stat3/ErbB2/PR en el promotor de ciclina D1. **A.** Esquema del gen de ciclina D1 humano. Los triángulos verdes representan los sitios GAS; la barra azul representa el elemento Inr, y las flechas rojas, los pares de *primers* utilizados para la PCR en tiempo real (las secuencias de los *primers* están detalladas en los Materiales y Métodos). Bajo las flechas se indican las posiciones de los extremos 5' de los *primers* forward y reverse. Se muestra como “+1” el sitio de inicio de la transcripción. Se realizó la técnica de CHIP sobre cromatinas de células T47D (**B**), T47D-Y-C587A-PR (**C**) o T47D transfectadas transientemente con 2 μ g/ml de hErbB2 Δ NLS (**D**). Las células fueron tratadas o no con MPA 10 nM por 30 min y se inmunoprecipitó Stat3, ErbB2, PR o IgG como control negativo. El ADN se amplificó por PCR en tiempo real utilizando los tres pares de *primers* esquematizados en A (amplicones “-984”, “-50” y “+8000”, este último como control negativo). Los valores obtenidos para cada muestra fueron divididos por los obtenidos para el ADN total, estableciendo en 1 los valores de las muestras inmunoprecipitadas con IgG, y determinando las veces de incremento de ADN inmunoprecipitado relativo a ese punto. Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes \pm SEM. ** vs sin MPA: $p < 0,001$.

Las modificaciones de las histonas regulan la remodelación de la cromatina provocando la activación o represión de la transcripción génica. En particular, la acetilación de histonas es una marca de transcripción activa. Para comprender mejor el mecanismo de coactivación de ErbB2 sobre Stat3, investigamos si coactivadores conocidos con actividad de histona acetiltransferasa (HAT) son co-reclutados junto con Stat3, ErbB2 y PR en el promotor de ciclina D1. Trabajos de otros autores describieron la asociación entre Stat3 y los coactivadores CBP [CREB (cAMP response element binding protein) binding protein] y p300, que poseen una potente actividad HAT. Estas interacciones aumentan la actividad transcripcional de Stat3 (Nakashima *et al.* 1999; Giraud *et al.* 2002). Por lo tanto, evaluamos el reclutamiento de CBP y p300 por ChIP en el gen de ciclina D1. El tratamiento de las células T47D con MPA durante 30 minutos provocó un aumento significativo de la unión de CBP y p300 y de la acetilación de las histonas H3 y H4 en los sitios -984 y -50 (figura 59 A). Cuando el experimento se repitió en las células T47D-Y-C587A-PR y en las T47D transfectadas con hErbB2 Δ NLS, en las cuales el complejo transcripcional Stat3/ErbB2/PR no se puede formar, MPA no fue capaz de inducir el reclutamiento de CBP y p300 ni afectó la acetilación de las histonas H3 y H4 en ninguno de los sitios estudiados (figura 59 B y C).

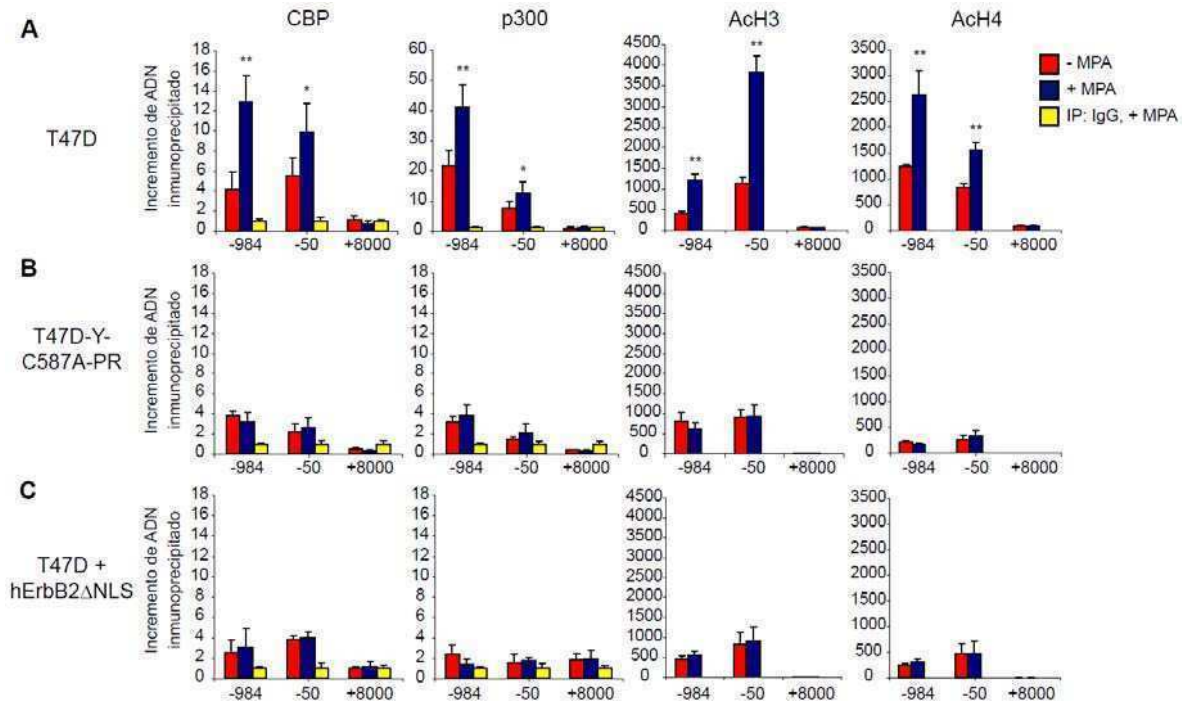


Figura 59. Reclutamiento de CBP y p300 al complejo Stat3/ErbB2/PR en el promotor de ciclina D1. Se realizó la técnica de ChIP sobre cromatinas de células T47D (A), T47D-Y-C587A-PR (B) o T47D

transfectadas transientemente con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de hErbB2 ΔNLS (C), tratadas o no con MPA 10 nM por 30 min. Se inmunoprecipitó CBP, p300, histona H3 acetilada (AcH3), histona H4 acetilada (AcH4) o IgG como control negativo. El ADN se amplificó por PCR en tiempo real con los mismos *primers* utilizados en la figura 58. Los resultados de la PCR se muestran como en la figura 58. Los datos mostrados son la media de dos a tres experimentos independientes \pm SEM. * vs sin MPA: $p < 0,01$; ** vs sin MPA: $p < 0,001$.

Por último evaluamos la regulación de la activación transcripcional del promotor de ciclina D1 por MPA en las células T47D-Y-C587A-PR. Las células fueron transfectadas con la construcción del promotor de ciclina D1 humano de 1745 pb ubicado río arriba del gen de la luciferasa. El tratamiento con MPA no afectó la activación del promotor de ciclina D1 y, como era predecible, tampoco el pretratamiento con el antiprogéstágeno RU486 (figura 60). Este resultado junto con los anteriores y los de la figura 52, en los que demostramos que la transfección de células C4HD con cantidades crecientes de hErbB2 ΔNLS inhibió la capacidad de MPA de inducir la activación del promotor de ciclina D1, indican que la formación del complejo Stat3/ErbB2/PR es necesario para la activación de la transcripción de ciclina D1.

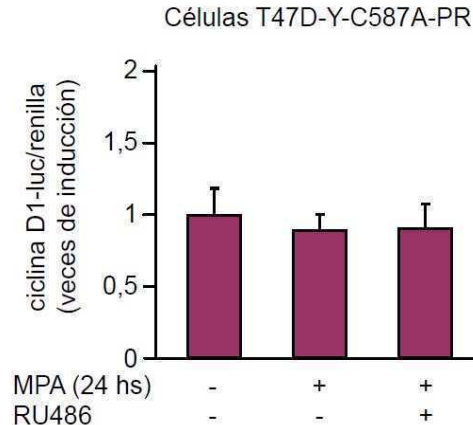


Figura 60. MPA no es capaz de inducir la activación del promotor de ciclina D1 en células T47D-Y-C587A-PR. Células T47D-Y-C587A-PR fueron transfectadas durante 24 hs con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del plásmido reportero -1745 ciclina D1-luc junto con 10 ng/ml de luciferasa *Renilla*. Luego de 24 hs de ayuno, las células se preincubaron o no con RU486 10 nM y se trataron o no con MPA 10 nM durante 24 hs. Los resultados están presentados como veces de inducción de actividad luciferasa respecto a la de las células sin tratar (primera barra). Los datos presentados representan la media de tres experimentos independientes \pm SEM.

La localización nuclear de ErbB2 es fundamental para la proliferación progestágeno-dependiente de células de cáncer de mama

Con el propósito de investigar la correlación entre la translocación nuclear de ErbB2 inducida por MPA y la proliferación celular, examinamos la respuesta proliferativa *in vitro* a MPA de células C4HD reconstituidas con hErbB2 Δ NLS. El ensayo de incorporación de timidina tritiada de la figura 61 muestra que la respuesta proliferativa a MPA de las células C4HD fue inhibida al silenciar la expresión de ErbB2 con siRNAs. Al reconstituir la expresión de ErbB2 con hErbB2WT pero no con hErbB2 Δ NLS, se recuperó la respuesta proliferativa a MPA (figura 61). Como la mutante hErbB2 Δ NLS actúa de inhibidor dominante negativo de la translocación nuclear del receptor endógeno, es de esperar que la transfección con hErbB2 Δ NLS de células que expresan ErbB2 endógeno, afecte la proliferación inducida por MPA. Bajo estas condiciones, la respuesta a MPA también fue nula (figura 61).

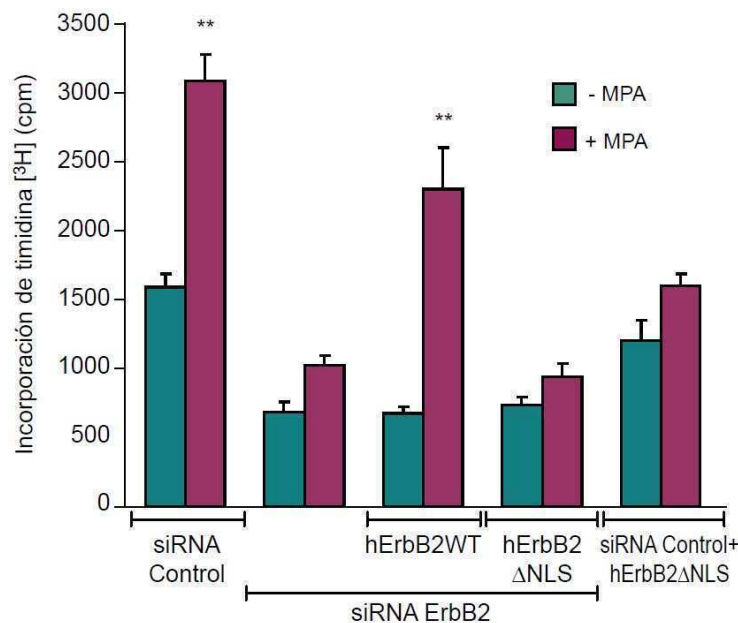


Figura 61. La localización nuclear de ErbB2 es fundamental para la proliferación *in vitro* de células C4HD. La expresión endógena de ErbB2 fue silenciada transfectando células C4HD durante 72 hs con siRNAs contra ErbB2 25 nM y se reconstituyó la expresión de hErbB2WT o hErbB2 Δ NLS cotransfectando con 2 μ g de cada plásmido. Como control, y para que todas las células tengan las mismas cantidades de siRNA y plásmido, se transfectó con siRNA control 25 nM y con 2 μ g del plásmido vacío pMe18SM. Después de 24 hs de ayuno fueron tratadas con MPA 10 nM durante 48 hs o permanecieron sin tratar. El ensayo de incorporación de timidina tritiada se utilizó como una medida de la síntesis de ADN. Los datos se presentan como la media de las cuentas por minuto \pm SD de octuplicados. ** vs sin MPA: $p < 0,001$. Se muestra un experimento representativo de tres.

La proliferación de células C4HD transfectadas con hErbB2 Δ NLS además fue evaluada por distribución del ciclo celular mediante ensayos de citometría de flujo de células teñidas con yoduro de propidio. Más del 50% de las células C4HD transfectadas con siRNA control se encontraron en las fases S y G2/M del ciclo celular al estimular con MPA, mientras que la mayoría de las células transfectadas con hErbB2 Δ NLS quedaron arrestadas en G0/G1 tras el tratamiento con el progestágeno (figura 62). Estos hallazgos demuestran una correlación directa entre la localización nuclear de ErbB2 y la proliferación inducida por progestágenos de células de cáncer mamario.

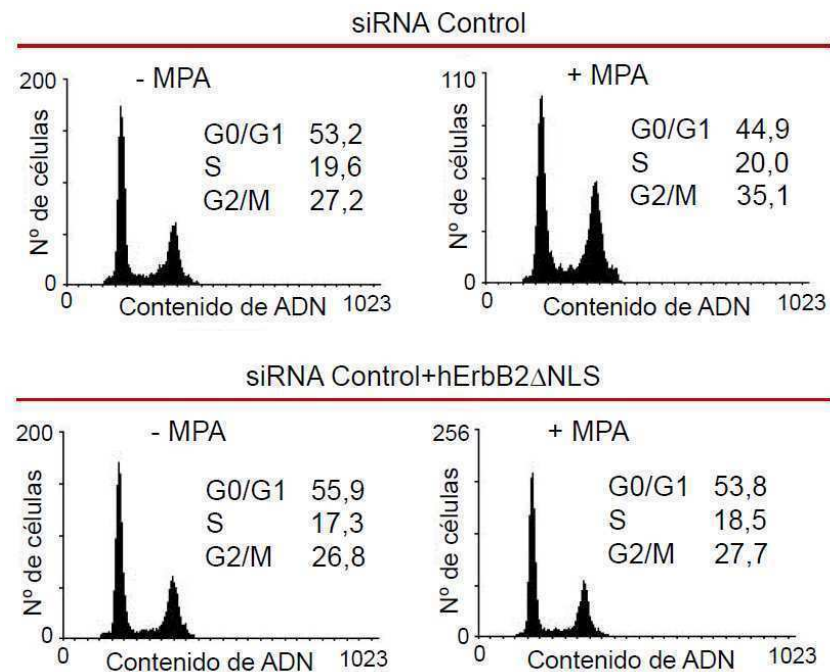


Figura 62. Proliferación de células C4HD que expresan hErbB2 Δ NLS medida por distribución del ciclo celular. Células C4HD fueron transfectadas y tratadas tal como se describió en la figura 61. Luego, fueron teñidas con yoduro de propidio y se analizó su distribución en el ciclo celular por citometría de flujo. Están indicados los porcentajes de células totales en cada fase del ciclo celular. Estos experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

El bloqueo de la localización nuclear de ErbB2 inhibe el crecimiento *in vivo* de tumores mamarios que expresan receptores de hormonas esteroideas y ErbB2

El modelo de cáncer de mama C4HD posee características únicas que lo hacen particularmente atractivo para experimentos *in vivo* en los que se quiere estudiar la función de ErbB2. Como los tumores C4HD sobreexpresan ErbB2 y también poseen altos niveles de expresión del receptor de estrógenos y progesterona, se asemejan al fenotipo presente en aproximadamente el 50% de los cánceres de mama humanos que sobreexpresan ErbB2, un fenotipo asociado a la resistencia a la terapia hormonal (Prat y Baselga 2008).

Cultivos primarios de células epiteliales C4HD fueron cotransfectados con el plásmido vacío pcDNA3.1 junto con siRNA control o con siRNA contra ErbB2, o con el vector de expresión de hErbB2 Δ NLS junto con siRNA contra ErbB2. Un millón de células fue inyectado subcutáneamente en la región tóraco-ventral de ratones hembras vírgenes BALB/c tratadas a su vez con un *depot* de MPA (conteniendo 40 mg cada uno). Todos los ratones (n=6) inyectados con células transfectadas con siRNA control desarrollaron tumores que fueron palpables a los 12 días de la inoculación. Por el contrario, sólo 4 de los 6 animales de cada uno de los grupos inyectados con células transfectadas con siRNA contra ErbB2 junto con el plásmido vacío o con hErbB2 Δ NLS desarrollaron tumores, con un retraso de 4 días en la latencia tumoral con respecto al grupo control. El silenciamiento de la expresión de ErbB2 inhibió en un 54% el crecimiento tumoral inducido por MPA ($p < 0,001$), y la reconstitución con hErbB2 Δ NLS provocó una inhibición del 57,6% ($p < 0,001$) (figura 63). La media del tamaño tumoral y la tasa de crecimiento de los dos grupos de tumores desarrollados a partir de las células transfectadas con siRNA contra ErbB2 fueron significativamente menores que aquellas de los tumores del grupo control (tabla 3 y figura 63).

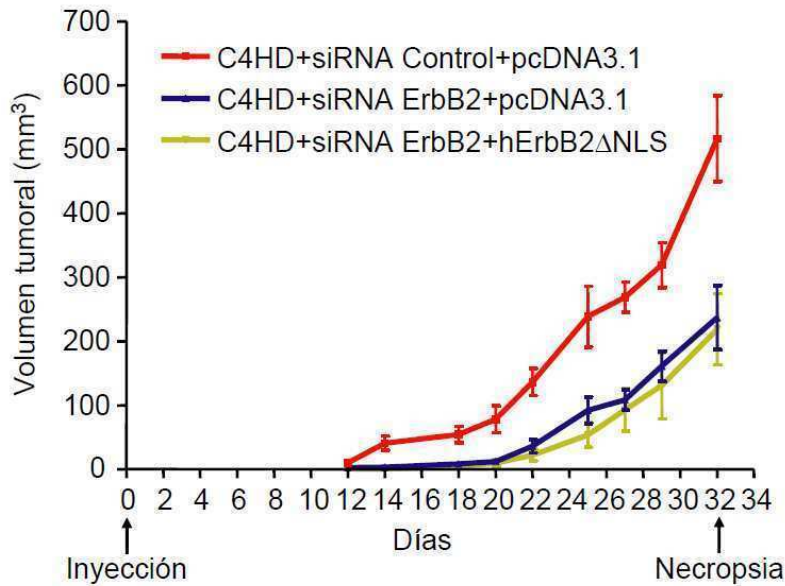


Figura 63. El bloqueo de la localización nuclear de ErbB2 inhibe el crecimiento in vivo progéstgeno-dependiente de tumores mamarios C4HD. Células C4HD fueron cotransfectadas por 72 hs con el plásmido vacío pcDNA3.1 junto con siRNA control o con siRNA contra ErbB2, o con hErbB2ΔNLS junto con siRNA contra ErbB2. Un millón de células fue inyectado s.c. en la región tóraco-ventral de ratones hembras vírgenes BALB/c tratadas a su vez, en el flanco opuesto, con un *depot* de MPA (conteniendo 40 mg cada uno). Los volúmenes tumorales fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos. Cada punto representa el volumen tumoral medio \pm SEM de 4 tumores para todos los grupos experimentales excepto para C4HD+siRNA Control+pcDNA3.1 que contenía 6 tumores.

Tabla 3. Crecimiento de los tumores C4HD

Grupo experimental	Media del volumen tumoral (mm ³) \pm SEM	Tasa de crecimiento (mm ³ /día) \pm SEM
Primer protocolo		
C4HD+siRNA Control+pcDNA3.1	516,7 \pm 67,1	23,1 \pm 1,5
C4HD+siRNA ErbB2+pcDNA3.1	237,1 \pm 50,1*	11,2 \pm 0,9*
C4HD+siRNA ErbB2+hErbB2ΔNLS	218,7 \pm 55,5*	10,2 \pm 1,6*
Segundo protocolo		
C4HD+pcDNA3.1	491,8 \pm 64,0	32,1 \pm 3,5
C4HD+hErbB2ΔNLS	123,1 \pm 21,8 [#]	8,5 \pm 1,0 [#]

Los volúmenes tumorales fueron calculados al día 32 post-inyección de células en el primer protocolo experimental y al día 20 en el segundo protocolo, como $(L \times A^2)/2$, donde L=largo (mm) y A=ancho (mm). Las tasas de crecimiento tumoral fueron determinadas como las pendientes de las curvas de crecimiento. * $p < 0,001$ con respecto a C4HD+siRNA Control+pcDNA3.1; # $p < 0,001$ con respecto a C4HD+pcDNA3.1.

Luego realizamos un segundo protocolo experimental en el que nos preguntamos si la transfección de la mutante hErbB2 Δ NLS en células C4HD que mantienen la expresión endógena de ErbB2 podría modular la respuesta proliferativa a MPA *in vivo*. Para esto, células C4HD fueron transfectadas con el vector hErbB2 Δ NLS o con el vector vacío pcDNA3.1 como control. Un millón de células fue inyectado subcutáneamente en dos grupos de 6 ratones cada uno, tratados con el *depot* de MPA. Todos los ratones de ambos grupos desarrollaron tumores que fueron palpables luego de 5 días de la inoculación. Como se muestra en la figura 64, la expresión de hErbB2 Δ NLS en las células C4HD inhibió en un 75% el crecimiento tumoral inducido por MPA ($p < 0,001$). La media del tamaño tumoral y la tasa de crecimiento del grupo de tumores desarrollados a partir de las células transfectadas con hErbB2 Δ NLS fueron significativamente menores que aquellas de los tumores del grupo control (tabla 3 y figura 64).

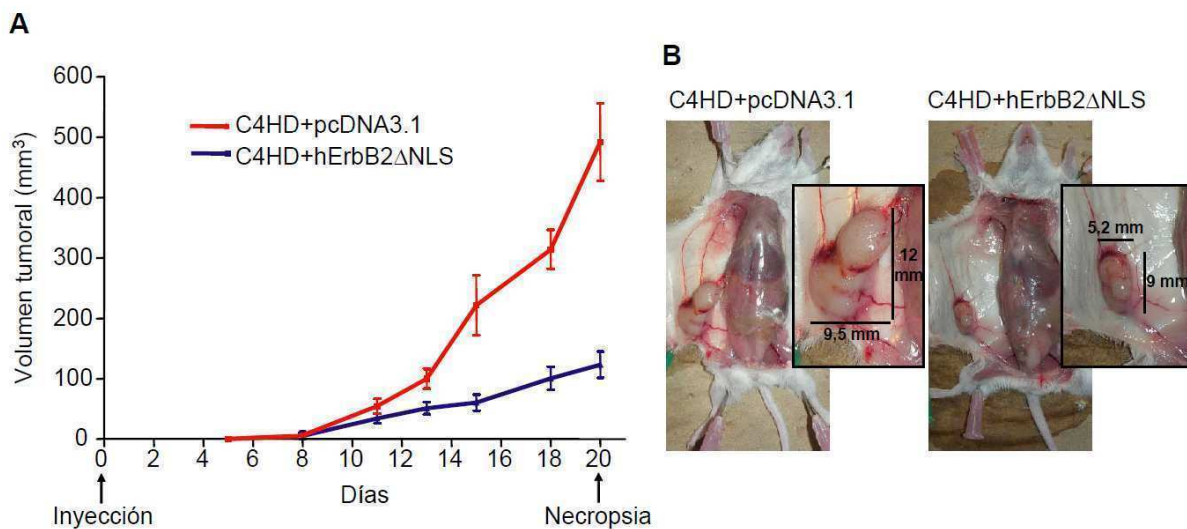


Figura 64. La expresión del vector hErbB2 Δ NLS inhibe el crecimiento *in vivo* progestágeno-dependiente de tumores mamarios C4HD que retienen la expresión endógena de ErbB2. **A.** Células C4HD fueron transfectadas por 48 hs con el plásmido vacío pcDNA3.1 o con hErbB2 Δ NLS. Un millón de células fue inyectado s.c. en la región tóraco-ventral de ratones hembras vírgenes BALB/c tratadas con un *depot* de MPA. Los volúmenes tumorales fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos. Cada punto representa el volumen tumoral medio \pm SEM de 6 tumores para los dos grupos experimentales. **B.** Fotografías representativas de tumores provenientes de células transfectadas con pcDNA3.1 o con hErbB2 Δ NLS, desarrollados con MPA. En los recuadros de la derecha se muestran los tumores detallados con sus medidas correspondientes.

Los animales fueron sacrificados y los tumores extraídos al día 32 post-inyección en el primer protocolo experimental (figura 63) y al día 20 en el segundo protocolo (figura 64). Los análisis histopatológicos mostraron que los tumores de los dos grupos de ratones que recibieron las células transfectadas con siRNAs contra ErbB2 junto con el plásmido vacío o con hErbB2 Δ NLS y el grupo de tumores desarrollados a partir de las células transfectadas con hErbB2 Δ NLS, exhibieron un grado histológico de II, con 3 a 4 mitosis por 10 HPF, mientras que los tumores de los grupos controles de ambos protocolos experimentales presentaron un grado histológico de III con más de 10 mitosis por 10 HPF (figura 65).

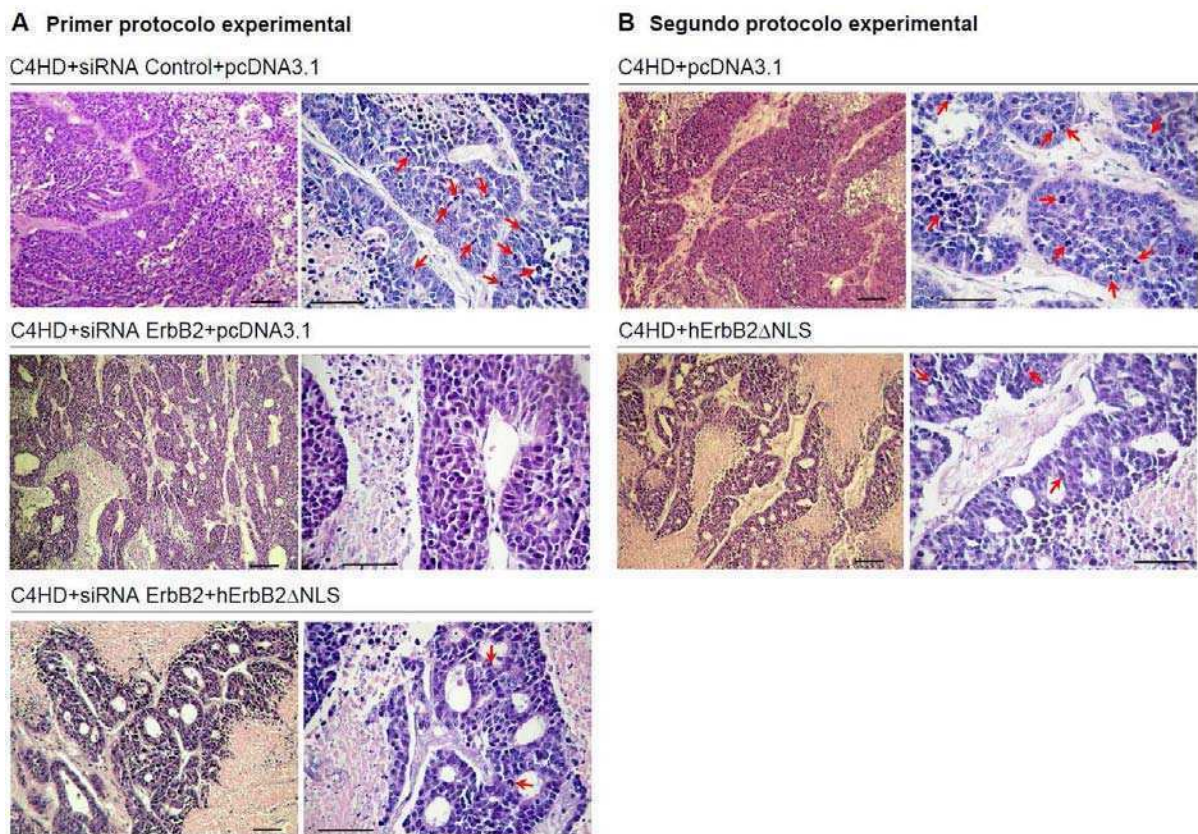


Figura 65. Exámenes histopatológicos de los tumores mamarios C4HD. Al día 32 post-inyección en el primer protocolo experimental y al día 20 en el segundo protocolo, los animales fueron sacrificados y los tumores extraídos. Fotografías representativas de secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina de los tumores provenientes del primer protocolo experimental (A) y del segundo protocolo (B). En los paneles superiores de A y B se aprecia una neoplasia epitelial maligna de grado III, con pleomorfismo celular acentuado, áreas de necrosis y sin formación de túbulos. En los paneles del medio e inferiores se observa una neoplasia epitelial maligna de grado II, con pleomorfismo celular moderado a acentuado, grandes áreas de necrosis y con formación de túbulos. En las fotografías de la derecha de A y B se indican las mitosis con flechas rojas. Barras de escala: 100 μ m.

Los análisis histopatológicos de ejemplares de pulmón, ganglios, corazón, hígado y páncreas provenientes de los dos protocolos experimentales no revelaron desarrollo de metástasis y tampoco se observó toxicidad en ningún órgano (resultados no mostrados). Asimismo, no se observó pérdida de peso en ningún animal.

Las estrategias experimentales utilizadas aquí se basan en transfecciones transientes con el vector hErbB2 Δ NLS. Por lo tanto, para conocer el porcentaje de células aún transfectadas, evaluamos su expresión intratumoral al final de los experimentos. Considerando las implicancias de mayor alcance del uso de hErbB2 Δ NLS como terapia de agente único, elegimos estudiar ejemplares del segundo protocolo experimental. Como el vector hErbB2 Δ NLS está etiquetado con GFP, se analizó el contenido de fluorescencia por citometría de flujo. La figura 66 A muestra que al día 20 aproximadamente el 30% de las células aún expresaban la mutante hErbB2 Δ NLS.

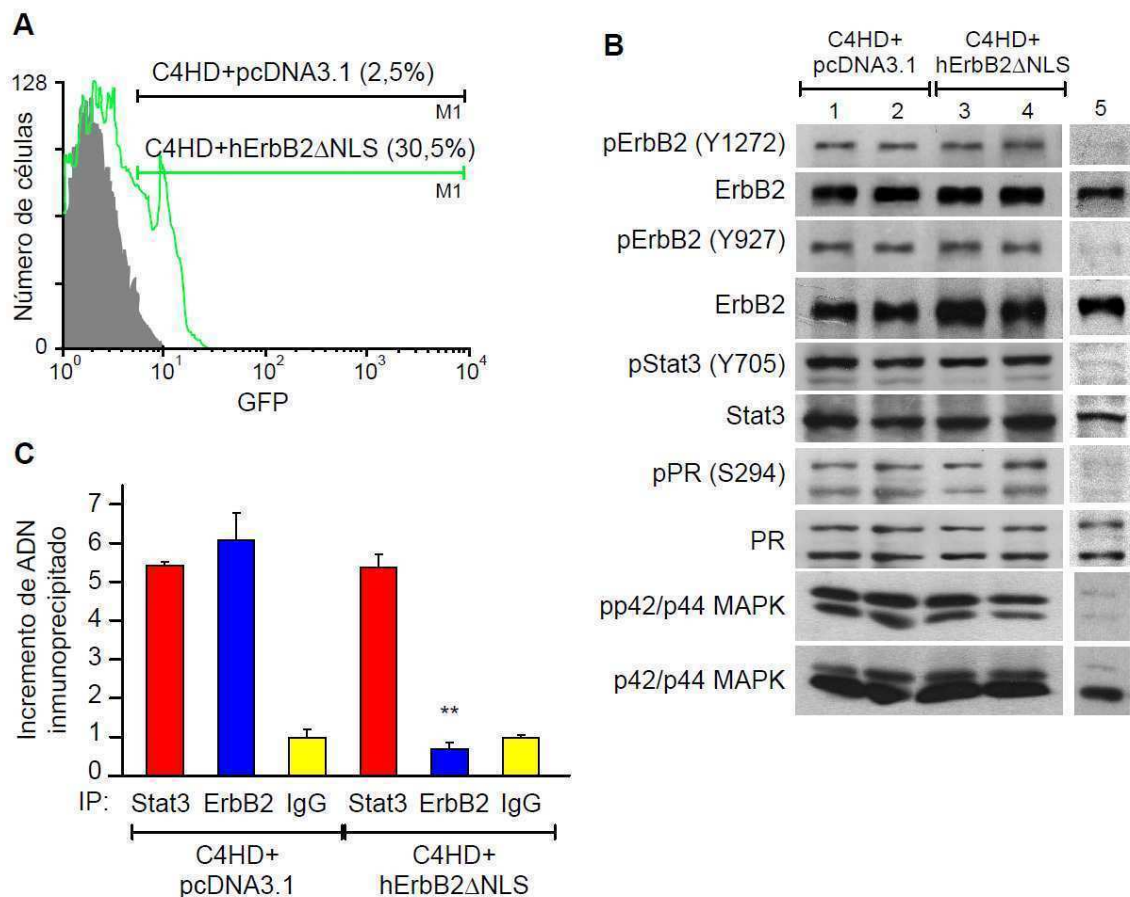


Figura 66. Estudios moleculares de los tumores mamarios C4HD. **A.** Tumores desarrollados a partir de células transfectadas con pcDNA3.1 o con hErbB2 Δ NLS fueron digeridos mecánicamente al día 20, cuando se extrajeron, y se evaluaron los niveles de expresión de GFP del vector hErbB2 Δ NLS (contenido de fluorescencia) por citometría de flujo. Se muestra el resultado de un ejemplar representativo de cada

tipo tumoral. **B.** Con los tumores C4HD del segundo protocolo experimental se realizaron extractos proteicos y 25 µg fueron analizados por WB. Las membranas reveladas con los anticuerpos contra las formas fosforiladas de las proteínas, fueron luego sometidas a *stripping* y reveladas con anticuerpos contra las proteínas totales. Se muestra el resultado de dos tumores representativos de cada grupo. En la calle 5 se sembró un extracto total de células C4HD provenientes de cultivo celular, sin tratar con MPA, como control del estado de fosforilación de las proteínas. El WB se repitió tres veces con resultados similares. **C.** Tumores de los dos grupos fueron digeridos mecánicamente, se realizaron extractos para ensayos de ChIP, y se inmunoprecipitó Stat3, ErbB2, PR o IgG como control negativo. El ADN se amplificó por PCR en tiempo real utilizando los *primers* esquematizados con flechas rojas en la figura 56 A. Los valores obtenidos para cada muestra fueron divididos por los obtenidos para el ADN total, estableciendo en 1 los valores de las muestras inmunoprecipitadas con IgG, y determinando las veces de incremento de ADN inmunoprecipitado relativo a ese punto. Los datos mostrados son la media de tres réplicas ± SEM. ** $p < 0,001$ respecto a IP: ErbB2 de C4HD+pcDNA3.1.

Luego se examinó el estado de activación de ErbB2, Stat3, MAPKs p42/p44 y PR en ejemplares de extractos tumorales del segundo protocolo experimental. La fosforilación de MAPKs p42/p44 se evaluó como clásica cascada de señalización activada por ErbB2. Los niveles de fosforilación de ErbB2, Stat3 y MAPKs p42/p44 en los tumores desarrollados a partir de células transfectadas con el plásmido vacío fueron similares a los provenientes de células con hErbB2ΔNLS (figura 66 B). También presentaron niveles comparables de fosforilación de PR en serina 294, que correlaciona directamente con su actividad transcripcional (Shen *et al.* 2001). Esto indica que durante el desarrollo tumoral inducido por MPA, la mutante hErbB2ΔNLS provocó una inhibición del crecimiento manteniendo sus funciones citoplasmáticas y de membrana intactas.

Ensayos de ChIP demostraron que los niveles de reclutamiento de Stat3 en los sitios GAS -971 y -874 del promotor de ciclina D1 murino en los tumores desarrollados a partir de células transfectadas con el plásmido vacío fueron similares a los encontrados en los tumores provenientes de células con hErbB2ΔNLS (figura 66 C). Por el contrario, no encontramos reclutamiento de ErbB2 en el promotor de ciclina D1 de los tumores desarrollados con células transfectadas con hErbB2ΔNLS (figura 66 C). Estos resultados sostienen la participación directa del complejo transcripcional nuclear que caracterizamos en este trabajo, formado por Stat3, ErbB2 y PR, en el crecimiento *in vivo* de tumores mamarios que expresan tanto PR como ErbB2.



DISCUSIÓN

Formación del complejo nuclear Stat3/ErbB2 inducida por HRG y MPA

En el presente trabajo identificamos un rol completamente nuevo de ErbB2 en el cáncer de mama, demostrando su capacidad de funcionar como coactivador transcripcional de Stat3. Resulta interesante resaltar que estamos definiendo una nueva clase de complejo transcripcional, en el que el factor de transcripción (Stat3) es a su vez un blanco río abajo de su coactivador (ErbB2). A nivel citoplasmático, ErbB2 activado por HRG o a través de PR unido a su ligando, actúa jerárquicamente como un efector río arriba de Stat3, induciendo la fosforilación de Stat3 en tirosina, mediada por las quinasas Jaks. Esto permite la translocación de Stat3 hacia el núcleo celular, donde actúa de factor de transcripción. Demostramos que la estimulación de células de cáncer de mama con HRG o con progestágenos promueve la translocación nuclear de ErbB2 y Stat3. En el núcleo encontramos colocalización e interacción física entre Stat3 y ErbB2, y la formación de un complejo transcripcional en el promotor de ciclina D1. En este complejo, Stat3 funciona de factor de transcripción, uniéndose directamente a sus elementos respondedores, y ErbB2 cumple el rol de coactivador de Stat3. Cuando la estimulación está dada por progestágenos, PR unido a su ligando también se recluta junto con Stat3 y ErbB2, formando parte del complejo transcripcional. Estos hallazgos revelan un nuevo e inesperado mecanismo de acción genómico no clásico del receptor de progesterona, ya que promueve la activación de Stat3 y ErbB2 a nivel citoplasmático y luego forma parte de un complejo transcripcional en el que no se une directamente al ADN. Mostramos que el reclutamiento de ErbB2 es fundamental para la unión de PR con Stat3 en el promotor de ciclina D1. Asimismo, en este complejo transcripcional, el reclutamiento de PR es necesario para que ocurra la unión de ErbB2 con Stat3. En la figura 67, se muestran dos modelos para esquematizar la acción de HRG y de los progestágenos en células de cáncer de mama, que describimos en este trabajo.

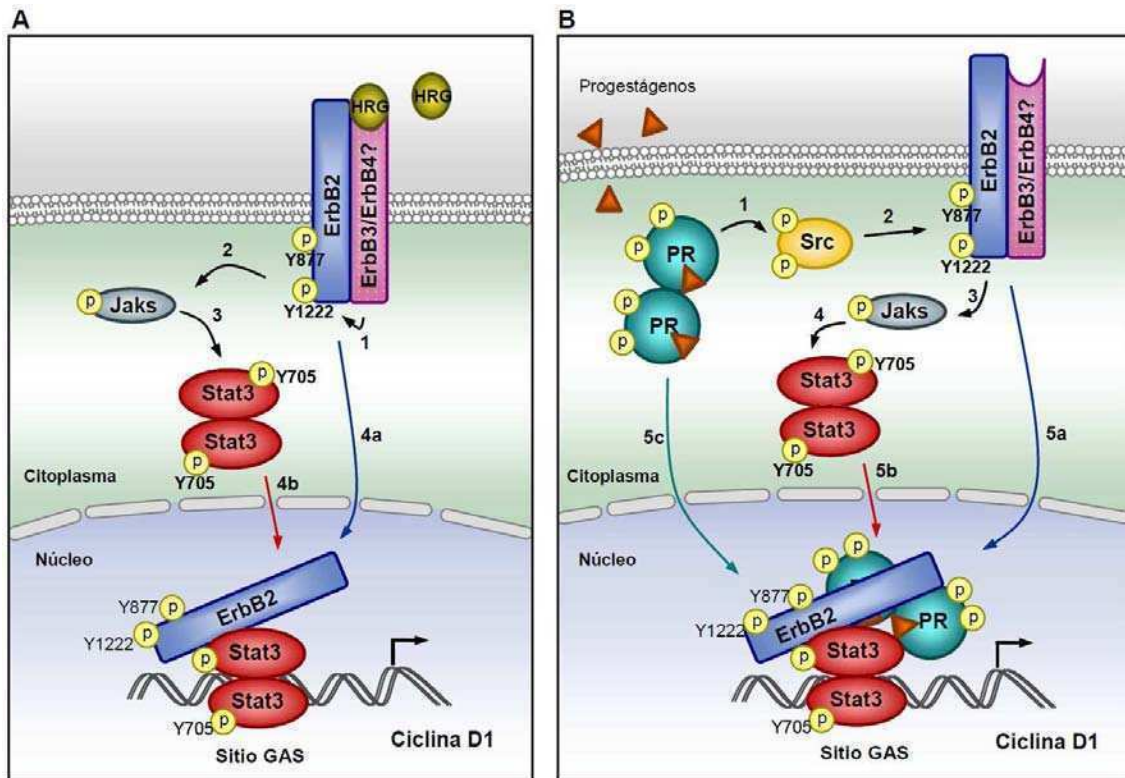


Figura 67. Modelos de formación de los complejos transcripcionales inducidos por HRG y progestágenos. **A.** La unión de HRG a su receptor, probablemente ErbB3 o ErbB4, provoca la heterodimerización con ErbB2, lo que induce la fosforilación de ErbB2 en tirosina 1222 y 877 (1). ErbB2 activado promueve la fosforilación de las quinasas Jaks (2), necesaria para la activación de Stat3 (3). ErbB2 y Stat3 activados translocan luego al núcleo (4a y 4b) donde forman un complejo transcripcional en los sitios GAS del promotor de ciclina D1, en el que ErbB2 actúa de coactivador de Stat3. **B.** El receptor de progesterona unido a su ligando induce la activación de Src (1) y la consecuente fosforilación de ErbB2 en tirosina 1222 y 877 (2). ErbB2 activado por estos efectos rápidos, no genómicos del PR promueve la fosforilación de las quinasas Jaks (3), necesaria para la activación de Stat3 (4). ErbB2 y Stat3 activados por PR translocan luego al núcleo (5a y 5b) donde forman un complejo transcripcional en los sitios GAS del promotor de ciclina D1, en el que ErbB2 actúa de coactivador de Stat3. PR también es ensamblado en el complejo transcripcional Stat3/ErbB2 (5c).

Los ensayos de proliferación *in vitro* y los de crecimiento tumoral *in vivo* realizados en esta Tesis, demuestran claramente que la presencia de ErbB2 en el núcleo, y consecuente formación del complejo Stat3/ErbB2, es un requisito absoluto para la proliferación de células de cáncer de mama inducida por HRG o por progestágenos, sugiriendo entonces que ErbB2 nuclear modula la tumorigénesis mamaria.

Los trabajos de Hung y colaboradores expandieron los conocimientos sobre la biología de ErbB2 al mostrar su localización nuclear y su capacidad de unirse a secuencias específicas del ADN denominadas HAS (por las siglas en inglés *HER2*

associated sequence). Los promotores que identificaron con secuencias HAS fueron los de los genes de PRPK (*p53-related protein kinase*), MMP-16 (*matrix metalloproteinase-16*), DDX-10 (*DEAD-box RNA helicase*) y COX-2 (*cyclooxygenase type II*). Solamente analizaron en detalle la interacción entre ErbB2 y el promotor de COX-2 (Wang *et al.* 2004). La asociación de ErbB2 con el promotor de COX-2 fue detectada tanto en células de cáncer de mama como en tumores primarios de mama humanos que sobreexpresan ErbB2. En estos trabajos se reportó la presencia de ErbB2 en el núcleo de modelos celulares en los que ErbB2 se encuentra constitutivamente activo (Wang *et al.* 2004). Continuando con la expansión de la comprensión de la biología de ErbB2, nuestros hallazgos conforman la primera evidencia de translocación nuclear de ErbB2 inducida por un ligando de los receptores ErbBs y por hormona. Además, describimos un nuevo rol de ErbB2 en el núcleo donde, en lugar de unirse a secuencias HAS para actuar de factor de transcripción, actúa de coactivador de otro factor de transcripción sin unirse directamente al promotor.

Interacción nuclear entre Stat3, ErbB2, ErbB3 y HRG

Mediante experimentos de microscopía confocal y coimmunoprecipitación, en esta Tesis mostramos que el tratamiento de las células T47D con HRG provocó la interacción a nivel nuclear de ErbB2 y ErbB3, de ErbB2 y HRG, y de ErbB3 y Stat3. Estos resultados sugieren que el estímulo con HRG induce la formación de heterodímeros ErbB2/ErbB3 que translocan al núcleo junto con el ligando, donde interactúan con Stat3 para formar complejos nucleares. Estos hallazgos junto con la evidencia de que las quinasas Jaks participan del mecanismo de activación de Stat3 inducida por HRG y que, en este mecanismo, ErbB2 actúa de manera jerárquica río arriba de las quinasas Jaks, nos permiten proponer el modelo esquematizado en la figura 68.

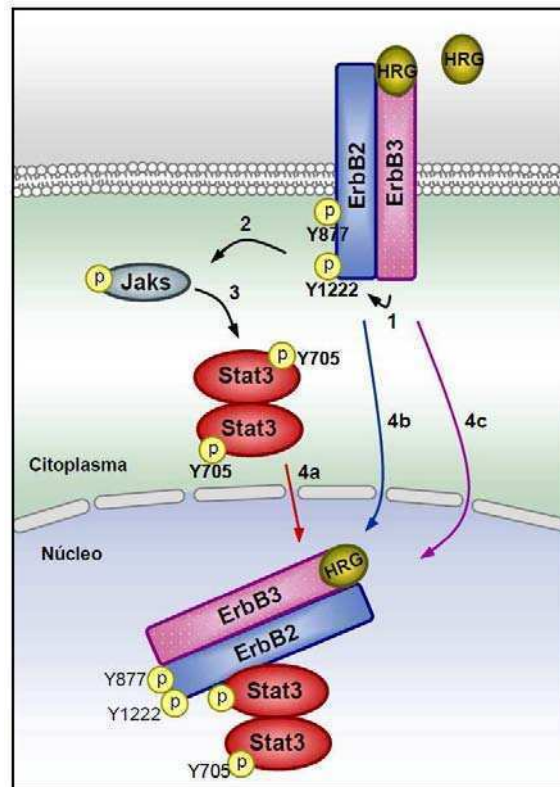


Figura 68. Modelo de formación del complejo nuclear Stat3/ErbB2/ErbB3/HRG. La unión de HRG a ErbB3 provoca la heterodimerización con ErbB2, lo que induce la fosforilación de ErbB2 en tirosina 1222 y 877 (1). ErbB2 activado promueve la fosforilación de las quinasas Jaks (2), necesaria para la activación de Stat3 (3), permitiendo la translocación nuclear de Stat3 (4a). ErbB2 y ErbB3 activados y unidos a HRG translocan luego al núcleo (4b y 4c) donde interactúan con Stat3.

Se ha reportado que los heterodímeros ErbB2/ErbB3 sufren una lenta endocitosis. Dependiendo del ligando al que estén unidos, la señalización puede continuar adentro del endosoma; la unión de HRG a ErbB3 es estable al pH endosomal (Kani *et al.* 2005). Asimismo, la presencia de HRG1 en el compartimiento nuclear ha sido bien reportada. En la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3 se demostró, mediante distintas técnicas, que HRG1 es rápidamente internalizada y transloca al núcleo como una molécula intacta. Además se mostró la presencia de una señal de localización nuclear en su secuencia (Li *et al.* 1996). La expresión nuclear de HRG1-4 también se detectó en carcinomas mamarios ductales de distintos grados de diferenciación (Marshall *et al.* 2006). Otro trabajo mostró que la localización nuclear de HRG1 es independiente del receptor, ya que, por un lado, se detectó en células que no expresan ninguno de sus receptores, ErbB3 ni ErbB4, y, por otro lado, no se vio afectada por la eliminación del dominio de unión al ligando del receptor (Golding *et al.* 2004). Los autores también

demonstraron que la secreción de HRG1 y la subsiguiente unión al receptor en la superficie celular no es un prerrequisito para la localización nuclear, y sugirieron que los ligandos no secretados podrían tener funciones específicas en el compartimiento nuclear (Golding *et al.* 2004). Queda por determinar en nuestro estudio si HRG endógena (cuya síntesis puede ser inducida por estimulación de las células con diferentes mitógenos) también localiza en el núcleo, y si esto depende de la translocación nuclear de su receptor.

De los cuatro miembros de la familia de los ErbBs, la localización nuclear ha sido estudiada más exhaustivamente para EGFR, y se sugirió que involucra su transporte desde los endosomas. Dentro del núcleo EGFR tendría funciones de factor de transcripción, agente remodelador de la cromatina, agente en la reparación del ADN y de transductor de señales por medio de su actividad tirosina quinasa (Wang y Hung 2009). Por el contrario, si bien ErbB3 fue detectado en el núcleo celular, además de su clásica localización en la membrana plasmática y en el citoplasma (Wells y Marti 2002; Carpenter 2003), existen pocos reportes sobre su localización nuclear, pero sugirieron una posible función interesante en este compartimiento. Ensayos en líneas celulares de cáncer de mama humano y en células de mama humanas inmortalizadas, mostraron la localización prominentemente nuclear del receptor ErbB3 entero, utilizando distintas técnicas y anticuerpos (Offterdinger *et al.* 2002). Se confirmó la presencia de una señal de localización nuclear activa en la región carboxi terminal de ErbB3. El tratamiento con un inhibidor de la exportación nuclear, indujo un aumento de las cantidades de ErbB3 en el compartimiento nuclear. En particular, en las células T47D, Offterdinger y colaboradores encontraron una localización de ErbB3 en la membrana plasmática y en el citosol, y luego del tratamiento con el inhibidor de la exportación nuclear, la localización del receptor fue predominantemente nuclear (Offterdinger *et al.* 2002). Sin embargo, la presencia de ErbB2 y de HRG no fue detectado en el núcleo de ninguno de los tipos celulares estudiados. Cuando las células inmortalizadas se diferenciaron y se polarizaron como resultado del crecimiento en una membrana permeable, ErbB3 nuclear se vio localizado principalmente en los nucleolos. En esas condiciones, la exposición a HRG durante tiempos prolongados (4 a 48 hs) resultó en un cambio de la localización del receptor desde los nucleolos hacia el nucleoplasma y luego hacia el citoplasma. El componente granular de los nucleolos es el sitio de procesamiento del ARNr y formación de los preribosomas. De este modo, los autores sugieren un rol para ErbB3 en la regulación de la biosíntesis de ribosomas durante el arresto del crecimiento,

y el tratamiento con HRG causaría la regulación negativa de este rol a través de su secuestro en el citoplasma durante la proliferación (Offterdinger *et al.* 2002).

En una línea celular transformada murina proveniente del epitelio pulmonar (células epiteliales tipo II) se observó una marcada localización nuclear de los cuatro receptores ErbBs en condiciones libre de suero y de estímulos. ErbB1 y ErbB3 se encontraron principalmente en los nucleolos, mientras que ErbB2 y ErbB4 se localizaron difusamente en el nucleoplasma y en menor cantidad, en el citoplasma. Estimulaciones cortas con HRG o EGF provocaron una tinción nuclear más pronunciada para ErbB2 y ErbB4. Coherente con los resultados de Offterdinger y colaboradores, el tratamiento con HRG resultó en un cambio de la localización de ErbB3 y también de ErbB1 desde los nucleolos hacia el nucleoplasma y en menor cantidad, hacia el citoplasma. Con distinta intensidad, los cuatro receptores colocalizaron entre ellos luego de la estimulación con HRG (Zscheppang *et al.* 2006). ErbB3 también fue detectado en el núcleo de células y líneas celulares de cáncer de próstata (Koumakpayi *et al.* 2006). Sus niveles nucleares fueron bajos o ausentes en tejidos no malignos y más frecuentes en cánceres refractarios a hormonas comparando con cánceres sensibles a hormonas, y se observó una correlación positiva entre la presencia de ErbB3 en el núcleo y la progresión tumoral. El tratamiento de líneas celulares de cáncer de próstata con HRG provocó la fosforilación en tirosina de ErbB3 en el citoplasma pero no en el núcleo, consistente con la ausencia de heterodímeros nucleares ErbB2/ErbB3 reportados por Offterdinger y colaboradores en células de cáncer de mama. A diferencia de este último trabajo, los estudios de Zscheppang y Koumakpayi no proponen una función precisa del receptor ErbB3 en el núcleo.

Nuestro trabajo es el primero que muestra la localización de las tres proteínas ErbB3, ErbB2 y HRG simultáneamente en el núcleo celular. Nuestros resultados nos permiten hipotetizar otra función de ErbB3 nuclear diferente a las reportadas: ErbB3 unido a su ligando HRG podría estar formando parte del complejo transcripcional nuclear Stat3/ErbB2 mostrado en el modelo de la figura 67, para regular la expresión de genes cuyos promotores poseen sitios de unión a Stat3. Sin embargo, sería necesario realizar los experimentos pertinentes para poner a prueba esta hipótesis.

ErbB2 transloca entero al núcleo, donde se encuentra fosforilado en los residuos tirosina 1222 y 877

Nuestros resultados de *Western Blot* realizados con extractos citosólicos y nucleares mostraron la translocación nuclear de la proteína ErbB2 entera, dado, por un lado, que el peso molecular de ErbB2 nuclear es igual al de ErbB2 presente en el extracto celular total y en la fracción citosólica, correspondiente a 185 kDa y, por otro lado, dos anticuerpos distintos dirigidos contra los extremos carboxi y amino terminal de ErbB2 reconocieron a la proteína en el extracto nuclear. Además, esos dos anticuerpos mencionados fueron utilizados para experimentos de microscopía confocal y reconocieron ErbB2 nuclear en células estimuladas con HRG o MPA, demostrando una vez más que bajo estas condiciones el receptor no se cliva, sino que se transloca entero al núcleo. En conjunto, nuestros resultados muestran que el receptor ErbB2 nuclear está constituido por la molécula intacta, lo cual concuerda con lo demostrado previamente para ErbB2 constitutivamente activo en células que sobreexpresan ErbB2 (Wang *et al.* 2004; Giri *et al.* 2005). Sin embargo, Baselga y colaboradores mostraron que el dominio extracelular de ErbB2 (el extremo amino terminal) puede sufrir una proteólisis en la membrana plasmática, lo que resulta en una activación constitutiva del dominio de ErbB2 remanente asociado a la membrana (Codony-Servat *et al.* 1999; Baselga y Albanell 2001). En otro trabajo, células HeLa y COS-7 fueron transfectadas con el dominio intracelular de ErbB2 (el extremo carboxi terminal, aminoácidos 655 a 1255) fusionado a GFP, y ese fragmento fue encontrado en el núcleo (Chen *et al.* 2005). Guo y colaboradores también demostraron que el dominio intracelular de ErbB2 entra al núcleo eficientemente en células SK-BR-3 y en células MCF-7, pero que la molécula completa se localiza predominantemente en la membrana citoplasmática (Chen *et al.* 2007). Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que un mismo receptor utilice diferentes mecanismos bajo distintas condiciones.

La actividad tirosina quinasa intrínseca de ErbB2 fue descrita como un requisito absoluto para la endocitosis y translocación del receptor hacia el núcleo (Wang *et al.* 2004). En este trabajo de Tesis, expandimos estos conocimientos mostrando que la translocación nuclear de ErbB2 requiere de su fosforilación en uno de los principales residuos de autofosforilación, tirosina 1222/1272 y en otro sitio distinto de los de autofosforilación, en el residuo tirosina 877/927, ubicado en el lazo de activación del

dominio quinasa (Guo *et al.* 2006; Xu *et al.* 2007). De esta manera, reportamos una nueva característica del estado de ErbB2 nuclear: su fosforilación en los residuos tirosina 1222/1272 y 877/927.

La proteína quinasa Src funciona de intermediario entre PR y ErbB2

Si bien la capacidad de ErbB2 para asociarse a Src y activarla es bien conocida (Kim *et al.* 2005), la función de Src como regulador río arriba de ErbB2 permanece poco explorada. Trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros grupos reportaron que Src actúa como activador de ErbB2 al inducir su fosforilación en el residuo tirosina 877 (Guo *et al.* 2006; Xu *et al.* 2007; Proietti *et al.* 2009). En el presente trabajo mostramos que MPA induce la fosforilación de ErbB2 en tirosina 1222/1272 y 877/927 tanto en las células T47D como en las C4HD, y este efecto fue bloqueado completamente por PP2 y RU486. Estos hallazgos son consistentes con un mecanismo en el que la fosforilación de ErbB2 en los residuos Y1222/1272 y Y877/927 es inducida por Src sí y sólo sí Src está activada por un PR unido a su ligando. Estos resultados están sustentados por los obtenidos en las células T47D-Y-PR-BmPro, que expresan la mutante de PR incapaz de activar las vías de señalización, en los que la fosforilación de ErbB2 no fue inducida por MPA. En resumen, se identifica un mecanismo en el que Src activada inicialmente por los efectos rápidos de PR unido a su ligando, actuaría como punto de convergencia entre ErbB2 y PR. Entonces, Src activada pasa a ser un modulador río arriba de ErbB2 induciendo la fosforilación en tirosina 1222/1272 y 877/927, que conduce a la activación de Stat3.

Importación nuclear de Stat3 y ErbB2: ambas proteínas deben estar fosforiladas para translocar al núcleo y para interactuar

La disección de la dependencia de la importación nuclear entre ErbB2 y Stat3 demostró que la translocación nuclear de Stat3 inducida por HRG o por progestágenos no depende de la migración nuclear de ErbB2, y viceversa. En este sentido, un trabajo que reportó la interacción nuclear entre Stat3 y EGFR, demostró que la importación nuclear de Stat3 puede ocurrir independientemente de la localización de EGFR (Lo *et*

al. 2005), coincidiendo con nuestros hallazgos. Previamente se describió la co-migración de Stat3 y el factor de crecimiento EGF desde la superficie celular hacia la región perinuclear a través de un mecanismo de endocitosis mediada por receptor (Bild *et al.* 2002). La colocalización de Stat3 con vesículas de endocitosis en tránsito desde la membrana celular hacia la región perinuclear, en respuesta a la estimulación con factores de crecimiento, indicaría que el transporte citoplasmático de Stat3 es un proceso activo. En nuestro trabajo el estímulo con HRG o MPA provocó el movimiento de hErbB2 Δ NLS desde la membrana citoplasmática hacia el citosol y a la región perinuclear, reteniendo de esta manera la capacidad potencial de co-transitar con Stat3 hasta esa zona. Sin embargo, ya atravesada la membrana nuclear, Stat3 no necesitaría de ErbB2 para ubicarse en el núcleo.

Está ampliamente reportado que la fosforilación de Stat3 en tirosina 705 es imprescindible para su migración nuclear (Darnell 1997; Bromberg y Darnell 2000). Sin embargo, un trabajo publicado en 2005 reportó que la fosforilación de Stat3 en tirosina es requerida para la unión de Stat3 a sus elementos respondedores en el ADN pero no para su importación nuclear, la cual ocurriría constitutivamente (Liu *et al.* 2005). En ese trabajo identificaron una región dentro del dominio “*coiled-coil*” (hélice superenrollada), en el extremo amino terminal de Stat3, que sería necesaria para la importación nuclear de la proteína, y demostraron que esa región es crítica para que sea reconocida por la proteína transportadora específica, la importina α 3. Sin embargo, nuestros resultados son consistentes con los de Darnell y Bromberg, porque la preincubación de las células C4HD y T47D con el inhibidor de las quinasas Jaks o con el inhibidor de ErbB2 (AG825), que previene la fosforilación de Stat3 inducida por HRG o MPA, resultó en una inhibición de la localización nuclear de Stat3. Además, estos hallazgos indican que ErbB2 juega un rol como inductor río arriba de la fosforilación de Stat3. Los resultados de los experimentos de fraccionamiento subcelular seguido de *Western Blot* y los de microscopía confocal mostraron que luego de la estimulación de las células con MPA o HRG durante 30 o 60 minutos, respectivamente, los niveles de fosforilación de ErbB2 y Stat3 en el citosol son muy bajos y las proteínas no colocalizan. Esto sugiere que ErbB2 y Stat3 sólo interactúan cuando ambas están fuertemente fosforiladas. En el caso de la estimulación por HRG, esta interacción sucede a los 10 minutos de tratamiento en el citosol (Proietti *et al.* 2009) y a tiempos más largos (1 hora), en el núcleo. El estudio mediante microscopía confocal de las células C4HD transfectadas con hErbB2 Δ NLS refuerza estos hallazgos,

dado que no se observó colocalización de Stat3 y hErbB2 Δ NLS a pesar de que las dos proteínas están presentes en el citoplasma tras la estimulación con HRG. En este caso sólo hErbB2 Δ NLS se encuentra fosforilada, ya que la fracción de Stat3 que permanece en el citoplasma a la hora de tratamiento con HRG, no está fosforilada.

Complejo transcripcional nuclear Stat3/ErbB2

Un trabajo anterior identificó la interacción nuclear entre EGFR y Stat3 en el promotor de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS), que contiene sitios de unión tanto para Stat3 como para EGFR, estos últimos denominados ATRS (por las siglas en inglés *AT rich sequence*) (Lo *et al.* 2005). En ese estudio, la naturaleza de la interacción nuclear entre EGFR y Stat3 fue explorada mediante una estrategia diferente a la nuestra, ya que se basó en la identificación de genes que contuvieran en sus promotores elementos respondedores a Stat3 y además ATRS. La presencia de dos secuencias ATRS y sitios de unión a Stat3 es esencial para la regulación del promotor de iNOS por EGFR (Lo *et al.* 2005). Esto distingue al complejo transcripcional Stat3/ErbB2 que nosotros identificamos en el promotor de ciclina D1, que requiere solamente de la unión de Stat3 a sus sitios GAS y el reclutamiento de ErbB2 a esos mismos sitios para actuar de coactivador de Stat3, sin unirse al ADN. Una posible interpretación de esta diferencia es que los complejos Stat3/EGFR y Stat3/ErbB2 regulan sus genes blancos mediante mecanismos distintos. También podría indicar que la naturaleza de la interacción nuclear entre Stat3 y los ErbBs dependería de los motivos de unión a Stat3 y ErbBs disponibles en la región promotora (o *enhancer*) del gen blanco, así como de las secuencias específicas y las características estructurales propias del ADN cercano a esos sitios de unión. Consistente con esto último, Stat3 y EGFR no se asocian juntos al promotor de ciclina D1, a pesar de contener ambos sitios ATRS y GAS (Lo *et al.* 2005) y de ser regulado por EGFR nuclear (Lin *et al.* 2001).

Unión de PR al complejo transcripcional Stat3/ErbB2 en el promotor de ciclina D1

Si bien la capacidad de los progestágenos, actuando a través de PR clásico, de inducir la expresión génica de ciclina D1 en células de cáncer de mama es bien

conocida (Faivre *et al.* 2005; Boonyaratanakornkit *et al.* 2007), poco se sabe de la contribución de la señalización rápida de PR y de los mecanismos transcripcionales de PR. Ciclina D1 no contiene PREs canónicos en su promotor proximal, por lo que este gen representa un modelo para investigar los mecanismos por los cuales los progestágenos unidos a PR regulan la expresión de genes independientemente de la unión de PR a sus PREs. Se ha demostrado que la activación inducida por progestágenos de las vías de las MAPKs y PI3K/Akt median la regulación de PR sobre la expresión de ciclina D1 en células de cáncer de mama (Faivre *et al.* 2005; Saitoh *et al.* 2005; Boonyaratanakornkit *et al.* 2007). Otro estudio sugirió que los progestágenos inducen la activación del promotor de ciclina D1 a través de la unión de PR al factor de transcripción AP-1 en un sitio de unión a AP-1 que se encuentra en el promotor proximal de ciclina D1 (Cicatiello *et al.* 2004). El mecanismo por el cual un factor de transcripción regula la expresión génica sin unirse a sus elementos respondedores en el ADN, sino estableciendo un contacto proteína-proteína con otro factor de transcripción en el ADN se lo denominó en inglés “tethering mechanism”. De esta manera, aunque sólo una de las dos proteínas se une al ADN, ambas poseen dominios de unión al ADN (Tung *et al.* 1993). Mediante este mecanismo se ha demostrado que PR se une al factor de transcripción Sp1 para regular la transcripción de genes cuyos promotores proximales contienen sitios de unión a Sp1 pero no PREs, como el promotor de p21 (Owen *et al.* 1998) y el de EGFR (Faivre *et al.* 2008).

Nuestros hallazgos proveen una comprensión totalmente novedosa del mecanismo por el cual PR induce la expresión de ciclina D1 en tumores mamarios, que integra la activación rápida de ErbB2 y Stat3 por PR unido a su ligando, y un mecanismo transcripcional no clásico de PR que consiste en la unión de un complejo nuclear sobre el promotor de ciclina D1, en el que ErbB2 actúa de coactivador de Stat3. Además, nuestro descubrimiento del co-reclutamiento de PR junto con Stat3 y ErbB2 en el promotor de ciclina D1 revela un nuevo aspecto del mecanismo no clásico de “tethering” de PR. Entonces, en este trabajo mostramos que el reclutamiento de ErbB2 es un requisito absoluto para el mecanismo de “tethering” de PR con Stat3 en los sitios GAS del promotor de ciclina D1. Esta es la primera demostración de una cooperación funcional en el núcleo entre un receptor de hormonas esteroideas, PR, y un receptor tirosina quinasa, ErbB2, para inducir la activación transcripcional de un gen. Encontramos también una explicación mecanística para la dependencia mutua entre ErbB2 y PR en la formación de un complejo transcripcional activo con Stat3.

Mostramos que el co-reclutamiento de coactivadores con actividad de remodelación de la cromatina, como CBP y p300, ocurre solamente si se forma el complejo multiproteico Stat3/ErbB2/PR.

Diversos estudios de receptores nucleares y sus sitios de unión a escala global genómica, mediante técnicas de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de la hibridización del producto a *microarrays* de oligonucleótidos (ChIP-chip) y captura de la conformación del cromosoma (*chromosome conformation capture*, 3C), demostraron que estos receptores pueden afectar la transcripción de un determinado gen uniéndose a secuencias muy lejanas (hasta 200 kilobases) del sitio de inicio de la transcripción, en regiones intergénicas e intrónicas (Carroll *et al.* 2005; Carroll *et al.* 2006; So *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007; Lefterova *et al.* 2008; Welboren *et al.* 2009). Estos hallazgos expandieron la noción de la clásica acción descrita para los receptores nucleares en los promotores proximales de genes respondedores a hormonas, para situarlos en contextos donde actúan como factores de largo alcance, más que como factores de transcripción clásicos. La organización espacial de los elementos respondedores a estos receptores en el núcleo puede implicar la combinación de múltiples sitios de unión, distales y proximales, mediante mecanismos de “*looping*”, para acercar elementos *enhancers* en *cis*- y en *trans*- a las proximidades del promotor (Biddie *et al.* 2009). Entonces, no podemos descartar la posibilidad de que el receptor de progesterona, además de su acción no genómica, activando rápidamente a ErbB2 y Stat3, regule la expresión de ciclina D1 a través de su acción como factor de largo alcance, acercándose a Stat3 desde regiones lejanas, pero unido a sus sitios PREs.

Formación del complejo nuclear Stat3/ErbB2 inducida por HRG

El reclutamiento simultáneo de Stat3 y ErbB2 en el promotor de ciclina D1 inducido por HRG lo corroboramos en distintas líneas celulares con diferentes niveles de expresión de ErbB2. Llamativamente, las líneas celulares con mayor expresión de ErbB2 mostraron un mayor reclutamiento del complejo Stat3/ErbB2 en los sitios GAS. Consistente con los resultados obtenidos en los experimentos de actividad luciferasa, en los que se detectó que la sobreexpresión de hErbB2WT aumentó fuertemente y de manera concentración-dependiente la actividad transcripcional de Stat3 sobre el promotor de ciclina D1 inducida por HRG, es posible que la correlación positiva que

encontramos entre la expresión de ErbB2 y la co-ocupación de Stat3 y ErbB2 inducida por HRG en el promotor de ciclina D1, se deba a un aumento de la actividad de ErbB2 como coactivador transcripcional de Stat3. Por otro lado, resulta interesante resaltar que la formación del complejo transcripcional Stat3/ErbB2 se observó en líneas celulares que expresan muy bajos niveles (o casi indetectables) de PR, como las células BT-474 y MCF-7. Estos resultados indican que la formación del complejo nuclear Stat3/ErbB2 inducida por HRG no requiere de la presencia de PR. También es posible que PR forme parte de este complejo en las células que lo expresan, dado que en trabajos anteriores del laboratorio se demostró la capacidad de HRG de inducir la activación de PR por un mecanismo que requiere la presencia de ErbB2 funcional y la activación de las p42/p44 MAPKs (Labriola *et al.* 2003). Sería necesario realizar los experimentos apropiados para dilucidarlo.

Acción de ErbB2 como coactivador

Además de ErbB2, todos los demás miembros de la familia de los ErbBs han sido detectados en el núcleo celular (Wang y Hung 2009). Como los receptores ErbBs no tienen dominios clásicos de unión al ADN, se propuso que otros factores de transcripción con capacidad de unirse al ADN cooperan con los ErbBs para regular la expresión génica. Si bien los primeros trabajos de Hung y colaboradores demostraron que ErbB2 modula la activación del promotor de COX-2 funcionando de factor de transcripción (Wang *et al.* 2004), la capacidad de ErbB2 de actuar de coactivador transcripcional no ha sido aún explorada. Los estudios realizados en el presente trabajo en células de cáncer de mama humano y murino proveen las primeras evidencias de la acción de ErbB2 como coactivador transcripcional.

En esta Tesis demostramos que ErbB2 cumple con la definición más amplia y general de un coactivador, es decir, una molécula que es reclutada por factores de transcripción unidos al ADN para aumentar la transcripción (O'Malley y Kumar 2009). Los experimentos clave realizados en este trabajo para postular a ErbB2 como coactivador transcripcional de Stat3 son los de activación del gen reportero, en los que la sobreexpresión de ErbB2 salvaje en células transfectadas con construcciones con promotores conteniendo sitios de unión a Stat3, aumentó fuertemente y de manera concentración-dependiente la activación del gen reportero inducida por HRG o por

MPA. Cuando las células fueron transfectadas con hErbB2 Δ NLS, los mitógenos no fueron capaces de inducir la actividad transcripcional de Stat3 sobre los promotores de las distintas construcciones utilizadas. En estas últimas condiciones, a pesar de que Stat3 se encuentra activa en el núcleo, no es capaz de activar la transcripción génica si ErbB2 no está disponible en el núcleo. Otro aporte importante para la definición del nuevo rol que identificamos de ErbB2, son los resultados de los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en células T47D transfectadas con hErbB2 Δ NLS, en los que mostramos que si ErbB2 no se recluta junto con Stat3 en el promotor de ciclina D1, no se puede formar un complejo transcripcionalmente activo ya que tampoco se reclutan las histonas acetiltransferasas, CBP y p300, necesarias para descomprimir la cromatina y, consistentemente, no se acetilan las histonas H3 ni H4.

Está claro que los coactivadores son muy diversos, no sólo en cuanto a la estructura que presentan sino también por el modo en el que interactúan con los factores de transcripción para regular el proceso de transcripción. De acuerdo al mecanismo de acción, los coactivadores han sido divididos en dos clases principales: 1) coactivadores primarios que se unen directamente a factores de transcripción y que contienen a menudo actividades enzimáticas relevantes necesarias para cambiar la estructura de la cromatina de un estado quiescente a uno que permite la transcripción génica activa; ejemplos de este tipo de coactivadores son p300, CBP y PCAF, dotados de una potente actividad histona acetiltransferasa, y 2) coactivadores secundarios que se acoplan a factores de transcripción y forman un andamiaje, facilitando el reclutamiento de otras proteínas que contienen actividades enzimáticas relevantes, resultando en el ensamblaje de complejos transcripcionales multi-proteicos (Korzus *et al.* 1998; Hoffmann y Spengler 2008). Generalmente los correguladores exhiben una gran variabilidad en sus propiedades enzimáticas y de andamiaje; sin embargo, dependen invariablemente de las proteínas “localizadoras” –i.e., los factores de transcripción que se unen a secuencias específicas en el ADN– para desempeñar sus roles (Ptashne y Gann 1997; Ptashne 2003). Nuestros resultados de los ensayos de ChIP en células transfectadas con hErbB2 Δ NLS, demuestran claramente que ErbB2 participa en la formación de un andamiaje para facilitar el reclutamiento de p300 y CBP. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que ErbB2 posea actividad de histona acetiltransferasa o de ADN desmetilasa o alguna otra actividad remodeladora de la cromatina aún no identificada.

Relación de Stat3 y ErbB2 con la tumorigénesis mamaria

Los mecanismos moleculares de la interacción entre ErbB2 y Stat3 que promueven el crecimiento de carcinomas mamarios permanecen muy poco explorados. Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró que ErbB2 activado por HRG induce la activación de Stat3 a través de la participación de PR como molécula de señalización sin unirse a su ligando. Una vez activada, Stat3 actúa como un efector río abajo tanto de HRG/ErbB2 como de un PR no unido a su ligando para inducir la proliferación en tumores mamarios (Proietti *et al.* 2009). Por otro lado, se reportó que la inhibición de Stat3 mediante péptidos bloqueantes inhibió la proliferación de células de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB2 (Tan *et al.* 2006). También se demostró que la sobreexpresión de ErbB2 correlaciona con la activación de Stat3 y consecuente unión de Stat3 a sus elementos respondedores en el promotor de p21^{Cip1}, y que esto está asociado a la resistencia a la quimioterapia en tumores mamarios (Hawthorne *et al.* 2009). El presente trabajo demuestra una correlación directa entre la función de ErbB2 nuclear como coactivador transcripcional de Stat3 y el crecimiento de tumores mamarios. Encontramos que células que expresan la mutante de ErbB2 incapaz de translocar al núcleo, hErbB2 Δ NLS, muestran una reducción en la respuesta proliferativa a HRG y progestágenos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados fueron obtenidos tanto en células cuya expresión de ErbB2 endógeno fue silenciada, como en células que retienen la expresión de ErbB2 endógeno. Cabe destacar que mostramos por primera vez que la mutante hErbB2 Δ NLS funciona como un inhibidor dominante negativo de la translocación nuclear de ErbB2 endógeno, probablemente mediante la formación de dímeros ErbB2 endógeno-hErbB2 Δ NLS que “secuestran” la proteína endógena en el citoplasma. Los experimentos realizados por Hung y colaboradores, en aquellos trabajos en los que identificaron el dominio de localización nuclear de ErbB2 y diseñaron y describieron la mutante hErbB2 Δ NLS (Giri *et al.* 2005), se llevaron a cabo en células que no expresan ErbB2 (o expresan muy bajos niveles), como las líneas 293 y CHO. Cuando transfectaron con hErbB2 Δ NLS las células SK-BR-3, que sobreexpresan ErbB2, no analizaron la localización del receptor endógeno.

Sustentando el concepto desarrollado en esta Tesis acerca del rol clave que desempeña el receptor ErbB2 nuclear en la tumorigénesis mamaria, demostramos que tras la estimulación con HRG y progestágenos, hErbB2 Δ NLS retiene su actividad

tirosina quinasa intrínseca intacta, siendo capaz de activar las vías de señalización clásicamente activadas por ErbB2, las MAPKs y PI3K/Akt, y de inducir la fosforilación de Stat3. Esto indica que a pesar de una función intacta como receptor tirosina quinasa de membrana y activador de las vías de señalización mitogénicas, el bloqueo de la función nuclear de ErbB2 impide notablemente sus efectos proliferativos en el desarrollo del cáncer de mama. La transfección con la mutante hErbB2 Δ NLS de células C4HD y JIMT-1 que retienen la expresión endógena de ErbB2, inhibió fuertemente el crecimiento tumoral. Esto es consistente con nuestros hallazgos en los que identificamos el rol de hErbB2 Δ NLS como un inhibidor dominante negativo de la translocación nuclear de ErbB2 endógeno. Los estudios moleculares de los tumores provenientes de ratones inyectados con células transfectadas con hErbB2 Δ NLS presentaron altos niveles de fosforilación de ErbB2, Stat3 y Akt o p42/p44 MAPKs. También encontramos un fuerte reclutamiento de Stat3 en el promotor de ciclina D1 en los tumores desarrollados con células transfectadas con hErbB2 Δ NLS y con MPA. En esos tumores no se observó la unión de ErbB2 en el promotor de ciclina D1. En conjunto, estos resultados poseen implicancias terapéuticas de largo alcance, ya que indican que el crecimiento de tumores mamarios con un ErbB2 con funciones tirosina quinasa intactas, puede ser inhibido mediante el bloqueo de la translocación de ErbB2 hacia el núcleo.

Actualmente, el único gen cuya expresión se demostró que es modulada por la función de ErbB2 como factor de transcripción, es COX-2 (Wang *et al.* 2004). En ese trabajo los autores mostraron que la inhibición de la expresión de COX-2 en células MCF-7 que sobreexpresan ErbB2 suprimió la actividad invasiva de esas células. Indudablemente, otros genes aún no identificados regulados por ErbB2 mediante su función como factor de transcripción, podrían estar involucrados en los efectos proliferativos de ErbB2 nuclear. Del mismo modo, la función de ErbB2 como coactivador de Stat3 podría suceder virtualmente en todos los genes regulados por Stat3, o incluso ErbB2 podría coactivar otros factores de transcripción. La función de ErbB2 en el núcleo celular conforma un nuevo campo de investigación, y los resultados de esta Tesis ponen en relieve la importancia de desarrollarlo.

Acción de la mutante hErbB2 Δ NLS versus trastuzumab

Debido al rol que ErbB2 y EGFR desempeñan en la patogénesis del cáncer, se convirtieron en importantes blancos de las terapias anticáncer: se han desarrollado drogas contra ambos receptores. En particular, la participación de ErbB2 en el desarrollo del cáncer de mama generó la implementación de distintas estrategias terapéuticas (Yarden y Sliwkowski 2001). Estas estrategias incluyen el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el dominio extracelular del receptor, como el trastuzumab, y el uso de pequeñas moléculas inhibidoras de tirosina quinasa, como el lapatinib, que inhibe la actividad tirosina quinasa tanto de ErbB2 como de EGFR (Baselga y Norton 2002).

El lapatinib (GW572016) inhibe los procesos de señalización de los receptores uniéndose al bolsillo de unión a ATP del dominio quinasa de ErbB2 y EGFR, previniendo la autofosforilación y subsiguiente activación de los mecanismos de señalización (Nelson y Dolder 2006). Además de la vía PI3K/Akt, el lapatinib inhibe la señalización de otras vías, como la de las MAPKs, y regula negativamente la expresión de proteínas anti apoptóticas, como survivina (Xia *et al.* 2002; Xia *et al.* 2006).

El anticuerpo monoclonal humanizado trastuzumab (Herceptin), que se une con alta afinidad al dominio extracelular de ErbB2 (Hudziak *et al.* 1989; Carter *et al.* 1992; Burgess *et al.* 2003), ha sido utilizado para el tratamiento de cánceres de mama que sobreexpresan ErbB2 desde 1998 y está aprobado para el tratamiento de cánceres de mama tanto metastásicos como en estadios tempranos. No obstante, los mecanismos de acción del trastuzumab no están completamente caracterizados. Algunos estudios demostraron que el trastuzumab previene específicamente la activación de Akt reduciendo la señalización de la vía PI3K/Akt (Nagata *et al.* 2004). Previamente la unión del trastuzumab a células que sobreexpresan ErbB2 y la consecuente activación del receptor, su internalización y su *down*-regulación, se postularon como mecanismos primarios de inhibición directa del crecimiento (Cuello *et al.* 2001). El trastuzumab también inhibe la angiogénesis posiblemente controlando la expresión de factores angiogénicos y anti angiogénicos (Izumi *et al.* 2002). Además de los efectos directos sobre las células de cáncer, algunas evidencias sugieren que la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo juega un rol importante en la actividad anti tumorigénica del trastuzumab (Clynes *et al.* 2000; Barok *et al.* 2007).

El trastuzumab proporciona beneficios clínicos sustanciales en pacientes con cánceres de mama avanzados que sobreexpresan ErbB2 (Cobleigh *et al.* 1999; Vogel *et al.* 2002; Baselga *et al.* 2005) y mejora la supervivencia cuando se administra junto con quimioterapia (Slamon *et al.* 2001; Marty *et al.* 2005). Además se demostró que el trastuzumab mejora la sobrevida libre de recaída y sobrevida general en pacientes con cánceres de mama en estadios tempranos que sobreexpresan ErbB2 (Piccart-Gebhart *et al.* 2005; Romond *et al.* 2005). Sin embargo, más del 70% de los pacientes con cánceres de mama que sobreexpresan ErbB2 no responde al trastuzumab administrado como terapia de agente único debido a la resistencia primaria o adquirida que desarrollan (Kute *et al.* 2004). Hay muchos mecanismos potenciales para la resistencia al trastuzumab, que incluyen la inactivación, mutación o pérdida de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), la fosfatasa que desfosforila PIP3, con la consecuente activación constitutiva de Akt; la mutación de *PIK3CA*, el gen que codifica la subunidad catalítica p110 α de PI3K, provocando su activación constitutiva (Nagata *et al.* 2004; Junttila *et al.* 2009); la activación de otros receptores tirosina quinasa, como IGF-1R (Lu *et al.* 2001), y evidencias recientes sugieren que la sobreexpresión de HRG1 y su acción autocrina también podría tener un rol en la resistencia al trastuzumab, ya que el tratamiento *in vitro* con HRG aumentó la resistencia al anticuerpo en líneas celulares de cáncer de mama (Yao *et al.* 2009). Otro posible mecanismo de resistencia es la acumulación de formas truncadas de ErbB2 que carecen del dominio extracelular al cual se une el trastuzumab (Scaltriti *et al.* 2007). Los fragmentos carboxi terminales de ErbB2, truncados en el amino terminal, conocidos como p95HER2 o fragmentos C-terminales, se encuentran frecuentemente en líneas celulares de cáncer de mama y tumores que expresan ErbB2 (Molina *et al.* 2002). Incluso en algunos tumores estos fragmentos constituyen la forma predominante de ErbB2 (Molina *et al.* 2002). El origen de esos fragmentos puede ser el resultado de una proteólisis del dominio extracelular de ErbB2 de membrana (Christianson *et al.* 1998; Codony-Servat *et al.* 1999), o por sitios alternativos de inicio de la traducción, puntualmente, de dos residuos metionina que se encuentran cercanos al dominio transmembrana de ErbB2 (Anido *et al.* 2006). La función biológica de las proteínas p95HER2 no ha sido caracterizada exhaustivamente, aunque se sabe que localizan preferentemente en el núcleo celular y se demostró que su sobreexpresión provocó el desarrollo de tumores xenotransplantados en ratones *nude*, que resultaron ser resistentes a trastuzumab (Anido *et al.* 2006; Scaltriti *et al.* 2007). Además se encontró una correlación positiva entre la expresión de p95HER2 y la

resistencia al trastuzumab en adenocarcinomas mamarios humanos (Scaltriti *et al.* 2007). Estos fragmentos carboxi terminales de ErbB2 tienen actividad quinasa intrínseca, y esta actividad es necesaria para su localización nuclear y para el crecimiento tumoral (Codony-Servat *et al.* 1999; Anido *et al.* 2006).

Por todo lo expuesto, los tumores que expresan p95HER2 son resistentes al tratamiento con trastuzumab porque estas formas truncadas de ErbB2 no poseen el dominio extracelular que reconoce el anticuerpo, pero es de esperar que sean sensibles a la administración de la mutante hErbB2 Δ NLS, ya que actuaría de inhibidor dominante negativo de la translocación nuclear de p95HER2.

En este trabajo mostramos que la inhibición de la translocación de ErbB2 hacia el núcleo utilizando la mutante hErbB2 Δ NLS, resultó ser una estrategia más efectiva que el tratamiento con trastuzumab para inhibir la proliferación inducida por HRG de las células sensibles a trastuzumab, BT-474 y SK-BR-3. Se ha reportado, por un lado, que estas líneas celulares expresan los fragmentos carboxi terminales de ErbB2 además de sobreexpresar el receptor entero (Christianson *et al.* 1998; Xia *et al.* 2004). Por otro lado, se demostró que el tratamiento *in vitro* con HRG1 aumentó la resistencia al trastuzumab en estas líneas celulares (Diermeier *et al.* 2005; Junttila *et al.* 2009; Yao *et al.* 2009), mediante un mecanismo en el cual HRG previene que el trastuzumab interrumpa la formación del complejo ErbB2/ErbB3 (Junttila *et al.* 2009). Estos podrían ser los motivos por los cuales el tratamiento con trastuzumab no es tan eficiente como la transfección con la mutante hErbB2 Δ NLS para inhibir la proliferación inducida por HRG.

Los tumores y líneas celulares de cáncer de mama que expresan p95HER2 son, sin embargo, sensibles a pequeñas moléculas inhibitoras de tirosina quinasa, como el lapatinib, ya que la actividad tirosina quinasa de estos fragmentos carboxi terminales de ErbB2 permanece intacta (Anido *et al.* 2006; Scaltriti *et al.* 2007). Sería interesante evaluar si el uso de hErbB2 Δ NLS es también más efectivo que el tratamiento con lapatinib para inhibir la proliferación celular. De todos modos, nuestros resultados de los experimentos *in vivo* con los tumores xenotransplantados desarrollados con las células JIMT-1 tienen mayor alcance, dado que estas células son resistentes tanto al trastuzumab como al lapatinib, y nuestros hallazgos muestran que la introducción de la mutante hErbB2 Δ NLS en estas células resultó ser una terapia sumamente efectiva para la inhibición del crecimiento tumoral. La capacidad de unión del trastuzumab a ErbB2 en las células JIMT-1 es relativamente baja comparada con la de otras líneas celulares

que sobreexpresan ErbB2, como BT-474 y SK-BR-3 (Koninki *et al.* 2010). La línea celular JIMT-1 tiene mutado el gen *PIK3CA*, presenta bajos niveles de expresión de PTEN, y muy altos niveles de ARNm de HRG1 comparando con otras líneas celulares positivas para ErbB2 (Koninki *et al.* 2010). Por otro lado, se demostró que en esta línea celular, el epítipo que permite que el trastuzumab reconozca el dominio extracelular de ErbB2 se encuentra enmascarado por el proteoglicano MUC4 (Nagy *et al.* 2005). Por lo tanto, la resistencia de las células JIMT-1 al trastuzumab y lapatinib probablemente se deba a varios mecanismos moleculares co-existentes, como los recién mencionados.

En este trabajo no pudimos evaluar la eficiencia del trastuzumab en los tumores que crecieron con HRG porque fueron tumores murinos y el anticuerpo humanizado no reconoce el receptor murino. Pero está reportado, por un lado, que el tratamiento *in vitro* con HRG1 exógena aumentó la resistencia al anticuerpo en líneas celulares de cáncer de mama (Motoyama *et al.* 2002; Diermeier *et al.* 2005; Junttila *et al.* 2009; Yao *et al.* 2009); y por otro lado, tumores xenotransplantados con resistencia adquirida al trastuzumab mostraron sobreexpresión de HRG1 (Ritter *et al.* 2007). Entonces, es de esperar que tumores desarrollados con HRG no respondan tan potentemente al trastuzumab como lo hicieron con la mutante hErbB2 Δ NLS.

Implicancias terapéuticas del uso de hErbB2 Δ NLS

El modelo de cáncer de mama C4HD posee características únicas que lo vuelven particularmente atractivo para experimentos *in vivo* en los que se quiere estudiar la función de ErbB2. Como los tumores C4HD sobreexpresan ErbB2 y también poseen altos niveles de expresión del receptor de estrógenos y progesterona, se asemejan al fenotipo presente en una gran cantidad de cánceres de mama humanos que sobreexpresan ErbB2, un fenotipo asociado a la resistencia a la terapia hormonal (Prat y Baselga 2008). Aproximadamente el 50% de los carcinomas mamarios humanos que sobreexpresan ErbB2 también expresan los receptores hormonales PR y receptor de estrógenos. A pesar de que la positividad de los receptores hormonales predice una eficacia de la terapia endocrina, datos preclínicos y clínicos sugieren que la sobreexpresión de ErbB2 confiere resistencia intrínseca al tratamiento hormonal. Además, la sobreexpresión de ErbB2 es un factor pronóstico adverso independiente sin

considerar el estado hormonal del tumor, indicando que en los pacientes con tumores mamarios que sobreexpresan receptores hormonales y ErbB2, no sería eficaz una terapia hormonal de agente único (Prat y Baselga 2008). A pesar de que los datos clínicos indican que las terapias combinadas anti hormonal y anti ErbB2, como la administración de trastuzumab, mejoran los resultados comparando con el tratamiento endocrino solo, otros estudios sugieren que estas terapias combinadas en realidad son menos eficaces que la combinación de la terapia anti ErbB2 con la quimioterapia (Prat y Baselga 2008). Estas discrepancias nos enfrentan con una gran cantidad de pacientes que requieren nuevas terapias para tumores mamarios que sobreexpresan ErbB2. Los resultados presentados en esta Tesis revelan una posible intervención terapéutica novedosa en tumores de mama que sobreexpresan ErbB2, basada en la inhibición de la translocación nuclear de ErbB2, posiblemente mediante terapia génica, y que consistiría en la transferencia de la mutante de ErbB2 incapaz de translocar al núcleo, hErbB2 Δ NLS, para ser usada como terapia de agente único.



REFERENCIAS

- Akiyama T, Matsuda S, Namba Y, Saito T, Toyoshima K, Yamamoto T (1991) The transforming potential of the c-erbB-2 protein is regulated by its autophosphorylation at the carboxyl-terminal domain. *Mol Cell Biol* 11:833-842.
- Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, Di Fiore PP, Kraus MH (1995) Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 10:1813-1821.
- Anido J, Scaltriti M, Bech Serra JJ, Santiago Josef B, Todo FR, Baselga J, Arribas J (2006) Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J* 25:3234-3244.
- Apter D, Vihko R (1983) Early menarche, a risk factor for breast cancer, indicates early onset of ovulatory cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 57:82-86.
- Apter D, Reinila M, Vihko R (1989) Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood. *Int J Cancer* 44:783-787.
- Arnold A, Papanikolaou A (2005) Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 23:4215-4224.
- Atlas E, Cardillo M, Mehmi I, Zahedkargar H, Tang C, Lupu R (2003) Heregulin is sufficient for the promotion of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells in vivo. *Mol Cancer Res* 1:165-175.
- Balana ME, Lupu R, Labriola L, Charreau EH, Elizalde PV (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.
- Balana ME, Labriola L, Salatino M, Movsichoff F, Peters G, Charreau EH, Elizalde PV (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.
- Ballare C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A, Auricchio F, Beato M (2003) Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 23:1994-2008.
- Barok M, Isola J, Palyi-Krek Z, Nagy P, Juhasz I, Vereb G, Kauraniemi P, Kapanen A, Tanner M, Szollosi J (2007) Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther* 6:2065-2072.
- Baselga J, Albanell J (2001) Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol* 12 Suppl 1:S35-41.
- Baselga J, Norton L (2002) Focus on breast cancer. *Cancer Cell* 1:319-322.
- Baselga J, Swain SM (2009) Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 9:463-475.
- Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, Clemens M, Green M, Harvey V, Morales S, Barton C, Ghahramani P (2005) Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol* 23:2162-2171.
- Batra SK, Castellino-Prabhu S, Wikstrand CJ, Zhu X, Humphrey PA, Friedman HS, Bigner DD (1995) Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated,

- cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 6:1251-1259.
- Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G (1996) All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 271:5251-5257.
- Beato M, Chavez S, Truss M (1996) Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61:240-251.
- Beral V (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362:419-427.
- Bernstein L (2002) Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7:3-15.
- Bernstein L, Ross RK (1993) Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15:48-65.
- Biddie SC, John S, Hager GL (2009) Genome-wide mechanisms of nuclear receptor action. *Trends Endocrinol Metab* 21:3-9.
- Bild AH, Turkson J, Jove R (2002) Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis. *EMBO J* 21:3255-3263.
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411:355-365.
- Boonyaratanakornkit V, McGowan E, Sherman L, Mancini MA, Cheskis BJ, Edwards DP (2007) The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol* 21:359-375.
- Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP (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.
- Bowman T, Jove R (1999) STAT Proteins and Cancer. *Cancer Control* 6:615-619.
- Bromberg J, Darnell JE, Jr. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19:2468-2473.
- Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, Lathem WW, Darnell JE, Jr. (1998) Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 18:2553-2558.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98:295-303.
- Bueter W, Dammann O, Zscheppang K, Korenbaum E, Dammann CE (2006) ErbB receptors in fetal endothelium--a potential linkage point for inflammation-associated neonatal disorders. *Cytokine* 36:267-275.
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12:541-552.
- Buser AC, Gass-Handel EK, Wyszomierski SL, Doppler W, Leonhardt SA, Schaack J, Rosen JM, Watkin H, Anderson SM, Edwards DP (2007) Progesterone receptor repression of prolactin/signal transducer and activator of transcription 5-mediated transcription of the beta-casein gene in mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 21:106-125.
- Carnevale RP, Proietti CJ, Salatino M, Urtreger A, Peluffo G, Edwards DP, Boonyaratanakornkit V, Charreau EH, Bal de Kier Joffe E, Schillaci R, Elizalde PV (2007) Progestin effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on

- progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways. *Mol Endocrinol* 21:1335-1358.
- Carpenter G (2003) Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Cell Biol* 15:143-148.
- Carraway KL, 3rd, Cantley LC (1994) A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 78:5-8.
- Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, Li W, Meyer CA, Szary AJ, Eeckhoutte J, Shao W, Hestermann EV, Geistlinger TR, Fox EA, Silver PA, Brown M (2005) Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* 122:33-43.
- Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoutte J, Brodsky AS, Keeton EK, Fertuck KC, Hall GF, Wang Q, Bekiranov S, Sementchenko V, Fox EA, Silver PA, Gingeras TR, Liu XS, Brown M (2006) Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* 38:1289-1297.
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-4289.
- Casimiro M, Rodriguez O, Pootrakul L, Aventian M, Lushina N, Cromelin C, Ferzli G, Johnson K, Fricke S, Diba F, Kallakury B, Ohanyerenwa C, Chen M, Ostrowski M, Hung MC, Rabbani SA, Datar R, Cote R, Pestell R, Albanese C (2007) ErbB-2 induces the cyclin D1 gene in prostate epithelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 67:4364-4372.
- Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R, Cancemi M, Caporali S, Caristi S, Scafoglio C, Teti D, Bresciani F, Perillo B, Weisz A (2004) Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol* 24:7260-7274.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6:443-446.
- Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17:2639-2648.
- Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J (1999) Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res* 59:1196-1201.
- Condon JC, Hardy DB, Kovaric K, Mendelson CR (2006) Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol Endocrinol* 20:764-775.
- Conneely OM, Maxwell BL, Toft DO, Schrader WT, O'Malley BW (1987) The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 149:493-501.
- Cuello M, Ettenberg SA, Clark AS, Keane MM, Posner RH, Nau MM, Dennis PA, Lipkowitz S (2001) Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-

- mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res* 61:4892-4900.
- Chen L, Qian L, Zhang Z, Shi M, Song Y, Yuan G, Zhang H, Hu M, Yu M, Zhang X, Shen B, Guo N (2007) Mutational analysis of ErbB2 intracellular localization. *Histochem Cell Biol* 128:473-483.
- Chen QQ, Chen XY, Jiang YY, Liu J (2005) Identification of novel nuclear localization signal within the ErbB-2 protein. *Cell Res* 15:504-510.
- Chlebowski RT, Kim JA, Col NF (2003) Estrogen deficiency symptom management in breast cancer survivors in the changing context of menopausal hormone therapy. *Semin Oncol* 30:776-788.
- Cho HS, Leahy DJ (2002) Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 297:1330-1333.
- Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ, Ramsey EE, Holmes R, Keenan EJ, Clinton GM (1998) NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res* 58:5123-5129.
- Darnell JE, Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.
- Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-1421.
- Decker T, Kovarik P (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19:2628-2637.
- Dickson RB, Lippman ME (1995) Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev* 16:559-589.
- Diermeier S, Horvath G, Knuechel-Clarke R, Hofstaedter F, Szollosi J, Brockhoff G (2005) Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res* 304:604-619.
- Dolled-Filhart M, Camp RL, Kowalski DP, Smith BL, Rimm DL (2003) Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res* 9:594-600.
- Dran G, Luthy IA, Molinolo AA, Montecchia F, Charreau EH, Pasqualini CD, 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.
- Eeckhoutte J, Carroll JS, Geistlinger TR, Torres-Arzayus MI, Brown M (2006) A cell-type-specific transcriptional network required for estrogen regulation of cyclin D1 and cell cycle progression in breast cancer. *Genes Dev* 20:2513-2526.
- Eto I (2000) Molecular cloning and sequence analysis of the promoter region of mouse cyclin D1 gene: implication in phorbol ester-induced tumour promotion. *Cell Prolif* 33:167-187.
- Ewen ME, Lamb J (2004) The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis. *Trends Mol Med* 10:158-162.
- Faivre E, Skildum A, Pierson-Mullany L, Lange CA (2005) Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. *Steroids* 70:418-426.
- Faivre EJ, Lange CA (2007) Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained

- activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 27:466-480.
- Faivre EJ, Daniel AR, Hillard CJ, Lange CA (2008) Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. *Mol Endocrinol* 22:823-837.
- Falls DL, Rosen KM, Corfas G, Lane WS, Fischbach GD (1993) ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* 72:801-815.
- Fedi P, Pierce JH, di Fiore PP, Kraus MH (1994) Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol Cell Biol* 14:492-500.
- Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11:507-517.
- Fiddes RJ, Janes PW, Sivertsen SP, Sutherland RL, Musgrove EA, Daly RJ (1998) Inhibition of the MAP kinase cascade blocks heregulin-induced cell cycle progression in T-47D human breast cancer cells. *Oncogene* 16:2803-2813.
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110:763-773.
- Giraud S, Bienvenu F, Avril S, Gascan H, Heery DM, Coqueret O (2002) Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J Biol Chem* 277:8004-8011.
- Giri DK, Ali-Seyed M, Li LY, Lee DF, Ling P, Bartholomeusz G, Wang SC, Hung MC (2005) Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol Cell Biol* 25:11005-11018.
- Golding M, Ruhrberg C, Sandle J, Gullick WJ (2004) Mapping nucleolar and spliceosome localization sequences of neuregulin1-beta3. *Exp Cell Res* 299:110-118.
- Goodearl AD, Davis JB, Mistry K, Minghetti L, Otsu M, Waterfield MD, Stroobant P (1993) Purification of multiple forms of glial growth factor. *J Biol Chem* 268:18095-18102.
- Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 16:1647-1655.
- Grillo M, Bott MJ, Khandke N, McGinnis JP, Miranda M, Meyyappan M, Rosfjord EC, Rabindran SK (2006) Validation of cyclin D1/CDK4 as an anticancer drug target in MCF-7 breast cancer cells: Effect of regulated overexpression of cyclin D1 and siRNA-mediated inhibition of endogenous cyclin D1 and CDK4 expression. *Breast Cancer Res Treat* 95:185-194.
- Guo W, Pylyayeva Y, Pepe A, Yoshioka T, Muller WJ, Inghirami G, Giancotti FG (2006) Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* 126:489-502.
- Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd (1994) Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8132-8136.

- Haslam SZ, Osuch JR, Raafat AM, Hofseth LJ (2002) Postmenopausal hormone replacement therapy: effects on normal mammary gland in humans and in a mouse postmenopausal model. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7:93-105.
- Hawthorne VS, Huang WC, Neal CL, Tseng LM, Hung MC, Yu D (2009) ErbB2-mediated Src and signal transducer and activator of transcription 3 activation leads to transcriptional up-regulation of p21Cip1 and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7:592-600.
- Henderson BE, Feigelson HS (2000) Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21:427-433.
- Hoffmann A, Spengler D (2008) A new coactivator function for Zc1's C2H2 zinc finger DNA-binding domain in selectively controlling PCAF activity. *Mol Cell Biol* 28:6078-6093.
- Hofseth LJ, Raafat AM, Osuch JR, Pathak DR, Slomski CA, Haslam SZ (1999) Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4559-4565.
- Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, 3rd, Hynes NE (2003) The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8933-8938.
- Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG, Cui Y, Allred DC, Horwitz KB, Fuqua SA (2004) Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res* 10:2751-2760.
- Hsiao JR, Jin YT, Tsai ST, Shiau AL, Wu CL, Su WC (2003) Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is present in the majority of nasopharyngeal carcinoma and correlates with better prognosis. *Br J Cancer* 89:344-349.
- Hsu SC, Hung MC (2007) Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *J Biol Chem* 282:10432-10440.
- Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A (1989) p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9:1165-1172.
- Hynes NE, Stern DF (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198:165-184.
- Hynes NE, Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5:341-354.
- Ismail PM, Amato P, Soyak SM, DeMayo FJ, Conneely OM, O'Malley BW, Lydon JP (2003) Progesterone involvement in breast development and tumorigenesis--as revealed by progesterone receptor "knockout" and "knockin" mouse models. *Steroids* 68:779-787.
- Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK (2002) Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 416:279-280.
- Jacobsen BM, Richer JK, Schittone SA, Horwitz KB (2002) New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. *J Biol Chem* 277:27793-27800.
- Jones FE, Jerry DJ, Guarino BC, Andrews GC, Stern DF (1996) Heregulin induces in vivo proliferation and differentiation of mammary epithelium into secretory lobuloalveoli. *Cell Growth Differ* 7:1031-1038.
- Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS, Sampath D, Sliwkowski MX (2009) Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is

- disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell* 15:429-440.
- Kani K, Park E, Landgraf R (2005) The extracellular domains of ErbB3 retain high ligand binding affinity at endosome pH and in the locked conformation. *Biochemistry* 44:15842-15857.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, 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.
- Key TJ (1999) Serum oestradiol and breast cancer risk. *Endocr Relat Cancer* 6:175-180.
- Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S, Brenner HJ (1979) Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* 15:659-670.
- Kim H, Chan R, Dankort DL, Zuo D, Najoukas M, Park M, Muller WJ (2005) The c-Src tyrosine kinase associates with the catalytic domain of ErbB-2: implications for ErbB-2 mediated signaling and transformation. *Oncogene* 24:7599-7607.
- King RJ (1993) William L. McGuire Memorial Symposium. Estrogen and progestin effects in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 27:3-15.
- Koninki K, Barok M, Tanner M, Staff S, Pitkanen J, Hemmila P, Ilvesaro J, Isola J (2010) Multiple molecular mechanisms underlying trastuzumab and lapatinib resistance in JIMT-1 breast cancer cells. *Cancer Lett* 294:211-219.
- Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG (1998) Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279:703-707.
- Koumakpayi IH, Diallo JS, Le Page C, Lessard L, Gleave M, Begin LR, Mes-Masson AM, Saad F (2006) Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 12:2730-2737.
- Kumar R, Thompson EB (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64:310-319.
- Kute T, Lack CM, Willingham M, Bishwokama B, Williams H, Barrett K, Mitchell T, Vaughn JP (2004) Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry A* 57:86-93.
- Labriola L, Salatino M, Proietti CJ, Pecci A, Coso OA, Kornblihtt AR, Charreau EH, Elizalde PV (2003) Heregulin induces transcriptional activation of the progesterone receptor by a mechanism that requires functional ErbB-2 and mitogen-activated protein kinase activation in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 23:1095-1111.
- Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD (1986) Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett* 33:215-223.
- Lange CA (2004) Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol Endocrinol* 18:269-278.
- Lange CA, Richer JK, Horwitz KB (1999) Hypothesis: Progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals. *Mol Endocrinol* 13:829-836.
- Lange CA, Shen T, Horwitz KB (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 U S A* 97:1032-1037.

- Lange CA, Richer JK, Shen T, Horwitz KB (1998) Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 273:31308-31316.
- Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, Feng D, Zhuo D, Stoeckert CJ, Jr., Liu XS, Lazar MA (2008) PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev* 22:2941-2952.
- Leonhardt SA, Boonyaratanakornkit V, Edwards DP (2003) Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 68:761-770.
- Leslie K, Lang C, Devgan G, Azare J, Berishaj M, Gerald W, Kim YB, Paz K, Darnell JE, Albanese C, Sakamaki T, Pestell R, Bromberg J (2006) Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res* 66:2544-2552.
- Li L, Shaw PE (2002) Autocrine-mediated activation of STAT3 correlates with cell proliferation in breast carcinoma lines. *J Biol Chem* 277:17397-17405.
- Li W, Park JW, Nuijens A, Sliwkowski MX, Keller GA (1996) Heregulin is rapidly translocated to the nucleus and its transport is correlated with c-myc induction in breast cancer cells. *Oncogene* 12:2473-2477.
- Li X, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (2003) Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol Cell Biol* 23:3763-3773.
- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3:802-808.
- Linggi B, Carpenter G (2006) ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol* 16:649-656.
- Liu L, McBride KM, Reich NC (2005) STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8150-8155.
- Lo HW, Ali-Seyed M, Wu Y, Bartholomeusz G, Hsu SC, Hung MC (2006) Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *J Cell Biochem* 98:1570-1583.
- Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, Bartholomeusz G, Shih JY, Hung MC (2005) Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 7:575-589.
- Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M (2001) Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 93:1852-1857.
- Lydon JP, Sivaraman L, Conneely OM (2000) A reappraisal of progesterone action in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:325-338.
- Magnusson C, Baron JA, Correia N, Bergstrom R, Adami HO, Persson I (1999) Breast-cancer risk following long-term oestrogen- and oestrogen-progestin-replacement therapy. *Int J Cancer* 81:339-344.
- Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y (2004) Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:903-913.
- Marshall C, Blackburn E, Clark M, Humphreys S, Gullick WJ (2006) Neuregulins 1-4 are expressed in the cytoplasm or nuclei of ductal carcinoma (in situ) of the human breast. *Breast Cancer Res Treat* 96:163-168.

- Marti U, Burwen SJ, Wells A, Barker ME, Huling S, Feren AM, Jones AL (1991) Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocyte nuclei. *Hepatology* 13:15-20.
- Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, Chan S, Grimes D, Anton A, Lluch A, Kennedy J, O'Byrne K, Conte P, Green M, Ward C, Mayne K, Extra JM (2005) Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 23:4265-4274.
- Matos E, Loria D, Zengarini N (2003) Atlas de Mortalidad por Cáncer en Argentina (1997-2001). Publicación del Ministerio de Salud de la Nación 2:13-16.
- Mayor S, Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:603-612.
- Meyer D, Birchmeier C (1995) Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378:386-390.
- Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F (1998) Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 17:2008-2018.
- Mincione G, Bianco C, Kannan S, Colletta G, Ciardiello F, Sliwkowski M, Yarden Y, Normanno N, Pramaggiore A, Kim N, Salomon DS (1996) Enhanced expression of heregulin in c-erb B-2 and c-Ha-ras transformed mouse and human mammary epithelial cells. *J Cell Biochem* 60:437-446.
- Molina MA, Saez R, Ramsey EE, Garcia-Barchino MJ, Rojo F, Evans AJ, Albanell J, Keenan EJ, Lluch A, Garcia-Conde J, Baselga J, Clinton GM (2002) NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 8:347-353.
- Molinolo AA, Lanari C, Charreau EH, Sanjuan N, Pasqualini CD (1987) Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J Natl Cancer Inst* 79:1341-1350.
- Moore MR, Conover JL, Franks KM (2000) Progestin effects on long-term growth, death, and Bcl-xL in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 277:650-654.
- Mora LB, Buettner R, Seigne J, Diaz J, Ahmad N, Garcia R, Bowman T, Falcone R, Fairclough R, Cantor A, Muro-Cacho C, Livingston S, Karras J, Pow-Sang J, Jove R (2002) Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 62:6659-6666.
- Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL (2002) Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 72:163-172.
- Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA (2002) The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 62:3151-3158.
- Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM (2003) Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9744-9749.

- Musgrove EA (2006) Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors* 24:13-19.
- Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CS, Sweeney KJ, Watts CK, Sutherland RL (1993) Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 13:3577-3587.
- Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D (2004) PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6:117-127.
- Nagpal JK, Mishra R, Das BR (2002) Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis. *Cancer* 94:2393-2400.
- Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, Jovin TM (2005) Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 65:473-482.
- Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsune T, Kawabata M, Miyazono K, Taga T (1999) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284:479-482.
- Nelson MH, Dolder CR (2006) Lapatinib: a novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors. *Ann Pharmacother* 40:261-269.
- Neve RM, Holbro T, Hynes NE (2002) Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene* 21:4567-4576.
- Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G (2001) gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294:2179-2181.
- Nicholson RI, Gee JM, Harper ME (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4:S9-15.
- Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H (2002) Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21:2000-2008.
- O'Malley BW, Kumar R (2009) Nuclear receptor coregulators in cancer biology. *Cancer Res* 69:8217-8222.
- Offterdinger M, Schofer C, Weipoltshammer K, Grunt TW (2002) c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 157:929-939.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19:3159-3167.
- Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, Daly JM, Hynes NE (1999) ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 274:17209-17218.
- Orr-Urtreger A, Trakhtenbrot L, Ben-Levy R, Wen D, Rechavi G, Lonai P, Yarden Y (1993) Neural expression and chromosomal mapping of Neu differentiation factor to 8p12-p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1867-1871.
- Ostrander JH, Daniel AR, Lofgren K, Kleer CG, Lange CA (2007) Breast tumor kinase (protein tyrosine kinase 6) regulates heregulin-induced activation of ERK5 and p38 MAP kinases in breast cancer cells. *Cancer Res* 67:4199-4209.
- Owen GI, Richer JK, Tung L, Takimoto G, Horwitz KB (1998) Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin- dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. *J Biol Chem* 273:10696-10701.

- Pandis N, Heim S, Bardi G, Limon J, Mandahl N, Mitelman F (1992) Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 5:14-20.
- Peles E, Yarden Y (1993) Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays* 15:815-824.
- Piccart-Gebhart MJ *et al.* (2005) Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1659-1672.
- Pike MC, Spicer DV (2000) Hormonal contraception and chemoprevention of female cancers. *Endocr Relat Cancer* 7:73-83.
- Pike MC, Ross RK (2000) Progestins and menopause: epidemiological studies of risks of endometrial and breast cancer. *Steroids* 65:659-664.
- Pinkas-Kramarski R, Alroy I, Yarden Y (1997) ErbB receptors and EGF-like ligands: cell lineage determination and oncogenesis through combinatorial signaling. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2:97-107.
- Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y (1996) Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J* 15:2452-2467.
- Planque N (2006) Nuclear trafficking of secreted factors and cell-surface receptors: new pathways to regulate cell proliferation and differentiation, and involvement in cancers. *Cell Commun Signal* 4:7.
- Prat A, Baselga J (2008) The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2. *Nat Clin Pract Oncol* 5:531-542.
- Proietti C, Salatino M, Rosembli C, Carnevale R, Pecci A, Kornbliht AR, Molinolo AA, Frahm I, Charreau EH, Schillaci R, Elizalde PV (2005) Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 25:4826-4840.
- Proietti CJ, Rosembli C, Béguelin W, Rivas MA, Diaz Flaque MC, Charreau EH, Schillaci R, Elizalde PV (2009) Activation of Stat3 by heregulin/ErbB-2 through the co-option of progesterone receptor signaling drives breast cancer growth. *Mol Cell Biol* 29:1249-1265.
- Ptashne M (2003) Regulated recruitment and cooperativity in the design of biological regulatory systems. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 361:1223-1234.
- Ptashne M, Gann A (1997) Transcriptional activation by recruitment. *Nature* 386:569-577.
- Qiu M, Lange CA (2003) MAP kinases couple multiple functions of human progesterone receptors: degradation, transcriptional synergy, and nuclear association. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:147-157.
- Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 7:1559-1571.
- Real PJ, Sierra A, De Juan A, Segovia JC, Lopez-Vega JM, Fernandez-Luna JL (2002) Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 21:7611-7618.
- Ren Z, Schaefer TS (2002) ErbB-2 activates Stat3 alpha in a Src- and JAK2-dependent manner. *J Biol Chem* 277:38486-38493.
- Rennstam K, Jonsson G, Tanner M, Bendahl PO, Staaf J, Kapanen AI, Karhu R, Baldetorp B, Borg A, Isola J (2007) Cytogenetic characterization and gene

- expression profiling of the trastuzumab-resistant breast cancer cell line JIMT-1. *Cancer Genet Cytogenet* 172:95-106.
- Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB (2002) Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 277:5209-5218.
- Riese DJ, Kim ED, Elenius K, Buckley S, Klagsbrun M, Plowman GD, Stern DF (1996) The epidermal growth factor receptor couples transforming growth factor- α , heparin-binding epidermal growth factor-like factor, and amphiregulin to Neu, ErbB-3, and ErbB-4. *J Biol Chem* 271:20047-20052.
- Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, Guix M, Dugger T, Engelman JA, Arteaga CL (2007) Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res* 13:4909-4919.
- Rivas MA, Tkach M, Béguelin W, Proietti CJ, Rosemblyt C, Charreau EH, Elizalde PV, Schillaci R (2010) Transactivation of ErbB-2 induced by tumor necrosis factor α promotes NF- κ B activation and breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat* 122:111-124.
- Romond EH *et al.* (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673-1684.
- Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC (2000) Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst* 92:328-332.
- Rowan BG, O'Malley BW (2000) Progesterone receptor coactivators. *Steroids* 65:545-549.
- Saitoh M, Ohmichi M, Takahashi K, Kawagoe J, Ohta T, Doshida M, Takahashi T, Igarashi H, Mori-Abe A, Du B, Tsutsumi S, Kurachi H (2005) Medroxyprogesterone acetate induces cell proliferation through up-regulation of cyclin D1 expression via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor- κ B cascade in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146:4917-4925.
- Salatino M, Schillaci R, Proietti CJ, Carnevale R, Frahm I, Molinolo AA, Iribarren A, Charreau EH, Elizalde PV (2004) Inhibition of in vivo breast cancer growth by antisense oligodeoxynucleotides to type I insulin-like growth factor receptor mRNA involves inactivation of ErbBs, PI-3K/Akt and p42/p44 MAPK signaling pathways but not modulation of progesterone receptor activity. *Oncogene* 23:5161-5174.
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19:183-232.
- Sartorius CA, Shen T, Horwitz KB (2003) Progesterone receptors A and B differentially affect the growth of estrogen-dependent human breast tumor xenografts. *Breast Cancer Res Treat* 79:287-299.
- Sartorius CA, Groshong SD, Miller LA, Powell RL, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB (1994) New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B- and A-receptors: only antiprogesterone-occupied B-receptors are switched to transcriptional agonists by cAMP. *Cancer Res* 54:3868-3877.
- Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, Anido J, Guzman M, Cortes J, Di Cosimo S, Matias-Guiu X, Ramon y Cajal S, Arribas J, Baselga J (2007) Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 99:628-638.

- Shen T, Horwitz KB, Lange CA (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.
- Shoelson SE (1997) SH2 and PTB domain interactions in tyrosine kinase signal transduction. *Curr Opin Chem Biol* 1:227-234.
- Shuai K (2000) Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19:2638-2644.
- Silberstein GB, Daniel CW (1987) Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor-beta. *Science* 237:291-293.
- Silva CM (2004) Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 23:8017-8023.
- Silvennoinen O, Schindler C, Schlessinger J, Levy DE (1993) Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation. *Science* 261:1736-1739.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-792.
- So AY, Chaivorapol C, Bolton EC, Li H, Yamamoto KR (2007) Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet* 3:e94.
- Stoecklin E, Wissler M, Schaetzle D, Pfitzner E, Groner B (1999) Interactions in the transcriptional regulation exerted by Stat5 and by members of the steroid hormone receptor family. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69:195-204.
- Sudol M (1998) From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *Oncogene* 17:1469-1474.
- Sutherland RL, Musgrove EA (2004) Cyclins and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9:95-104.
- Sutherland RL, Prall OW, Watts CK, Musgrove EA (1998) Estrogen and progestin regulation of cell cycle progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:63-72.
- Taga T, Kishimoto T (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15:797-819.
- Tan M, Lan KH, Yao J, Lu CH, Sun M, Neal CL, Lu J, Yu D (2006) Selective inhibition of ErbB2-overexpressing breast cancer in vivo by a novel TAT-based ErbB2-targeting signal transducers and activators of transcription 3-blocking peptide. *Cancer Res* 66:3764-3772.
- Taylor AH, McParland PC, Taylor DJ, Bell SC (2006) The progesterone receptor in human term amniochorion and placenta is isoform C. *Endocrinology* 147:687-693.
- Trachtenberg JT, Thompson WJ (1996) Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. *Nature* 379:174-177.
- Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P (1972) Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 48:605-613.
- Tsai B, Ye Y, Rapoport TA (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:246-255.
- Tsai MS, Shamon-Taylor LA, Mehmi I, Tang CK, Lupu R (2003) Blockage of heregulin expression inhibits tumorigenicity and metastasis of breast cancer. *Oncogene* 22:761-768.

- Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horwitz KB (1993) Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol Endocrinol* 7:1256-1265.
- Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-212.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20:719-726.
- Wang Q, Li W, Liu XS, Carroll JS, Janne OA, Keeton EK, Chinnaiyan AM, Pienta KJ, Brown M (2007) A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. *Mol Cell* 27:380-392.
- Wang SC, Hung MC (2009) Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors. *Clin Cancer Res* 15:6484-6489.
- Wang SC, Lien HC, Xia W, Chen IF, Lo HW, Wang Z, Ali-Seyed M, Lee DF, Bartholomeusz G, Ou-Yang F, Giri DK, Hung MC (2004) Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell* 6:251-261.
- Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt EV (1994) Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 369:669-671.
- Wang YN, Yamaguchi H, Hsu JM, Hung MC (2010) Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene* 29:3997-4006.
- Watson CJ (2001) Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:115-127.
- Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL, Quinn PG (1996) An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 10:1379-1387.
- Welboren WJ, van Driel MA, Janssen-Megens EM, van Heeringen SJ, Sweep FC, Span PN, Stunnenberg HG (2009) ChIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *EMBO J* 28:1418-1428.
- Wells A, Marti U (2002) Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:697-702.
- Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM (2003) Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 200:290-297.
- Xia W, Liu LH, Ho P, Spector NL (2004) Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene* 23:646-653.
- Xia W, Mullin RJ, Keith BR, Liu LH, Ma H, Rusnak DW, Owens G, Alligood KJ, Spector NL (2002) Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene* 21:6255-6263.
- Xia W, Bisi J, Strum J, Liu L, Carrick K, Graham KM, Treece AL, Hardwicke MA, Dush M, Liao Q, Westlund RE, Zhao S, Bacus S, Spector NL (2006) Regulation

- of survivin by ErbB2 signaling: therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Res* 66:1640-1647.
- Xie Y, Hung MC (1994) Nuclear localization of p185neu tyrosine kinase and its association with transcriptional transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1589-1598.
- Xu W, Yuan X, Beebe K, Xiang Z, Neckers L (2007) Loss of Hsp90 association up-regulates Src-dependent ErbB2 activity. *Mol Cell Biol* 27:220-228.
- Yang C, Klein EA, Assoian RK, Kazanietz MG (2008) Heregulin beta1 promotes breast cancer cell proliferation through Rac/ERK-dependent induction of cyclin D1 and p21Cip1. *Biochem J* 410:167-175.
- Yang Y, Spitzer E, Meyer D, Sachs M, Niemann C, Hartmann G, Weidner KM, Birchmeier C, 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.
- Yao E, Zhou W, Lee-Hoeflich ST, Truong T, Haverty PM, Eastham-Anderson J, Lewin-Koh N, Gunter B, Belvin M, Murray LJ, Friedman LS, Sliwkowski MX, Hoeflich KP (2009) Suppression of HER2/HER3-mediated growth of breast cancer cells with combinations of GDC-0941 PI3K inhibitor, trastuzumab, and pertuzumab. *Clin Cancer Res* 15:4147-4156.
- Yarden Y (2001) Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 61 Suppl 2:1-13.
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137.
- Yu H, Jove R (2004) The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4:97-105.
- Yu Q, Geng Y, Sicinski P (2001) Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 411:1017-1021.
- Zscheppang K, Korenbaum E, Bueter W, Ramadurai SM, Nielsen HC, Dammann CE (2006) ErbB receptor dimerization, localization, and co-localization in mouse lung type II epithelial cells. *Pediatr Pulmonol* 41:1205-1212.