

Tesis Doctoral

Dinámica de activación y cooperación entre los receptores de la familia de ErbB y proteínas de unión a matriz extracelular en células tumorales mamarias

Toscani, Andrés Martín

2016-03-18

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:

Toscani, Andrés Martín. (2016-03-18). Dinámica de activación y cooperación entre los receptores de la familia de ErbB y proteínas de unión a matriz extracelular en células tumorales mamarias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Toscani, Andrés Martín. "Dinámica de activación y cooperación entre los receptores de la familia de ErbB y proteínas de unión a matriz extracelular en células tumorales mamarias". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-18.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Dinámica de activación y cooperación entre los receptores de la familia de ErbB y proteínas de unión a matriz extracelular en células tumorales mamarias

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. Andrés Martin Toscani

Director de tesis: Dr. Federico Coluccio Leskow

Consejero de estudios: Dra. Elba Vázquez

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Buenos Aires, año 2016

Dinámica de activación y cooperación entre los receptores de la familia de ErbB y proteínas de unión a matriz extracelular en células tumorales mamarias

ErbB2 es un receptor de membrana con actividad de tirosina quinasa que se localiza en formando parches o *clusters* cuyo tamaño depende del nivel de expresión y grado de estimulación de la célula. Pese a no haber un ligando descrito, puede ser activado por la unión de heregulina- β 1 (HRG) a su homólogo ErbB3, el cual induce la formación de heterodímeros ErbB2/3. ErbB2 se expresa en la glándula mamaria normal y su desregulación en procesos de desarrollo tumoral induce un fenotipo agresivo. El objetivo de este trabajo es describir la interacción entre ErbB2 y receptores de proteínas de matriz extracelular. Se muestra que, en contraste con lo propuesto en la literatura, ErbB2 no coexiste con β 1-integrina (receptor de laminina, fibronectina y colágeno) en complejos de adhesión focal maduros. Por otro lado, ErbB2 si colocaliza con el Receptor de Dominio Discoidina 1 (DDR1), un receptor tirosina-quinasa específico para colágeno, en *clusters* de membrana tanto en células con altos como bajos niveles de expresión de ErbB2. Además, se ha caracterizado la interacción física de ErbB2 con DDR1 en modelos con de expresión endógena y mediante sobreexpresión de protenias recombinantes. Por otro lado, se demostró que el colágeno, pero no fibronectina, es capaz de regular la fosforilación de Akt en células tumorales mamarias. Los presentes resultados proponen a DDR1 como un novedoso regulador de la activación la vía de Akt por HRG en células tumorales mamarias.

Palabras clave: ErbB2, Complejos de Adhesión Focal, β 1-integrina, DDR1, Akt

Activation dynamics and cooperativity between ErbB receptor family and extracellular matrix receptors in breast cancer cells

ErbB2 is a tyrosine kinase receptor forming membrane clusters whose size depends on expression levels and stimulation of the cell. Although a ligand for ErbB2 has not yet been described, it can be activated by ErbB3 binding to heregulin- β 1 (HRG), inducing heterodimerization and transphosphorylation of ErbB2. ErbB2 is expressed in the normal mammary gland and its dysregulation during cancer development leads to an aggressive phenotype. The aim of the present work is to describe the interaction between ErbB2 and extracellular matrix receptors in breast cancer cells. In contrast with what has been reported in the literature, ErbB2 do not coexist with β 1-integrin (laminin, fibronectin and collagen receptor) in mature Focal Adhesion Complexes. On the other hand, ErbB2 colocalizes with Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1), a collagen-specific tyrosine-kinase receptor, in clusters in cells expressing high and low ErbB2 levels. It has also been characterized the physical interaction between these two receptors in both endogenous and overexpressed cellular models. Furthermore, we showed that collagen, but not fibronectin, is capable of regulate Akt phosphorylation. All together these results propose DDR1 as a novel regulator of HRG activated Akt pathway in breast cancer cells.

Keywords: ErbB2, Focal Adhesion Complexes, β 1-integrin, DDR1, Akt

Agradecimientos

A Fede Coluccio Leskow por hacerme parte de su grupo de trabajo, otorgándome la posibilidad de realizar mi doctorado en su laboratorio. Durante toda esta etapa formativa ha sido un modelo a seguir de dedicación, compromiso y esfuerzo en la carrera científica.

A Eli Jares-Erijman por transmitirnos su entusiasmo por la ciencia, y a quien extrañamos mucho.

A los doctores Tom Jovin y Donna Arndt-Jovin por darme la oportunidad de trabajar en el Instituto Max Planck de Química-Biofísica, la cual fue una experiencia invaluable para mi formación científica.

A los chicos del labo: Lu Barcos, Ampí Lago-Huvelle, Oscar Pérez, Cecilia Prudkin, Chikita Martínez y Pako Velázquez-Duarte, quienes supieron generar un gran ambiente laboral.

A aquellos amigos que me ha dejado el laboratorio: Laucha Zubeldia-Brenner, Fran Guaimas, Guille Menéndez, Joni Fauerbach y muy especialmente a Fede Fuentes, compañero de copas y microscopios.

A Lore Sigaut, Yani Álvarez, Cata von Bilderling, Mica Bianchi y Juan Burdisso del CMA. Especialmente a su directora Lía Pietrasanta, por quien tengo gran aprecio personal, por su apoyo tanto técnico como personal durante este período.

A la gente del Instituto Roffo, en especial a Marina Simian y Ro Sampayo por darme la oportunidad de trabajar con ustedes, uno de los placeres más grandes que me dio este doctorado.

A la gente del Instituto Mercedes y Martín Ferreyra, Córdoba, en especial al Pincho Cáceres por los asados en Alemania, charlas, consejos y cervezas compartidas.

A los docentes y amigos de Química I de la UNLu: Beti Eissa, Sergio Begonja, Oscar Zabala, Mauri Monenegro, Tincho Sarraceno y Exe Giorgi por acompañarme durante toda mi carrera. Muy especialmente a la Dra. Elena Borghi, cuyo cariño no me alcanzarían estas páginas para expresar, por compartir estos diez años de docencia juntos, por aconsejarme, acompañarme y formarme como docente, persona y profesional desde mis tiernos 18 años.

A Carla Spagnuolo y Ceci Samaniego, del depto. de Química Orgánica

Al Dr. Omar Coso, la Dra. Edith Kordon, la Dra. Olga Castro y la Dra. Adalí Pecci por las charlas (tanto formales como de pasillo), los consejos y el apoyo constante.

A la Dra. Elba Vázquez, mi consejera de estudios, y la Dra. Mónica Kotler del Depto. de Química Biológica, por quienes tengo un gran cariño.

A Moni Vazquez-Levin, del IBYME, por la buena onda, ayuda y aprecio que siempre me brindó.

A la gente del INIBIOLP, en especial a Jorge Pórfido, Vale Silva, Gise Franchini, Betina Córscico y Liso Falomir.

A los chicos del CM1, en especial a Dieguito, Bel, Mariano, Dai, Tocci, Vir y Viki.

A los chicos de QB, en especial a Fer Toledo, Juli Laiseca, Juan "el vikingo" Angiolini y Euge Dieterle.

A los chicos del IFIBYNE, en especial a Mauri Montenegro, Ceci Borassi, Mati Blaunstein y Jose "el chileno" Moya.

A los chicos del MPI-BPC, en especial a Lu, Mencho, Liso, Flori, Anthony, Elisa, Seba y Romi.

A Leo Martinez-Tosar y Hernán Burrieza, mis amigos de Agrobio, por las charlas de pasillo y cervezas compartidas durante todos estos años

A todos los que forman parte de mi hermosa universidad, la UNLu: docentes, colegas, amigos y alumnos. En especial a Lau Rigacci, Ro Rosso, Joni Gómez, Nacho Túnez, Adonis Giorgi, Susana Pistorale, Mauri Demarzi, Jorge Mufato, Pepe Aguirre, María Inés Gismondi, Berta Llorente, José María Duval y a toda la División Física.

A mis amigos, de la facu y de la vida: Mauri Montenegro, Santi Meléndez, Juan Ferro, Mati Eöry y Machi Nardelli.

A los músicos: Maxi Bandín, "el Chino" Genovesi, "el albañil del rock" Ema Gianne, "el Ruso" Rojas, "el Gato" Battaglini y Gonza Mandra

Mia, Emma y Shermann, mis mas fieles compañeros.

A la familia Bandín Ruggiero: Ana, Jorge, Maru, Maxi y Javi.

A los Rodríguez y González Sawicki: Rose, Jorge, Fer, Maite, Juan, Aurélie, "el petiso" Leo y especialmente a Silvita y Richard por dejarme formar parte de su maravillosa familia.

A mi familia: la Oma, la Tía Moni, el Tío Carlos, Ger, Ana, "las galleguitas" Martina y Olivia, Esteban, Kari, Nico y Mica por su cariño y su apoyo incondicional. En especial a mi querido "Opa" Klauss Lipp, quien aunque hace 15 años no esté entre nosotros es y seguirá siendo mi modelo a seguir, la persona a quien más respeto y admiro.

A Lu, mi pareja, mi compañera y la persona más importante para mí, por todo el aguante, la ayuda y paciencia. TE AMO MAS QUE A NADA.

Por último, quiero agradecer especialmente a mis viejos, mi hermanita Ceci y mi cuñado (quien supo ser además un gran amigo) Javi, sin los cuales ninguno de mis logros hubiese sido posible.

A la universidad pública

Índice

Introducción

1. Cáncer.....	3
2. El Microambiente Tumoral.....	5
3. Factores de crecimiento y receptores tirosina-quinasa de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico	
3.1 Estructura y función.....	5
3.2 Señalización mediada por PI3K-Akt.....	8
3.3 Receptores de la familia de EGFR en cáncer.....	9
4. La Matriz Extracelular	
4.1 Componentes de la MEC.....	9
4.1.1 Lamininas.....	10
4.1.2 Fibronectinas.....	10
4.1.3 Colágenos.....	11
4.2 Moléculas de adhesión a la MEC.....	13
4.2.1 Integrinas y complejos de adhesión focal.....	14
4.2.2 Receptores tirosina-quinasa con dominio de discoidina (DDR).....	19
4.3 Interacción entre la MEC y los factores de crecimiento.....	21
5. La Glándula Mamaria	
5.1 Desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria	
5.1.1 Desarrollo embrionario.....	22
5.1.2 Desarrollo glandular en la pubertad.....	22
5.1.3 La glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia.....	23
5.1.4 La involución mamaria.....	23

5.3 Receptores de la familia de EGFR en la glándula mamaria.....	24
5.4 Las integrinas en la glándula mamaria.....	26
5.5 Cáncer de mama	
5.5.1 Clasificación histológica.....	27
5.5.2 Clasificación por expresión de receptores hormonales.....	28
5.5.3 Clasificación por expresión génica.....	28

Hipótesis y Objetivos

Objetivo General.....	33
Objetivos Específicos.....	33

Materiales y Métodos

1. Técnicas de Cultivo y Líneas Celulares

1.1 Líneas celulares utilizadas.....	37
1.2 Cultivo y propagación.....	38
1.3 Recubrimiento de superficies con laminina, colágeno o fibronectina.....	39
1.4 Células madre tumorales de glioblastoma.....	39

2. Plásmidos

2.1 Plásmidos utilizados.....	40
2.2 Generación de bacterias <i>Escherichia coli</i> ultracompetentes químicas por el método de Inoue.....	41
2.3 Transformación de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico.....	42
2.4 Digestión con enzimas de restricción.....	43
2.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	43
2.6 Generación de β 1-integrina-ECFP.....	43

2.7 Subclonado del plásmido β 1-Integrina-ECFP-shRNA.....	45
2.8 Generación de la construcción ErbB2-TagRFP.....	46
2.9 Purificación de plásmidos	
2.9.1 Minipreparación de plásmidos.....	46
2.9.2 Maxipreparación de plásmidos.....	47
2.10 Transfección.....	47
3. Drogas e Inhibidores Farmacológicos.....	48
4. Anticuerpos.....	49
5. Protocolos de Bioquímica General	
5.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS.....	50
5.2 Cuantificación de proteínas: método de Bradford.....	51
5.3 Western blot.....	51
5.4 Dot blot.....	52
5.5 Co-inmunoprecipitación.....	53
6. Microscopía	
6.1 Inmunofluorescencia.....	53
6.2 Inmunofluorescencia en suspensión.....	54
6.3 Microscopía confocal.....	54
6.4 Colocalización.....	55
6.5 Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica (<i>STochastic Optical Reconstruction Microscopy</i> , STORM).....	56
7. Ensayos de <i>Pull-down</i>	
7.1 Síntesis y purificación de ACPwtS.....	58
7.2 Ensayos de <i>Pull-down</i> con ACP-ErbB2.....	61
8. Bioinformática.....	62

9. Ensayos de Viabilidad.....	62
10. Ensayos de Ciclo Celular.....	63
11. Análisis de Datos.....	63

Capítulo 1: Caracterización de Distintos Modelos de Células Tumorales para el Estudio Funcional de la Adhesión Celular

Objetivo General.....	67
Objetivos Específicos.....	67
1. Modelos Celulares en el Estudio del Cáncer.....	67
1.1 Células MCF7.....	68
1.2 Células T47D.....	69
1.3 Células SKBR3.....	69
1.4 Estudio de la expresión de ErbB2 en líneas tumorales mamarias.....	69
1.5 Expresión de moléculas de adhesión en líneas tumorales mamarias.....	73
1.6 Estrategias para la sobreexpresión de β 1-integrina.....	74
2. Células Madre Tumorales.....	75
2.1 Células madre tumorales mamarias.....	77
2.2 Células madre tumorales en el sistema nervioso.....	78
2.3 Caracterización de las líneas de células madre de glioblastoma.....	78
3. Conclusiones.....	80

Capítulo 2: Efecto de la Adhesión Celular sobre la Respuesta al Tratamiento con la Droga Quimoterapéutica Cucurbitacina I

Objetivo General.....	83
Objetivos Específicos.....	83

1. Introducción	
1.1 Terapéutica del cáncer.....	83
1.2 Quimioterapia.....	85
1.3 Cucurbitacina I.....	86
2. Cucurbitacina I y su Efecto sobre Células Tumorales Adherentes	
2.1 Las células tumorales mamarias MCF7 son sensibles al tratamiento con Cucurbitacina I.....	88
2.2 Cucurbitacina I induce el desacoplamiento de los complejos de adhesión focal.....	88
3. Efecto de Cucurbitacina I sobre Esferoides de Células Madre Tumorales de Glioblastoma	
3.1 Las células 1080spIR son sensibles a Cucurbitacina I a tiempos de incubación mayores que las células MCF7.....	91
3.2 Cucurbitacina I induce arresto del ciclo celular en células madre tumorales no adherentes.....	93
4. Conclusiones.....	97

Capítulo 3: Estudio de las Dinámicas de Interacción entre ErbB2 y β 1-integrina

Objetivos

Objetivo General.....	101
Objetivos Específicos.....	101
1. Introducción	
1.1 Interacción entre receptores de la familia de EGFR y moléculas de los complejos de adhesión focal.....	101
1.2 Interacción entre ErbB2 e integrinas en células tumorales.....	103
2. ErbB2 y β 1-Integrina no Colocalizan en Complejos de Adhesión Focal Maduros	
2.1 ErbB2 y β 1-Integrina colocalizan sólo en células con alta expresión de estas proteínas.....	106

2.2 ErbB2 y β 1-Integrina colocalizan cuando ambas proteínas se encuentran sobreexpresadas.....	107
2.3 La coexistencia de ErbB2 y β 1-Integrina es regulada por el acoplamiento de los complejos de adhesión focal.....	109
3. Conclusiones.....	112

Capítulo 4: DDR1 como Novedoso Regulador de la Señalización de ErbB2 Gatillada por HRG

Objetivo General.....	117
Objetivos Específicos.....	117
1. Introducción	
1.1 La MEC regula la activación de las vías de señalización activadas por factores de crecimiento.....	117
1.2 Las vías de señalización activadas por la unión de ligandos a receptores de la familia de EGFR están reguladas por la MEC.....	118
2. DDR1 regula la Activación de Akt Mediada por HRG a Través la Interacción con ErbB2	
2.1 Colágeno tipo I es capaz de modular la respuesta a HRG en células MCF7.....	119
2.2 DDR1, a diferencia de β 1-integrina, es capaz de interactuar con ErbB2 en células tumorales mamarias.....	123
2.3 DDR1 se coexpresa con ErbB2 en la glándula mamaria.....	128
Conclusiones.....	130

Conclusiones Finales y Discusiones

La Matriz Extracelular.....	137
Los Receptores de la Familia de ErbB y la MEC.....	137
DDR1 y la Glandula Mamaria.....	141
DDR1 en la Biología Tumoral.....	143

Perspectivas.....	143
Anexo: Acrónimos.....	147
Referencias Bibliográficas.....	151

Introducción

1. Cáncer

Se define con el término “cáncer” a un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal y descontrolado de células del organismo. El proceso por el cual las células adquieren la capacidad de proliferar fuera de los programas normales desarrollo y mantenimiento tisular se denomina “transformación”. Una clasificación general para este conjunto de enfermedades puede realizarse entre tumores “sólidos”, donde dicha multiplicación descontrolada genera una masa celular definida y tumores “no sólidos”, donde las células se multiplican y esparcen libremente por el organismo, lo que es característico de las neoplasias hematológicas como las leucemias.

El simple crecimiento desregulado de una célula y la generación de una masa celular compacta no es un proceso diagnosticable como “cáncer”. La formación de una masa de células compacta en el tejido donde se originó se denomina “carcinogénesis *in situ*”. Para que un proceso hiperproliferativo sea clasificado como “cancerígeno” debe, a su vez, ser invasivo. Esto implica que las células que forman parte de dicha masa celular (conocida como “tumor primario”) sean capaces de liberarse de su nicho original, migrar e invadir otros tejidos para formar un nuevo tumor (denominado “tumor secundario”), en un proceso conocido como “metástasis” (Alberts et al., 2002). Los tumores se clasifican de acuerdo al tejido y el tipo celular del que derivan. Aquellos generados a partir de células epiteliales se denominan “carcinomas”, mientras que aquellos derivados de células del tejido conjuntivo o músculo se denominan “sarcomas”.

Para que una población celular se vuelva tumoral necesita acumular un gran número de mutaciones. Estas células deben romper con las barreras regulatorias de la proliferación celular, como el acortamiento de los telómeros, la independencia de factores de crecimiento, etc., así como generar estrategias que le permitan evitar ser detectadas por el sistema inmune y por ende ser eliminadas. De esta forma, es necesario no solamente “encender” las señales proliferativas sino “apagar” aquellas que inhiben el proceso de multiplicación. Aquellos genes que al activarse inducen transformación en la célula mutada son denominados protooncogenes, mientras que aquellos cuyo producto inhibe la proliferación celular son denominados genes supresores tumorales (Lodish et al., 2013). Así, para que una célula normal se transforme en una célula tumoral debe acumular mutaciones que aumenten la actividad o expresión del producto génico de un

protooncogén así como bloquear la función o expresión de un gen supresor tumoral.

Por otro lado, una vez que la población celular logra multiplicarse de forma desregulada, estas pueden permanecer en el nicho original o migrar y colonizar nuevos tejidos. Este es un proceso complejo durante el cual las células transformadas acumulan mutaciones que le permiten adquirir la capacidad multiplicarse indefinidamente, atravesar la matriz extracelular, migrar a través de los vasos sanguíneos o linfáticos y colonizar otros ambientes tisulares, denominado “progresión tumoral”. Durante este proceso se acumulan mutaciones que contribuyen a la desregulación de la fisiología celular normal. Si bien en cada población celular ocurren diferentes mutaciones, es posible identificar patrones de cambio entre tumores. Durante la progresión tumoral la población celular debe sobreexpresar o activar protooncogenes así como mutar o inactivar de genes supresores tumorales, los cuales le permiten desregular su crecimiento. Asimismo, deben ser capaces de desarrollar estrategias para sortear el control del sistema inmunológico y producirse cambios en el perfil de expresión de moléculas de adhesión y metaloproteasas, que le permiten abrirse paso a través de la matriz extracelular (MEC) (Yokota, 2000).

Para que una célula “normal” sea capaz de colonizar un nuevo tejido debe ser capaz de perder adhesión a la MEC y células adyacentes, así como de adquirir la capacidad de migrar a través del tejido. A este cambio, tanto morfológico como de expresión de marcadores moleculares, se denomina “transición epitelio-mesenquimal” (Gonzalez y Medici, 2014). Durante este proceso la célula pierde expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina y polaridad celular, aumentando su capacidad migratoria y expresando marcadores de células mesenquimales como N-cadherina, fibronectina o colágeno tipo I y III.

De esta forma, la población de células transformadas se ve sometida a un proceso microevolutivo en el cual se acumulan aquellos cambios que permitan sobrevivir y proliferar. Asimismo, no solo la capacidad proliferativa y el control dado por el sistema inmune ejercen presiones selectivas sobre las células tumorales. Dado que la célula se encuentra en un entorno complejo y dinámico, conocido como microambiente tumoral (MAT), los factores biofísicoquímicos de éste también cumplen una función crucial en dicho proceso evolutivo.

2. El Microambiente Tumoral

Los tumores son masas heterogéneas formadas no sólo por células transformadas sino que se comportan como órganos complejos que reclutan distintos tipos celulares, secretando proteínas y regulando sus propiedades fisicoquímicas como pH, presión de oxígeno, dióxido de carbono, etc. Se define como MAT al entorno celular incluyendo vasos sanguíneos circundantes, células del sistema inmunológico, fibroblastos, células inflamatorias derivadas de médula ósea, moléculas de señalización y la MEC, así como las interacciones entre las células malignas y las no transformadas, sumado a los factores secretados por estas. Las células cancerosas influyen en el MAT mediante la liberación de señales extracelulares, la expresión y modificación de proteínas de la MEC, el reclutamiento y la promoción de la angiogénesis, y la inducción de la tolerancia inmune periférica. Por otro lado, las células del sistema inmunológico en el MAT pueden afectar el crecimiento y la evolución de las células cancerosas (Korkaya et al., 2011) (Figura 1).

La interacción entre las células transformadas, las células “normales” reclutadas por éstas, la presencia de citoquinas proinflamatorias, quemoquinas, factores de crecimiento y la MEC es lo que hace que cada tumor tenga características particulares y responda a tratamientos de forma diferente (Balkwill et al., 2012).

3. Factores de Crecimiento y Receptores Tirosina-quinasa de la Familia del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

3.1 Estructura y función

Los receptores tirosina-quinasa de la familia del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*) son proteínas transmembrana de tipo I que participan en el crecimiento y diferenciación de varios tejidos. Dicha familia está formada por 4 miembros: EGFR (ErbB1 o HER1), ErbB2 (HER2/neu o p185), ErbB3 y ErbB4 (Holbro y Hynes, 2004). Todos comparten una estructura homóloga dada por cuatro dominios claramente diferenciados: dos dominios

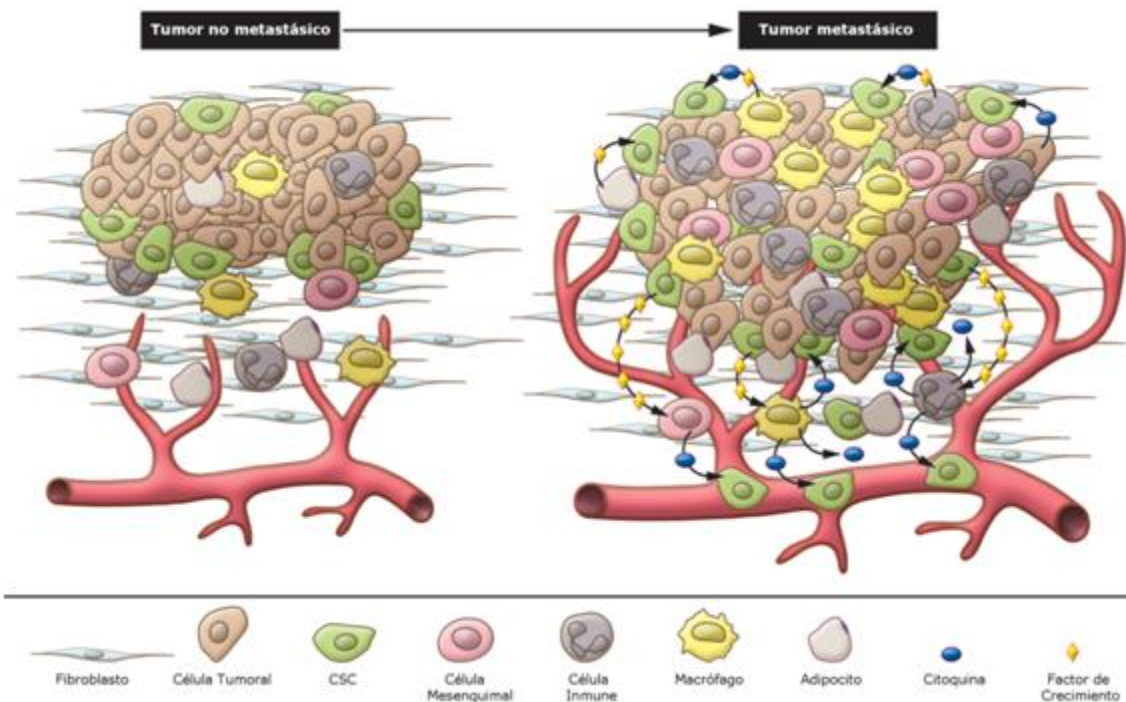


Figura 1. Microambiente tumoral. Los tumores son complejos órganos formados por diferentes tipos celulares. Mientras que los tumores no metastásicos son masas sólidas formadas principalmente por células tumorales diferenciadas y células madres tumorales (CSC), los tumores invasivos reclutan diferentes tipos celulares los cuales generan vasos sanguíneos y secretan citoquinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular que favorecen el crecimiento tumoral. Adaptado de Korkaya, et al, 2011.

extracelulares, uno de unión a ligando y otro de dimerización, y dos dominios citosólicos: un dominio quinasa y un dominio C-terminal de unión a proteínas señalizadoras. Si bien todos tienen una estructura similar, algunos poseen características particulares que determinan su acción biológica: ErbB2 no posee dominio de unión a ligando activo (al menos, no hay ligandos descritos), mientras que ErbB3 posee un dominio quinasa catalíticamente inactivo. Estos receptores pueden unir una gran cantidad de ligandos entre ellos: el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *Epidermal Growth Factor*), los factores de crecimiento de unión a heparina similares al EGF (*Heparin-binding EGF-like growth factor* o HB-EGF) y las Neuregulinas. El EGFR posee alta afinidad por EGF, mientras que los demás ligandos son capaces de activar a otros miembros de la familia. Uno de ellos es Neuregulina- β 1, también denominada heregulina- β 1 (HRG), la cual induce la formación de heterodímeros ErbB2-ErbB3 (Figura 2-A) (Sliwkowski et al., 1994).

Mediante técnicas de FRET¹ y N&B² se ha determinado que ErbB2 se encuentra en la membrana formando agrupamientos o *clusters* cuyo tamaño depende del nivel de expresión y la estimulación de la célula (Figura 2-B) (Nagy et al., 2010; Szabó et al., 2008). Por otro lado, mediante la utilización de receptores quiméricos, se ha reportado que, a diferencia de EGFR el cual tiene una dinámica de internalización rápida, las quimeras con regiones citoplasmáticas de ErbB2, 3 y 4 tienen velocidades de internalización más lentas, reteniéndolas en la membrana para su señalización (Baulida et al., 1996).

Si bien todavía se encuentra en discusión la dinámica y cooperatividad de la unión de EGF a su receptor, se sabe que la unión del ligando promueve la formación de homodímeros de EGFR, lo que induce un cambio conformacional en el mismo (Lemmon, 2008; Lemmon et al., 1997; Ziolkiewicz et al., 2013). Esta transición promueve la transfosforilación del dímero, en un mecanismo denominado “asimétrico”, ya que una molécula del dímero activo fosforila a la otra (Dawson et al., 2005; Lemmon, 2007; Mattoon et al., 2004). Una vez fosforilado, el receptor recluta proteínas adaptadoras que activan las diferentes vías de señalización aguas abajo. Además, EGFR puede heterodimerizar con otros miembros de su familia como ErbB2, lo que modifica sus dinámicas de agregación e internalización y por ende los niveles de activación de las diferentes vías de señalización (Citri y Yarden, 2006; Guo et al., 2015).

Asimismo, la estimulación con HRG induce la formación de heterodímeros ErbB2-ErbB3 (Sliwkowski et al., 1994). Dado que ErbB3 posee seis sitios de unión para la subunidad adaptadora p85 de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3 quinasa (PI3K, del inglés *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3 Kinase*) (Hynes y Lane, 2005), el acoplamiento de esta subunidad a ErbB3 fosforilado activa la vía de señalización de PI3K con la consecuente fosforilación de Akt (Hellyer et al., 2001; Holbro et al., 2003).

¹ FRET (del inglés *Förster Resonance Energy Transfer*) Esta técnica consiste en detectar la transferencia de energía entre dos fluoróforos cuyos espectros de emisión y absorción se solapan. Estos deben encontrarse a una distancia igual o menor a 10 nm. Dada la corta distancia entre fluoróforos la existencia de transferencia de energía se correlaciona con la interacción entre las dos moléculas o regiones de una misma moléculas que posean dichos fluoróforos (Jares-Erijman y Jovin, 2003, 2006).

² N&B (del inglés *Numbers and Brightness*) Esta técnica permite, mediante fluctuaciones en la señal de fluorescencia detectadas en un microscopio confocal, determinar la estequiometría de un complejo macromolecular (Digman et al., 2009).

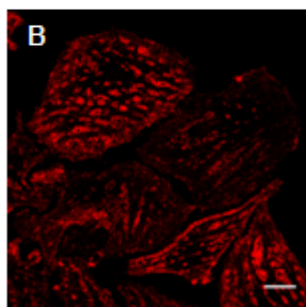
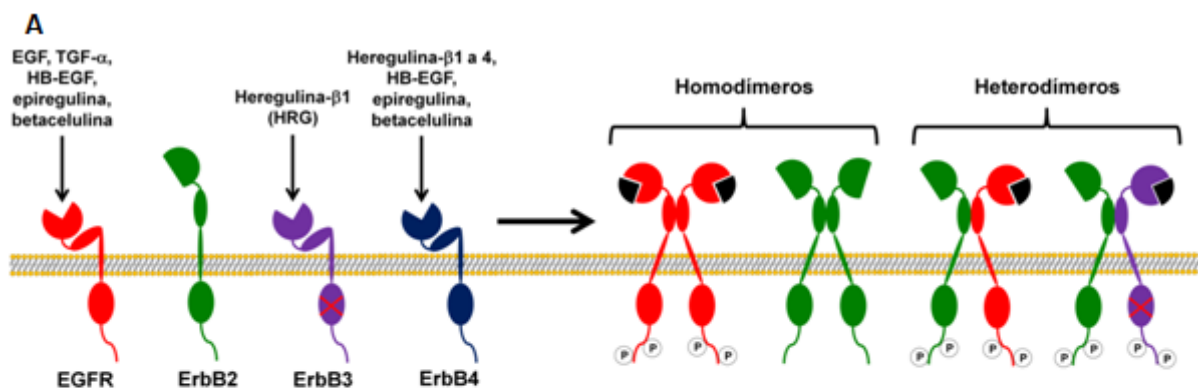


Figura 2. Receptores tirosina-quinasa de la familia de ErbB.
A- Los cuatro receptores de la familia pueden formar diferentes homo/heterodímeros funcionales con afinidad por diferentes ligandos.
B- Células SKBR3 (tumores mamarias con sobreexpresión de ErbB2) donde pueden apreciarse grandes complejos macro moleculares formados por homoasociación de ErbB2 en la membrana celular. Barra de escala: 10µm.

3.2 Señalización mediada por PI3K-Akt

PI3K es una proteína heterotrimérica que consiste en dos subunidades regulatorias (p85 y p55) y una subunidad catalítica (p110). PI3K fosforila al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3). PDK1 y Akt se unen a PIP3 en la membrana y de esta forma PDK1 fosforila Akt en el residuo T308 induciendo un cambio conformacional que aumenta su actividad catalítica (Manning y Cantley, 2007; Paplomata y O'Regan, 2014). Existen tres isoformas de Akt, todas ellas regulan la dinámica del citoesqueleto, crecimiento, proliferación y supervivencia lo que conlleva a un aumento del metabolismo celular y la síntesis proteica (Franke, 2008; Xue y Hemmings, 2013). Numerosas alteraciones de esta vía han sido descritas en la fisiopatología del cáncer: mutaciones en PI3K, sobreexpresión o mutaciones que aumentan la actividad de Akt o la desregulación de vías de señalización aguas arriba que activan Akt, como ErbB2-ErbB3 (Altomare y Testa, 2005; Fresno Vara et al., 2004; Toker y Yoeli-Lerner, 2006). Si bien es necesaria la heterodimerización con ErbB2 para la activación de Akt mediada por HRG, se ha descrito que ErbB3 puede homodimerizar haciendo aún más compleja la interacción de esta familia de receptores (Steinkamp et al., 2014).

3.3 Receptores de la familia de EGFR en cáncer

La desregulación en la función o en los niveles de expresión de estos receptores o sus ligandos es capaz de generar procesos patológicos. Las proteínas anteriormente descritas cumplen funciones esenciales en procesos tumorigénicos. Las células tumorales adquieren mecanismos que les permiten independizarse de dichas señales y una de estas estrategias es la sobreexpresión de receptores para factores de crecimiento (Mehra et al., 2011). Los receptores de la familia de EGFR se expresan en varios tipos de tumores. EGFR se encuentra sobreexpresado en tumores de mama, próstata, pulmón, gliomas y ovario, además de presentar mutaciones o deleciones que aumentan su actividad (como es el caso del mutante EGFRvIII) (Gan et al., 2013; Levitzki y Klein, 2010; Yarden y Pines, 2012).

ErbB2 se expresa en páncreas, próstata y mama, entre otros. La sobreexpresión de ErbB2 puede activar dicho receptor de forma ligando-independiente (Hynes y Lane, 2005; Olayioye et al., 2000) induciendo un fenotipo invasivo al activar vías de señalización que promueven la proliferación y migración celular (Wolf-Yadlin et al., 2006). Además, se postula que la sobreexpresión de este último podría ser un mecanismo tumoral para generar resistencia a antiestrógenos como el tamoxifeno en cáncer de mama (Borg et al., 1994; Pancholi et al., 2008). Por otro lado, si bien la sobreexpresión de ErbB3 ocurre con baja frecuencia en comparación con la frecuencia de aparición de tumores con sobreexpresión o mutación de EGFR o ErbB2, su expresión, aunque sea a niveles basales, es necesaria para la activación de Akt a través de ErbB2 (Holbro et al., 2003; Sithanandam y Anderson, 2008; Stern, 2008; Yarden y Pines, 2012).

4. La Matriz Extracelular

4.1 Componentes de la MEC

Si bien la MEC está compuesta por una amplia variedad de proteínas y proteoglicanos, para el presente trabajo de tesis son de relevancia tres de dichos componentes: lamininas, fibronectinas y colágenos.

4.1.1 Lamininas

Las lamininas son una familia de glicoproteínas compuestas por un dominio globular, dominios repetitivos de homología al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y un dominio α -helicoidal. Estructuralmente, esta proteína existe como un heterotrímero formado por tres subunidades: α , β y γ , que se entrelazan para formar estructuras lineales o en forma de cruz (Figura 3-A). Hasta la fecha se han descrito cinco subunidades α , cuatro β y tres γ , pudiendo formar un total de 16 trímeros diferentes (Mouw et al., 2014; Yurchenco et al., 2002).

Estas proteínas se encuentran formando parte de la lámina basal y algunos compartimientos mesenquimales, mediando la interacción entre receptores celulares como integrinas y otros componentes de la MEC (Kular et al., 2014).

4.1.2 Fibronectinas

La familia de las fibronectinas comprende mas de 20 proteínas de aproximadamente 250KDa, productos de procesamiento diferencial (o *splicing* alternativo) a partir de un mismo gen (Pankov, 2002), siendo piezas clave en la organización de la MEC intersticial y la membrana basal. Estas proteínas pueden existir en forma soluble circulando por el torrente sanguíneo o agregadas formando una red en la MEC donde interactúa con otras proteínas y receptores específicos en la membrana plasmática (Frantz et al., 2010; Kular et al., 2014). Se ha demostrado que son necesarias para el desarrollo y funcionalidad de numerosos tejidos, cicatrización y migración celular, siendo críticas en el desarrollo de los vertebrados (Pankov, 2002).

Estas proteínas existen principalmente en forma dimérica, mediante la formación de puentes disulfuro entre los dominios C-terminales (Mouw et al., 2014) (Figura 3-B). Un monómero de fibronectina consiste en tres módulos de unidades repetitivas denominados tipo I, II y III. Las unidades repetitivas de tipo I, aproximadamente 12 en total, se encuentran en la porción N-terminal de cada monómero y poseen sitios de unión a fibrina I y II. Estas son seguidas de dos subunidades repetitivas de tipo II, que participan en la unión a integrinas (como α 4- β 1-integrina), colágeno o gelatinas. Las subunidades

repetitivas de tipo III tiene la mayor cantidad de sitios de glicosilación y poseen diferentes dominios de interacción con integrinas. Particularmente, en la subunidad tipo III₁₀ existe un dominio característico de esta familia de proteínas denominado RGD (ya que posee una secuencia Arg-Gly-Asp), que es crucial para la interacción con α V- β 1 y α V- β 3-integrina (Humphries et al., 2006; Pankov, 2002; Wierzbicka-Patynowski y Schwarzbauer, 2003).

4.1.3 Colágenos

El colágeno es la proteína más abundante en el organismo que forma parte del tejido conectivo, tendones y piel, entre otros. Esta familia de proteínas cumple funciones principalmente estructurales, dándole elasticidad y resistencia mecánica a los tejidos así como participando de procesos de adhesión y migración. Existen aproximadamente 30 tipos de colágeno diferentes, los cuales pueden formar redes o fibras que confieren propiedades diferenciales a la MEC de cada tejido (Kular et al., 2014). Específicamente, la formación de fibrillas está restringida a colágenos tipo I, II, III, V y XI.

Estructuralmente, el colágeno se caracteriza por ser un homo o hetero-trímero en forma de hélice dextrógira (Figura 3-C). Esta estructura se forma en cuatro pasos: el primero consiste en la síntesis y modificación de los monómeros de procolágeno en el retículo endoplásmico rugoso donde, además, se forma la triple hélice. A continuación, la molécula de procolágeno se modifica en el aparato de Golgi y se empaqueta para su secreción. La molécula de procolágeno es luego secretada al medio extracelular y proteolíticamente clivada donde, a su vez, puede entrecruzarse con otras moléculas de colágeno para formar estructuras supramacromoleculares con alta resistencia mecánica (Brinckmann, 2005; Kadler et al., 2007; Mouw et al., 2014).

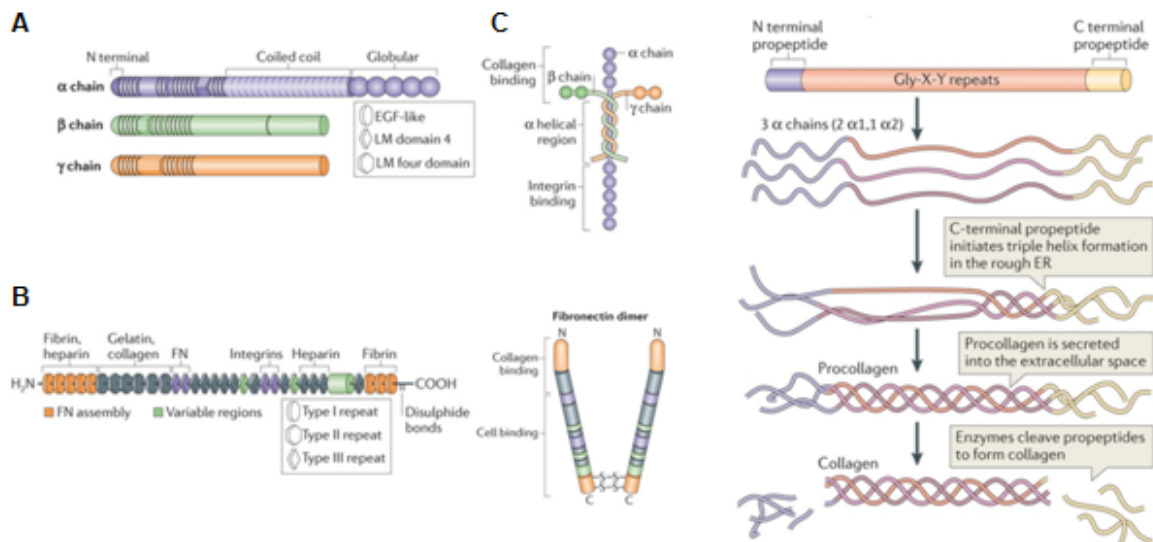


Figura 3. Proteínas de la Matriz Extracelular. A- Laminina es una proteína formada por tres cadenas: α , β y γ . B- Estructura de la fibronectina. Esta proteína es un homodímero formado por dos puentes disulfuros en la región C-terminal. Cada subunidad posee dominios de interacción con otras proteínas de la matriz extracelular y un dominio de unión a integrinas, denominado *RGD*. C- La molécula de colágeno fibrilar se forma por el entrecruzamiento de tres cadenas α (para el caso del colágeno tipo I son dos cadenas $\alpha 1$ y una $\alpha 2$). Cada subunidad está formada por dos propéptidos C- y N-terminales que flanquean una región de repeticiones Gly-X-Y (donde X e Y representan cualquier aminoácido, siendo los más comunes Prolina o Hidroxiprolina). Las tres subunidades se entrelazan para formar una estructura de triple hélice para luego ser secretado al espacio extracelular, donde dicha proteína es digerida por metaloproteasas que remueven las regiones C- y N-terminales de cada subunidad. Adaptado de Mouw, Ou, & Weaver, 2014.

4.2 Moléculas de adhesión a la MEC

El desarrollo de tejidos conlleva la necesidad de que las células adquieran la capacidad de interactuar entre sí y con su entorno para definir su función y/o destino celular. Para sentir los estímulos mecánicos del micro-entorno celular, las células deben poder adherirse tanto a un sustrato como a otras células. Existen varias familias de moléculas que cumplen dichas funciones. Las principales familias de proteínas de adhesión son las pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig-CAM, del inglés *Immunoglobulins superfamily of Cell Adhesion Molecules*), las selectinas, las cadherinas y las integrinas (Balkwill et al., 2012).

Las Ig-CAM son proteínas monoméricas que se caracterizan por tener una o más copias de un denominado dominio Ig, una estructura compacta determinada por dos residuos de cisteína separados por entre 55 y 75 aminoácidos arreglados en una hoja β antiparalela. Esta familia participa desde el desarrollo del sistema nervioso hasta el funcionamiento del sistema inmune (Aplin et al., 1998). Las selectinas son proteínas compuestas por un dominio N-terminal del tipo lectina, seguido por un dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico, entre dos y nueve sitios regulatorios, un dominio transmembrana y una corta cola citoplasmática. Estas proteínas participan en la unión heterotípica de proteínas de membrana, principalmente a proteínas que poseen residuos de glicanos conjugados con ácido siálico mediante uniones Ca^{2+} dependiente. Son cruciales, entre otros procesos, en la unión entre leucocitos y células endoteliales o plaquetas durante procesos inflamatorios (Aplin et al., 1998).

Las cadherinas son una familia de proteínas homodiméricas de membrana que participan en la unión célula-célula. Los dominios extracelulares de este dímero interactúan con otras cadherinas homólogas de células adyacentes. Del lado citoplasmático, las cadherinas se unen a proteínas como p120, α y β catenina (Aplin et al., 1998), que sirven de nexo entre dichas proteínas de anclaje y el citoesqueleto de actina (Aplin et al., 1998).

Por su parte, p120 también cumple funciones independientes de su participación en la adhesión mediada por cadherinas. Esta proteína actúa en la vía de señalización de Wnt regulando negativamente la actividad transcripcional de β -catenina. Además, se ha comprobado que α -catenina modula la actividad de pequeñas GTPasas como Rho y que,

al formar homodímeros, es capaz de inhibir la nucleación de actina mediada por Arp2/3 en ensayos *in vitro* (Daugherty y Gottardi, 2007).

4.2.1 Integrinas y complejos de adhesión focal

Los complejos de adhesión focal, también denominados “focos de adhesión”, son estructuras asociadas a la membrana que cumplen funciones de anclaje a la MEC y de integración de señales dadas por diferentes receptores de membrana con actividad tirosina-quinasa o acoplados a proteína G (Scott y Yap, 2006). Hasta la fecha se han identificado alrededor de 150 proteínas que conforman los focos de adhesión, entre las que se encuentran moléculas integrales de membrana, quinasas, fosfatasas, proteasas, moléculas adaptadoras, reguladoras de pequeñas proteínas que unen GTP y moduladores del citoesqueleto de actina.

Las principales moléculas de adhesión que forman parte de estos complejos pertenecen a una familia de glicoproteínas heterodiméricas de membrana denominadas integrinas. Estas proteínas se encuentran formadas por una unidad α y otra β y participan tanto en la unión célula-célula como con la MEC. Hasta la fecha han sido descritas 18 subunidades α y 8 subunidades β , las cuales pueden combinarse formando 25 heterodímeros diferentes abarcando así una gran variedad de especificidades a diferentes ligandos (Romer et al., 2006).

La región extracelular de las subunidades α consiste de cuatro dominios: un dominio de siete hojas β situado en su extremo amino terminal, un dominio de tipo inmunoglobulina y dos dominios de tipo β -sándwich denominados CALF 1 y 2 (Figura 4-A). Por su parte, las subunidades β poseen una región extracelular de ocho dominios: un dominio N-terminal rico en cisteínas denominado PSI (Plexina-Semaforina-integrina) el cual es seguido por cuatro dominios del tipo EGF que continúan en un dominio terminal ligado al dominio transmembrana (denominado dominio de cola β). La región extracelular de las integrinas posee una región denominada “cabeza” la cual es responsable de las interacciones tanto entre subunidades como proteína-ligando. Las hojas β de la subunidad α interactúan con el dominio β A de la subunidad β para formar la cabeza que, como bien se mencionó anteriormente, es la responsable de la estabilización del heterodímero $\alpha\beta$

(Humphries et al., 2006). El dominio βA de la subunidad β posee un sitio de unión a Ca^{2+} que estabiliza la interacción entre subunidades. Otros cinco cationes metálicos se unen al dímero en la subunidad α : cuatro en la hoja β y uno en el dominio CALF-1 (Arnaout et al., 2007; Campbell y Humphries, 2011).

En la región intracelular de las integrinas se encuentran sitios de interacción con proteínas citoplasmáticas como proteínas adaptadoras, quinasas y proteínas de unión a citoesqueleto de actina. La eliminación de la región citoplasmática completa de la subunidad α o simplemente de la secuencia GFFKR próxima al dominio transmembrana, activa constitutivamente al dímero. En cambio, mientras que variantes truncadas cerca del extremo C-terminal de la subunidad β bloquean la activación, la eliminación de regiones más cercanas a la membrana plasmática la activan constitutivamente. Durante el estado de reposo las colas citoplasmáticas de ambas subunidades se encuentran muy cercanas unas de otras, lo que fue demostrado por experimentos de FRET donde el tratamiento con un agonista que promueve la activación del dímero produce una reducción en la transferencia de energía entre fluoróforos (Arnaout et al., 2007; Campbell y Humphries, 2011). La activación de estas proteínas puede darse por dos vías: una intrínseca y otra extrínseca. La vía de activación intrínseca o activación "*inside-out*" consiste en un cambio conformacional del dímero $\alpha\beta$ -integrina por la unión de proteínas citoplasmáticas a las regiones C-terminal de la proteína (Calderwood, 2004). Talina, una proteína de unión al citoesqueleto de actina, participa activamente en esta vía de activación. Ésta es un homodímero antiparalelo el cual se une con alta afinidad a las regiones citoplasmáticas de $\beta 1A$, $\beta 1D$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 5$ -integrina, y con menor afinidad a $\beta 7$ -integrina, siendo esta unión un paso esencial en la activación *inside-out*. Otras proteínas citoplasmáticas participan de la activación intrínseca de las integrinas, entre ellas puede nombrarse a $\beta 3$ -endonexina, que se une específicamente a $\beta 3$ -integrina, y citohesina que se une a la subunidad β y a la proteína CIB (del inglés *Calcium and Integrin Binding Protein*) que interactúa con la región citoplasmática de la subunidad α (Askari et al., 2009). La unión de dichas proteínas a las regiones citoplasmática de la integrina produce la separación de las colas C-terminales lo que causa un cambio conformacional que se propaga a través de la membrana exponiendo los dominios extracelulares distales de unión a ligando (Calderwood, 2004). La activación extrínseca o "*outside-in*" se produce cuando el pasaje de la forma inactiva a la forma activa es inducido por presencia del ligando, el cual interactúa con la cabeza de

la proteína induciendo el cambio conformacional en el dímero (Calderwood, 2004). La tensión mecánica producida por la unión del ligando induce un cambio conformacional que facilita la interacción de proteínas citoplasmáticas con las colas C-terminales de las integrinas y el reclutamiento de los diferentes componentes para la formación del complejo de adhesión focal (Figura 4-B) (Askari et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, las integrinas se localizan en estructuras de membrana conocidas como focos de adhesión, los cuales cumplen funciones tanto de adhesión como de señalización. Una de las principales proteínas señalizadoras asociadas a integrinas en los complejos de adhesión focal identificada hasta la fecha es la quinasa de los focos de adhesión (FAK, del inglés *Focal Adhesion Kinase*). La región N-terminal de FAK interactúa con la región citoplasmática de la subunidad β integrina y con la forma activa del EGFR. La activación de integrinas por unión a su ligando conduce a la fosforilación de FAK. La fosforilación en el residuo Y397, dentro de la región N-terminal, genera un sitio de alta afinidad para la unión con el dominio SH2 de Src (Askari et al., 2009). Existen en esta proteína, además, secuencias ricas en prolinas que permiten la interacción de CAS y GRAF (proteína con actividad GAP para Rho) con FAK a través de sus dominios SH3.

Además de moléculas señalizadoras pueden hallarse un gran número de proteínas reguladoras del citoesqueleto dentro de las cuales puede nombrarse a zyxina. Esta proteína cumple funciones regulatorias del citoesqueleto de actina al interactuar tanto con los filamentos como con proteínas de adhesión como cadherinas e integrinas, entre las cuales podemos destacar las formadas por la subunidad $\beta 1$ (Parsons, 2003).

La quinasa ligada a integrinas o ILK (del inglés *Integrin-Linked Kinase*) se encuentra acoplada a la subunidad $\beta 1$ -integrina en los focos de adhesión y regula la fosforilación de Akt y GSK3, la inducción de señales relacionadas con la supervivencia y proliferación celular mediada por factores de crecimiento (Drees et al., 1999) y la activación de Rac-1 en células endoteliales y fibroblastos (McDonald et al., 2008). Además de estar ligada a las integrinas, ILK interactúa también con cadherinas y regula la unión célula-célula mediada por éstas (Boulter et al., 2006).

Otras proteína-quinasa relacionadas con los focos de adhesión son las pertenecientes a la familia de Src (Src, Fyn, Yes, Yrk, Blk, Fgr, Hck, Lck, y Lyn). Éstas están acopladas a un gran número de moléculas señalizadoras entre las cuales pueden

citarse receptores tirosina-quinasa, integrinas y receptores acoplados a proteína G, quienes median la fosforilación de una amplia variedad de sustratos como lo son p190 (una GAP específica para Rho), STAT3, FAK, paxilina y p130CAS, entre otros (Aplin et al., 1998).

p130CAS (*p130 CRK Associated Substrate*) es una proteína de andamiaje o *scaffold* que funciona como sensor de estiramiento. CAS posee un dominio sustrato central rico en tirosinas que en su estructura terciaria en el estado plegado se encuentra protegido por las regiones N- y C-terminales. En el N-terminal presenta dominios SH3 y de unión a FAK, mientras que en el C-terminal encontramos un dominio de unión a Src. La separación de las regiones C y N-terminales, debido al estiramiento sentido por integrinas, expone el dominio sustrato central a fosforilación exógena por parte de quinasas como Src, FynT o Abl1 lo que permite el acoplamiento de moléculas adaptadoras que median la activación de MAPK río abajo (Okutani et al., 2006).

Además de un amplio espectro de quinasas, existe una variedad de proteínas pequeñas de unión a GTP de la familia de Rho (Rho, Rac1, Cdc42) que están involucradas en la señalización mediada por integrinas. Rho se encuentra involucrada en la organización de los complejos focales y la adhesión celular a través del reclutamiento de vinculina y la regulación del estado de fosforilación de FAK (Sawada et al., 2006). Experimentos realizados con mutantes para la región citoplasmática de β 1-integrina mostraron que esta GTPasa pequeña participa en la señalización de supervivencia/proliferación mediante la vía FAK-Cas-Rac-JNK (Clark et al., 1998).

Numerosos experimentos dan evidencia de que la actividad de proteínas de la familia de Rho (Rho, Rac y Cdc42) es modulada por señales de adhesión dependientes de cadherinas (Hirsch et al., 2002). Fournier y colaboradores demostraron que una regulación conjunta entre las vías de señalización de E-cadherina y β 1-integrina sobre Rac modula la expresión de ciclina-D1 la cual controla la progresión del ciclo celular (Yap y Kovacs, 2003). Asimismo, Yano y colaboradores demostraron que la regulación de Rac por las vías de señalización dependientes de integrinas es esencial en la adhesión celular mediada por cadherinas y el control de la interacción de la región citoplasmática de estas con β -catenina (Fournier et al., 2008).

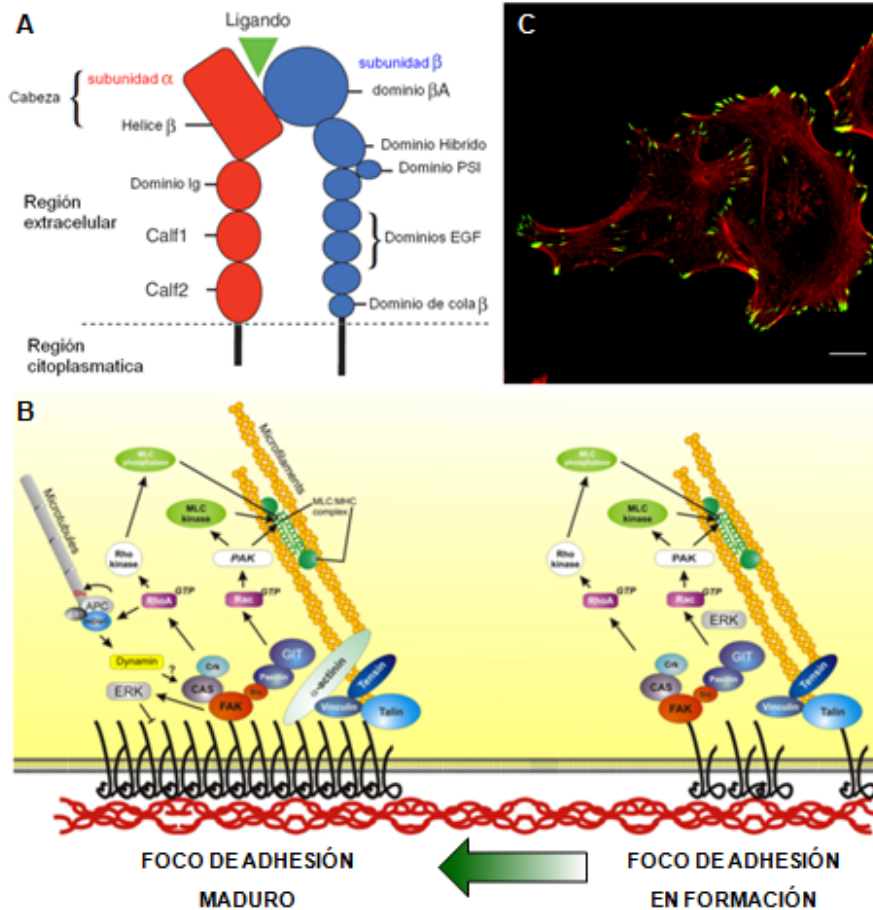


Figura 4. Integrinas y complejos de adhesión focal. A- Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas ($\alpha\beta$) que poseen una región N-terminal extracelular con dominios de unión a ligando e interacción entre monómeros y una cola C-terminal citoplasmática que interactúa con diferentes proteínas que cumplen funciones tanto de regulación de la adhesión celular como de transducción de señales. Adaptado de Askari, 2009. B- Estas proteínas se asocian a otras proteínas y forman estructuras macromoleculares conocidas como complejos de adhesión focal, los cuales cumplen la función de vincular la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina, detectar estímulos mecánicos e integrar señales dadas por diferentes receptores y moléculas de señalización. Adaptado de Vicente-Manzanares et al., 2005. C- Célula tumoral mamaria marcada con faloidina-R6G (que une al citoesqueleto de actina, en rojo) y un anticuerpo específico contra zyxina, una proteína de los complejos de adhesión focal (en verde). Barra de escala: 10 μ m.

4.2.2 Receptores tirosina-quinasa con dominio de discoidina (DDR)

Los DDR son receptores tirosina-quinasa de unión a colágeno. Dichos receptores son proteínas transmembrana de tipo I formadas por tres dominios: un dominio intracelular con actividad quinasa, un dominio transmembrana y un dominio extracelular homólogo a la discoidina, una proteína de adhesión de *Dictyostelium discoideum* (Figura 5-A) (Fu et al., 2013a; Johnson et al., 1993; Valiathan et al., 2012). En estado quiescente el receptor se encuentra como homodímeros los cuales, luego de unir colágeno, se transfosforilan y agregan formando complejos macromoleculares que regulan la activación de cascadas de señalización intracelular (Figura 5-A) (Carafoli y Hohenester, 2013; Leitinger, 2011; Mihai et al., 2009). Existen dos tipos de receptores DDR: DDR1, el cual es capaz de unir colágeno tipo I, II, V y VII, y DDR2, el cual une colágeno fibrilar (Yeh et al., 2012). Además, ambos receptores son factibles de ser activados por clivaje mediante metaloproteasas de matriz extracelular (MMP, del inglés *matrix metalloproteinases*) (Fu et al., 2013b).

Consecuentemente con la unión de colágeno a DDR1, la autofosforilación de la región citoplasmática genera sitios de unión para proteínas con dominios homólogos a Src 2/3 y dominios de unión a fosfo-tirosina (Koo et al., 2006; Lemeer et al., 2012). Asimismo, DDR1 se asocia a numerosas proteínas adaptadoras como Nck2, ShcA, Csk, Crk-II, la unidad regulatoria de PI3K p85, quinasas como Src, proteínas de la familia de STAT (STAT1a/b, STAT3, STAT5), factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs, del inglés *Guanine nucleotide Exchange Factor*) como Vav 2/3 y fosfatasas como SHIP2. La fosforilación de DDR1 promueve la activación de las vías PI3K/Akt y Ras/MAPK los cuales inducen la actividad de NFκB, Hes1, Hey2 y Notch (Reyes-Urbe et al., 2015).

DDR1 se expresa predominantemente en células epiteliales mientras que DDR2 se encuentra primordialmente en tejido conectivo de origen mesodérmico (Alves et al., 1995). Los DDR participan en numerosos procesos fisiológicos. DDR1 y DDR2 son necesarios para el desarrollo del neuroectodermo. Además, DDR1 participa en el crecimiento de neuritas, la diferenciación de oligodendrocitos y la diferenciación del epitelio bronquial, mientras que DDR2 se expresa también en el músculo esquelético, piel, riñones y pulmón (Vogel et al., 2006). Asimismo, DDR1 regula la motilidad celular mediante asociación con miosina IIA (Huang et al., 2009), promueve la adhesión a colágeno mediante la activación

“inside-out” de $\alpha 1\text{-}\beta 1$ y $\alpha 2\text{-}\beta 1$ -integrinas (Xu et al., 2012), estabiliza las uniones célula-célula mediante la expresión de E-cadherina (Yeh et al., 2011) y regula la expresión de MMP (Leitinger, 2014), entre otras funciones.

DDR1 cumple un papel importante en procesos patológicos como el cáncer. Se ha reportado que ratones deficientes en estas proteínas desarrollan un fenotipo mamario anormal, caracterizado por la hiperproliferación del epitelio mamario y la disrupción de la arquitectura ductal normal (Vogel et al., 2001). Si bien algunos estudios reportan un aumento en la abundancia de DDR1 en carcinomas invasivos primarios y metástasis en nódulos linfáticos (Barker et al., 1995), otros muestran una reducción moderada en carcinomas mamarios de grado intermedio y altos en relación al tejido normal (Neuhaus et al., 2011). Asimismo, es posible que dichas diferencias se relacionen no solo al grado sino al tipo histológico del tumor. Aunque DDR1 también se expresa en numerosas líneas tumorales mamarias, la relación entre la expresión de esta proteína y la malignidad o capacidad invasiva todavía no es del todo clara (Valiathan et al., 2012).

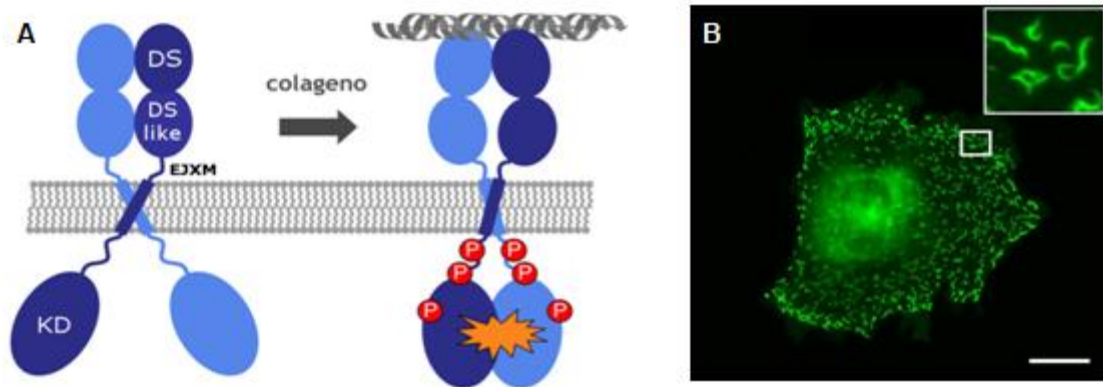


Figura 5. Receptores tirosina-quinasa para colágeno con dominio de Discoidina (DDR).
A- Estructura de los DDR. Estos receptores se encuentran formando homodímeros que cambian su conformación y se activan luego de unir colágeno. DS: Dominio homólogo a Discoidina. EJXM: sitio de clivaje por metaloproteasas. KD: Dominio quinasa. Adaptado de Leitinger, 2011. B- Célula NIH-3T3 expresando la proteína de fusión DDR1-EGFP. La unión de estos receptores a colágeno induce su agregación formando complejos macromoleculares en la membrana. Adaptado de Mihai, 2009. Barra de escala: 20 μm .

4.3 Interacción entre la MEC y los factores de crecimiento

Para proliferar, una célula tumoral debe, además de independizarse de los factores de crecimiento, modular su adhesión al sustrato. Esta capacidad de regular su interacción con la MEC le permitirá migrar y colonizar nuevos entornos. Existe amplia evidencia que demuestra la regulación cruzada entre receptores de MEC y receptores de factores de crecimiento u hormonas. Se ha demostrado que α V- β 3-integrina es capaz de asociarse con los receptores de insulina y factor de crecimiento derivado de plaquetas β (PDGF β , del inglés *Platelet-Derived Growth Factor β*) (Schneller et al., 1997). Asimismo, se ha descrito que β 1-integrina es capaz de regular la dinámica de traslocación nuclear del receptor de estrógeno α (ER- α , del inglés *Estrogen Receptor- α*) con implicancias en la resistencia al tratamiento con tamoxifeno (Pontiggia et al., 2012; Sampayo, 2015).

Por otro lado, se ha demostrado que la activación de receptores tirosina-quinasa de la familia de EGFR promueven la fosforilación de proteínas de complejos de adhesión focal como FAK, Src y p130CAS (Cabodi et al., 2010a; Kuramochi et al., 2006; Olayioye et al., 2000; Roskoski, 2014; Soung et al., 2010), las cuales, a su vez regulan la capacidad proliferativa de la célula como el ensamblaje de dichos complejos. En particular, se ha observado que diferentes integrinas son capaces interactuar con ErbB2 en numerosos modelos celulares (Alexi et al., 2011; Falcioni et al., 1997; Guo et al., 2006; Soung et al., 2010; Szabó et al., 2008; Wang et al., 2009). Esto sustenta la hipótesis de que la información de señales dadas por factores de crecimiento y la MEC es integrada *in situ* en los complejos de adhesión focal. Además, se postula que la interacción entre receptores de moléculas solubles y proteínas de MEC podrían llevar a la activación de quinasas asociadas a los complejos de adhesión focal. Esto promovería la resistencia a los tratamientos contra inhibidores de quinasas o anticuerpos bloqueantes de ErbB2 como Trastuzumab (Huang et al., 2011; Lesniak et al., 2009; Mocanu et al., 2005; Nagy et al., 2002).

5. La Glándula Mamaria

5.1 Desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria

5.1.1 Desarrollo embrionario

En ratones, el desarrollo de la glándula mamaria comienza entre los días 10 y 11 de desarrollo embrionario, tanto en machos como en hembras, cuando los brotes epiteliales proliferan y se ramifican invadiendo el mesénquima. El desarrollo comienza con la formación de las líneas mamarias a partir de tejido ectodérmico, de las cuales se desarrollaran cinco pares de glándulas. El tejido ectodérmico que se invagina estimula al mesodermo adyacente a diferenciarse y formar el mesénquima de la glándula. Este proceso, que dura unas semanas, se detiene al día 18 del desarrollo embrionario murino (Richert et al., 2000). En los machos, a diferencia de lo que sucede en el humano donde los ductos permanecen conectados con el pezón, la glándula mamaria murina regresiona en respuesta al aumento de las concentraciones circulantes de andrógenos (Hynes & Watson, 2010).

5.1.2 Desarrollo glandular en la pubertad

Durante las primeras semanas luego del parto, los ductos se elongan y ramifican a una tasa relativamente elevada (Figura 6-A). En los extremos de dichos túbulos se diferencian estructuras denominadas brotes terminales (*terminal end buds*, TEB). Los TEB son estructuras multicelulares organizadas en múltiples capas de células epiteliales con una capa más externa de células pluripotentes no diferenciadas denominadas “células del capuchón” (*cap cells*).

Durante la pubertad y debido al aumento en la secreción de hormonas ováricas, los TEB se elongan y ramifican en conductos secundarios y terciarios invadiendo así la almohadilla de grasa. Esta extensa actividad mitótica continúa hasta que la almohadilla de grasa es llenada por completo (Figura 6-B) (Watson y Khaled, 2008). En los machos, la testosterona actúa sobre las células del mesénquima inhibiendo el desarrollo de la glándula.

5.1.3 La glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia

Durante la preñez, debido al aumento en los niveles de progesterona y en conjunto con los niveles crecientes de prolactina (PRL), se estimula la mitosis de las células epiteliales y la diferenciación de los TEB en alvéolos secretorios (Figura 6-C y D). Dichas estructuras son las unidades funcionales de la glándula, encargadas de la producción, secreción, almacenamiento y, eventualmente, expulsión de la leche (Watson y Khaled, 2008).

Debido a la alta actividad mitótica a lo largo de la gestación, la almohadilla de grasa se llena por completo de ductos y alvéolos secretores preparando la glándula para el período de lactancia. Hacia el final de la preñez, el lactógeno placentario y la PRL estimulan la diferenciación alveolar y la lactogénesis. El estroma mamario se reemplaza completamente por alvéolos que ocupan toda la almohadilla de grasa y a partir de este momento la glándula es capaz de producir leche (Figura 6-E) (Richert et al., 2000). Hacia el final de la preñez y luego del parto, se produce una caída abrupta de los niveles circulantes de estrógeno y progesterona sistémicos. A partir de este momento la arquitectura funcional de la glándula se mantiene principalmente gracias a la PRL liberada desde la glándula pituitaria en respuesta al estímulo de succión de las crías, y a los glucocorticoides (Reichardt et al., 2001; Topper y Freeman, 1980).

5.1.4 La involución mamaria

Una vez que las crías dejan de amamantar, la leche se acumula dentro de los alvéolos aumentando así su volumen y disparando la secreción de factores locales que determinan la inducción de la apoptosis en el epitelio mamario. A su vez, el cese del estímulo de succión sobre el pezón disminuye la secreción neurohipofisaria de prolactina, lo que conduce a la pérdida de estímulo secretorio de leche y determina el proceso de remodelación de la glándula (Watson, 2006). Este proceso se ha clasificado en 2 etapas. La primera etapa, o etapa reversible, abarca las primeras 48 horas luego del destete. Una característica fundamental de esta etapa reside en que si durante dicho lapso se restablece la succión, la muerte celular se detiene y se restituye la capacidad

secretora de leche del epitelio acinar. La segunda fase de la involución mamaria es irreversible y se inicia con la disminución de los niveles sistémicos de hormonas lactogénicas (Chapman et al., 1999). Durante este período se produce la mayor cantidad de muerte del epitelio secretorio y también, debido al aumento de la actividad de MMP específicas, el remodelado de la glándula (Khokha y Werb, 2011), lo cual termina con una glándula con características histológicas similares a una glándula virgen (Figura 6-F). Existen dos hipótesis sobre los posibles estímulos de la expresión de estos factores locales. La primera hipótesis propone que al producirse la acumulación de leche dentro de los alvéolos secretorios aumenta la concentración de factores pro-apoptóticos (que salen al exterior durante la lactancia) que resultan ser los responsables de disparar la muerte del epitelio secretorio. La otra hipótesis es que la acumulación de leche al interrumpirse el amamantamiento produce un aumento de la presión intra-alveolar que estimula mecánicamente a las células epiteliales e induce la expresión de estos factores locales (Marti et al., 1997).

5.3 Receptores de la familia de EGFR en la glándula mamaria

Los receptores tirosina-quinasa de la familia del EGFR han sido extensamente estudiados en la glándula mamaria dado que su desarrollo es principalmente posnatal y sus células son particularmente susceptible a sufrir una transformación inducida por la desregulación de estos (Holbro et al., 2003; Kang et al., 2011; Osborne y Schiff, 2011; Stern, 2008). Ratones knock-out (KO) para ErbB3 muestran un menor crecimiento en los botones terminales, ramificaciones y espacios luminales, aunque la tasa de proliferación celular no se ve aparentemente afectada. Además, se ha demostrado que ErbB3 cumple un papel crucial en el mantenimiento de la polarización vaso-luminal en las células epiteliales (Balko et al., 2012). Tanto EGFR como ErbB2 se expresan en la glándula mamaria y son necesarios para el desarrollo glandular durante la pubertad, mientras que durante el embarazo y la lactancia, ErbB4 adquiere mayor relevancia.

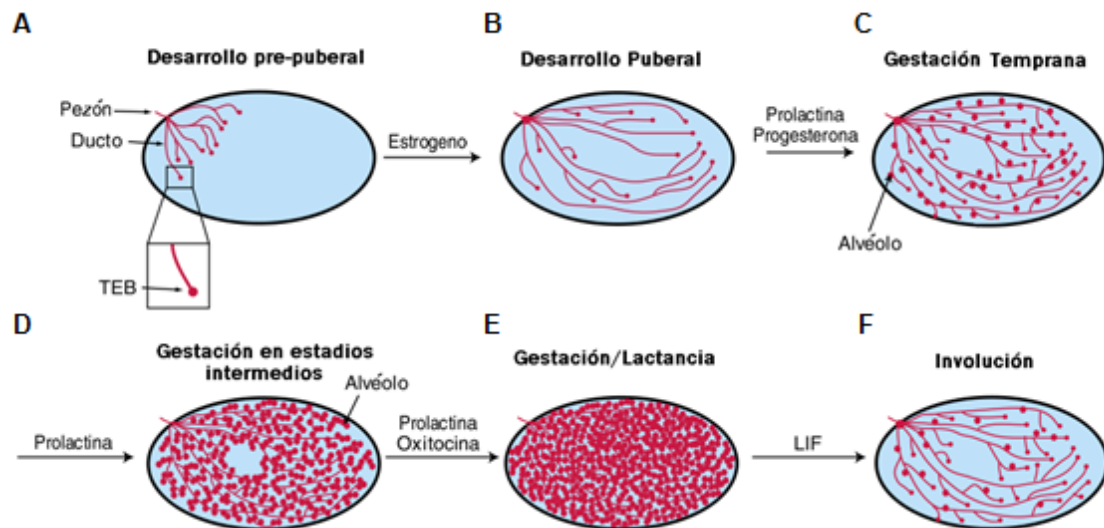


Figura 6. Cambios morfológicos en la glándula mamaria durante su desarrollo. A- Durante las primeras semanas luego del parto, los túbulos se elongan y ramifican. B- En la pubertad, se induce nuevamente la proliferación del epitelio mamario hasta que la almohadilla de grasa se llena de túbulos. C y D- Debido a los crecientes niveles circulantes de progesterona y PRL, las células epiteliales entran en mitosis y los TEB se diferencian en alvéolos secretorios. E- En la lactancia, los alvéolos adquieren su mayor capacidad secretoria y se llenan de leche. La succión de la cría estimula la secreción hipofisaria de PRL y oxitocina que mantienen a la glándula en un estado secretorio máximo. F- El cese de la succión durante el destete y la consecuente acumulación de leche en los acinos estimula la secreción local de LIF el cual induce la apoptosis del epitelio acinar mamario. La caída en los niveles de PRL y oxitocina promueven la remodelación de la glándula lo que hace volver a un estado histológico similar al de una glándula virgen. Adaptado de Watson, CJ, 2008.

5.4 Las integrinas en la glándula mamaria

La utilización de ratones mutantes condicionales para β 1-integrina aportó al entendimiento del papel de dicha subunidad en la fisiología mamaria. Los ratones KO para β 1-integrina presentan un fenotipo letal, sin superar la etapa de blastocito durante el desarrollo embrionario (Fässler y Meyer, 1995; Tarone et al., 2000). Para sortear este problema, se desarrollaron ratones KO condicionales a partir de una cepa transgénica que posee una recombinasa que se expresa bajo el control del promotor de la β -lactoglobulina (Blg-Cre). En estos ratones, la recombinasa se activa sólo en las células del epitelio acinar mamario, haciendo posible eliminar la región codificante del gen de interés únicamente en las células epiteliales sin afectar otros tejidos. Esto permitió desarrollar varios KO condicionales para el estudio *in vivo* de la funcionalidad de diferentes genes en este órgano.

Los ratones KO condicionales para β 1-integrina mostraron que ésta subunidad es esencial para el desarrollo acinar, la capacidad secretora y la integridad epitelial de la glándula mamaria (Li et al., 2005). Los ratones mutantes (β 1fx/fx;Blg-Cre) tuvieron un desarrollo significativamente menor de las yemas terminales en comparación con los ratones control (β 1fx/fx) (Figura 7-A, B y C) y la capacidad secretora de dichas estructuras se vio seriamente comprometida. La pérdida de expresión de esta proteína en el tejido mamario provoca la disrupción del epitelio con cúmulos de células disociadas en la luz acinar de los ratones mutantes (Figura 7-B, C y E). Sorprendentemente, las células libres en los acinos no presentaron marcadores para apoptosis ya que mostraron ser negativas para caspasa-3 activada y sus núcleos son morfológicamente normales (Figura 7-E) (Naylor et al., 2005).

Asimismo, experimentos similares fueron realizados utilizando ratones KO condicionales para las subunidades α 3 y α 6-integrina. Tanto ratones nulos para α 3 como para α 6 mostraron un desarrollo y diferenciación glandular normal, sin pérdida de capacidad secretora en el individuo adulto (Klinowska et al., 2001). Mientras que en los ratones deficientes en α 6 se evidenció una pérdida de la expresión de β 4-integrina, la expresión de β 1 se mantuvo invariable en ambos mutantes.

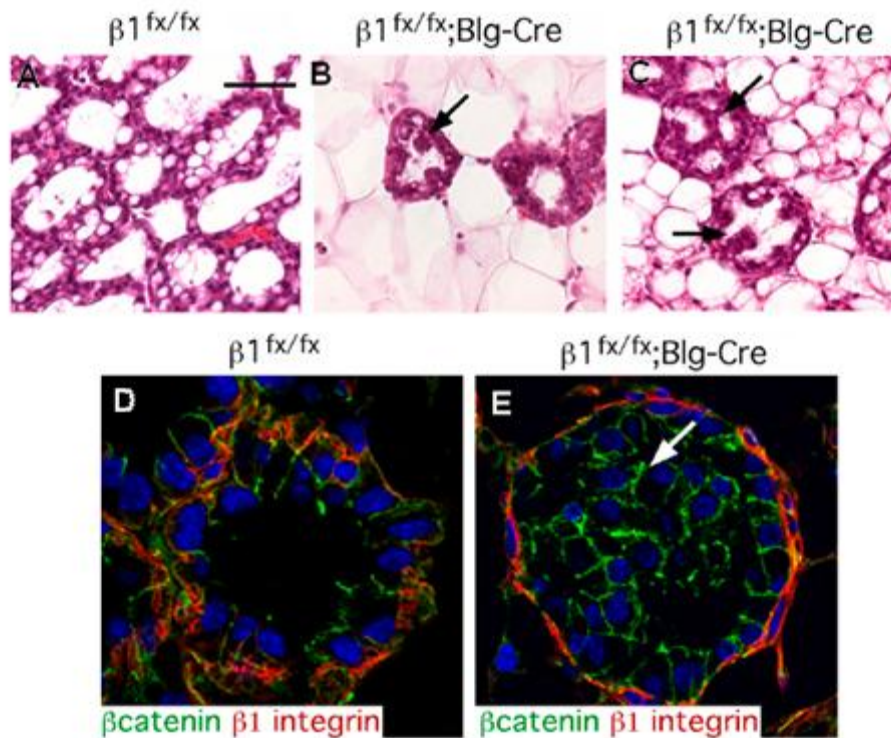


Figura 7. Efectos de la delección de $\beta 1$ -integrina sobre la histología de la glándula mamaria. La falta de expresión de $\beta 1$ -integrina en el epitelio acinar mamario (B, C y D) disminuye el tamaño de los TEB y la pérdida de anclaje de las células del epitelio (B y C, flechas negras). Las células que pierden adhesión a la matriz no presentan núcleos apoptóticos y conservan la adhesión célula-célula mediada por cadherinas (E, flecha blanca). Adaptado de Naylor, et al, 2006.

5.5 Cáncer de mama

5.5.1 Clasificación histológica

Como se discutió anteriormente, se denomina “cáncer” a un conjunto de enfermedades relacionadas cuya característica en común es la desregulación en el crecimiento de algún tipo celular, lo que genera una masa celular conocida como tumor. Cuando el tumor crece en el mismo órgano del cual surgió se denomina “*in situ*”, mientras que si las células son capaces de migrar a otros tejidos se denomina “invasivo”. Ahora, si

el origen de dichas células es la glándula mamaria, la enfermedad se denomina “cáncer de mama”, y ya que deriva de tejido epitelial, se le otorga el nombre de *carcinoma*. Existen dos subtipos básicos de cáncer de mama basados en el origen de dicha célula transformada: *Ductal* (proveniente las células de los ductos) o *Lobular* (de células de los acinos mamarios).

5.5.2 Clasificación por expresión de receptores hormonales

Los tumores mamarios pueden clasificarse según el tipo de receptores hormonales que expresen:

- **Receptor hormonal positivos:** si las células expresan receptor de estrógeno (ER, del inglés *Estrogen Receptor*) o receptor de progesterona (PR, del inglés *Progesterone Receptor*), pudiendo ser sensibles a terapias hormonales como el Tamoxifeno.
- **Receptor hormonal negativo:** Las células no expresan tanto ER como PR.
- **HER2-positivo:** Expresan altos niveles de la proteína ErbB2, esto puede ser tanto por multiplicación del gen o por desregulación en la expresión génica. Dichos tumores son sensibles a terapias con inhibidores de quinasas, como Lapatinib, o anticuerpos monoclonales bloqueantes como Trastuzumab o Pertuzumab. Se ha propuesto, además, que este puede subclasificarse en función a la expresión de ER (Vaz-Luis et al., 2013).
- **HER2-negativo:** Expresan niveles basales de ErbB2
- **Triple negativo:** No expresa ninguno de los receptores anteriormente nombrados.
- **Triple positivo:** Expresa tanto ER, como PR y ErbB2.

5.5.3 Clasificación por expresión génica

Los tumores mamarios, a su vez, pueden clasificarse según la expresión de diferentes marcadores moleculares:

- **Luminal A:** Es el subtipo más común, representa alrededor del 50% de los casos.

Son positivos para ER y/o PR y mantienen patrones de expresión génica similares a las células normales que recubren los conductos y las glándulas del seno. Los cánceres *luminal A* son de bajo grado, suelen crecer con bastante lentitud y tener buena prognosis (Eroles et al., 2012; Guiu et al., 2012; Sørlie et al., 2006; Yersal, 2014).

- **Luminal B:** Corresponde entre el 15 y 20% de los casos. Comparten muchas características con los *luminal A*, pero con un fenotipo más agresivo, diferenciándose del subtipo *luminal A* por una mayor expresión de genes relacionados con la proliferación celular (como v-MYB, GGH, LAPTMB4, etc.). A su vez, pueden subdividirse según los niveles de expresión de ErbB2 (Eroles et al., 2012; Guiu et al., 2012; Yersal, 2014).
- **HER2-positivos:** Corresponde entre el 15 y 20% de los tumores mamarios. Se caracterizan por alta expresión de ErbB2 (tanto por desregulación como por multiplicación del gen HER2/neu), pudiendo además ser positivos para ER. Sus células tienen alta tasa de proliferación por lo que los tumores tienden a crecer más rápidamente, ser altamente invasivos y, por ende, tener peor prognosis (Eroles et al., 2012; Guiu et al., 2012; Yersal, 2014).
- **Basal:** Corresponde alrededor del 10% de los casos estudiados. Estos son llamados también *triple negativo*, lo que significa que carecen de los receptores de estrógeno, progesterona y ErbB2³. Los patrones de expresión génica son similares a las células mioepiteliales y tienen peor prognosis que los *luminales*, con mayor frecuencia de mutaciones en p53 y BRCA1. (Eroles et al., 2012; Guiu et al., 2012).
- **Tipo mamario normal (normal breast-like):** Corresponde entre el 5 y el 10% de los tumores mamarios. Su clasificación como subtipo independiente está todavía en discusión, ya que se cree que pueden ser un artefacto dado por la contaminación con tejido mamario normal en los *microarrays* (Weigelt et al., 2010). Dada la baja expresión de ER, PR y ErbB2 son generalmente clasificados como *triple negativos*, pero no son considerados de tipo *basal* ya que no expresan CK5 y EGFR. Comparten patrones de expresión con el tejido adiposo y presentan una

³ Si bien se utilizan comúnmente como sinónimos, *basal* y *triple negativo* no representan exactamente la misma patología, con aproximadamente un 20 a 30% de discordancia entre diagnósticos. *Triple negativo* se define mediante la no expresión de ER, PR y ErbB2, mientras que el subtipo *basal* está definido por patrones de expresión más complejos (Yersal, 2014).

prognosis intermedia entre los tipos *luminales* y *basales* (Yersal, 2014).

- ***Claudina-baja (Claudin-low)***: Se caracteriza por la baja expresión de genes involucrados en las uniones estrechas e intercelulares como claudina-3, -4, -7 (de ahí su nombre), cingulina, ocludina, y E-cadherina. Además, sobrepresan un subgrupo de genes relacionados a la diferenciación mesenquimal, son altamente infiltrantes y están asociados a un fenotipo de célula madre tumoral. Este tipo de tumores son de mala prognosis (Eroles et al., 2012; Herschkowitz et al., 2007).

Hipótesis y Objetivos

Teniendo en cuenta la importancia que posee el microambiente tumoral en el comportamiento de las células tumorales y la evidencia existente respecto a la posible interacción entre proteínas asociadas a los complejos de adhesión focal, como β 1-integrina, y receptores tirosina-quinasa, nuestra hipótesis de trabajo propone que la MEC, como parte esencial del microambiente tumoral, modula el comportamiento de los receptores tirosina-quinasa de la familia de EGFR lo que alteraría el comportamiento de la célula tumoral, ya sea durante el proceso de proliferación o invasividad como en la respuesta a tratamientos oncológicos en células tumorales mamarias. Dada la función crucial que cumple ErbB2 tanto en el desarrollo y la función normal como en los procesos tumorigénicos asociados a la glándula mamaria, nos proponemos estudiar la interacción de este receptor con las moléculas que participan de la adhesión celular, tanto a nivel estructural como funcional.

De esta forma, los objetivos de esta tesis son:

Objetivo General:

- Estudiar el efecto de la matriz extracelular y sus receptores en el comportamiento de células tumorales mamarias, particularmente su interacción física y funcional con los receptores tirosina-quinasa de la familia de EGFR.

Objetivos Específicos:

- Estudiar el efecto de la adhesión celular sobre la respuesta a drogas antitumorales como Cucurbitacina I.
- Caracterizar la interacción física entre ErbB2 y proteínas de adhesión a la matriz extracelular como β 1-integrina y DDR1.
- Estudiar la modulación dada por la matriz extracelular de las vías de señalización activadas por HRG.

Materiales y Métodos

1. Técnicas de Cultivo y Líneas Celulares

1.1 Líneas celulares utilizadas

Línea	Origen	Características	Medio de Cultivo
MCF7	Adenocarcinoma mamario humano (Soule et al., 1973)	Epitelial, adherente, ER positivo, ErbB2 negativo (expresa niveles similares a una célula epitelial mamaria normal). Mantienen muchas características de las células epiteliales mamarias normales.	DMEM alta glucosa / F12
T47D	Carcinoma ductal mamario humano (Keydar et al., 1979)	Epitelial, adherente, Receptor de Estrógeno y Progesterona positivos, ErbB2 negativo.	RPMI
SKBR3	Adenocarcinoma mamario humano (Trempe, 1976)	Epitelial, adherente, ErbB2 positivo (sobreexpresa dicho receptor), sensibles a Trastuzumab.	DMEM alta glucosa / F12
HC11	Epitelial mamaria murina (Ball et al., 1988)	Epitelial, capaz de ser diferenciada y secretar proteínas de leche como β -lactoglobulina	RPMI + insulina 5 μ g/ml
HeLa	Adenocarcinoma de cervix humano	Epitelial adherente	DMEM alta glucosa

A4-HeLa	Línea estable generada a partir de la línea HeLa en el laboratorio del Dr. Thomas Jovin (Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen, Alemania)	Sobreexpresión estable de la proteína de fusión ErbB2-mYFP.	DMEM alta glucosa
CHO ACP-EGFR	Línea estable generada a partir de la línea CHO (Ovario de Hamster Chino) en el laboratorio del Dr. Thomas Jovin (Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen, Alemania)	Sobreexpresa la proteína de fusión ACP-EGFR.	DMEM alta glucosa
COS7	Riñón de mono verde (<i>Cercopithecus aethiops</i>) (Gluzman, 1981)	Adherentes de tipo fibroblásticas, fácilmente transfectable	DMEM alta glucosa
Tabla 1. Líneas celulares. Características principales y medios de cultivo utilizados en las líneas celulares utilizadas.			

1.2 Cultivo y propagación

Las líneas celulares utilizadas se mantuvieron rutinariamente en placas de 10 mm con medio de mantenimiento (dependiente de cada línea) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Internegocios), 26 mM NaHCO₃, 100UI/ml Penicilina y 100 µg/ml Estreptomycin. La incubación se realizó en una estufa gaseada a 37°C y en atmósfera con 5% CO₂ y 100% de humedad.

Los subcultivos de las células se realizan diluyendo a 1/5 el cultivo empleando una solución de Tripsina y 0.25% EDTA (Gibco/Invitrogen) en solución tampón o *buffer* fosfato

(PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH= 7,4) en el caso de HeLa, HC11 y T47D, mientras que MCF7 y SKBR3 se subcultivaron utilizando 10 mM EDTA-PBS como agente desagregante. Las células se aislaron por la acción de 1 ml de la solución sobre la monocapa durante 5 minutos a 37°C. La tripsina se neutraliza luego por el agregado de 9 ml de medio fresco suplementado con SFB y se disgrega mecánicamente la monocapa con ayuda de una pipeta automática.

1.3 Recubrimiento de superficies con laminina, colágeno o fibronectina

Para el recubrimiento o *coating* de superficies para microscopía se utilizaron cubreobjetos de vidrio tratados con HCl 6 M durante por lo menos 24 horas. Estos se lavaron repetidas veces con agua destilada y se mantuvieron en etanol 96% para luego esterilizar por flameo. En el caso del material plástico, este no recibió tratamiento previo de lavado.

Con el objetivo de cargar positivamente la superficie para mejorar la adhesión de las proteínas, se incubó con poli-D-lisina (PDL, Sigma) 40 µg/ml en *buffer* borato 0,1 M pH=8,5 durante 1 hora y se lavó la superficie con PBS 3 veces. Para el recubrimiento con laminina (Invitrogen) se incubaron los vidrios con 20 µg/ml de laminina en PBS. El *coating* con fibronectina se realizó incubando la superficie del vidrio con una solución de fibronectina (Invitrogen) 50 µg/ml en PBS. Para generar una superficie recubierta de colágeno se diluyó una solución 3 mg/ml de colágeno tipo I de cola de rata (Inamed Purecol) a una concentración final de 100 µg/ml en HCl 0,1 M. En todos los casos, la solución se incubó 2 horas a 37°C, se lavó con PBS por triplicado y se mantuvo en dicho *buffer* hasta el momento de su utilización.

1.4 Células madre tumorales de glioblastoma

Se han aislado una serie de líneas celulares a partir de biopsias de tumores de pacientes con glioblastoma. Dichas células son altamente indiferenciadas y muestran características de células madre tumorales o *cancer stem cells*, si bien su transcriptoma

no ha sido todavía resuelto completamente (Barrantes-Freer et al., 2013, 2015). A partir de estas células (denominadas parentales, spp) se generaron tumores en el cerebro de ratones inmunodeficientes o *nude*. Posteriormente, los ratones fueron sometidos a sesiones de radioterapia y nuevas líneas de células madre cancerígenas (*cancer stem cell lines*) fueron aisladas a partir de dichos tumores (líneas ahora denominadas splR). Se dispuso de tres pares de líneas celulares (tres parentales y sus respectivas líneas seleccionadas por radiación): 10, 1051 y 1080. Dichas células fueron cultivadas en botellas de baja adherencia y con un medio definido (Neurobasal Medium (Gifco) con 2% de suplemento B27 (Gifco), 10ng/ml bFGF (Peprotech), 20ng/ml EGF (Peprotech) y 0,1% BSA.

2. Plásmidos

2.1 Plásmidos utilizados

Nombre	Inserto	Vector	Comentarios	Fuente
β1-integrina-ECFP	β 1-integrina murina fusionada a ECFP (Clontech)	pcDNA3.1/ZEO (+)	La proteína fluorescente se encuentra en el extremo C-terminal (lado citoplasmático)	Ver 2.6
β1-integrina-ECFP-shRNA	β 1-integrina murina fusionada a ECFP (Clontech)	pcDNA3.1/ZEO (+)	Posee además un shRNA contra la region 3'UTR del mRNA de β 1-integrina murina para disminuir la expresión de la proteína endógena, aguas abajo de una secuencia IRES	Ver 2.7
α6-integrina	α 6-integrina humana	pRcCMV	-	Lab.del Dr. Arnoud Sonnenberg, Instituto Holandes para el Cancer, Amsterdam, Holanda

ErbB2-mYFP	ErbB2 fusionada a una variante monomérica de EYFP (Clontech)	pcDNA3	La proteína fluorescente se encuentra en el extremo C-terminal.	Lab. del Dr. Thomas Jovin, Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen, Alemania
ErbB2-TagRFP	ErbB2 fusionada a TagRFP (Evrogen)	pTagRFP-N1	La proteína fluorescente se encuentra en el extremo C-terminal.	Ver 2.8
ACP-ErbB2	ErbB2 fusionado a un <i>ACP-tag</i>	pcDNA3	El péptido añadido a la secuencia de la proteína se encuentra en el extremo N-terminal.	Lab. del Dr. Thomas Jovin, Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen, Alemania
DDR1a-ECFP	DDR1 (variante a) fusionada a ECFP y un MYC-tag	pcDNA3.1	La proteína fluorescente se encuentra en el extremo C-terminal (lado citoplasmático)	Lab. del Dr. Rafael Fridman, Depto. de patología, Facultad de Medicina, Universidad de Wayne State University, Detroit, Michigan, EE.UU.
ECFP-N1	Proteína fluorescente ECFP	ECFP-N1	Variante de EGFP con espectros de excitación y emisión desplazados al azul	Clontech

Tabla 2. Plásmidos. Origen y características de los plásmidos utilizados en esta tesis.

2.2 Generación de bacterias *Escherichia coli* ultracompetentes químicas por el método de Inoue

Para amplificar los ADN plasmídicos es necesaria la incorporación del plásmido en células de *Escherichia coli* DH5 α . Para esto, fue necesario generar células capaces de captar y amplificar dicho plásmido. En esta tesis se utilizó el método de Inoue (Sambrook y Russell, 2006) para la generación de bacterias ultracompetentes químicas. Este método

consiste en inocular 25ml de medio de cultivo LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, pH=7,0) e incubarlo durante 6 horas a 37°C. A continuación, 250 ml de medio de cultivo SOB (20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, pH=7,0) se inoculó con 500µl del cultivo previo y se mantuvo en agitación a 20°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0,55. Dicho cultivo se enfrió en baño de hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 2500 x g por 10 minutos. El precipitado fue resuspendido en 80ml de *buffer* de transformación de Inoue (55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 10mM PIPES, pH=6,7) frío y se repitió la centrifugación. El nuevo precipitado se resuspendió suavemente en 20ml del mismo *buffer* y se agregó 1,5 ml de DMSO. Las células se mantuvieron en hielo durante 10 minutos para ser luego alicuotadas, congeladas en Nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

2.3 Transformación de *Escherichia coli* por choque térmico

Para la transformación de *E. coli* se utilizaron 5µl de reacción de ligación o 100ng de plásmido purificado. Se incubó dicho producto con 100µL de bacterias ultracompetentes químicas de la cepa DH5α y se incubaron en hielo por 30 minutos. A continuación, se sometió a choque térmico en un *baño* a 42°C durante 90 segundos e inmediatamente se transfirieron a hielo por otros 7 minutos más. A cada tubo se le agregó 1 ml de medio de cultivo SOC (20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM glucosa, pH=7,0) y se incubó 1 hora a 37°C, para luego sembrar en placas de LB-agar (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl y 15 g/l agar-agar (Difco), pH=7) con 1 mg/ml de ampicilina (Ivax) a 37°C por 16 horas. Se picaron colonias en tubos de LB 1 mg/ml de ampicilina y se cultivaron durante 16 horas con agitación a 37°C y 200 r.p.m. La identidad de las colonias fue analizada por minipreparación del plásmido seguida de digestión con enzimas de restricción.

2.4 Digestión con enzimas de restricción

Para analizar los plásmidos empleados a lo largo de este trabajo de tesis se recurrió al corte con enzimas de restricción para su posterior análisis electroforético. Las digestiones fueron realizadas según el mismo protocolo básico y empleando un *buffer* adecuado en el cual la combinación de enzimas empleadas en la mezcla tenga una actividad igual o mayor al 75% según los datos del fabricante. Para un volumen final de 10 μ l de reacción, 0.5 a 1 μ g de ADN se incubó con 1ng/ μ l de albúmina bovina sérica (BSA) y 3 unidades enzimáticas de cada enzima de restricción en el *buffer* recomendado por el fabricante. Las muestras para ligación se incubaron aproximadamente 16 horas a 37°C.

2.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa permite separar fragmentos de ácidos nucleicos, ADN o ARN (ácido ribonucleico) mediante la aplicación de un campo eléctrico que induce el desplazamiento de las moléculas cargadas negativamente a través de matriz de gel de agarosa. Los fragmentos de ADN o ARN se separan en base a su relación masa/carga. En el caso de los plásmidos linealizados se emplean geles de 0,8 al 1.2% de agarosa. La solución se preparó en *buffer* 90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH=8 y se le agregó 1 μ l de bromuro de etidio (Invitrogen) para revelar la presencia de ácidos nucleicos en un transiluminador de luz ultravioleta.

2.6 Generación de β 1-integrina-ECFP

La secuencia codificante para β 1-integrina murina se amplificó por PCR a partir de ADN copia⁴ de la línea celular Neuro-2a⁵ utilizando como cebadores o *primers* los siguientes oligonucleótidos: primer directo, **GCGCTAGCGCTGCGAAAAGATGAATTT**; primer reverso, **CGGGATCCCCAGCTTGTCTCGTCGTCGAGCTCCTCCTCCTCTTTT**

⁴ ADN copia, o cDNA (del inglés *copy DNA*), es una cadena de ADN simple generada por retrotranscripción de ARN mensajero.

⁵ Neuro-2a: línea celular derivada de neuroblastoma de ratón Balb-C (Klebe y Ruddle, 1969).

CCCTCATACTTCGGATT. Dichos *primers* fueron diseñados de manera de agregar sitios de restricción en el producto de PCR para la enzima *Nhe I* en el extremo 5' y *BamH I* en el extremo 3' con el fin de utilizarlos en etapas posteriores de clonado (resaltados en negrita). Además, el primer reverso se diseño de forma que exista una cadena aminoacídica que separe la integrina de la proteína fluorescente, mejorando así la probabilidad de que el plegamiento de forma correcta (Parsons et al., 2008).

Para la reacción de PCR se utilizó 1 unidad de Pfu ADN polimerasa, 1 μ M de dNTPs (Promega), aproximadamente 10 ng de cDNA como templado y 5 μ M de cada *primer* en solución 20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0,1% Tritón X-100 y 0,1mg/ml de BSA, pH=8,8. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador utilizando el siguiente programa: 2 minutos iniciales de desnaturalización a 94°C seguidos de 30 ciclos de: 30 segundos a 94°C + 30 segundos de apareamiento o hibridación a 55°C + 5 minutos de elongación a 72°C culminando con 10 minutos adicionales a 72°C al finalizar el programa.

El producto de PCR se purificó con el kit *QIAquick PCR purification* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen correspondiente a 2 μ g del producto purificado y 500ng del vector pCDNA 3.1/ZEO(+) (Invitrogen) (cedido generosamente por el Dr. Thomas Jovin, Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen, Alemania), cuantificados por densitometría en gel de agarosa, fueron digeridos utilizando 1 U de *NheI* y 1 U de *EcoRI* (Promega) en *buffer* E (6 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 6 mM MgCl_2 , 1 mM DTT y 0,1 mg/ml de BSA, pH=7,5) (Promega) a 37°C durante toda la noche. La mañana siguiente, al vector se le adicionaron 10 U de Fosfatasa Alcalina de Camarón o SAP (por sus siglas en ingles *Shrimp Alkaline Phosphatase*) y se incubó por 1 hora adicional para remover los fosfatos de los extremos 5'. Las digestiones fueron corridas en un gel de 0,9% agarosa-TBE con bromuro de etidio, reveladas en un transiluminador UV y las bandas correspondientes al vector y al producto digeridos fueron cortadas y purificadas usando un kit comercial siguiendo las indicaciones del fabricante (*QIAquick gel extraction kit, Qiagen*). Finalmente, la concentración del producto y el vector digeridos se cuantificó por densitometría en gel de la misma forma que se describió anteriormente.

Para la reacción de ligación se utilizaron 30 ng del vector digerido y purificado los cuales se ligaron con 45 ng del producto de PCR cortado. Cada reacción se llevo a cabo en un *buffer* 30 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT y 1 mM ATP, pH=7,8

utilizándose 1 U de T4 ADN Ligasa (Promega) en 10 ml finales por reacción e incubándose a 14°C durante toda la noche. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias como fue descrito anteriormente (ver **Transformación de *Escherichia coli* por shock térmico**) y se realizaron minipreparaciones del ADN plasmídico para identificar clones positivos mediante digestión con las enzimas *Hind III* y *BamH I* de la misma manera que fue descrita anteriormente. Posteriormente los clones positivos fueron secuenciados y analizados utilizando el software Jaligner 1.0 (Ahmed Moustafa, JAligner: Open source Java implementation of Smith-Waterman).

Para generar la proteína de fusión a ECFP, se digirieron los plásmidos ECFP-N1 (Promega) y el conteniendo la secuencia codificante para β 1-integrina en el vector pcDNA3.1/ZEO(+) (anteriormente descrito) con *BamH I* y *Not I* (Promega) en *buffer* D (6 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 6 mM MgCl₂ y 0,1 mg/ml de BSA, pH=7,9) toda la noche a 37°C. El fragmento conteniendo la proteína fluorescente se separó por electroforesis en gel de agarosa y se purificó utilizando el kit QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Posteriormente, 30ng de β 1-integrina-pcDNA3.1/ZEO(+) se ligaron con la misma masa de la secuencia codificante para ECFP y se incubó con T4 ADN Ligasa (Promega) en las condiciones anteriormente descritas. El producto de ligación fue transformado en *E. coli* ultracompetentes químicas y las colonias chequeadas de la forma anteriormente descrita.

2.7 Subclonado del plásmido β 1-integrina-ECFP-shRNA

Dada la dificultad de expresar correctamente β 1-integrina en células debido a la alta expresión endógena de esta proteína, se decidió generar un plásmido en el cual, además del constructo anteriormente descrito, se expresara un shRNA que disminuyera selectivamente la expresión de la proteína endógena pero no la transfectada. Para esto se utilizó el shRNA que híbrida una secuencia en el extremo 3'UTR del ARN mensajero de β 1-integrina de ratón, diseñado por Naipauer y colaboradores (Naipauer et al., 2013), el cual se encuentra río abajo de un sitio de ingreso interno del ribosoma (IRES).

Dado esto, se digirió dicho plásmido con las enzimas *Pme I* y *Not I* (Promega) para liberar el fragmento que contiene al IRES y la secuencia codificante para el shRNA, para

clonarlo en el vector β 1-integrina-ECFP de la misma forma descrita anteriormente.

2.8 Generación de la construcción ErbB2-TagRFP

Se digirió el plásmido ErbB2-mYFP con las enzimas *Nhe* I y *Hin* DIII y se aisló el fragmento que contiene la secuencia codificante para ErbB2. Dicha secuencia se insertó en el plásmido TagRFP-N1 (Evrogen) de la misma forma que fue descrita anteriormente.

2.9 Purificación de plásmidos

2.9.1 Minipreparación de plásmidos

La obtención de ADN plasmídico a partir de bacterias de *E. coli* se realizó por el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001) (Sambrook & Russell, 2001). Se cosecharon 1.5ml de cultivo bacteriano fresco en medio Luria Bertani (LB) con el correspondiente antibiótico (crecido toda la noche a 37°C y con agitación) en un tubo eppendorf por centrifugación a 12000r.p.m. durante 1-2 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet de bacterias se resuspendió en 300 μ l de una solución 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH=8 (*buffer* de resuspensión). La lisis alcalina se realizó mediante el agregado de 300 μ l de una solución 0,2 M NaOH y 1% SDS (*buffer* de lisis) recientemente preparada. Se mezcló suavemente por inversión y se incubó a temperatura ambiente por no más de 5 minutos hasta observar la lisis por clareado de la suspensión bacteriana. Luego se neutralizó el lisado con 300 μ l de una solución 5 M de acetato de potasio y 11,5%v/v ácido acético (*buffer* de neutralización), enfriada en hielo, agitación suave por inversión e incubación en hielo por 5 minutos. La muestra se centrifugó a 12000r.p.m. por 5 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.

El DNA presente en sobrenadante del paso anterior se precipitó por agregado de 700 μ L de Isopropanol e incuó a -20°C durante media hora. Luego se centrifugó a 12000r.p.m. por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó y el pellet fue lavado con 750 μ L de etanol al 70% con posterior centrifugación a 12000r.p.m. por 15 minutos a 4°C.

El ADN precipitado se redisolvió en 50 μ l de agua bidestilada y se almacenó a -20°C . La concentración de ADN plasmídico purificado se determinó utilizando un Nanodrop Thermo por absorbancia a 260/280nm.

2.9.2 Maxipreparación de plásmidos

Se cultivaron bacterias transformadas con la construcción de interés en LB-agar-ampicilina. 200 μ L de dicho cultivo se utilizaron para inocular 500ml de LB con ampicilina 0,1mg/ml y se mantuvieron en agitación a 200r.p.m. y 37°C durante 16 horas. Se colectaron las bacterias por centrifugación y se resuspendieron con 10ml de *buffer* de resuspensión. Luego de que las bacterias fueron totalmente resuspendidas, se lisaron con 10ml de *buffer* de lisis agitando suavemente. Para la precipitación del ADN genómico, membranas y proteínas, se agregó 10ml de solución de renaturalización y se incubó 10 minutos en hielo. La muestra se centrifugó a 20000 x g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante fue trasvasado a otro recipiente y se repitió la centrifugación. El plásmido contenido en el sobrenadante se purificó con columnas de afinidad QIAGEN Tip 500 siguiendo las recomendaciones del fabricante (QIAGEN). El sobrenadante se colocó en la columna previamente equilibrada con 10ml de *buffer* QBT, se dejó escurrir por gravedad y se realizaron dos lavados con 30ml de *buffer* QC. El ADN se eluyó con 15ml de *buffer* QF y se recolectó en un tubo Falcon de 50ml conteniendo 11ml de isopropanol. La mezcla se incubó 16 horas a 4°C aumentar que el ADN plasmídico precipite y se centrifugó en frío a 5000 x g 60 minutos. El precipitado se lavó con 5ml de etanol 70% y se repitió la centrifugación. El precipitado se seco y fue resuspendido en *buffer* 10mM Tris, pH=8,5.

2.10 Transfección

Las células se transfectaron en placas de 24 pocillos a una densidad de entre 80 y 90%. Para la transfección se incubaron 2 μ L de Lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), en 25 μ L de OPTI-MEM (Gifco) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se le agregaron 0,8 μ g de plásmido disueltos en 25 μ L de OPTI-MEM

(Gifco) y se incubó la solución durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se agregó al cultivo celular que previamente había sido lavado dos veces con PBS e incubado en 200 µl de medio sin suero y sin antibiótico. Las células se mantuvieron en estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante cuatro a cinco horas, luego se removió el medio de transfección y se agregaron 2 ml del medio completo correspondiente. Las células se mantuvieron en cámara de cultivo durante 48 horas con el fin de alcanzar adecuados niveles de expresión proteica. Las cantidades mencionadas anteriormente fueron duplicadas para transfecciones en placas de 12 pocillos y quintuplicadas para placas de 60 mm.

3. Drogas e Inhibidores Farmacológicos

Droga	Fuente	Características	Conc. del stock	Solvente	Conc. de uso
LY294002	Sigma-Aldrich	Inhibidor de p13K	10 mM	Etanol	20 µM
CI1033	Sigma-Aldrich	Inhibidor del dominio quinasa de ErbB 1, 2 y 4	1 mM	DMSO	1 µM
Cucurbitacina I	Sigma-Aldrich	Inhibidor de la vía JAK/STAT3	10 mM	DMSO	variable

Tabla 3. Inhibidores farmacológicos. Características y concentraciones de stock y uso de los inhibidores farmacológicos utilizados.

4. Anticuerpos

Epítotope	Fuente	Nombre (código)	Isotipo	Blot	IF	IP
AKT total	Cell Signaling	C67E7	Conejo	1/1000	-	-
AKT fosforilado en Ser473	Cell Signaling	D9E	Conejo	1/1000	1/500	-
ErbB2 (región intracelular)	Millipore	OP15	Ratón	1/1000	1/200	-
ErbB2 (región extracelular)	Genetech	Trastuzumab	Humanizado	-	5 ng/ μ L	10 ng/ μ L
ErbB3 fosforilado en Tyr1289	Cell Signaling	21D3	Conejo	1/1000	-	-
ErbB3 total	Cell Signaling	1B2E	Conejo	1/1000	-	-
β1-integrina (humana, región extracelular)	Millipore	mAb1981	Ratón	-	1/200	-
β1-integrina (policlonal)	Cell Signalling	mAb9699 (D2E5)	Conejo	1/1000	-	-
α5-integrina (policlonal)	Cell Signaling	4705	Conejo	1/1000	-	-
αV-integrina (policlonal)	Cell Signaling	4711	Conejo	1/1000	-	-
α4-integrina (policlonal)	Cell Signalling	mAb8440 (D2E1)	Conejo	1/1000	-	-
β4-integrina (policlonal)	Cell Signaling	4707	Conejo	1/1000	-	-
β3-integrina (policlonal)	Cell Signaling	mAb13166 (D7X3P)	Conejo	1/1000	-	-
β5-integrina (policlonal)	Cell Signaling	mAb3629 (D24E5)	Conejo	1/1000	-	-
DDR1 (región intracelular)	Cell Signaling	D1G6	Conejo	1/1000	1/800	1/200
Control (inespecífico)	Cell Signaling	DA1E	Conejo	-	-	1/200
GFP	Santa Cruz	sc-8334	Conejo	1/1000	-	-
Actina	Santa Cruz	I-19	Cabra	1/5000	-	-
Zyxina	Abcam	ab58210	Conejo	-	1/500	-
β3-Tubulina	Cell Signaling	2146	Conejo	-	1/200	-

Tabla 4. Anticuerpos. Fuente y concentración de uso de los anticuerpos utilizados.

5. Protocolos de Bioquímica General

5.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS

La electroforesis de proteínas es una técnica que se emplea para analizar una mezcla de proteínas compleja o para caracterizar una proteína. Debido a que las proteínas poseen coeficientes electroforéticos muy variados y que dependen de la conformación así como del pH del *buffer* en el que se encuentra, es fundamental fijar algunas variables para poder realizar comparaciones. Se fija el pH del gel y de los *buffer* de corrida y se recurre a un agente desnaturizante que permite desplegar los péptidos de forma que la conformación de cada proteína no influya en la corrida. En la mayoría de los casos la electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó según el método glicina-SDS-PAGE (Laemmli, 1970) en el cual la desnaturización por calor y el posterior agregado de SDS permite dotar a las proteínas de una relación carga/masa prácticamente uniforme y, de este modo, se logra una separación en base al tamaño molecular de los péptidos. Las muestras son incubadas, en el *buffer* de muestra (2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 0.002% azul de bromfenol, 75 mM Tris HCl pH=6,8.), durante 10 minutos a 100°C antes de la siembra. El agregado de β-mercaptoetanol en el *buffer* de muestra permite romper los enlaces disulfuro. Junto con las muestras se siembra también un marcador de peso molecular como referencia.

Los geles de poliacrilamida están constituidos por dos fases: En la parte superior se ubica el gel concentrador (o *stacking*), de 3% Acrilamida: Bisacrilamida (29:1), 0,125 M de Tris-HCl pH=6,8, 0,1% de SDS, 0,05% de persulfato de amonio, 0,1% de TEMED, donde se siembran las muestras y cuya función es el “apilamiento” de las proteínas para el ingreso al gel separador (de corrida o *running*). Esto se produce dado que a pH=6,5 el SDS se encuentra mayormente protonado y la carga de las proteínas es baja, con lo que migran más lentamente. El gel separador, de concentración de Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) entre 6 y 12%, 0,375 M Tris-HCl pH=8,8, 0,1% de SDS, 0,03% de persulfato de amonio 0.03%, 0,07% de TEMED, es donde se resuelven las proteínas. Los geles se armaron en un equipo para celdas MiniProtean III (Bio-Rad) y se corrieron en *buffer* de corrida (25 mM de Tris-HCl pH= 8,8, 192 mM de glicina, 0.1% de SDS) entre 90 y 120 minutos a 100 V, hasta que el frente de corrida llega a pocos milímetros del borde inferior

del gel.

La tinción de los geles se realizó en una solución 0.1% Coomassie Blue R-250 en H₂O:metanol:acético (5:5:2). La decoloración se efectuó con una solución acuosa con 10% ácido acético 30% etanol. Los geles fueron digitalizados y analizados por densitometría con ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

5.2 Cuantificación de proteínas: método de Bradford

Esta es una técnica ampliamente difundida para cuantificar la presencia de proteínas en muestras biológicas basada en el cambio en el espectro de absorción que muestra el colorante *Coomassie Brilliant Blue G250* al unirse a los residuos de los aminoácidos en una proteína, el máximo de absorción pasa de 465nm a 595nm. Debido al tipo de interacción con dichos residuos, principalmente lisinas, muestra gran variación con la secuencia de las mismas cuando se analizan muestras puras y se prefiere su uso con muestras complejas.

La técnica se desarrolla preparando diluciones de las muestras a analizar y del patrón (solución de concentración conocida de BSA), para armar una curva de calibración. Cada muestra se lleva a 10 µl con H₂O bidestilada y se le agregan 300 µl de la solución de reacción (0.01% *Coomassie Brilliant Blue G250* en 8.5% Ácido fosfórico, 10% Etanol). El rango lineal de detección abarca una concentración en la muestra de 100 a 1500 µg/ml. El color tarda 5 minutos en desarrollarse y es estable por 90 minutos, y se utilizó un lector de placas para la determinación.

5.3 Western blot

El ensayo de Western blot se empleó para detectar la presencia de proteínas (o proteínas fosforiladas) mediante el uso de anticuerpos específicos. La técnica consiste en la transferencia e inmovilización de proteínas, separadas previamente por electroforesis en gel SDS-PAGE a un soporte sólido seguida de la detección inmunológica de la

proteína de interés.

La separación de las proteínas se realizó por SDS-PAGE y se empleó como referencia el marcador de peso molecular *Full Range Rainbow Protein Molecular Weight Marker* (GE Healthcare) que contiene bandas de proteínas precoloreadas (250 kDa Azul, 160 kDa Rojo, 105 kDa Verde, 75 kDa, Amarillo, 50 kDa Violeta, 35 kDa Azul, 30 kDa Naranja, 25 kDa Verde, 15 kDa Azul, 10 kDa Rojo). Las proteínas resueltas por el gel de SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de PVDF (GE healthcare) en una celda *immunoblot* para cubas MiniProtean III (Bio-Rad), empleándose un *buffer* de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20%v/v Metanol, pH=8,3). Se transfirió 90 minutos a 100V luego de los cual la membrana se bloqueó una hora a temperatura ambiente (RT) con 5% de BSA en *buffer* TBS (50 mM Tris-HCl pH=7,5, 15 0mM NaCl, pH=7,5) suplementado con Tween-20 0,05% (TBST).

Posteriormente, la membrana se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo, al día siguiente se lavó la membrana 5 veces con TBST y se incubó una hora a temperatura ambiente con una dilución 1/5000 del anticuerpo secundario conconjugado a peroxidasa de rábano (HRP, *HorseRadish Peroxidase*) (conejo o ratón: Genetech, cabra: Santa Cruz). El uso de anticuerpos secundarios unidos a HRP permite el uso de kits comerciales que acoplan la oxidación del ácido cumarínico y luminol con la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), como el *SuperSignal WestPico* (Pierce). Para el revelado, la membrana se lavó 5 veces con TBST, se montó en un *cassette* y se agregó cantidad suficiente de reactivo *SuperSignal WestPico* para cubrir totalmente la superficie de la membrana. Para la detección de la señal de quimioluminiscencia se utilizaron placas radiográficas (Agfa). La placa revelada se escaneo y las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando la distribución FIJI (Schindelin et al., 2012) del software libre ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

5.4 Dot blot

El ensayo de Dot blot se empleó como método rápido de *screening* de expresión de proteínas. Para esto, 500µg de proteína se sembraron en una membrana de PVDF (GE healthcare) la cual se secó en estufa a 37°C 15 minutos. Posteriormente, dichas

membranas se trataron de igual forma que las generadas por transferencia de un gel de SDS-PAGE (ver **Western blot**).

5.5 Co-inmunoprecipitación

Células creciendo en placas de 60 mm se lisaron con 300 μ L de *buffer* NP40 (50mM Tris pH=8, 150 mM NaCl, 1%NP40) con inhibidor de proteasas en frío. Para mejorar la extracción de proteínas de membrana, el homogenato se paso por una jeringa de 1 ml cinco veces y se centrifugó 1 minuto a 12000 r.p.m.. La concentración total de proteínas se cuantificó por el método de Bradford. 500 μ g del lisado se incubaron con 0,2 mg de proteína A conjugada a sefarosa (Sigma, resuspendida en *buffer* NP40) durante una hora (en agitación a 4°C) con el objetivo de evitar el pegado inespecífico de proteínas a la matriz durante la precipitación. La mezcla se centrifugó 5 minutos a 12000 r.p.m. y se tomó el sobrenadante.

Para la inmunoprecipitación, el sobrenadante se incubó con el anticuerpo en agitación a 4°C. Al día siguiente se añadió 0,2 mg de proteína A-sefarosa a un volumen final de 1 ml y se mantuvo en agitación a 4°C durante 2 horas. Posteriormente, se centrifugó 5 minutos a 12000 r.p.m., se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de *buffer*. Se repitió el lavado cinco veces, se añadieron 20 μ L de *buffer* de muestra 2x (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromfenol, 150 mM Tris HCl pH=6,8), se calentó 10 minutos a 100°C y se centrifugó 1 minuto a 12000 r.p.m. El sobrenadante se corrió en un gel de acrilamida 6% con el objetivo de poder resolver eficientemente ErbB2 de DDR1 y las proteínas se detectaron por Western blot.

6. Microscopía

6.1 Inmunofluorescencia

Las células fueron fijadas con 4% paraformaldehido (PFA) en PBS con 4% sacarosa durante 10 minutos. La muestra se trató posteriormente con 10mM Tris-PBS para bloquear cualquier grupo libre del PFA que pudiese reaccionar con un grupo amino

del anticuerpo (evitando así el reconocimiento inespecífico) y posteriormente se incubó una hora a 4°C con *buffer* de bloqueo (0.05% de Triton-X100 (Sigma) y 5% BSA en PBS). En el caso de las inmunofluorescencias contra epítopes fosforilados, al *buffer* de bloqueo se le agregaron inhibidores de fosfatasas.

La muestra fue luego incubada con el anticuerpo primario (en su dilución correspondiente en *buffer* de bloqueo) una hora a RT para, posteriormente, lavarse con PBS durante cinco minutos por quintuplicado. El mismo procedimiento se llevó a cabo para el anticuerpo secundario, utilizándose anticuerpos generados en cabra acoplados a un fluoróforo Alexa (Sigma-Aldrich) contra la inmunoglobulina correspondiente (ratón o conejo, Invitrogen). Las muestras fueron luego montadas en medio de montaje a base de Mowiol o *buffer* Rab-Tyrode (135 mM NaCl, 10mM KCl, 0,4 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5,6 mM Glucosa y 10mM HEPES, pH=7,2), según la técnica correspondiente.

6.2 Inmunofluorescencia en suspensión

En el caso de las muestras en suspensión, las células se colectaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugaron 5 minutos a 9000 r.p.m., para luego fijarse con 4% paraformaldehído (PFA) en PBS con 4% sacarosa durante 10 minutos en agitación. A continuación se repitió el procedimiento anteriormente descrito para las células adheridas colectando las células por centrifugación entre lavados. Una vez marcadas, se colocaron en una cámara LabTec de 8 pocillos recubierta con Poli-D-Lisina para mejorar la adhesión de las células que, por decantación, se depositaban en el fondo de la cámara evitando así el movimiento de la muestra durante la adquisición de imágenes.

6.3 Microscopía confocal

Para la adquisición de imágenes de microscopía confocal de barrido se utilizó un módulo de escaneo láser confocal Olympus FV1000 acoplado a un microscopio Olympus IX81 con un objetivo de inmersión en aceite Olympus 60x / 1,42NA UPLAN SAPO. Para la adquisición de cada canal se utilizó la siguiente configuración:

- DAPI: excitación, láser de diodo 405 nm; emisión: paso de banda (BP) 430 a 470 nm.
- ECFP: excitación, láser pulsátil 440 nm; emisión: paso de banda (BP) 470 a 490 nm.
- Alexa488/EGFP: excitación, láser de Ag línea 488 nm; emisión: paso de banda (BP) 505 a 525 nm.
- EYFP: excitación, láser de Ag línea 514 nm; emisión: BP 525-535 nm
- Alexa555/TagRFP: excitación, láser de He/Ne 543 nm; emisión: BP 560-620 nm.
- Alexa647: excitación, láser de diodo 633 nm; emisión: BP 650-750 nm.

Las imágenes fueron adquiridas utilizando el software provisto en el equipo y procesadas con la distribución FIJI (Schindelin et al., 2012) del software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) o MATLAB (MATLAB and Statistics Toolbox Release 2010a, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, EE.UU.).

6.4 Colocalización

Para estudiar cuantitativamente la localización relativa de dos proteínas por microscopía confocal, fue necesario el desarrollo de métodos estadísticos que permitan correlacionar la posición e intensidad de la señal en una imagen con otra. El coeficiente de correlación de Pearson (r) mide la relación lineal entre dos variables cuantitativas independientes:

$$r = \frac{\sum(S_{1i} - S_{1,\text{promedio}}) \times (S_{2i} - S_{2,\text{promedio}})}{\sqrt{\sum(S_{1i} - S_{1,\text{promedio}})^2 \times \sum(S_{2i} - S_{2,\text{promedio}})^2}}$$

Este coeficiente puede tomar valores entre 1 y -1. En el caso de una imagen de microscopía confocal, S_{1i} y S_{2i} corresponden al valor de un par de píxeles de dos canales (Bolte y Cordelieres, 2006; Manders et al., 1992; Zinchuk et al., 2007).

Si bien dicho coeficiente da una noción de la correlación entre la señal de un canal y otro, no da información espacial de que región aporta positiva o negativamente a dicho valor. Para esto, se realizaron mapas de Pearson, los cuales muestran el aporte relativo de cada pixel al valor de dicho coeficiente. De esta manera, es posible determinar si los pixels colocalizantes corresponden a una estructura o región de la célula determinada.

El coeficiente de superposición de Manders (Manders et al., 1993) se define de forma similar a r, pero si restar el valor promedio:

$$R = \frac{\sum (S_{1i} \times S_{2i})}{\sqrt{\sum (S_{1i}^2) \times \sum (S_{2i}^2)}}$$

Este coeficiente toma valores entre 0 y 1. La principal ventaja de este coeficiente es no verse afectado por diferencias en las señales relativas, dadas por diferencias en la marcación, fotoblanqueo o parámetros de adquisición.

Otros coeficientes usualmente utilizados para cuantificar el nivel de correlación entre píxeles de dos imágenes son los coeficientes M1 y M2 de Manders (Dunn et al., 2011; Manders et al., 1993). M1 corresponde a la fracción de píxeles de la imagen 1 que colocalizan con la imagen 2, mientras M2 corresponde a la fracción de píxeles de la imagen 2 que colocalizan con la imagen 1:

$$M1 = \frac{\sum S_{1,coloc}}{\sum S_{1i}}; M2 = \frac{\sum S_{2,coloc}}{\sum S_{2i}}$$

Para la cuantificación de colocalización y la generación de los mapas se utilizó el algoritmo GUI_Coloc 3.0, que trabaja sobre la plataforma MATLAB (MATLAB and Statistics Toolbox Release 2010a, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, EE.UU.), desarrollado por Villalta y colaboradores (Villalta et al., 2011).

6.5 Microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM)

La técnica de microscopía de superresolución denominada Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica (del inglés STochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM) (Coltharp y Xiao, 2012; Schermelleh et al., 2010), o también denominada Ground State Depletion Microscopy (GSDM), se basa en una propiedad de algunos fluoróforos que, al absorber un fotón, un electrón pasa a un estado conocido

como singulete excitado. Este electrón puede tanto decaer por fluorescencia a su estado fundamental como sufrir un proceso denominado “cruzamiento entre sistemas”, para pasar a un estado de triplete excitado. Dichos electrones en el estado de triplete excitado poseen una vida media mucho más alta que los electrones en estado de singulete. Además, mientras la molécula posee un electrón en estado de triplete excitado, esta no puede volver a excitarse y fluorescer, lo que se denomina “estado oscuro” de la molécula. Al excitar la muestra con altas potencias de láser, se induce el pasaje al estado de triplete de la mayor parte de las moléculas fluorescentes del campo, siendo solo algunas capaces de fluorescer. Es así como durante la adquisición la muestra es excitada con altas potencias de láser tomándose sucesivas imágenes cada una con un número finito de moléculas individuales emitiendo de forma aleatoria. Además, se utiliza un láser denominado *back pumping*, que induce el decaimiento de los electrones del estado de triplete excitado al estado fundamental lo que permite regular de esta forma la cantidad de moléculas que emiten simultáneamente. Es posible calcular con gran precisión la posición de la molécula emisora en cada imagen y, así, reconstruir una imagen de superresolución al sumar el total de las imágenes adquiridas y procesadas (entre 10 y 15 mil imágenes en total).

Para esto se utilizó un microscopio Olympus IX71 con un objetivo de inmersión en aceite Olympus 60x / 1,42NA UPLAN SAPO. La muestra fue preparada en vidrios de 18 mM y montadas en un soporte donde se colocó *buffer de Imaging* (50 mM Tris pH=8, 10 mM NaCl, 10% m/v de glucosa, ~1 µg/ml de Glucosa Oxidasa (Sigma) y ~0,5 µg/ml de Catalasa (Sigma). La muestra marcada con Alexa647 se excitó con un láser de diodo de 633 nm y un láser de *back pumping* de 405 nm. Se adquirieron 15000 imágenes con una cámara Andor DU-885-K-CS0-#VP mediante el software Andor IQ y se procesó con un software desarrollado por el grupo del Dr. Fernando Stefani (Barabas et al., sin publicar).

7. Ensayos de *Pull-down*

7.1 Síntesis y purificación de ACPwtS

Una familia de enzimas procariontes denominada fosfopanteteinil transferasas (PPTasa) catalizan la reacción de transesterificación entre la coenzima A y una serina ubicada dentro de una secuencia consenso específica de proteínas transportadoras de acilos de *Escherichia coli* (ACP, del inglés *Acyl Carrier Protein*) (George et al., 2004). Cada fosfopanteteinil transferasa reconoce una secuencia específica denominada *ACPtag*. La *Acil Carrier Protein wild type Synthase* (ACPwtS) de *E. coli* reconoce una familia de secuencias peptídicas con alta especificidad y transfiere un residuo de acilo en la serina mas cercana al extremo C-terminal (Zhou et al., 2007). La adición de una secuencia que codifique para dicho péptido en una proteína eucarionte permite la unión de cualquier producto conjugado con coenzima A (CoA) (Figura 8-A). Esta técnica se ha utilizado previamente para la marcación y visualización de moléculas de membrana (George et al., 2004; Jacquier et al., 2006) y para la adición de moléculas reporteras durante la síntesis de antibióticos (La Clair et al., 2004).

Bacterias *E. coli* (araBAD⁻ y araEFGH⁺) fueron transformadas por electroporación con el plásmido pBAD-ACPwtS (cedido por el Dr. Thomas. Jovin, Instituto Max Planck de Química Biofísica, Göttingen, Alemania), sembradas en LB-agar con ampicilina (0,1 mg/ml) e incubadas a 37°C por una noche. Este plásmido posee la región codificante de la ACPwtS a la cual se le adicionó un tag de seis histidinas, lo que permite su purificación por resinas de afinidad con Ni²⁺, y que se encuentra bajo control de un promotor de expresión procarionte inducible por L-arabinosa.

Al día siguiente se picó una colonia en un tubo conteniendo 3ml de medio 2xYT (16 g/l triptona, 10 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl, pH=7) y se incubó a 37°C una noche. 400µl de dicho cultivo sirvieron de inóculo para 200ml de medio 2xYT con ampicilina (0,1 mg/ml), el cual fue cultivado a 37°C y 200r.p.m. hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0,8. En ese momento se estimuló la expresión del gen mediante el agregado de L-arabinosa a una concentración final de 0,1% m/v y se incubó a 30°C ON.

Al día siguiente, se centrifugaron las células durante 15 minutos a 5400 r.p.m. y 4 °C. El pellet fue resuspendido en 50ml de *buffer* de lisis (10 mM Imidazol, 250 mM NaCl,

50mM, NaH₂PO₄ e inhibidor de proteasas, pH=8, 10 ml por gramo de pellet) y se sonicó tres veces durante 15 segundos para lisar las bacterias. Se agregó 1% de Triton X-100, se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugo a 9500r.p.m. a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante recolectado de la centrifugación fue dividido en dos tubos Falcon de 50 ml e incubado con 2 ml de la resina Ni-NTA (QIAGEN) en hielo durante 1 hora. La resina luego se colectó por centrifugación a 3500 r.p.m., se descarto el sobrenadante y el pellet fue transferido a un tubo eppendorf de 1,5 ml. A continuación, se procedió a lavar la resina 10 veces con 1 ml de *buffer* de lavado I (500 mM NaCl, 20 mM Imidazol y 50 mM NaH₂PO₄, pH=8) y subsecuentemente 5 veces con *buffer* de lavado II (100 mM NaCl, 20 mM imidazol, 50 mM NaH₂PO₄, pH=8), centrifugándose a 10000 r.p.m. cada vez. Finalmente, se eluyó la enzima de la resina realizando 10 lavados de 500 µL con *buffer* de elución (100 mM NaCl, 400 mM imidazol y 20% glicerol, pH=8). Al eluato se le agregó dithiothreitol (DTT) a una concentración final de 1mM y se lo congeló en nitrógeno líquido, para luego almacenarse en freezer de -80°C.

Para la cuantificación, se tomaron 20 µL de cada fracción eluída y se corrió en un gel de SDS-PAGE al 10% con el objetivo de cuantificar la cantidad de proteína en la muestra, se sembraron patrones de BSA de 10, 1 y 0,1 µg. El gel fue teñido con Coomassie Brilliant Blue G-250 y se digitalizó utilizando un escáner CanoScan Lide 100 (Canon) y se cuantificaron las bandas correspondientes a los eluatos por densitometría utilizando el programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). La actividad de la enzima se analizó por microscopía de fluorescencia para lo que se utilizó como control positivo células CHO expresando de forma estable la construcción ACP-EGFR. Las células, plaqueadas en vidrios de 10mm, se marcaron con 1 µM de biotina-CoA (sintetizado por J.Giudice (Giudice et al., 2013)) y 10ng/µL de ACPwtS en *buffer* Rab-Tyrode a 37°C durante 1 hora.

Para la detección del receptor biotinilado se utilizaron puntos cuánticos o *Quantum dots* (QD). Los QD son nanopartículas semiconductoras fluorescentes que tienen la característica de, a pesar de excitarse en el rango del UV, emiten en una banda discreta en el rango de luz visible, cuya longitud de onda es directamente dependiente del tamaño de dicha partícula (Barroso, 2011; Michalet et al., 2005). Estas partículas tienen la ventaja de ser sumamente brillantes, lo que facilita su detección en el microscopio de fluorescencia. La superficie de los QD puede ser químicamente modificada para darle

especificidad mediante la unión a un anticuerpo específico para una determinada proteína de interés, o estreptavidina.

Las células marcadas con ACPwtS y biotina-CoA se lavaron 5 veces con *buffer* Rab-Tyrode y se marcaron con QD-estreptavidina 1nM durante 10 minutos. Las muestras se lavaron 5 veces con *buffer* Rab-Tyrode y se montaron en el mismo *buffer* para la adquisición de imágenes (Figura 8-B).

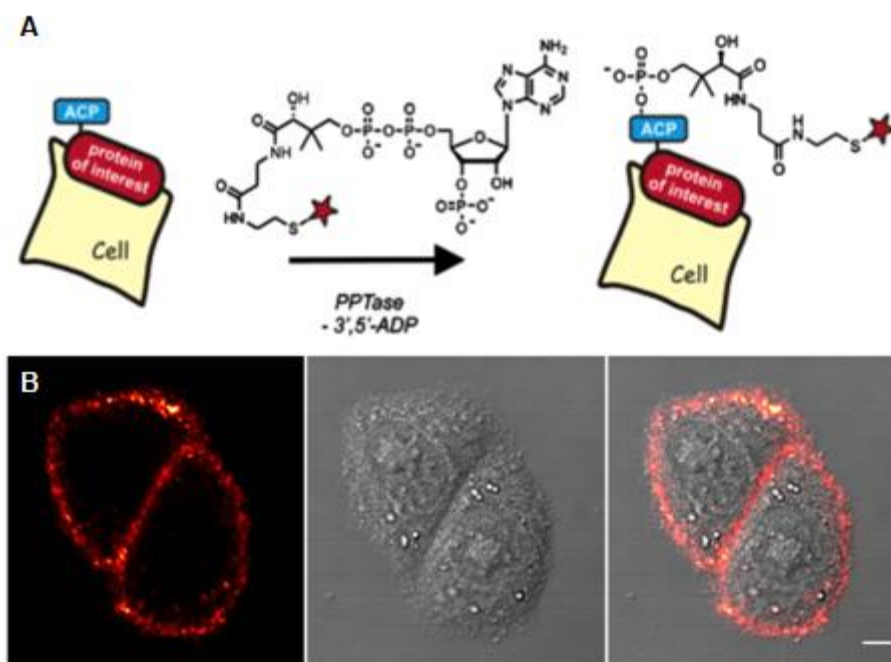


Figura 8. Puesta a punto de la marcación con biotina-CoA y ACPwtS.

A- La enzima ACP-Sintasa cataliza la reacción de trans-esterificación entre el sustrato conjugado a Coenzima-A y una serina en la secuencia consenso.

B- Células CHO que expresan establemente la construcción ACP-EGFR fueron exitosamente marcadas con biotina-CoA y QDs650-streptavidina utilizando la enzima purificada en *E. coli*. Puede observarse que la señal de QDs proviene únicamente de la membrana externa de la célula. Barra de escala: 10 μ m.

7.2 Ensayos de pull-down con ACP-ErbB2

Células COS-7 transfectadas en una placa de 60mM se lavaron con *buffer* Rab-Tyrode y se marcaron con 1 μ M de biotina-CoA y 10 ng/ μ L de ACPwtS en *buffer* Rab-Tyrode a 37°C durante 2 horas.

La biotina, también llamada vitamina B7, vitamina H o coenzima R, es una pequeña molécula de 244,31 Da capaz de unirse muy fuertemente (aunque no de forma covalente) a la avidina⁶. La avidina es una proteína tetramérica que posee cuatro sitios de unión a biotina. La unión entre la biotina y la avidina es una de las uniones no covalentes más fuertes en la naturaleza, con una constante de disociación de 10^{15} M^{-1} (Diamandis y Christopoulos, 1991). Esta unión, de entre 3 y 6 órdenes de magnitud mayor que la unión antígeno-anticuerpo, es resistente a cambios en el pH, la fuerza iónica y la temperatura, haciéndola inalterable en condiciones de trabajo fisiológicas. La alta especificidad y estabilidad de esta unión resulta de gran utilidad al momento de desarrollar técnicas de aplicación biotecnológica. La utilización de biotina-CoA como sustrato para la ACPwtS permitirá generar un derivado biotinilado de ACP-ErbB2 lo cual genera, a su vez, un sitio de unión para una molécula de avidina.

Las células se lavaron 5 veces con *buffer* Rab-Tyrode, se lisaron con 500 μ L de *buffer* NP40 con inhibidor de proteasas en frío y dicho homogenato se centrifugó 5 minutos a 12000 r.p.m.. Al sobrenadante se añadió 0,2 mg de streptavidina-sefarosa y se incubó toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó 5 minutos a 12000 r.p.m., se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de *buffer*. Se repitió el lavado cinco veces, se añadieron 20 μ L de *buffer* de muestra 2x y se corrió en un gel de acrilamida 10%.

⁶ En este texto se hace referencia indiferentemente a "avidina" como "streptavidina". La diferencia subyace en que mientras la avidina es de origen eucarionte, extrayéndose de huevos de aves, reptiles y anfibios, la streptavidina es producida por la bacteria *Streptomyces Avidinii*. Aunque existen leves diferencias entre una proteína y la otra, la afinidad por la biotina es del mismo orden de magnitud.

8. Bioinformática

Para el análisis de coexpresión de las proteínas estudiadas en este trabajo se utilizó la base de datos *online* CoexpressDB (coxpresdb.jp) (Kinoshita, 2009; Obayashi et al., 2008; Okamura et al., 2014).

9. Ensayos de Viabilidad

Con el objetivo de evaluar el efecto de Cucurbitacina I en las células MCF7, se plaquearon 10^5 células en placas de 96 pocillos (Greiner) y se mantuvieron en medio completo por 24 horas. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de la droga durante 2, 12, 18 y 24 horas en 100 μ L de DMEM-F12. Posteriormente, se agregó 100 μ L de MTT 2mg/ml (Promega) y se incubó a 37°C durante 2 horas. El MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio) es una sal de formazan que es capaz de ser reducida por enzimas dependientes de NADH en la célula, produciendo un precipitado violeta (Levitz y Diamond, 1985). De esta forma, al ser la cantidad de precipitado dependiente de la concentración de NADH, es utilizado para evaluar la función mitocondrial (Gerlier y Thomasset, 1986). Luego de la incubación, se eliminó el sobrenadante y el reactivo precipitado se redisolvió con 200 μ L de DMSO y se midió la absorbancia a 570 nm, sustrayéndose la señal de *background* a 630 nm.

Para estudiar el efecto de Cucurbitacin I en las líneas derivadas de glioma se realizaron curvas de toxicidad incubando 2×10^3 células (en 200 μ L de volumen final) en placas de 96 pocillos para quimioluminiscencia (Greiner) a diferentes concentraciones de la droga entre 1 y 6 días. Finalizado el tratamiento se determinó la cantidad de ATP por luminiscencia utilizando el kit *CellTiter-Glo* (Promega) y se midió la señal en un lector de placa.

Con el fin de determinar si esta droga induce muerte celular en dichas células, 1080spIR fueron cultivadas en camaras LabTec de 8 pocillos en medio suplementado con 5% de suero en presencia de Cucurbitacina I de 0, 1, 3 y 5 días. Las células apoptóticas fueron marcadas utilizando AnexinaV-Cy3 (Bossy-Wetzel y Green, 2000) mediante el kit *Annexin V-Cy3 Apoptosis Detection* (Abcam).

De la misma forma, se repitió el procedimiento marcando las células con yoduro de propidio (Sigma) y diaceto-fluoresceína (Sigma) con el objetivo de estudiar la permeabilidad de la membrana. Células 1080splR fueron cultivadas en medio suplementado con 5% de suero en presencia de Cucurbitacina I de 0, 1, 3 y 5 días. Las células se marcaron con 500 nM de yoduro de propidio y 5 µg/ml de diaceto-fluoresceína durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron por quintuplicado con *buffer* Rab-Tyrode y se analizaron por microscopía de fluorescencia.

10. Ensayo de Ciclo Celular

Para estudiar las poblaciones de células en diferentes estadios del ciclo celular se cuantificó el contenido de ADN por citometría de flujo utilizando la sonda Hoechst 33342 (Arndt-Jovin y Jovin, 1977), 10^6 células se incubaron con la 100 nm de Cucurbitacina I durante 0, 1, 2 y 3 días. Las células se incubaron con Tripsina durante 5 minutos a 37°C, se disgregaron los esferoides con una pipeta automática de 200 µL y se fijaron con PFA 4% durante 5 minutos. Se agregó Tris pH=7,4 hasta una concentración final de 10 mM para evitar el agregado de las células entre sí. Estas se centrifugaron 1 minuto a 12000 r.p.m. y se resuspendieron en 1ml de PBS 0,5% BSA. Para la tinción del ADN se agregó Hoechst 33342 a concentración final de 10 µM. Dado que esta sonda solo brilla al intercalarse en el ADN, no fue necesario el lavado posterior a la marcación. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Aria II (BD) excitando con un láser de 405nm.

11. Análisis de Datos

Los experimentos se realizaron cómo mínimo por triplicado en forma independiente. Los resultados se expresan como las medias con sus respectivos errores estándar de la media (ESM). Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 5 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Las diferencias entre las mismas son analizadas estadísticamente

empleando el test “*t*” de Student, en el caso de diferencias entre dos grupos, o un ANOVA y test Tukey para experimentos con más de dos grupos experimentales.

Capítulo 1:

Caracterización de Distintos Modelos de Células Tumoraes para el Estudio Funcional de la Adhesión Celular

Objetivo general

- Caracterizar diferentes líneas celulares como modelos de estudio.

Objetivos específicos

- Caracterizar las células tumorales mamarias MCF7, SKBR3 y T47D analizando los niveles de expresión de:
 - Receptores de la familia de ErbB: ErbB2.
 - Moléculas de adhesión a matriz extracelular: integrinas y DDR1.
- Diseñar y poner a punto estrategias para la sobreexpresión de proteínas de fusión de ErbB2 y β 1-integrina.
- Estudiar la morfología, el comportamiento adhesivo y la expresión de integrinas en células madre tumorales de glioblastoma.

1. Modelos Celulares en el Estudio del Cáncer

Desde hace más de un siglo los científicos han cultivado células de mamífero *in vitro*. El trabajo con células aisladas permite estudiar la fisiología celular manteniendo el contexto genético propio de una célula de mamífero (lo que no es posible lograr estudiando eucariotas unicelulares). Además, a diferencia del trabajo con animales de laboratorio, el uso de células en cultivo permite realizar experimentos con alto control de las variables ambientales, a un (relativo) bajo costo y tiempos cortos.

El primer cultivo de tejidos fue realizado por Wilhelm Roux (Alemania, 1850-1924) en 1885 al remover la placa neural de un embrión de pollo y mantenerla en una solución

salina durante días. Muchos investigadores lograron cultivar células o tejidos en cultivo durante un determinado período de tiempo, pero recién aproximadamente 50 años más tarde, en 1943, Wilton Earle (EE.UU., 1901-1980) logró obtener la primera línea celular inmortalizada a partir de tejido subcutáneo de ratón (Earle et al., 1943).

En 1951, George Otto Gey (EE.UU., 1899-1970), en la escuela de medicina de la universidad Johns Hopkins, EEUU, logró por primera vez obtener una línea celular humana. Dichas células se aislaron de una biopsia de adenocarcinoma cérvico-uterino proveniente de una paciente afroamericana, Henrietta Lacks (EE.UU., 1920-1951), de quién derivó el nombre de la línea: HeLa. Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada y permitió desde estudiar procesos fisiológicos celulares hasta desarrollar la vacuna contra la poliomelitis (Masters, 2002; Skloot, 2010). A partir de la segunda mitad del siglo XX se han obtenido numerosas líneas celulares a partir de diferentes tejidos, tanto normales como tumorales. Las líneas celulares tumorales son una herramienta poderosa en el estudio del cáncer. Su uso permitió caracterizar el efecto de la desregulación en la expresión génica y la mutación de proteínas involucradas en vías de señalización así como el estudio de moléculas con potencial efecto antitumoral (Ferreira et al., 2013; Gazdar et al., 2010).

1.1 Células MCF7

Numerosas líneas celulares han sido desarrolladas para estudiar el cáncer de mama. Una de las primeras y más utilizadas es la denominada MCF7, acrónimo para "*Michigan Cancer Foundation*"-7, Instituto en la ciudad de Detroit, EE.UU., donde fue aislada (Soule et al., 1973). Esta línea fue obtenida en 1973 de una paciente de 69 años diagnosticada con un adenocarcinoma maligno con efusión pleural. Las células muestran características típicas de las células epiteliales mamarias tales como procesar estrógeno a través de receptores específicos en el citoplasma. Asimismo, a diferencia de la línea epitelial mamaria normal MCF10a que forma estructuras pseudo-acinares al ser cultivadas en matrices tridimensionales (como matrigel), las MCF7 forman masas densas de células mostrando que la polarización típica de las células epiteliales no se encuentra conservada (Kenny et al., 2007).

1.2 Células T47D

Otra línea tumoral mamaria comúnmente utilizada es la denominada T47D. Esta línea fue aislada por lafa Keydar (Romania, 1923) a partir de la efusión pleural de una mujer de 54 años con un carcinoma ductal invasivo (Keydar et al., 1979). Las células tienden a crecer formando cúmulos gracias a la que tienen fuertes uniones célula-célula. Además, al igual que las MCF7, son ER y PR positivas, expresando niveles bajos para ErbB2

1.3 Células SKBR3

Otra línea comúnmente utilizada es la SKBR3. Esta línea, también denominada AU565, fue aislada en el Memorial Sloan–Kettering Cancer Center, EE.UU., en el año 1970. Las células SKBR3 derivan de la efusión pleural de una paciente de 43 años tratada con radiación, esteroides, citoxano y 5-fluorouracilo (Trempe, 1976). Esta línea posee una morfología epitelial al ser cultivada en monocapa y desarrolla estructuras desorganizadas en cultivos tridimensionales (Kenny et al., 2007). Además, tienen la particularidad de sobreexpresar el producto del gen HER2/c-erb-2 (ErbB2) y ser sensibles al tratamiento con el anticuerpo bloqueante humanizado Trastuzumab (Tseng et al., 2006), así como otros tratamientos dirigidos a dicho receptor y sus vías de señalización.

1.4 Estudio de la expresión de ErbB2 en líneas tumorales mamarias

Como se discutió en la sección 5.3 de la introducción, ErbB2 es un receptor tirosina-quinasa que se encuentra desregulado en numerosos procesos tumorales. Particularmente, este receptor cumple un papel crucial en la evolución del cáncer de mama, tanto que la sola sobreexpresión de ErbB2, pero no de otros proto-oncogenes, es capaz de inducir la transformación de un cultivo de células epiteliales mamarias normales (Leung y Brugge, 2012). Dada la relevancia de dicho receptor en esta patología, su dinámica de activación, regulación e interactómica han sido objeto de estudio durante los últimos 20 años.

Con el fin de estudiar la dinámica de activación de ErbB2 en células epiteliales mamarias, fue necesario caracterizar la expresión de dicho receptor. Tanto las líneas tumorales mamarias MCF7 como T47D expresan niveles muy bajos de ErbB2 (Figura 9), los cuales son prácticamente indetectables por Western blot. En contraposición, las células SKBR3 tienen altos niveles de expresión de ErbB2. Como control se utilizaron células HeLa que sobreexpresan de forma estable la proteína de fusión ErbB2-mYFP (Figura 9).

Por su parte, los niveles de expresión de ErbB3 son similares en las líneas MCF7 y SKBR3 (Figuras 10 y 11). Sin embargo, dada su baja actividad tirosina quinasa, ErbB3 necesita interactuar con otros miembros de su familia, en particular ErbB2, para activarse luego de la unión de su ligando HRG (Sliwkowski et al., 1994). De esta forma, el bloqueo del dominio quinasa de todos los miembros de la familia de ErbB (1, 2 y 4) con la droga CI1033 en células MCF7 bloquea completamente la fosforilación de ErbB3 y Akt (Figura 10-B). Además, cuando se bloquea selectivamente la interacción con ErbB2 utilizando el anticuerpo monoclonal 2C4 (Jackson, 2004) se observa el mismo efecto (Figura 10-C), lo que demuestra que, si bien los niveles de ErbB2 son bajos (no detectables por Western blot, Figura 9) en la línea celular MCF7, este receptor se expresa en bajas cantidades y es fundamental para la señalización por HRG a través de ErbB3.

Se ha descrito que la amplificación de ErbB2 induce la activación constitutiva de dicho receptor, lo que lleva aparejada la fosforilación de EGFR y la consecuente activación de las vías de señalización aguas abajo (Worthylake et al., 1999). Dicha activación constitutiva es la responsable del efecto transformante de la sobreexpresión de ErbB2 (Leung y Brugge, 2012). La línea SKBR3, al expresar grandes cantidades de ErbB2, muestra ni-

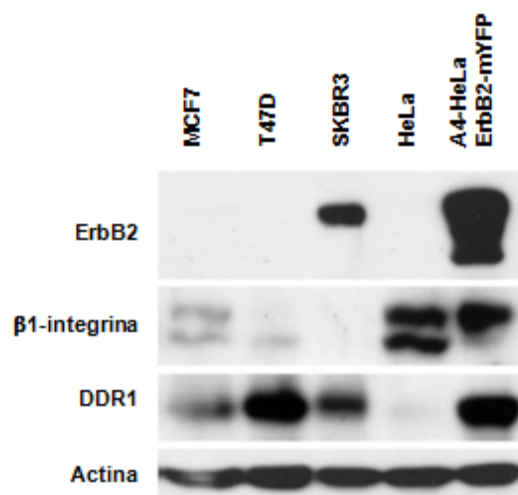


Figura 9. Expresión de ErbB2, DDR1 y β1-integrina. Western blot de las líneas MCF7, T47D, SKBR3, HeLa (parental) y A4-HeLa (línea estable que sobreexpresa la proteína de fusión ErbB2-mYFP).

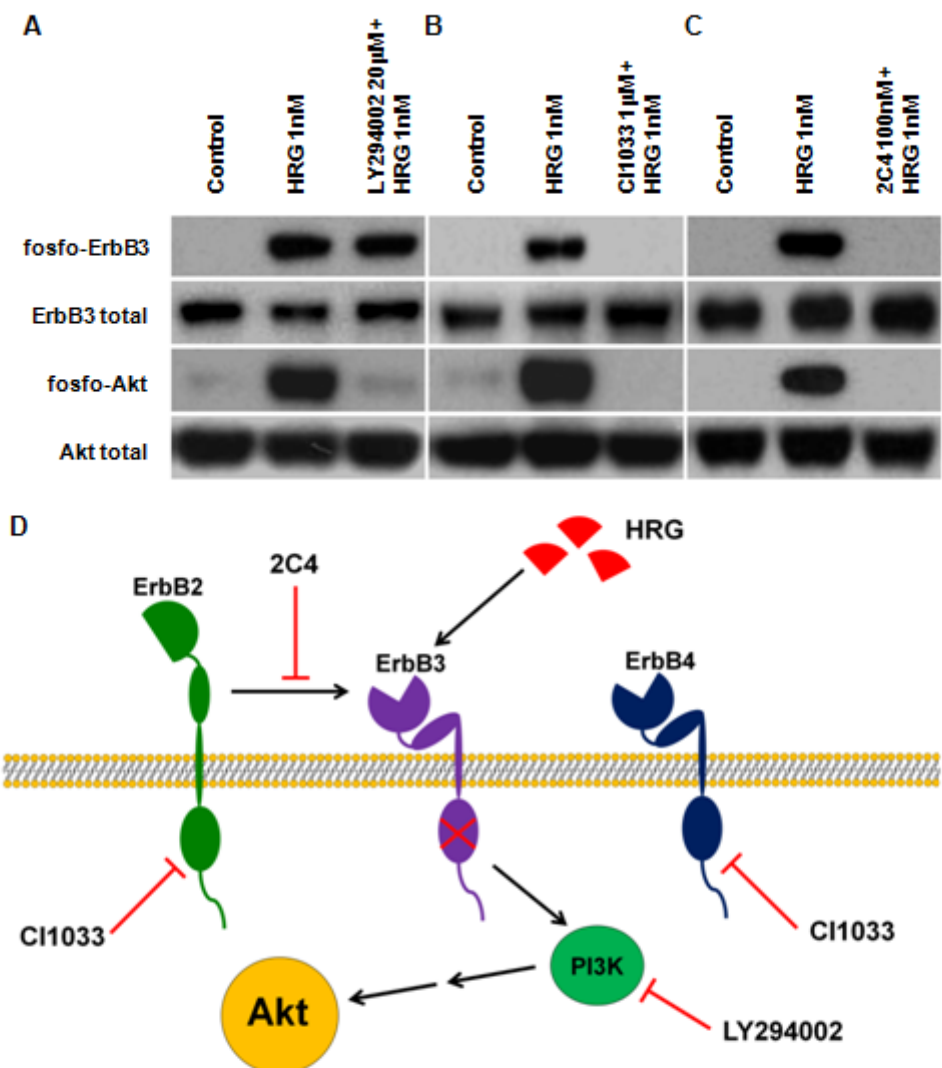


Figura 10. Vía de activación de Akt inducida por HRG en células MCF7.
A- Células MCF7 tratadas con 20μM de LY294002 (inhibidor de PI3K) durante 3 horas fueron estimuladas con 1nM HRG durante 5 minutos. **B-** Células tratadas con 1μM de CI1033, que inhibe de forma irreversible el dominio quinasa de todos los miembros de la familia de ErbB. **C-** Células MCF7 incubadas con 100nM del anticuerpo monoclonal 2C4 previas a la estimulación. Este anticuerpo se une al dominio de dimerización de ErbB2 lo que impide la interacción tanto con EGFR como con ErbB3 y ErbB4. **D-** Esquema de la fosforilación de Akt mediada por HRG en células MCF7. Luego de la unión a HRG ErbB3 dimeriza con ErbB2 e induce la fosforilación de Akt mediada por PI3K. Si bien ErbB4 podría unir HRG, este no participaría en la vía dado que al tener un dominio quinasa activo no necesitaría de la interacción con ErbB2 para su actividad, la cual no se vería afectada por el tratamiento con 2C4.

veles de fosforilación de ErbB3 y Akt constitutivos que no se ven afectados por la estimulación con HRG. En contraste, la fosforilación de ErbB3 y Akt inducida por HRG en la línea MCF7 muestra un comportamiento del tipo dosis-respuesta (Figura 11) lo que permite analizar las dinámicas de activación y regulación de dicha vía en esta línea celular.

El estudio de receptores de membrana por microscopia de fluorescencia requiere de su marcación con una sonda fluorescente, ya sea utilizando anticuerpos primarios o secundarios marcados (por inmunofluorescencia indirecta), marcación química de un ligando o la generación de una proteína de fusión con VFP. Dados los bajos niveles de expresión de ErbB2 en células MCF7 y la ausencia de ligando para este receptor no es posible marcarlo utilizando anticuerpos o ligandos unidos a sondas fluorescentes. Por lo tanto, para estudiar la localización de ErbB2 en la membrana de células MCF7, se decidió transfectar estas células con la construcción ErbB2-TagRFP. Se estudió la correcta expresión de dicha proteína de fusión en la membrana de células MCF7 marcando *in vivo* las células transfectadas con el anticuerpo monoclonal humanizado Trastuzumab unido al fluoróforo Alexa488. Dado que el anticuerpo no es permeable a la membrana plasmática,

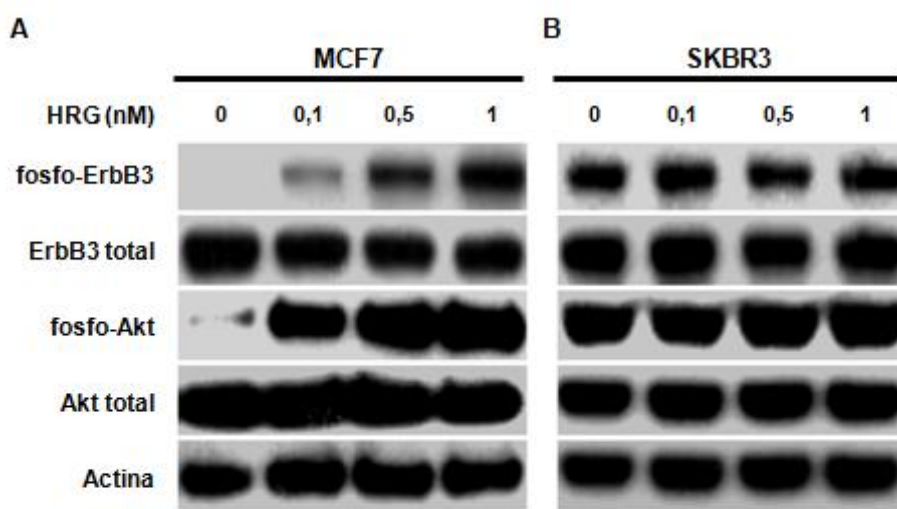


Figura 11. Activación de Akt y ErbB3 inducida por HRG.
A- Células MCF7 estimuladas con 0,1, 0,5 y 1nM de HRG durante 5 minutos a 37°C. **B-** Células SKBR3 estimuladas con HRG. Debido a los altos niveles de ErbB2, dicha línea celular no responde a la estimulación con HRG en una relación dosis-respuesta.

la sonda Trastuzumab-Alexa488 solo marcará el receptor que se encuentra expuesto al espacio extracelular el cual fue correctamente procesado y dirigido a la membrana. Además, tanto la señal dada por TagRFP (fusionada a ErbB2) como la sonda Trastuzumab-Alexa488 colocalizan con la señal dada por la inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo monoclonal contra la región intracelular de ErbB2 OP15 (Millipore) (Figura 12). Dada la correcta expresión y procesamiento de la proteína de fusión ErbB2-TagRFP, se utilizó dicha construcción para el estudio de ErbB2 en MCF7 por microscopía de fluorescencia.

1.5 Expresión de moléculas de adhesión en líneas tumorales mamarias

Las células epiteliales necesitan anclarse a un sustrato para poder sobrevivir. Dichas células, al perder adhesión, entran en un programa de muerte celular programada

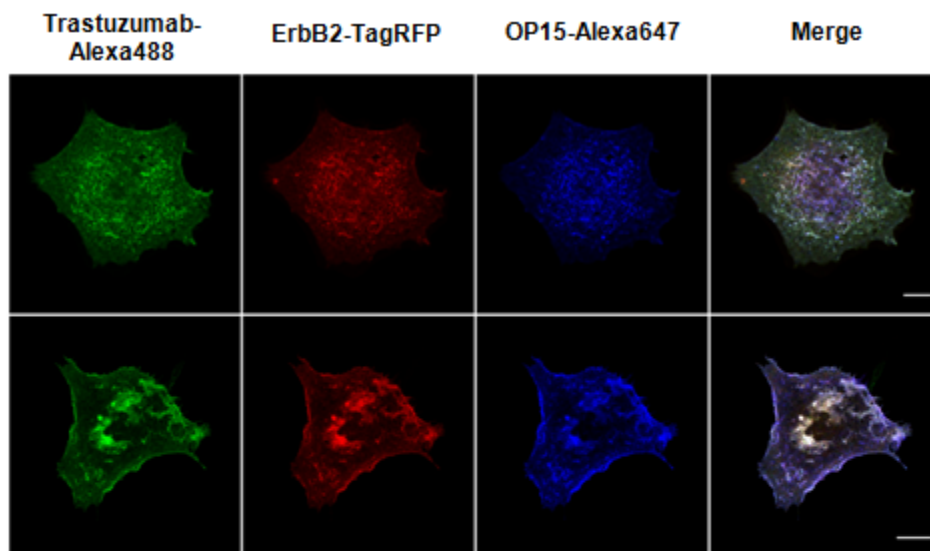


Figura 12. Expresión de la proteína de fusión ErbB2-TagRFP en células MCF7. La marcación *in vivo* de ErbB2 con Trastuzumab-Alexa488 muestra que la proteína de fusión se encuentra en la membrana de la célula. Además, ErbB2-TagRFP es reconocida por el anticuerpo monoclonal OP15, que se une a la región citoplasmática del receptor. Barra de escala: 10 μ m.

denominado anoikis (Frisch y Francis, 1994a). Se ha planteado que la pérdida de adhesión a la membrana basal (principalmente, laminina-111 secretada por las células mioepiteliales) es una señal proapoptótica en las células epiteliales mamarias durante el proceso de remodelación de la glándula luego de la lactancia (Watson, 2006; Inman, Robertson, Mott, & Bissell, 2015).

Las integrinas son la principal familia de proteínas de adhesión. Son éstas las encargadas de anclar la célula a la MEC, servir de puente entre el sustrato y el citoesqueleto transmitiendo fuerzas mecánicas entre uno y otro, y detectar el tipo de proteínas de MEC presentes y su estructura. Las células MCF7 expresan $\beta 1$ (Figura 9), $\beta 5$ y αV -integrina, mostrando bajos niveles de la subunidad $\beta 3$ -integrina la cual también forma receptores para fibronectina como $\beta 1$ -integrina (Taherian et al., 2011). Asimismo, las células SKBR3 expresan niveles inferiores de $\beta 1$ -integrina comparados con MCF7 (Figura 9) y en ambos casos son capaces de responder al tratamiento con anticuerpos bloqueantes para dicha proteína (Park et al., 2006). Esto permite utilizarlas como modelos de estudio para la interacción entre receptores de adhesión, particularmente $\beta 1$ -integrina, y ErbB2. Asimismo, las tres líneas tumorales mamarias: MCF7, SKBR3 y T47D expresan el receptor tirosina-quinasa para colágeno DDR1. Llamativamente, la línea celular A4-HeLa expresa niveles muy altos de dicho receptor mientras que en la línea parental dicha proteína no puede detectarse. No es posible determinar si esto es una característica propia de este clon en particular o es un producto de la sobreexpresión de ErbB2.

1.6 Estrategias para la sobreexpresión de $\beta 1$ -integrina

Como se discutió previamente, $\beta 1$ -integrina es esencial para el desarrollo de numerosos tejidos, entre ellos, la glándula mamaria (Nisticò et al., 2014). Como estrategia para estudiar la localización y dinámicas de acoplamiento a otras proteínas, se desarrolló una proteína de fusión a ECFP. A diferencia de lo que ocurre con $\beta 3$ -integrina-EGFP (González Wusener et al., 2015), al transfectar células A4-HeLa con la construcción $\beta 1$ -integrina-ECFP, esta no se localiza en complejos de adhesión focal inclusive al cultivarlas sobre una superficie recubierta con laminina. Por el contrario, se observa una intensa señal citoplasmática (Figura 13-A). Esto probablemente se deba a que $\beta 1$ -integrina

(Figura 9) requiere de un complejo procesamiento, glicosilación y heterodimerización con una subunidad α para ser funcional. Si bien estas células expresan dicha subunidad de forma endógena, el desajuste estequiométrico dado por la sobreexpresión de esta quimera saturaría el sistema de procesamiento quedando atascada en el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi.

Con el objetivo de estimular la formación de proteína heterodimérica funcional que sea capaz de ser procesada y translocada a la membrana, se cotransfectaron dichas células con la construcción β 1-integrina-ECFP junto con α 6-integrina (cuyo dímero es un receptor para laminina). Fue posible observar células formando estructuras en la membrana, lo que supone que la proteína de fusión se habría procesado correctamente (Figura 13-B). A pesar de eso, solo células con baja señal para ECFP mostraban dichas características, siendo muy poco reproducible este resultado.

Existe poca evidencia en la literatura acerca del uso de proteínas de fusión a β 1-integrina. Los mejores resultados se han obtenido utilizando células que KO para esta proteína (Parsons et al., 2008), lo que apoya la hipótesis de que sería la subunidad endógena la que estaría compitiendo con la de fusión por la maquinaria de procesamiento y el acoplamiento a subunidades α . De esta forma, se diseñó una estrategia novedosa: se subclonó la secuencia codificante para β 1-integrina-ECFP en un vector que posee un shRNA dirigido a la región 3'UTR del ARN mensajero de β 1-integrina murina (Naipauer et al., 2013) (Figura 13-C). Así, al ser transfectada en células de ratón permite disminuir la cantidad de subunidad endógena al mismo tiempo que se expresa la de fusión. Esta estrategia fue sumamente eficaz, mostrando a β 1-integrina-ECFP en dominios discretos de membrana (Figura 13-D) y por ende, será la utilizada en los experimentos expuestos en el Capítulo 3.

2. Células Madre Tumoraes

El concepto de “células madre” fue propuesto por primera vez en los trabajos de Till y McCulloch en 1961, demostrando la capacidad tanto de autoreplicación como de diferenciación de ciertas poblaciones celulares que daban lugar a precursores hematopoyéticos en la médula osea (Till & McCulloch, 1961). Una célula madre se carac-

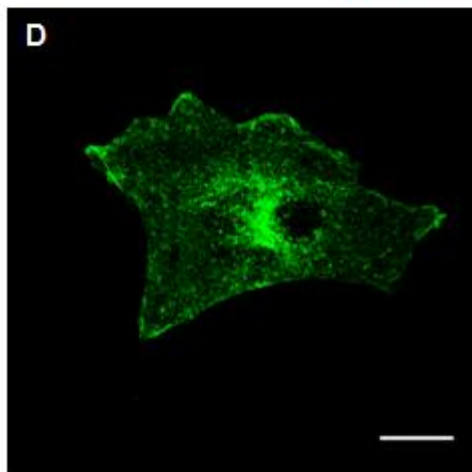
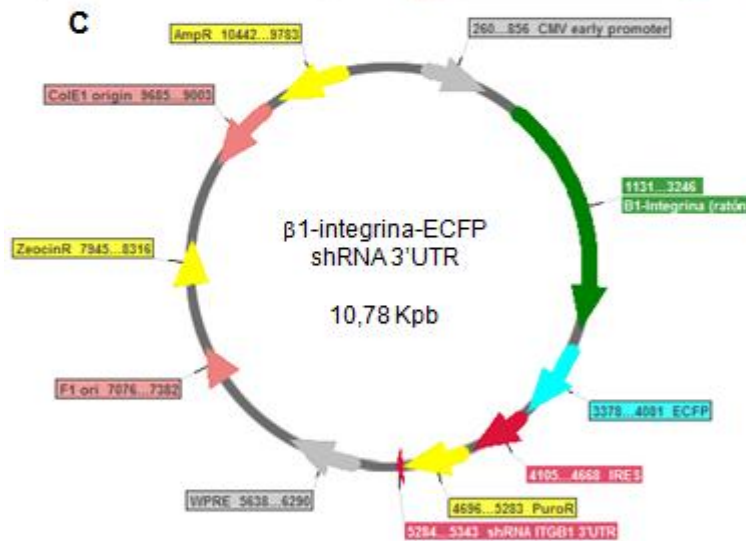
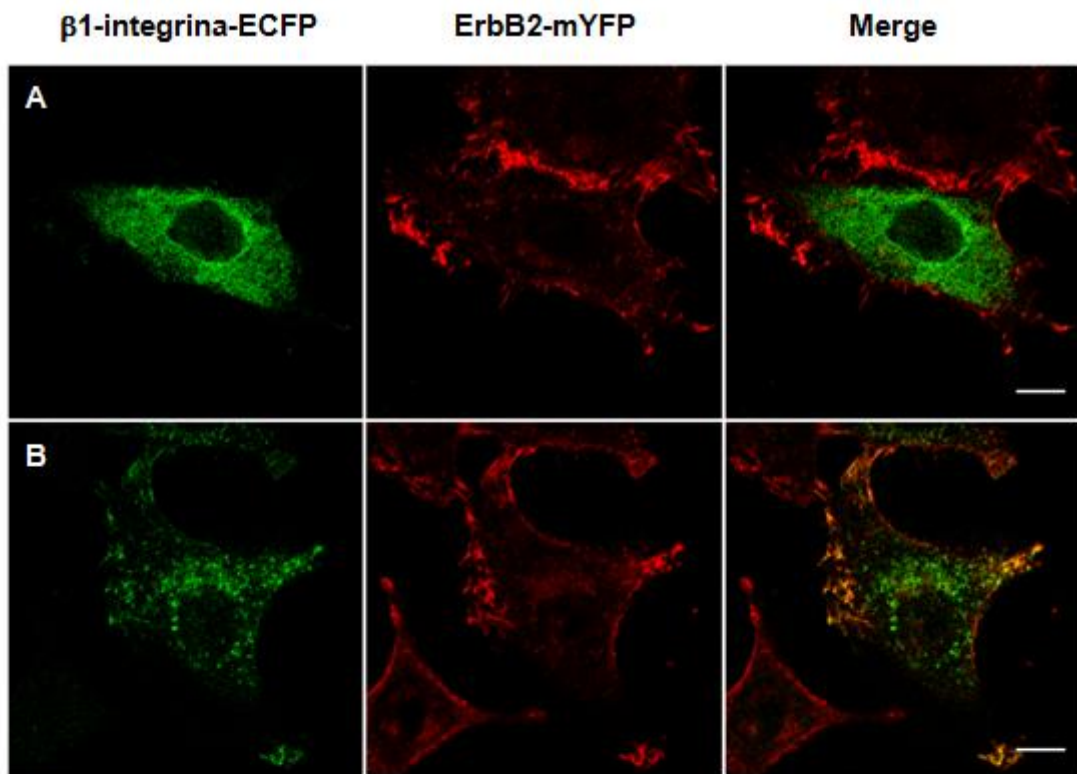


Figura 13. Expresión de $\beta 1$ -integrina-ECFP.

A- Células A4-Hela transfectadas con la construcción $\beta 1$ -integrina-ECFP y plaqueadas sobre laminina, donde se observa señal para ECFP solamente en el citoplasma. B- Células cotransfectadas $\beta 1$ -integrina-ECFP y $\alpha 6$ -integrina. Solo en células

con baja intensidad para ECFP es posible observar que la señal para dicha proteína en estructuras de membrana. C- Mapa para la construcción de $\beta 1$ -integrina-ECFP junto con un shRNA específico contra la región 3'UTR del mensajero para $\beta 1$ -integrina murino. D- Célula de la línea epitelial mamaria murina HC11 transfectada con el plásmido $\beta 1$ -integrina-ECFP shRNA 3'UTR.

teriza por la capacidad de división ilimitada, tanto para autorenovarse como para diferenciarse y mantener estable el número de poblaciones celulares que de esta deriven.

El mismo concepto fue extrapolado al proceso de desarrollo tumoral. Las células madre tumorales son las encargadas de alimentar la población de células que forman el tumor, con capacidad de autorenovación. A diferencia de una célula madre “normal”, una célula madre tumoral posee la capacidad de generar tumores *de-novo* por multiplicación clonal (Clarke et al., 2006; Kreso y Dick, 2014). De esta forma, si una célula madre tumoral pudiera escapar de su nicho, viajar por el torrente sanguíneo (o linfático) y fijarse en un nuevo tejido podría desarrollar un tumor en un ambiente completamente diferente (Soltysova et al., 2005). Las células madre tumorales juegan un papel central en el proceso de metástasis y el estudio de cómo el microambiente tumoral (entre ellos, la MEC) afecta su comportamiento es de sumo interés y tiene gran aplicabilidad en el campo terapéutico (Tang et al., 2007).

2.1 Células madre tumorales mamarias

El cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea que abarca subtipos de cánceres distintos, cada uno generado por la transformación de células basales, luminales o epiteliales, lo que genera un amplio espectro de enfermedades que pueden desarrollarse a partir de este complejo órgano (Sørli et al., 2006; Guedj et al., 2012). Dado esto, no es sorprendente encontrar heterogeneidad en los patrones de expresión de células madre provenientes de diferentes subtipos de tumores.

Se ha descrito un tipo de células madre tumorales mamarias derivadas de células basales. Estas están caracterizadas por un patrón de expresión de los marcadores de membrana CD44⁷ alto y CD24⁸ bajo, además de bajos niveles de expresión de ErbB2 (Mimeault, & Batra, 2014). Asimismo, es posible identificar dos subtipos de células

⁷ CD44: glicoproteína de membrana expresada en numerosos tipos celulares como célula T, linfocitos B, timocitos medulares, granulocitos, macrófagos y eritrocitos, entre otros. La relación entre la expresión de este marcador y CD24 es un indicador de células madre tumorales mamarias (de Beça et al., 2013).

⁸ CD24: proteína de adhesión celular que cumple funciones en el proceso de metástasis. La relación entre la expresión de este marcador y CD44 es un indicador de células madre tumorales mamarias (de Beça et al., 2013).

madres tumorales mamarias basales CD44^{alto}/CD24^{bajo}: basal B, con morfología mesenquimal, y basal A, con morfología tanto epitelial como mesenquimal (Jordan et al., 2006). De esta forma, tanto células con morfología epitelial como mesenquimal pueden tener patrones de expresión característicos de células madre tumorales y estar involucradas en procesos de metástasis y resistencia a terapias.

2.2 Células madre tumorales en el sistema nervioso

En el año 2003, Singh y colaboradores utilizando técnicas para obtener células madre neuronales normales, lograron aislar células pluripotenciales a partir de tumores cerebrales de pacientes pediátricos. Estas células representaban un porcentaje bajo del número total de células del tumor y expresaban el marcador de membrana CD133⁹ (Singh et al., 2003). Asimismo, pueden diferenciarse *in vitro* a células con la misma morfología que las células del tumor (Soltysova et al., 2005). Dichas células al ser cultivadas en superficies no adherentes dan lugar a estructuras macizas denominadas neuroesferas. Las células creciendo en este estado mantienen el compartimiento de células madre, se dividen ilimitadamente y, al ser separadas en células individuales, pueden generar nuevas estructuras (Jordan et al., 2006).

2.3 Caracterización de las líneas de células madre de glioblastoma

El grupo de la Dra. Ella Kim, del hospital Mainz en Alemania, ha aislado una serie de líneas celulares a partir de biopsias de tumores de pacientes con glioblastoma. Dichas células son altamente indiferenciadas y muestran características típicas de una célula madre tumoral como la expresión de CD133 (Barrantes-Freer et al., 2013, 2015). A partir de estas células (denominadas parentales o spp) se generaron tumores en el cerebro de ratones *nude*. Posteriormente, los ratones fueron sometidos a sesiones de radioterapia y nuevas líneas celulares madre cancerígenas fueron aisladas a partir de dichos tumores

⁹CD133: prominina-1, antígeno de células madre hematopoyéticas. La expresión de este marcador está relacionada al fenotipo de célula madre tumoral (Li, 2013).

(líneas ahora denominadas spIR). Se dispuso de tres pares de líneas celulares (tres parentales y sus respectivas líneas seleccionadas por radiación): 10, 1051 y 1080.

Estas células tumorales madre fueron mantenidas en botellas de baja adherencia formando estructuras de neuroesferas (Figura 14-A). Sin embargo, al cultivarlas en medio suplementado con 5% de SFB, dichas células se adhieren rápidamente (Figura 14-B), en particular la línea 10 la cual genera proyecciones 30 minutos luego de plaquearlas. A pesar de su capacidad invasiva y resistencia al tratamiento con radiación, no se observaron diferencias morfológicas entre las líneas parentales y las seleccionadas por radiación.

Dado que estas células son adherentes únicamente bajo determinadas condiciones, se realizaron Dot blots con el objetivo de estudiar la expresión de diferentes integrinas en estas células. Se observó que la línea 1080spIR expresa αV , $\beta 3$ y $\beta 5$ -integrina. Por su parte, 10spIR expresa $\beta 1$, $\beta 3$ -integrina y bajos niveles de $\beta 5$ -integrina, mientras que 1051spIR solo expresa niveles bajos de $\beta 5$ -integrina. También se estudió la expresión de $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\beta 4$ -integrina, cuyos resultados fueron negativos (Figura 15).

Si bien este tipo de células tiene capacidad ilimitada de reproducirse, su tasa de duplicación es baja, con ciclos entre 2 y 7 días. Las líneas, 1080spp y 1080spIR muestran mayor velocidad de crecimiento, con una tasa de replicación de aproximadamente 48 horas. Si bien dicha línea celular expresa integrinas en su membrana, es capaz de proliferar en suspensión sin señales de la MEC, lo que las diferencia de otras líneas celulares tumorales como MCF7. Tomando esto en consideración, y dada la baja tasa de proliferación del resto de las líneas y su alto costo de cultivo, se utilizó la línea 1080spIR para el estudio del efecto diferencial de drogas quimioterapéuticas sobre células tumorales no

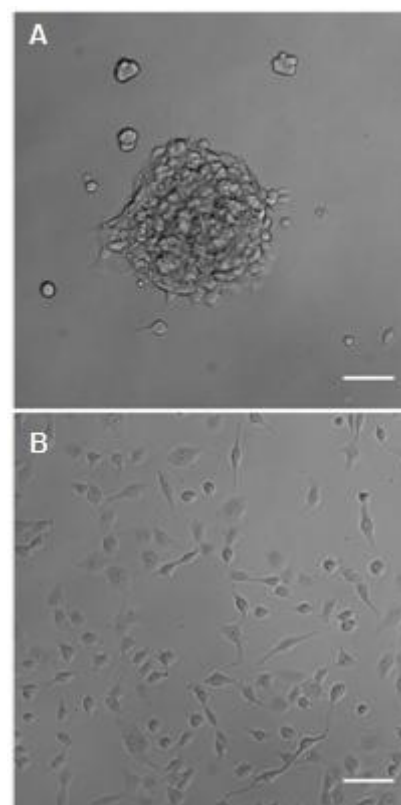


Figura 14. Morfología de las líneas de células madre de glioblastoma. A- Células 1080spIR creciendo como neuroesferas en suspensión en medio de cultivo Neurobasal. **B-** Dicha línea se adhiere al sustrato en presencia de 5% de SFB. Barra de escala: 50µm.

adherentes y células tumorales dependientes de la adhesión, como MCF7, que se desarrolla en el siguiente capítulo.

3. Conclusiones

En este capítulo se han relevado las características de origen, morfológicas y bioquímicas más importantes de tres modelos de líneas celulares tumorales con distinto grado de dependencia de anclaje a la MEC e interacción con la misma, las cuales se utilizaron durante el desarrollo de la presente tesis. Tanto la línea celular MCF7 como SKBR3 son líneas tumorales derivadas de tejido epitelial, las cuales conservan ciertas características, como la expresión de moléculas de adhesión (entre otras, β 1-integrina) y dependen de la interacción con el sustrato para sobrevivir y proliferar.

Por otro lado, las células madre tumorales derivadas de glioblastoma, si bien expresan moléculas de adhesión, tienen la capacidad de proliferar en suspensión formando esferoides. Esto permitirá estudiar cómo el efecto del sustrato y la capacidad adhesiva son capaces de condicionar la respuesta celular tanto a factores de crecimiento como al tratamiento con agentes quimioterapéuticos.

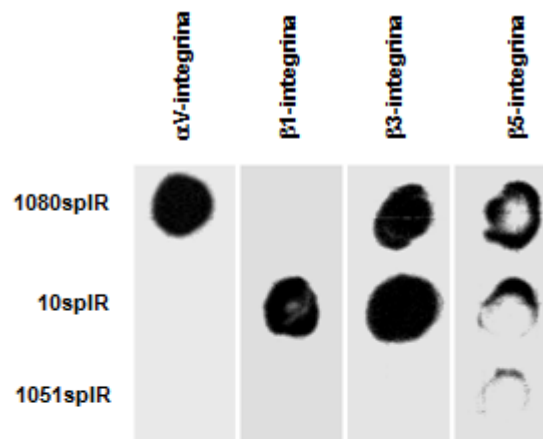


Figura 15. Dot blot para proteínas de adhesión en células madre tumorales de glioblastoma. La línea tumoral 1080spIR expresa α V, β 3 y β 5-integrina. 10spIR expresa β 1, β 3 y β 5-integrina, mientras que la línea 1051 expresa solo bajos niveles de β 5-integrina. También se estudió la expresión de α 4, α 5, α 6 y β 4-integrina pero dichas proteínas no fueron detectadas.

Capítulo 2:

Efecto de la Adhesión Celular sobre la Respuesta al Tratamiento con la Droga Quimoterapéutica Cucurbitacina I

Objetivo General

- Estudiar como la interacción con el sustrato afecta la toxicidad celular de Cucurbitacina I

Objetivos Específicos

- Estudiar el efecto de Cucurbitacina I sobre células tumorales mamarias de la línea MCF7
- Evaluar la toxicidad de Cucurbitacina I en células madre tumorales de glioblastoma no adherentes

1. Introducción

1.1 Terapéutica del cáncer

El cáncer es una enfermedad heterogénea. Dos tumores, aún del mismo subtipo, si bien tienen características similares poseen diferencias devenidas de las mutaciones azarosas acumuladas durante su desarrollo. Asimismo, el tumor se ve sometido a un proceso microevolutivo inducido por las presiones selectivas dadas por las condiciones del tumor como la disponibilidad de oxígeno, naturaleza de la matriz, pH, etc. y las terapias aplicadas, modificando así su fenotipo a lo largo del tiempo.

Al provenir de células somáticas que sufrieron un proceso de transformación, las células tumorales comparten características con las células normales de los tejidos originales. Esto plantea un desafío al momento de encarar una terapia antitumoral, ya que es sumamente difícil encontrar un tratamiento que actúe diferencialmente sobre células tumorales sin afectar a las células de los tejidos normales.

La primera aproximación terapéutica fue la extracción quirúrgica del tumor en el año 1846 realizada por Theodor Bilroth (Prusia, 1829-1894), William Sampson Handley (Inglaterra, 1872-1962) y William Halsted (EE.UU., 1852-1922) incursionaron en la extirpación quirúrgica de tumores y ganglios linfáticos adyacentes. Años más tarde, James Paget (Inglaterra, 1814-1899) reportó que células tumorales podían migrar, colonizar nuevos tejidos y desarrollar nuevos tumores, proceso conocido como metástasis (Sudhakar, 2009).

A finales del siglo XIX se comenzó a utilizar la radioterapia como método alternativo para el tratamiento de tumores. Esta terapia se basa en utilizar radiación ionizante para dañar el material genético de las células y así eliminar el tejido tumoral. Si bien esta terapia carece de especificidad es efectiva en casos donde el tejido a eliminar se encuentra circunscripto y, en combinación con otros tratamientos como la quimioterapia, ha dado buenos resultados particularmente en tumores difícilmente operables como gliomas.

Otras estrategias terapéuticas han sido desarrolladas a lo largo de los años. En tumores capaces de responder a hormonas, como son los de mama y próstata, inhibidores de aromatasas, antagonistas hormonales (como el tamoxifeno) y moléculas que interfieren con el metabolismo de las hormonas esteroideas han sido utilizadas con fines terapéuticos. Asimismo, varias estrategias terapéuticas fueron desarrolladas a partir del estudio de la desregulación de las vías de señalización aguas abajo de receptores hormonales y factores de crecimiento. Inhibidores específicos de quinasas, entre otros, son utilizados actualmente para el tratamiento de tumores especialmente aquellos con sobreexpresión de receptores para factores de crecimiento, como el EGFR, donde drogas como Gefitinib en combinación con otros tratamientos han dado resultados positivos en el tratamiento de esta enfermedad (Armour y Watkins, 2010; Levitzki y Klein, 2010; Politi et al., 2015).

Durante la década de los '90 y gracias al desarrollo de anticuerpos monoclonales e ingeniería genética, nuevas estrategias terapéuticas fueron diseñadas con el fin de mejorar la especificidad de la terapia y disminuir los efectos colaterales de la misma. Anticuerpos monoclonales humanizados como Trastuzumab (comercializada por Roche como Herceptina) (Rossi et al., 2016; Slamon et al., 2001) o Pertuzumab (versión humanizada del anticuerpo 2C4) (Barthélémy et al., 2014; Jhaveri y Esteva, 2014) han

sido revolucionarios en el tratamiento de tumores mamarios altamente agresivos que sobreexpresan el receptor ErbB2. Asimismo, la producción de proteínas recombinantes permitió la utilización de interferón, interleuquinas y citoquinas para modular la respuesta inmune (Sudhakar, 2009).

El uso de anticuerpos ha permitido aumentar la especificidad del blanco terapéutico. Actualmente, el principal foco de la investigación en farmacología oncológica se basa en encontrar estrategias que permitan una terapia dirigida, aumentando la toxicidad sobre las células tumorales y evitando la citotoxicidad sobre tejidos sanos, principal causante de los efectos colaterales y, por ende, del detrimento en la calidad de vida de los pacientes oncológicos durante el tratamiento.

1.2 Quimioterapia

El término “quimioterapia” fue esgrimido por el químico alemán Paul Ehrlich (Silesia, actualmente Polonia, 1854-1915) a principio del siglo XX definiéndolo como “el uso de agentes químicos para tratar una enfermedad”. Si bien es un término de uso general, en oncología este hace referencia al uso de moléculas sintéticas en el tratamiento de un tumor.

Uno de los primeros agentes quimioterapéuticos utilizados en oncología fue el Gas Mostaza, utilizado previamente como arma química en la primera guerra mundial. Se observó que la fuga accidental de pequeñas cantidades de Gas Mostaza indujo depresión en la médula ósea y los ganglios linfáticos de aquellas personas que se vieron afectadas. En 1943 Alfred Gilman (EE.UU., 1908-1984) y Louis Goodman (EE.UU., 1906-2000), de la universidad de Yale, en colaboración con Gustaf Lindskog (EE.UU., 1903-2002) realizaron los primeros ensayos. Administrando uno de estos compuestos a pacientes con linfoma no-Hodgkin lograron remisión parcial de la enfermedad (Gilman, 1946). Aunque los primeros resultados fueron prometedores, la remisión resultó ser incompleta y dicha terapia cayó en desuso prontamente.

A partir de esos primeros descubrimientos y hasta la actualidad, grandes avances se han hecho en la quimioterapéutica. Por ejemplo, en los años '60 el uso de antibióticos y transfusión de plaquetas permitió aumentar la sobrevida de pacientes con linfoma

tratados con drogas que, al inducir muerte celular en la médula ósea generaban problemas de coagulación e inmunodeficiencias que comprometían la salud del paciente. Asimismo, a partir de los años 70' se expandió el uso de agentes químicos en el tratamiento del cáncer. No solamente se utilizaron como terapia principal, sino también como “adyuvantes” de otras terapias, como la cirugía o la radioterapia. De esta forma, se consiguió disminuir las probabilidades de que tanto células que no hayan sido quirúrgicamente removidas como aquellas que se encontraban en el torrente sanguíneo o linfático generen un tumor *de novo*. De la misma forma, se ha demostrado que la terapia con anticuerpos monoclonales, en auge a partir de mediados de los años '90, es más eficiente con el uso conjunto de una o varias drogas (DeVita y Chu, 2008).

Ya desde los años '70 y hasta estos días, el mayor desafío que se plantea en el desarrollo y aplicación de agentes quimioterapéuticos es lograr un efecto citotóxico altamente eficiente en las células tumorales sin comprometer la viabilidad y el funcionamiento de los tejidos sanos. Esta búsqueda de especificidad dio lugar al desarrollo de fármacos que bloquean vías de señalización que se encuentran constitutivamente activas en células tumorales, como Gefitinib, un inhibidor específico de la actividad tirosina-quinasa de EGFR. Es en este contexto donde el diseño inteligente de fármacos y la medicina personalizada podrán dar grandes avances terapéuticos para mejorar tanto la especificidad de las drogas como la elección de moléculas blanco según las características del tumor y del paciente en particular.

1.3 Cucurbitacina I

Desde tiempos remotos existen registros del uso de plantas para el tratamiento de diferentes enfermedades: plantas medicinales con propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antipiréticas, antimicrobiales o, inclusive, antitumorales. Hace más de 50 años se han aislado una familia de compuestos triterpenoides tetracíclicos de plantas pertenecientes a la familia *Cucurbitaceae*, las cuales fueron utilizadas tradicionalmente por sus efectos antiinflamatorios y antitumorales (Geissman, 1963). Ya desde los años '60, estos compuestos fueron caracterizados como agentes con capacidad antitumoral tanto *in vivo* como *in vitro* (Lee et al., 2010; Rios et al., 2012).

La familia de las cucurbitacinas está formada por 17 miembros (nombrados por letras sucesivas del abecedario desde la "A" a la "T") y numerosos derivados (Chen et al., 2005). Estas moléculas han captado la atención de investigadores durante las últimas dos décadas dada su capacidad de funcionar como inhibidores específicos de las vías de STAT3 (del inglés *Signal Transducers and Activators of Transcription 3*) y Jak2 (del inglés *JANus Kinase 2*), con distintas especificidades (Sun et al., 2005). Cucurbitacina I (Figura 16-A) mostró ser un potente inhibidor de la fosforilación de STAT3 y Jak2. Este compuesto inhibe dichas vías con efectos citotóxicos en diferentes líneas celulares derivadas de tumores, tanto *in vitro* como en modelos de xenoinjertos (Hsu et al., 2011). Si bien no se conoce el blanco molecular de dicha droga, se ha descrito que Cucurbitacina I induce la despolimerización del citoesqueleto de actina de forma similar a la observada con el tratamiento con citocalasina B. Además, ejerce un efecto antiinflamatorio mediante la inactivación de la ciclooxigenasa-2 (Chen et al., 2012). Asimismo, se ha demostrado que Cucurbitacina I inhibe la vía de Rac, disminuyendo la motilidad celular al alterar el balance de activación entre las GTPasas pequeñas Rac1 y RhoA en células MCF7 (Lopez-Haber y Kazanietz, 2013).

Varios estudios mostraron que la inhibición de las vías Jak2/STAT3 induce muerte en células madre tumorales. El tratamiento con Cucurbitacina I a concentraciones menores a 200nM inhibe la proliferación, induce la expresión de marcadores de diferenciación y sensibiliza a células de meduloblastoma CD133 positivas a la radioterapia (Chang et al., 2012). El mismo efecto se observó en células CD133 positivas derivadas de cáncer de pulmón no microcítico (de células no pequeñas) (Hsu et al., 2011).

Otro miembro de esta familia de compuestos, Cucurbitacina B, mostró un efecto inhibitorio de la vía ErbB2 - integrina- $\alpha 6$. Esta droga es capaz de inhibir la proliferación *in vitro* de células de las líneas MDA-MB-231, SKBR3, y MCF7 así como reducir del tamaño de tumores generados a partir de la línea celular MDA-MB-231 en ratones *nude* (Gupta y Srivastava, 2014). Asimismo, se observó que a las 72hs de tratamiento se ven disminuidos los niveles de fosforilación de EGFR, Src, p130CAS e ILK1 en todas las líneas anteriormente mencionadas. Dado que Cucurbitacina I muestra un efecto altamente citotóxico en células tumorales, independientemente de la expresión de marcadores de células madre tumorales (como CD133), y que compuestos de la misma familia son capaces de inhibir la fosforilación de moléculas aguas abajo de las vías de adhesión

(como p130CAS e ILK1), se propone que la interacción con la MEC y la dependencia de ésta para la supervivencia celular condicionará el efecto de esta droga sobre la célula tumoral. Para comprobar esto se propone utilizar dos modelos celulares: MCF7, célula tumoral adherente; y la línea de célula madre tumoral de glioblastoma 1080spIR, que es independiente de las vías de adhesión para proliferar, con el fin de estudiar como la interacción con el sustrato afecta la toxicidad celular de Cucurbitacina I.

2. Cucurbitacina I y su Efecto sobre Células TumORAles Adherentes

2.1 Las células tumorales mamarias MCF7 son sensibles al tratamiento con Cucurbitacina I

Con el fin de estudiar la toxicidad de Cucurbitacina I en células MCF7, éstas fueron tratadas con concentraciones entre 5 y 250nM de la droga durante 2 a 24 horas. La viabilidad se midió utilizando el reactivo MTT (Riss et al., 2015), que se reduce enzimáticamente consumiendo NADH. Es posible observar que, a concentraciones mayores a 100nM, la viabilidad celular disminuye a partir de las 12 horas (Figura 16-B). Se observó también que a partir de las 12 horas un porcentaje creciente de células han perdido su morfología epitelial. Asimismo, a partir de las 48 horas, las células se encontraban mayoritariamente en suspensión. Esto puede deberse tanto al potente efecto citotóxico, que induce muerte celular de forma rápida, o porque dicha droga induzca pérdida de la adhesión en esta línea celular, siendo esta la consecuencia de la disminución en la viabilidad celular que induce dicha droga.

2.2 Cucurbitacina I induce el desacoplamiento de los complejos de adhesión focal

Con el fin de estudiar si dicha droga afecta el acoplamiento de los complejos de adhesión focal, se trataron células MCF7 con 100nM de Cucurbitacina I durante 1 hora. Las células se fijaron y se tiñó el núcleo con DAPI, el citoesqueleto de actina con Faloidina-Rodamina 6G y β 3-tubulina y zyxina (como marcador de los focos de adhesión)

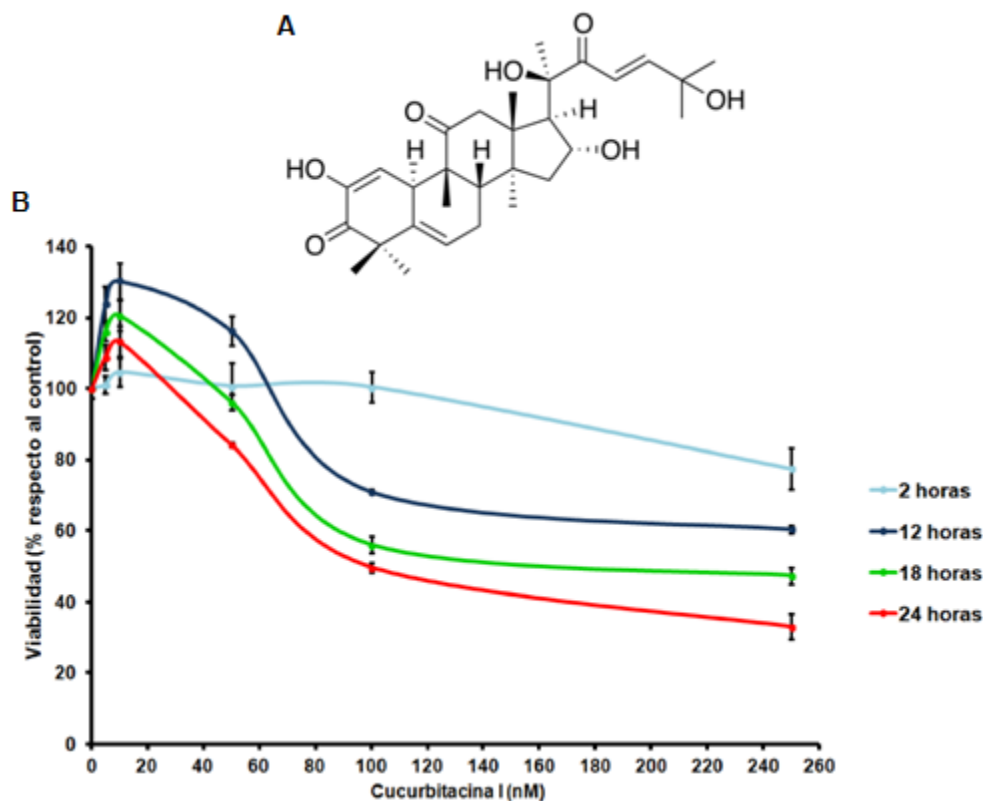


Figura 16. Curva de viabilidad para células MCF7 tratadas con Cucurbitacina I.
A- Estructura de la Cucurbitacina I. **B-** Efecto de la Cucurbitacina I sobre células MCF7. Es posible observar que, a concentraciones superiores a 100nM, dicha droga disminuye la viabilidad celular (medida con MTT) luego de 12 horas de incubación. Barra de error: \pm error estándar de la media (SEM, del inglés *Standard Error of the Mean*) $n=4$

con anticuerpos específicos.

Es posible observar un dramático cambio morfológico en las células tratadas con Cucurbitacina I. Las células MCF7 pierden su morfología epitelial característica tomando forma redondeada o ahusada con largas prolongaciones (Figura 17). Además, se observa una pérdida del patrón radial de los microtúbulos y una disgregación del citoesqueleto de actina, donde la β -actina en vez de formar fibras se encuentra agregada en el citoplasma. Asimismo, es posible observar que, mientras en las células control zyxina se encuentra formando estructuras conspicuas correspondientes a los complejos de adhesión focal, el tratamiento con 100nM de Cucurbitacina I durante una hora es capaz de desensamblar

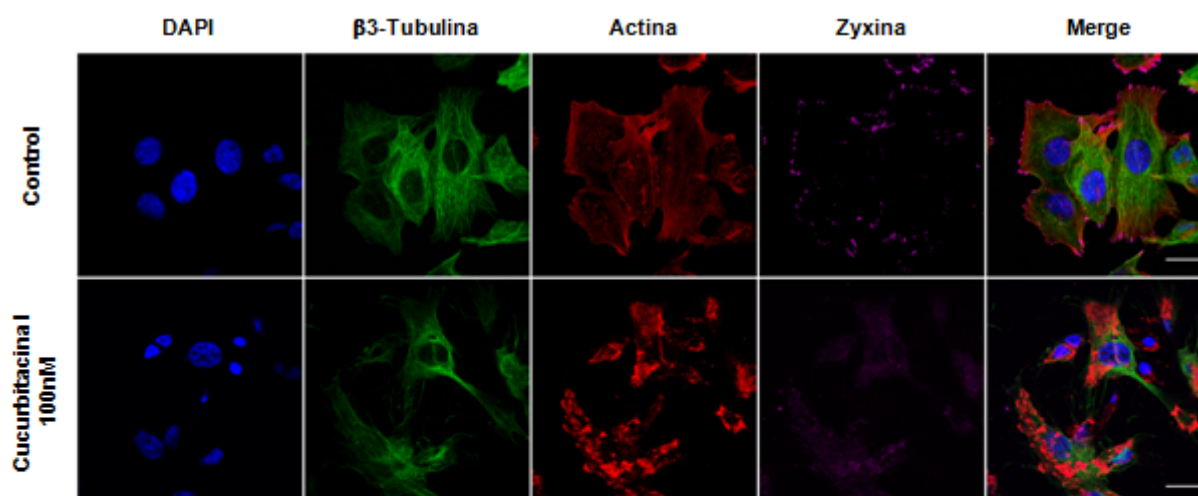


Figura 17. Efecto de Cucurbitacina I sobre el citoesqueleto de actina y los complejos de adhesión focal. Células MCF7 tratadas con 100nM de Cucurbitacina I durante 1 hora se fijaron con 4% PFA, 4% sacarosa en PBS y se realizaron tinciones para núcleo (DAPI), citoesqueleto de actina (Faloidina-R6G), β 3-tubulina y zyxina (con anticuerpos específicos). Es posible observar que la droga disgrega los focos de adhesión e induce un rearrreglo del citoesqueleto de actina. Barra de escala: 10 μ m.

totalmente dichas estructuras.

Como se comentó anteriormente, Cucurbitacina I es capaz de inhibir la activación de Rac1 modificando la relación Rac1/RhoA activo en la célula (Lopez-Haber y Kazanietz, 2013). La activación de las vías de Rac1 y RhoA cumple la función de regular la dinámica del citoesqueleto de actina así como la adhesión celular a través de la fosforilación y reclutamiento de proteínas de los complejos de adhesión focal y la activación *inside-out* de integrinas (Fukata et al., 1999; Katoh et al., 2011). Las señales dadas por la adhesión a la MEC son necesarias para la supervivencia, proliferación y/o funcionalidad de muchos tipos celulares, en especial las células epiteliales. La disrupción de la adhesión celular trae como consecuencia la muerte celular programada por un proceso conocido como anoikis (Frisch y Francis, 1994b; Gilmore, 2005). De esta forma, Cucurbitacina I podría inducir un proceso citotóxico dada la disrupción de la adhesión celular causada por la desregulación de las vías de Rac1 y RhoA a través de un proceso de muerte celular por un mecanismo de anoikis.

3. Efecto de Cucurbitacina I sobre Esferoides de Células Madre Tumoraes de Glioblastoma

3.1 Las células 1080spIR son sensibles a Cucurbitacina I a tiempos de incubación mayores que las células MCF7

Con el objetivo de estudiar si Cucurbitacina I tiene un efecto diferencial sobre las líneas de células madre tumorales de glioblastoma y si a su vez, la selección por radiación confiere o no resistencia a dicha droga, se utilizaron células en suspensión para realizar curvas de toxicidad incubando 2×10^3 células a concentraciones entre 5 y 250nM de Cucurbitacina I durante 48 horas. Con el objetivo de tener mayor sensibilidad, la viabilidad se midió utilizando el kit CellTiter-Glo, el cual determina la concentración de ATP por luminiscencia (Riss et al., 2015). No se observaron diferencias en la respuesta a Cucurbitacina I entre las líneas parentales (1051spp y 1080spp) y las seleccionadas por radiación (1051spIR y 1080spIR) (Figura 18-A). Dada su tasa de proliferación más alta, con tiempos de duplicación de aproximadamente 48 horas, se utilizó la línea 1080spIR para estudiar el efecto de esta droga sobre células madre tumorales no adherentes. Teniendo en cuenta que muchas drogas quimioterapéuticas requieren del pasaje a través de fase S del ciclo celular y que éstas células poseen tiempos de duplicación largos, se decidió estudiar el efecto de Cucurbitacina I a tiempos de incubación más prolongados. Para esto se repitió el experimento de proliferación utilizando células 1080spIR en suspensión e incubándolas durante 1 a 6 días con dicha droga (Figura 18-B).

La viabilidad de las células 1080spIR varía en función de la duración del tratamiento. Mientras que a las 24 horas de incubación no se observan diferencias con las células control, se requieren 4 días de tratamiento para alcanzar una disminución significativa de la viabilidad comparable con la observada en células MCF7 luego de 24 horas de incubación. Dado que éstas células son capaces de crecer en suspensión, no dependen de las señales de adhesión que, como se ha descrito, se disrumen por el tratamiento con Cucurbitacina I. De esta forma, el tratamiento con esta droga tendría un efecto citotóxico diferente en células en suspensión ya que induce la muerte celular a tiempos mas largos, lo que sugiere la participación de otras vías.

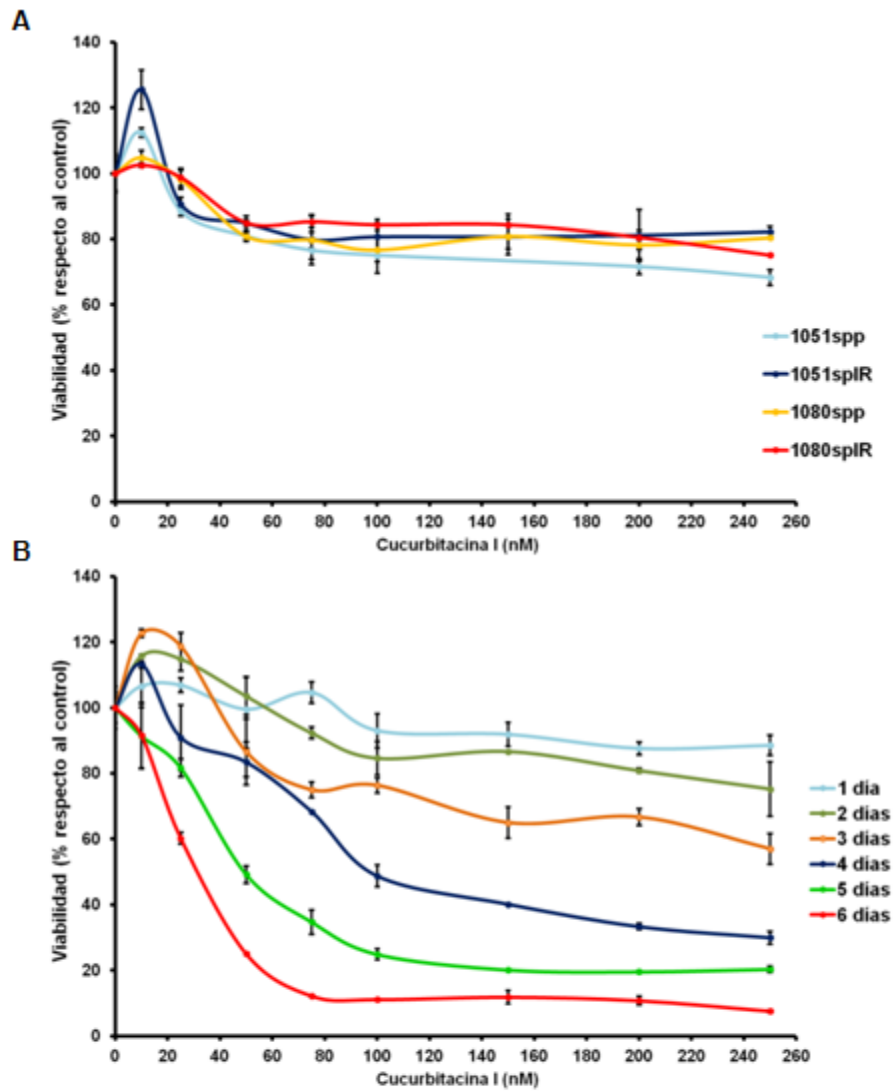


Figura 18. Efecto de Cucurbitacina I sobre las líneas de células madre de glioblastoma en suspensión. A- 10^3 células 1051spp, 1051splR, 1080spp y 1080splR en suspensión fueron tratadas con Cucurbitacina I durante 48 horas y se determinó la viabilidad celular con el *kit CellTiter-Glo* (Promega). B- Curva de viabilidad para la línea 1080splR entre 1 y 6 días de incubación. Barra de error: \pm SEM, n=4.

3.2 Cucurbitacina I induce arresto del ciclo celular en células madre tumorales no adherentes

Si bien estas células al ser cultivadas en botellas de baja adherencia con medios específicos pueden crecer en suspensión formando esferoides, cuando se cultivan en botellas convencionales con 5% de SFB las células se adhieren al sustrato. Éstas células son capaces de proliferar en suspensión, son independientes de las señales de adhesión y por lo tanto aún estando adheridas no muestran un comportamiento diferencial. De esta forma, se propuso estudiar si la disminución en la viabilidad observada se correlaciona con la inducción de procesos citotóxicos midiendo cambios en la estructura de la membrana por marcación con anexinaV y su integridad por tinción con yoduro de propidio y diaceto-fluoresceína. Células 1080spIR fueron incubadas durante 1 a 5 días en presencia de 100nM de Cucurbitacina I. Estas células se cultivaron en placas *LabTec* de 8 pocillos con medio suplementado con 5% de SFB para inducir su adhesión, dado que el estar adheridas facilita la marcación de las muestras.

Con el objetivo de evaluar si existe una correlación entre la disminución de la viabilidad y la integridad de la membrana, se tiñeron las células con diaceto-fluoresceína e yoduro de propidio. La diaceto-fluoresceína es permeable a la célula, pero al ingresar es desacetilada, formando una especie cargada que permanece dentro de la célula a excepción que la integridad de la membrana se vea comprometida. Por otro lado, el yoduro de propidio es un agente intercalante de ácidos nucleicos impermeable a la membrana, de forma que solo es capaz de unirse al ADN o a estructuras secundarias de ARN de células con poros en sus membranas. De esta forma, las células vivas serán marcadas con fluoresceína (verde) y aquellas inviables, cuya membrana este comprometida, será marcada con yoduro de propidio (rojo) (Ross et al., 1989). Se puede observar que tanto en las células adheridas e incubadas durante 1 a 5 días como en las células control la membrana no se ve comprometida ya que presentan intensa señal para fluoresceína (Figura 19). Asimismo, pueden observarse algunas células marcadas con yoduro de propidio solo luego de 5 días de incubación, lo que es coherente con los resultados de los experimentos de viabilidad anteriormente descriptos. Complementariamente, se tiñeron células adheridas con anexinaV acoplada a Cy3. De la misma forma, solo fue posible detectar células positivas a partir de los 3 días de

tratamiento (Figura 20). A diferencia de lo observado en células MCF7, la adhesión al sustrato no se ve alterada por el tratamiento con Cucurbitacina I (Figura 19 y 20), por ende la disminución en la viabilidad no se produciría por un mecanismo de anoikis. Estos resultados sugieren que la disminución en la viabilidad no es una consecuencia directa sobre la muerte celular sino debido a un efecto sobre la proliferación celular.

Ha sido descrito que otros miembros de esta familia de drogas tienen capacidad de desregular el ciclo celular. Cucurbitacina E es capaz de arrestar el ciclo celular en fase G2/M, tanto en células tumorales mamarias triple negativas como en cultivos primarios de

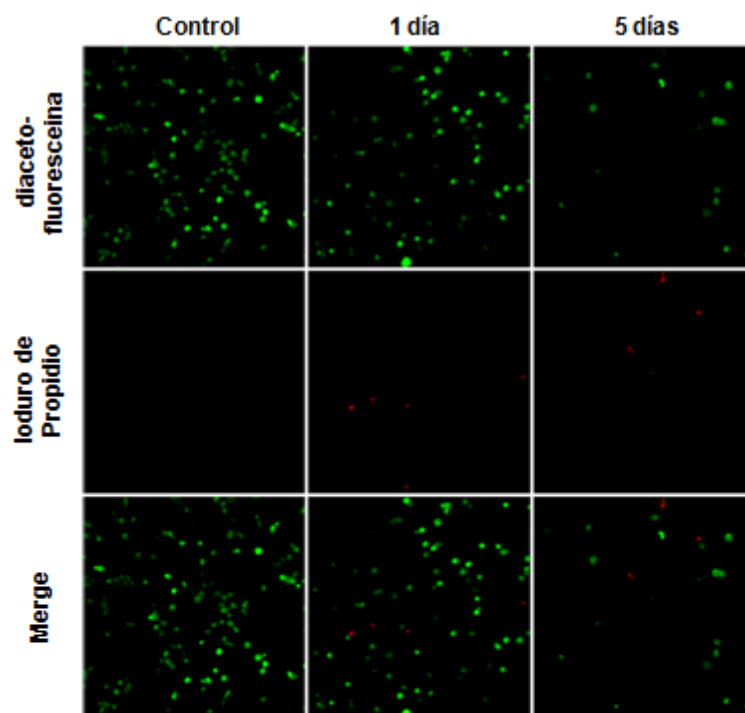


Figura 19. Estudio de la integridad de membrana en células 1080splR tratadas con Cucurbitacina I. Células 1080splR adheridas al vidrio se incubaron con 100nM de Cucurbitacina I durante 1 y 5 días. Las células se tiñeron con diaceto-fluoresceína y ioduro de propidio *in vivo*. Inclusive luego de 5 días de tratamiento, donde se observó que la viabilidad disminuye dramáticamente, las células siguen teniendo señal para fluoresceína, con pocas células marcadas con Ioduro de Propidio.

células de cáncer colorectal (Hsu et al., 2014; Kong et al., 2014), y Cucurbitacina B induce el mismo efecto en células K562 de leucemia (Chung et al., 2015; Guo et al., 2014). Con el objetivo de estudiar el efecto del tratamiento con Cucurbitacina I sobre el ciclo celular en células madre tumorales de glioblastoma, se trataron células 1080spIR en suspensión con 100nM de Cucurbitacina I, se disgregaron las neuroesferas y se marcaron *in vivo* con Hoechst 33342. Esta molécula es permeable a la membrana pero solo fluoresce al intercalarse en el ADN (Arndt-Jovin y Jovin, 1977). Como la eficiencia cuántica de la forma soluble es prácticamente nula y no es capaz de unirse a estructuras secundarias de ARN, es una sonda ampliamente utilizada para la tinción nuclear *in vivo*. Así, se observó que a partir de las 48 horas comienza un aumento en la población de células en fase G2/M, respecto al control (Figura 21). Asimismo, a partir de las 72 horas, se observa que aumenta la población sub-G1. Esto es coherente con lo observado con en las tinciones con yoduro de propidio y anexinaV, donde los eventos de muerte celular se detectaban a partir de las 72 horas. Este efecto es posterior a los cambios morfológicos observados en el citoesqueleto de tubulina, los cuales son evidentes a partir de las 24 horas de incubación (Figura 22). Dado que la Cucurbitacina I modifica la dinámica del citoesqueleto de tubulina y este es necesario para la migración de los cromosomas durante la mitosis, es posible que sea ésta la causa del aumento en la población G2/M observada por citometría de flujo. Se observa una banda sub-G1 en las células control lo cual puede deberse a que, al formar grandes esferoides, las células del centro no poseen el abastecimiento de oxígeno y nutrientes óptimo promoviendo así su muerte celular.

De esta forma, es posible concluir que a diferencia de lo que ocurre con células adherentes como el caso de las células MCF7, las células madre tumorales no adherentes mueren por un mecanismo diferente al de anoikis al no depender de la adhesión. Probablemente este efecto se deba a eventos desencadenados a partir del bloqueo de otras vías de señalización o de la aneuploidía generada por el efecto sobre el citoesqueleto de tubulina y el arresto del ciclo celular.

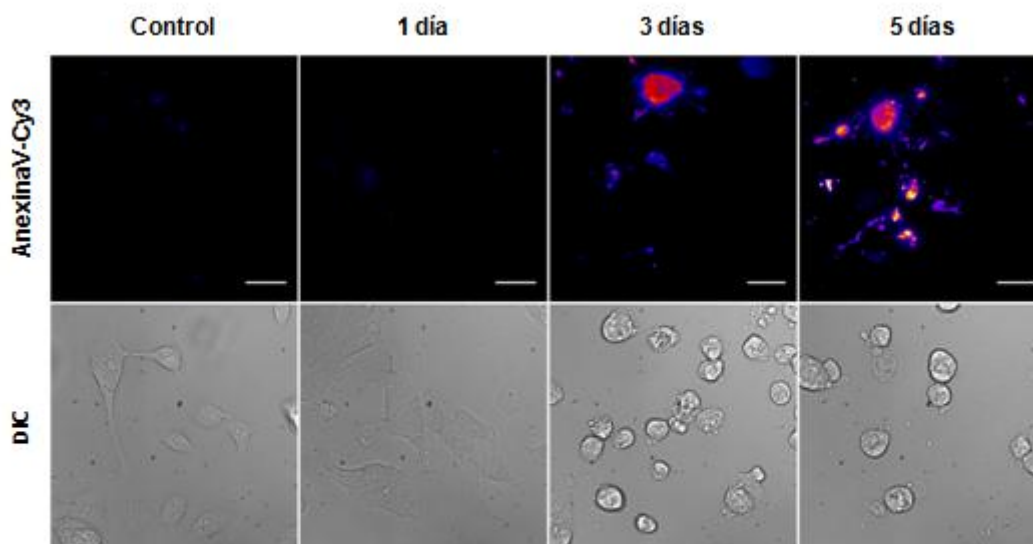


Figura 20. Marcación con AnnexinaV-Cy3 de células madre tumorales de glioblastoma tratadas con Cucurbitacina I. Células 1080splR adheridas a vidrio se incubaron con 100nM de Cucurbitacina I. Las células se tiñeron con AnnexinaV-Cy3 y fijadas con PFA 4%, sacarosa 4% en PBS. Barra de escala: 20 μ m.

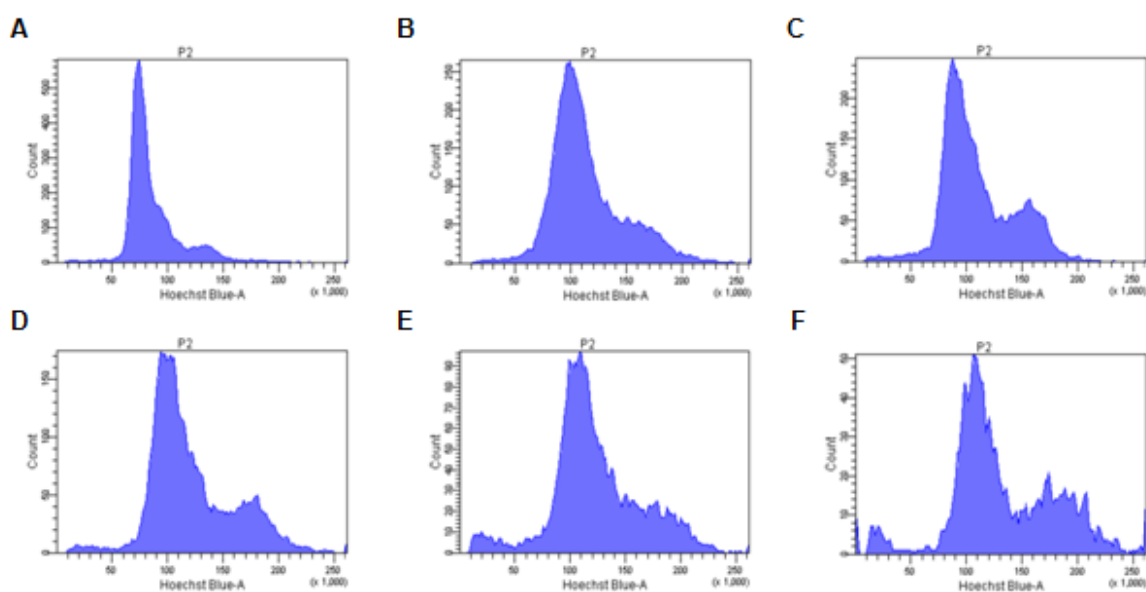


Figura 21. Estudio de ciclo celular en células 1080splR tratadas con Cucurbitacina I. Células 1080splR en suspensión fueron tratadas con 100nM de Cucurbitacina I durante 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E) y 5 días (F). Las células se fijaron con 4% PFA y se tiñó el ADN con 1 μ M Hoechst 33342. Puede observarse un aumento en la población G2/M con respecto al control (A), sugiriendo que la droga estaría arretando a las células antes de la entrada a citocinesis.

4. Conclusiones

Una innumerable cantidad de compuestos extraídos de plantas han sido utilizados con fines terapéuticos a lo largo de la historia. Uno de ellos en particular, Cucurbitacina I, ha sido objeto de estudio durante la última década dada su actividad como inhibidor de la vía de supervivencia y proliferación celular Jak2/STAT3 y su efecto citotóxico en células tumorales (Villarino et al., 2014). Si bien no se conoce el mecanismo por el cual Cucurbitacina I induce muerte celular, se propone que no sería por mecanismos de apoptosis (Ishdorj et al., 2011). Los resultados presentados en este capítulo muestran que dicha droga podría tener un efecto diferencial según el tipo de célula y su estadio de diferenciación. En células tumorales altamente dependientes de adhesión, como el carcinoma nasofaríngeo, se ha probado que Cucurbitacina I disminuye la capacidad invasiva y sensibiliza a dichas células a la muerte por anoikis (Lui et al., 2009). En concordancia con dichos resultados, en este trabajo se ha demostrado que en células tumorales mamarias Cucurbitacina I tiene un rápido y sensible efecto sobre la adhesión celular, disrumpiendo con la dinámica del citoesqueleto de actina, desensamblando los

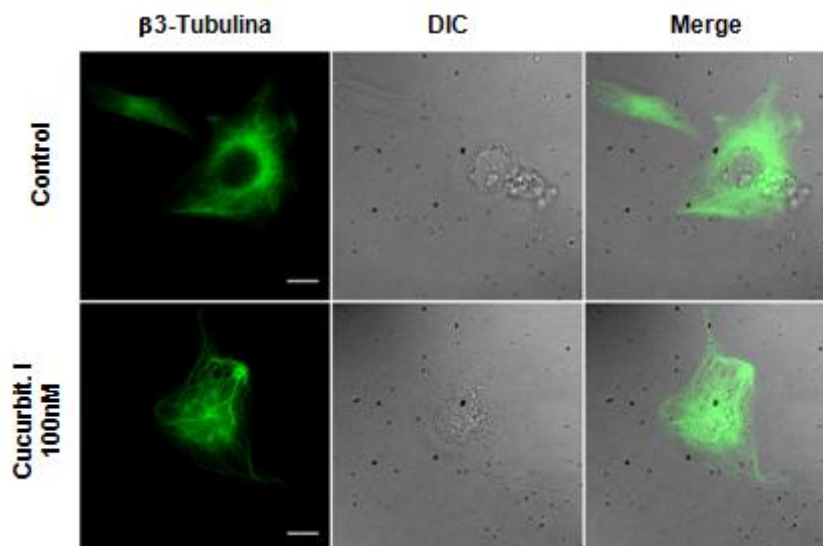


Figura 22. Efecto de Cucur-bitacina I sobre el citoesqueleto de tubulina. Células 1080splR se sembraron en Neurobasal con 5% SFB y se trataron con 100nM de Cucurbitacina I durante 24 horas. Barra de escala: 10 μ m.

complejos de adhesión focal e induciendo la pérdida de adhesión al sustrato, lo que conlleva a una disminución rápida de la viabilidad celular (Figuras 16-B y 17).

En contraposición, el tratamiento de células madre tumorales de glioblastoma no adherentes con Cucurbitacina I indujo una disminución en la viabilidad celular con dinámicas mucho más lentas (Figura 18-B). Este efecto no se correlaciona con la identificación de células muertas (Figura 19 y 20) pero si con un incremento en la población en fase G2/M en función del tiempo de incubación (Figura 21). El mismo efecto citotóxico ha sido descrito en otros modelos celulares, tanto con Cucurbitacina I como con otros miembros de la misma familia de compuestos (Guo et al., 2014; Hsu et al., 2014; Kong et al., 2014). Esto permite concluir que, si bien Cucurbitacina I posee un marcado efecto farmacológico sobre la vía Jak2/STAT3, el efecto citotóxico varía según el tipo y contexto celular estudiado.

Estos experimentos ponen de manifiesto que si bien una molécula puede inhibir farmacológicamente una vía, su efecto a nivel células puede variar. Aquí se muestra como la dependencia con la matriz extracelular condiciona la respuesta al agente quimioterapéutico Cucurbitacina I. Esta droga bloquea las mismas vías de señalización pero induce muerte celular con mecanismos y dinámicas sumamente diferentes según las características de las líneas celulares estudiadas. En particular, la dependencia de las células con la interacción a la matriz extracelular mostró ser crítica en este proceso.

Numerosos experimentos han demostrado la eficiencia de este tratamiento sobre tumores xenotransplantados (Gupta y Srivastava, 2014; Hsu et al., 2011; Iwanski et al., 2010; Lui et al., 2009; Tseng et al., 2012). Esta familia de drogas se perfila como un potencial agente químico de aplicación clínica la cual, en combinación con otras terapias clásicas como radiación o cirugía, podría resultar en nuevas alternativas terapéuticas especialmente en tumores altamente invasivos. Dado el amplio rango de efectos citotóxicos que posee Cucurbitacina I, especialmente el efecto diferencial sobre células adherentes y aquellas capaces de crecer sin interacción con la matriz extracelular, resulta necesario estudiar *in vivo* el efecto del tratamiento sobre tejidos. Por ejemplo, sobre epitelios cuya pérdida de adhesión compromete su funcionalidad lo que acarrearía efectos secundarios no deseados en la clínica.

Capítulo 3:

Estudio de las Dinámicas de Interacción entre ErbB2 y β 1- integrina

Objetivo General

- Caracterizar la interacción entre ErbB2 y β 1-integrina.

Objetivos Específicos

- Estudiar la coexistencia de ErbB2 y β 1-integrina en regiones definidas de la membrana en células tumorales mamarias.
- Determinar la dependencia de dicha heteroasociación con los niveles de expresión y activación de los receptores de adhesión.

1. Introducción

1.1 Interacción entre receptores de la familia de EGFR y moléculas de los complejos de adhesión focal

Las células están constantemente recibiendo señales de su entorno tanto químicas como físicas, tales como el tipo y densidad del sustrato, radiaciones, temperatura y pH, entre muchas otras. La capacidad de responder a mensajeros químicos sintetizados y liberados por otras células (ya sea de forma endócrina o parácrina) y la capacidad de integración de dichas señales son imprescindibles para definir el destino celular: proliferación, diferenciación, senescencia o muerte celular. Alteraciones en dichas señales, o su capacidad de detectarlas e integrarlas, puede conllevar a perturbaciones en el desarrollo de tejidos u órganos, condiciones fisiopatológicas o neoplasias.

Se ha descrito que no sólo los factores de tipo soluble, sino la composición y densidad de la MEC *per se* es capaz de determinar el destino celular (Park et al., 2011; Rowlands et al., 2008; Witkowska-Zimny et al., 2012). Las estructuras encargadas de sensor el tipo y densidad de la MEC son los complejos de adhesión focal. Estas

estructuras son, además, unidades de integración de señales por excelencia. Son complejos supramacromoleculares dinámicos compuestos por moléculas de adhesión (por ejemplo, integrinas), adaptadoras, proteínas regulatorias del citoesqueleto, quinasas, fosfatasa y receptores, los cuales integran señales tanto mecánicas como de factores de crecimiento y hormonas (Romer et al., 2006; Schiller y Fässler, 2013).

Se ha descrito que, en cultivos primarios de miocitos de rata, el tratamiento con HRG induce fosforilación de Src y FAK dependiente de ErbB2 y su interacción con p130CAS lo que regula la formación de los complejos de adhesión focal (Kuramochi et al., 2006). Sin embargo, aunque Akt y ERK también se fosforilan por estimulación con HRG, en este modelo celular dicha fosforilación no se ve afectada por el bloqueo de ErbB2 con anticuerpos específicos, lo que sugiere que otro receptor, probablemente ErbB4, este involucrado en dicha activación.

En células MCF10a¹⁰ que sobreexpresan ErbB2 se demostró que la estimulación con TGF- β induce la fosforilación de EGFR, Src y FAK, lo que también promueve la interacción de ErbB2 con α 6, β 1 y β 4-integrina vía FAK, a través de un mecanismo indirecto de activación de ErbB2 por EGFR (Wang et al., 2009). Se ha reportado que la transformación de células NIH/3T3 por sobreexpresión de ErbB2 necesita de la coexpresión de p130CAS para inducir un fenotipo tumoral (Cabodi et al., 2006, 2010a). Estas proteínas, además, podrían formar parte de un complejo macromolecular con FAK y Src como ha sido descrito en otros modelos celulares.

Creciente evidencia sugiere la existencia de un control dinámico entre los componentes de las vías de señalización de EGF, HRG y adhesión, donde la dinámica del citoesqueleto, la adhesión y activación de vías de señalización aguas abajo de los receptores tirosina-quinasa se ven interregulados (Alexi et al., 2011; Cabodi et al., 2010b; Ivaska y Heino, 2011; Kim et al., 2011b; de Laurentiis et al., 2007; Pickup et al., 2014; Soung et al., 2010). Dicha interrelación permitiría integrar todas las señales, para alcanzar una regulación minuciosa de los procesos de diferenciación, proliferación o invasividad.

¹⁰ MCF10a: línea celular no tumorigénica epitelial mamaria humana adherente. Son células adherentes y polarizadas que expresan marcadores de células epiteliales mamarias normales como el antígeno de glóbulos de grasa de la leche. Son, además, capaces de diferenciarse y formar estructuras pseudoacinares en cultivos tridimensionales (Pauley et al., 1993).

1.2 Interacción entre ErbB2 e integrinas en células tumorales

Como se comentó anteriormente, la integración de señales es necesaria para la regulación de la fisiología celular. Aunque la interacción funcional entre receptores de adhesión y factores de crecimiento ha sido extensamente estudiada, las bases estructurales de dicha interacción siguen siendo una incógnita. Esto ocurre principalmente dada la complejidad del sistema de estudio y la gran variabilidad existente entre los modelos celulares utilizados. Ivaska y Heino proponen que la interacción entre receptores de MEC y de factores de crecimiento puede darse a diferentes niveles (Ivaska y Heino, 2011):

- Mediante la activación o regulación la misma vía de señalización.
- A través del rearrreglo de complejos macromoleculares en la membrana dada por la adhesión celular, lo que altera la distribución e interacción de receptores de membrana y afectando así sus dinámicas de activación.
- Por medio de la activación cruzada de receptores de factores de crecimiento e integrinas de forma ligando-independiente.
- Mediante la activación y/o inducción de la expresión moléculas de adhesión por factores de crecimiento, de la misma manera que la activación de integrinas puede estimular la expresión de receptores para factores de crecimiento.

$\beta 4$ y $\beta 1$ -integrina (formando dímeros con $\alpha 6$ -integrina) son los principales receptores de laminina-111 en la célula epitelial mamaria. Esta proteína de MEC es producida por las células mioepiteliales y resulta esencial para el desarrollo y funcionamiento de la glándula mamaria (Humphries et al., 2006; Inman et al., 2015; Nisticò et al., 2014) y es uno de los principales componentes de la lámina basal en dicho tejido. Se ha descrito que la activación de $\beta 4$ -integrina induce resistencia a apoptosis y aumenta la capacidad invasiva de células tumorales mamarias (Bon et al., 2006; Weaver et al., 2002). Además, se ha postulado que la expresión y activación de $\beta 4$ -integrina promueve la fosforilación de Akt a través del aumento en la expresión de ErbB3 (Folgiro et al., 2008) cuya activación, como ha sido demostrado en el capítulo 1 (Figura 10), requiere de la participación de ErbB2.

Se ha descrito además la interacción de $\beta 4$ -integrina con ErbB2 por coimmunoprecipitación en numerosas líneas celulares con alta expresión de ErbB2. Inclusive ambas proteínas pueden interactuar *in vitro* cuando se obtienen a partir de

fracciones de membrana (Falcioni et al., 1997). Además, se ha determinado que β 4-integrina interactúa físicamente con ErbB2 en células epiteliales mamarias, y que la formación de dichos complejos aumenta la actividad de los factores de transcripción STAT3 y c-Jun, lo que disrumpe la unión epitelial, favorece la pérdida de polaridad e induce un fenotipo invasivo tanto *in vivo* como *ex vivo* (Guo et al., 2006).

Resultados similares a los mencionados anteriormente se han obtenido al estudiar la interacción entre ErbB2 y β 1-integrina (Falcioni et al., 1997). Por ejemplo, α 6, β 1 y β 4-integrina coinmunoprecipitan con ErbB2 en células MCF10a que sobreexpresan dicho receptor al ser estimuladas con TGF- β (Wang et al., 2009). Si bien no se ha observado correlación directa entre la expresión de ErbB2 y β 1-integrina (Shimizu et al., 2002), β 1-integrina juega un papel crucial en el proceso de metástasis en células tumorales mamarias ErbB2 positivas, donde células que no expresan dicho receptor de adhesión generan tumores más pequeños, menos vascularizados y con menor capacidad de producir metástasis en pulmón (Huck et al., 2010). Ha sido propuesto también que la interacción entre ErbB2 y β 1-integrina participa en la resistencia de células tumorales mamarias ErbB2 positivas al tratamiento con Trastuzumab. Se mostró que, en células SKBR3 o MCF7 sobreexpresando establemente la proteína ErbB2, la sobreexpresión de β 1-integrina incrementa los niveles de fosforilación de Akt y ERK1/2 además de disminuir su sensibilidad al tratamiento con Trastuzumab (Lesniak et al., 2009).

Se ha descrito además que ErbB2 y β 1-integrina pueden interactuar físicamente en células en suspensión. Es posible detectar interacción directa en células JIMT-1¹¹ y NCI-N87¹² al medir FRET entre estos receptores por citometría de flujo mediante el uso de anticuerpos primarios marcados (Mocanu et al., 2005). Dicha interacción en suspensión no es detectable en células SKBR3 o MKN-7¹³, aún teniendo en consideración que todas estas líneas celulares expresan altos niveles de ErbB2 y/o β 1-integrina. Contradictoriamente, en células MKN-7 adheridas a un sustrato, se detectó transferencia

¹¹ JIMT-1: línea tumoral mamaria con alta expresión de ErbB2 ($1,12 \cdot 10^5$ receptores por célula) y β 1-integrina ($2,46 \cdot 10^6$ receptores por célula), resistente al tratamiento con Trastuzumab (Mocanu et al., 2005; Tanner et al., 2004).

¹² NCI-N87: línea de adenocarcinoma gástrico con alta expresión de ErbB2 ($1,20 \cdot 10^6$ receptores por célula) y β 1-integrina ($1,22 \cdot 10^5$ receptores por célula), sensible a Trastuzumab (Mocanu et al., 2005; Park et al., 1990).

¹³ MKN-7: línea de adenocarcinoma gástrico con alta expresión de ErbB2 ($5,00 \cdot 10^5$ receptores por célula) y β 1-integrina ($5,66 \cdot 10^5$ receptores por célula), resistente a Trastuzumab (Mocanu et al., 2005; Motoyama et al., 1986).

de energía sólo en la membrana basal lo que sugiere que el rearrreglo de la membrana durante la adhesión modificaría estos complejos a la vez que induce la interacción entre estos receptores. Además, no es posible observar en estas células focos de adhesión bien diferenciados, sino que la señal se observa distribuida en toda la membrana celular (Fazekas et al., 2008). Asimismo, independientemente de la heteroasociación física directa entre receptores, todos ellos muestran altos niveles de colocalización con balsas lipídicas o *lipid rafts*, lo que sugiere que estas estructuras funcionarían como plataformas donde se integra la información de dichos receptores (Mocanu et al., 2005).

Los *lipid rafts* son dominios lipídicos ricos en colesterol que se encuentran más densamente empaquetados, por lo cual se comportan como “balsas” (*rafts*, en inglés) que “flotan” en la bicapa fosfolipídica más desordenada y fluida de las membranas celulares (Brown y London, 1998; Rietveld y Simons, 1998). Esta arquitectura no homogénea permite generar una compartimentalización de la membrana con diferentes dominios lipídicos que funcionan como plataformas donde convergen proteínas, lípidos y otras moléculas con funciones específicas como la endocitosis o la señalización (Lingwood y Simons, 2010; Simons y Toomre, 2000). Estas estructuras están reguladas, entre otras cosas, por la adhesión celular mediada por integrinas (Guan, 2004; Del Pozo, 2004), y sirven de plataforma de señalización a la vez que regulan la asociación entre receptores de la familia de EGFR, como ErbB2 (Nagy et al., 2002).

Como se ha mencionado anteriormente, ErbB2 cumple un papel crucial tanto durante el desarrollo como en el proceso de tumorigénesis de la glándula mamaria, con lo que el presente estudio se enfocará en la interacción de dicho receptor con la MEC y sus receptores. Si bien no está clara la naturaleza de la interacción entre ErbB2 y β 1-integrina, la expresión de este receptor de MEC es un factor de mala prognosis en tumores mamarios ErbB2 positivos en pacientes tratados con Trastuzumab (Lesniak et al., 2008, 2009). Teniendo esto en cuenta, se propone estudiar la interacción entre ErbB2 y β 1-integrina, así como su regulación por los niveles de expresión y activación de dichos receptores.

2. ErbB2 y β 1-integrina no Colocalizan en Complejos de Adhesión Focal Maduros

2.1 ErbB2 y β 1-integrina colocalizan sólo en células con alta expresión de estas proteínas

Con el objetivo de estudiar la dependencia de los niveles de expresión en la coexistencia de ErbB2 y β 1-integrina en los mismos dominios de membrana, se utilizaron tres modelos celulares: MCF7, que expresa bajos niveles de ambos receptores; SKBR3, que expresa altos niveles de ErbB2 pero bajos de β 1-integrina; y la línea A4-HeLa, células HeLa que expresan niveles muy altos de ambas proteínas y expresan de forma estable la construcción ErbB2-mYFP (Capítulo 1, Figura 9). Todas estas líneas celulares se sembraron en vidrios recubiertos con fibronectina con el objetivo activar a β 1-integrina y estimular la formación de complejos de adhesión focal.

Como se comentó en el capítulo 1, dado los bajos niveles de ErbB2 que expresan las células MCF7, para los estudios de microscopía de fluorescencia se transfectaron las células con un plásmido para expresar la proteína de fusión ErbB2-TagRFP. Para determinar la localización de ErbB2 endógeno en células SKBR3, este receptor se marcó con Trastuzumab-Alexa488. Asimismo, en todos los casos, para la marcación de β 1-integrina se realizó inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo MAB1981 (Millipore) y un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa647.

Tanto en células MCF7 como SKBR3, β 1-integrina se observa en complejos de adhesión focal (Figura 23). En el caso de las células A4-HeLa, si bien se observan focos de adhesión, la señal para β 1-integrina es detectada principalmente en la membrana plasmática. Asimismo, ErbB2 se observa en agrupamientos o *clusters* en la membrana, pero solo se puede detectar colocalización en células A4-HeLa donde los niveles de ambas proteínas son mucho más altos que en MCF7 o SKBR3 (Figura 23). Además, la colocalización de estas proteínas se observa en dominios de membrana fuera de los complejos de adhesión focal maduros.

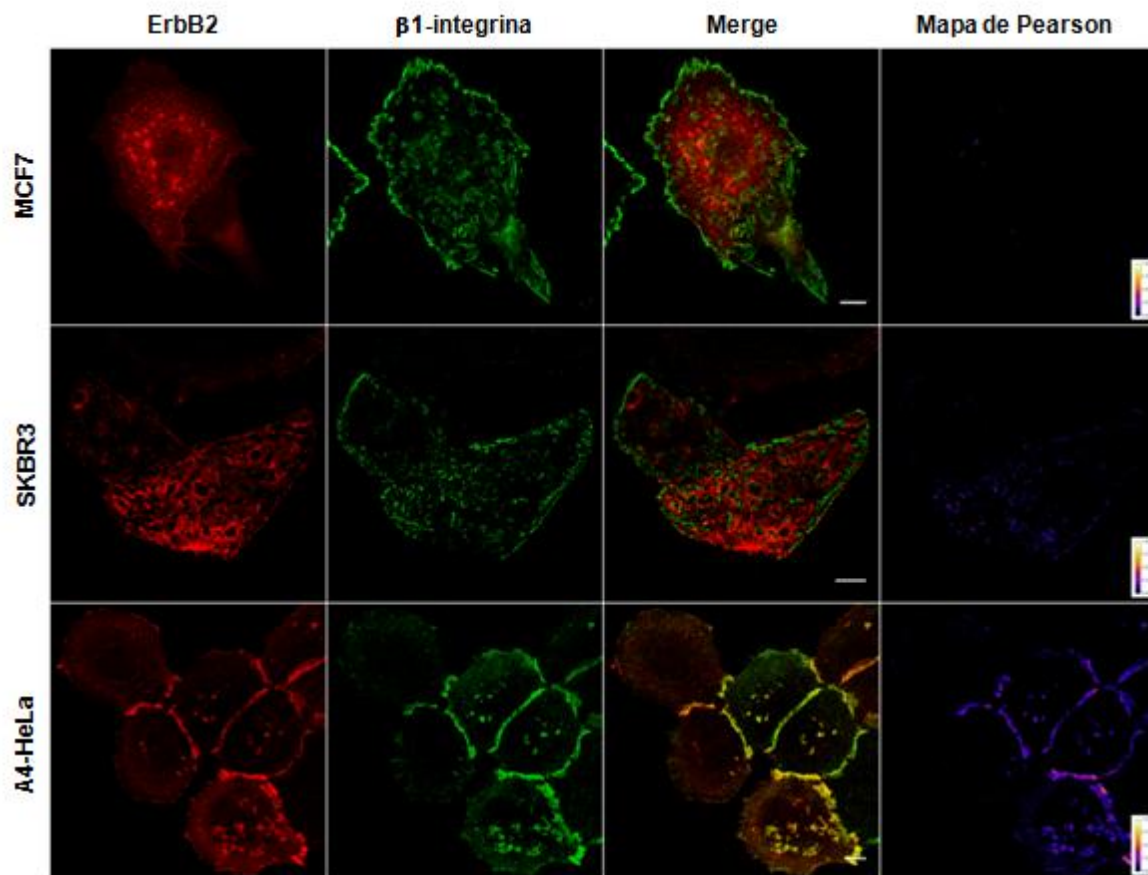


Figura 23. Colocalización de ErbB2 y β 1-integrina en células con distintos niveles de expresión. Células MCF7 que expresan establemente la proteína de fusión ErbB2-TagRFP y células SKBR3 no muestran colocalización entre el receptor ErbB2 y β 1-integrina, lo que si es observable en la línea celular A4-HeLa, la cual presenta altos niveles de expresión de ambas proteínas. Barra de escala: 10 μ m

2.2 ErbB2 y β 1-integrina colocalizan cuando ambas proteínas se encuentran sobreexpresadas

Para estudiar si la colocalización entre los receptores en estudio es una particularidad de la línea celular A4-HeLa, se cotransfectaron células HC11 con los plásmidos ErbB2-mYFP, α 6-integrina y β 1-integrina-ECFP-shRNA. Como se discutió en el Capítulo 1 (Sección 1.6), al expresar únicamente la proteína β 1-integrina-ECFP esta queda retenida en el sistema de membranas interno (retículo endoplásmico o aparato de Golgi), probablemente al saturarse los sistemas de glicosilación y la capacidad de heterodimerizar (Parsons et al., 2008). Al disminuir los niveles de β 1-integrina endógenos

y coexpresar una subunidad α con la cual puede dimerizar, la proteína es correctamente procesada y traslocada a la membrana externa. Dado que el shRNA está dirigido al 3'UTR murino, se utilizó la línea epitelial mamaria de ratón HC11. Al igual que lo observado en la línea celular A4-HeLa, las células HC11 que sobreexpresan las proteínas de fusión ErbB2-mYFP y β 1-integrina-ECFP muestran un alto nivel de colocalización en clusters de membrana (Figura 24-A).

Como se mostró anteriormente, ErbB2 forma espontáneamente *clusters* en la membrana cuyo tamaño varía en función de los niveles de expresión y del grado de activación del receptor (Nagy et al., 2010; Szabó et al., 2008). Para estudiar la morfología de estos *clusters* de receptores en mayor detalle, se utilizó una técnica de microscopía de superresolución denominada *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy* (STORM), o también denominada *Ground State Depletion Microscopy* (GSDM) (Coltharp y Xiao, 2012; Schermelleh et al., 2010).

Para generar las imágenes de STORM se realizaron inmunofluorescencias indirectas utilizando el anticuerpo anti-ErbB2 OP15 (Millipore), cuyo epítipo se encuentra en la región citoplasmática de ErbB2, junto a un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo Alexa647. Se puede observar en dichas imágenes que cada *cluster* está formado por un número variable de moléculas de receptor. Aunque no es posible observarlos por microscopía de fluorescencia convencional, esta técnica también permite detectar receptores en forma monomérica fuera de dichos complejos (Figura 25, flechas blancas). En contraposición, no es posible determinar si existen diferencias en el número de receptores (o tamaño) en los *clusters* dependiendo del sustrato donde se encuentre la célula ya que, como fue descrito anteriormente, el estado de agregación del receptor es altamente dependiente de los niveles de expresión (Nagy et al., 2010; Szabó et al., 2008) y este es, a su vez, variable inclusive dentro de una misma línea celular (con diferencias de entre el 10 y el 20% en células SKBR3).

De esta forma, es posible concluir que en células adheridas a fibronectina, β 1-integrina se encuentra acoplada a los complejos de adhesión focal. En el caso de células con baja expresión de β 1-integrina (como MCF7 o SKBR3), no es posible observar colocalización con ErbB2, mientras que en células donde β 1-integrina tiene alta expresión (A4-HeLa, Figura 23) o se encuentra sobreexpresada de forma exógena, ambos receptores se encuentran colocalizando (Figura 24-B). De esta forma, la heteroasociación entre ErbB2 y

β 1-integrina solo podría ocurrir en gran escala cuando los niveles de expresión son altos. Sin embargo, no es posible descartar que haya moléculas de ErbB2 que se encuentren en los complejos de adhesión focal sin poder ser detectados por esta técnica, ya que existen receptores (como monómeros o en otro estado de agregación) fuera de los grandes *clusters*.

2.3 La coexistencia de ErbB2 y β 1-integrina es regulada por el acoplamiento de los complejos de adhesión focal

Como se mostró anteriormente, los *clusters* de ErbB2 no colocalizan con los focos de adhesión. Sin embargo, en modelos de alta expresión tanto de ErbB2 como β 1-integrina, el número de receptores fuera de los *clusters* puede aumentar saturando el sistema y forzando así la coexistencia de los receptores fuera de los complejos de adhesión focal. Dado que muchos estudios han determinado la coexistencia y/o interacción entre ErbB2 y β 1-integrina por citometría de flujo, donde las células no interactúan con el sustrato y las integrinas están desactivadas, se repitió la inmunofluorescencia en células MCF7 en suspensión. Aunque las células MCF7 adheridas no muestran coexistencia de ambos receptores en los mismos dominios de membrana, las células en suspensión muestran colocalización para las señales correspondientes a ErbB2 (TagRFP) y β 1-integrina (Alexa647) (Figura 26-C y D). Además, reconstrucciones tridimensionales de dichas células muestran que existen estructuras donde coexisten ambas proteínas en toda la superficie celular (Figura 26-E).

De esta forma, se ha demostrado que, en contraste con lo propuesto en la literatura (Fazekas et al., 2008; Mocanu et al., 2005), los *clusters* de ErbB2 no colocalizan con los complejos de adhesión focal sino que, en el caso de existir interacción entre dichos receptores, esta se produce en otros dominios de membrana fuera de dichos complejos.

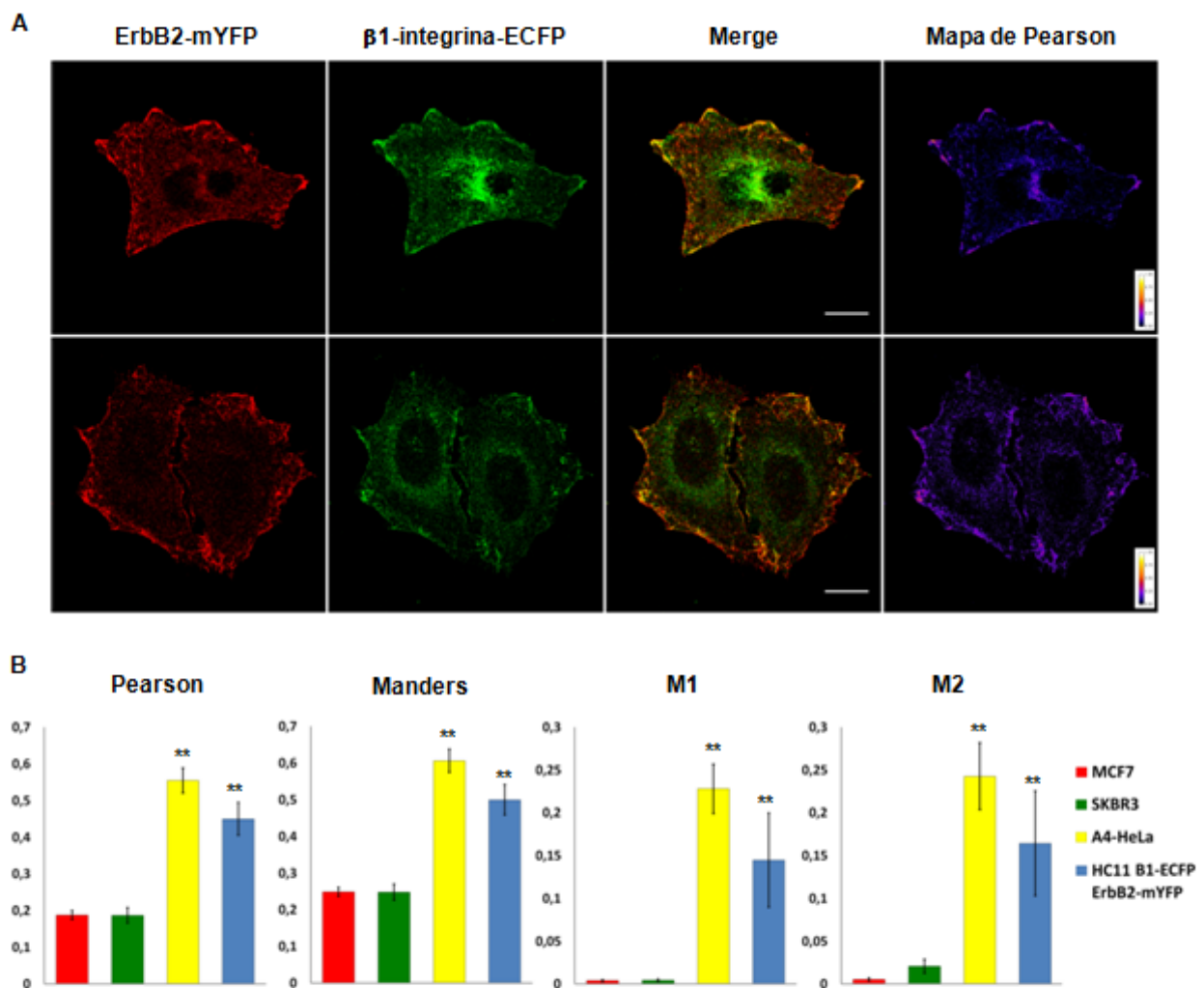


Figura 24. Sobreexpresión y colocalización de ErbB2 y β 1-integrina en células HC11. **A-** Células HC11 que coexpresan ErbB2-mYFP y β 1-integrina-ECFP, se observa en ambos casos que las proteínas se encuentran coexistiendo en los mismos *clusters* de membrana. **B-** Cuantificación del coeficiente de correlación de Pearson, coeficiente de superposición de Manders y coeficientes M1 y M2, donde en todos los casos las células con alta expresión de ErbB2 y β 1-integrina tienen niveles de correlación de sus señales significativamente mayores. Barra de escala: 10 μ m. ** $p < 0,01$ vs MCF7 y SKBR3, $n=23$ para MCF7, $n=22$ para SKBR3 y A4-HeLa, $n=15$ para HC11.

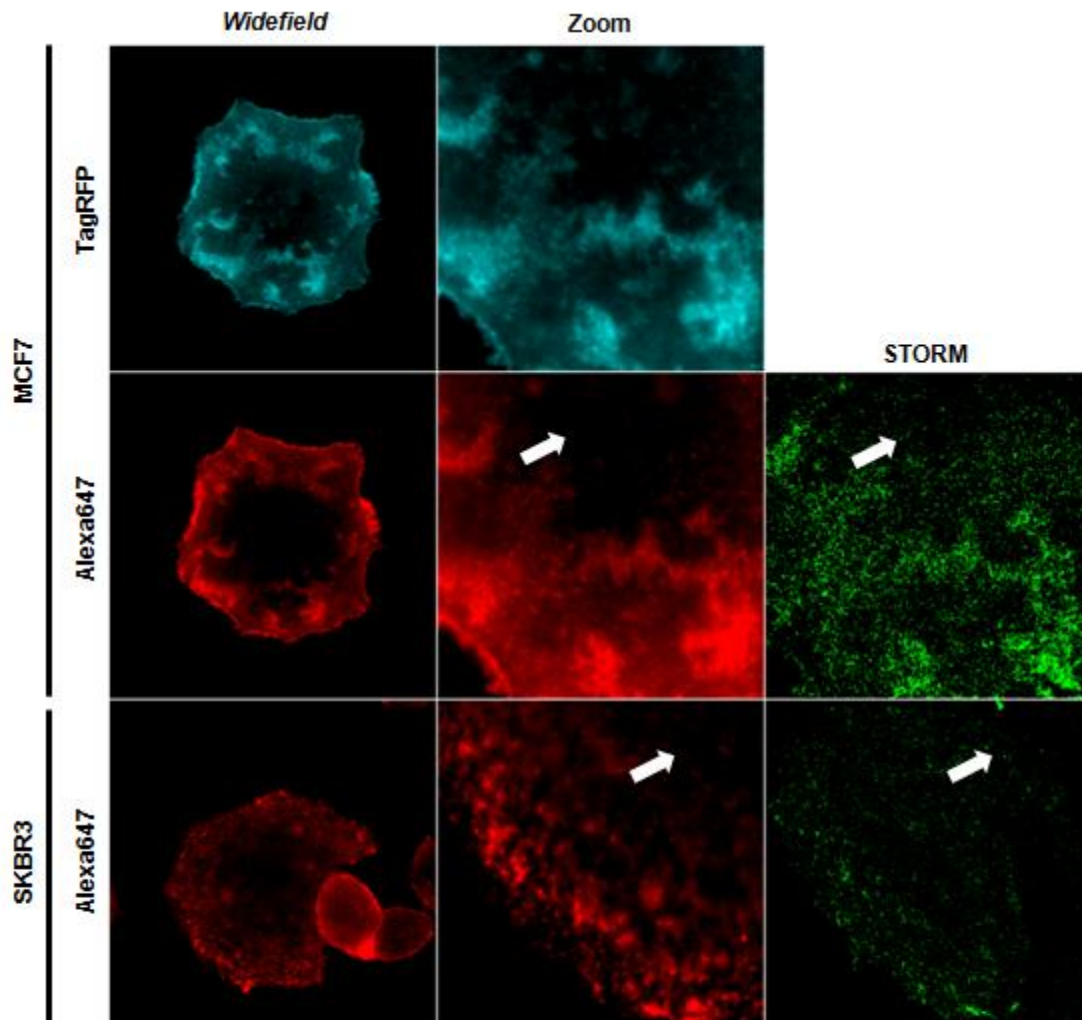


Figura 25. Microscopía de STORM de células MCF7 que expresan la proteína de fusión ErbB2-TagRFP y SKBR3. Las células se incubaron con un anticuerpo primario contra ErbB2 (OP15, Millipore) y un secundario anti-ratón acoplado al fluoróforo Alexa647. Sería posible observar la presencia de dos poblaciones de receptores en la célula: una población de ErbB2 en los *clusters* y otra de receptores mono o diméricos (flechas blancas) fuera de ellos, los cuales no podrían ser detectados mediante técnicas de microscopía convencionales.

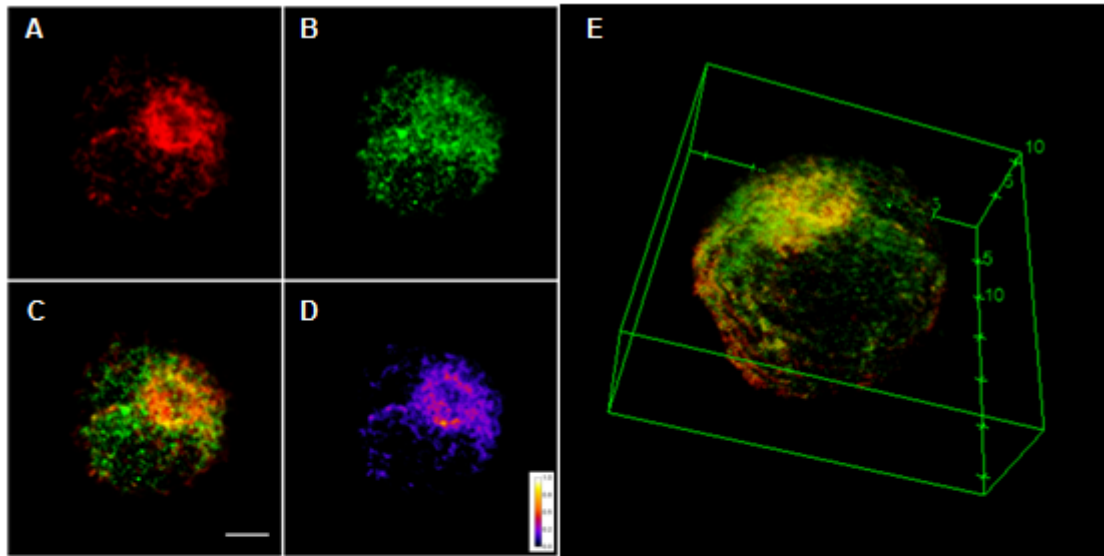


Figura 26. Colocalización entre ErbB2 y β 1-integrina en células MCF7 que expresan la proteína de fusión ErbB2-TagRFP en suspensión. A diferencia de lo que ocurre con β 1-integrina en los focos de adhesión maduros, esta proteína coexiste con ErbB2 en *clusters* de membrana de células en suspensión. **A-** ErbB2-TagRFP. **B-** Inmunofluorescencia para β 1-integrina. **C-** Merge. **D-** Mapa de Pearson. **E-** Reconstrucción tridimensional de una célula MCF7 en suspensión. Barra de escala: 5 μ m

3. Conclusiones

La membrana celular es una estructura compartimentalizada y dinámica con zonas que difieren en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Esta organización permite definir regiones y agrupar proteínas interrelacionadas funcionalmente en un mismo contexto físico. Dominios lipídicos definidos participan en procesos de señalización celular (Chidlow y Sessa, 2010; Reis-Sobreiro et al., 2013), regulando la dinámica de receptores de membrana, como los receptores tirosina-quinasa de la familia de EGFR (Irwin et al., 2011; de Laurentiis et al., 2007; Nagy et al., 2002).

Se ha demostrado en la literatura la existencia de heteroasociación en *lipids rafts* entre ErbB2 y β 1-integrina en células tumorales (Fazekas et al., 2008; Mocanu et al., 2005). Los resultados aquí expuestos, en contraposición, revelan que dicha asociación no ocurre en células adheridas salvo en el caso de células con niveles muy altos de expre-

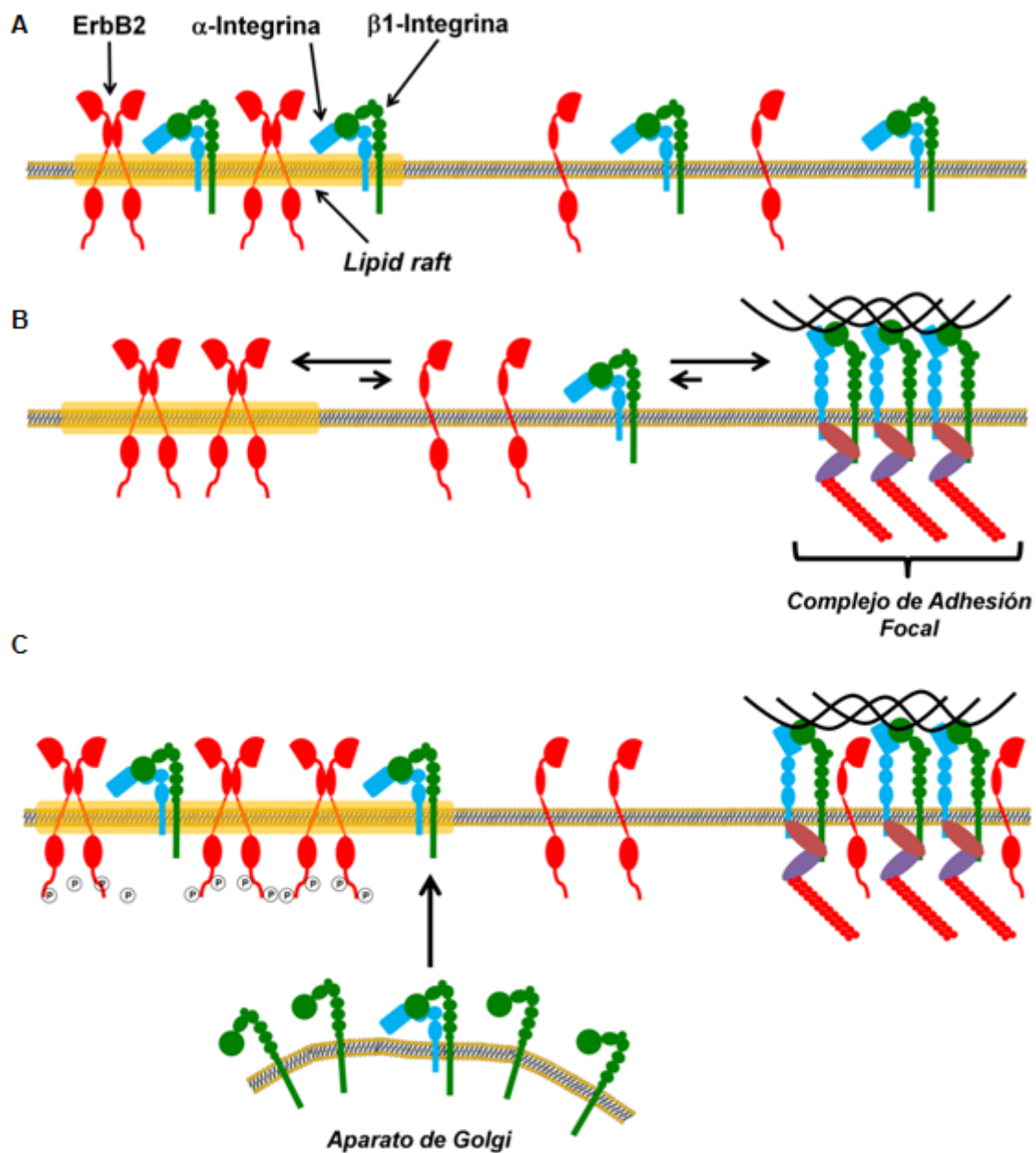


Figura 27. Modelo de interacción entre $\beta 1$ -integrina y ErbB2. A- Al no interactuar con el sustrato, $\beta 1$ -integrina (como dímero con una subunidad α) y ErbB2 coexisten en *lipid rafts* (Figura 25). B- Al interactuar con el sustrato, $\beta 1$ -integrina se activa, se libera de los *lipid rafts* y se acopla a otras proteínas para formar los complejos de adhesión focal (Figura 22). C- En células con alta expresión tanto de $\beta 1$ -integrina como de ErbB2, el sistema se satura y puede observarse la presencia de ambas proteínas coexistiendo en clusters de membrana, aun cuando la célula se encuentra adherida al sustrato y los complejos de adhesión focal ensamblados (Figura 22 y 23). Además, dado que $\beta 1$ -integrina necesita glicosilarse y heterodimerizar para ser activa, en el caso de la sobreexpresión de la proteína de fusión $\beta 1$ -integrina-ECFP, la proteína mal procesada y/o monomérica queda retenida, probablemente, en el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi (Figura 23) .

si3n de ambos receptores donde, adem1s, la colocaci3n se da fuera de los complejos de adhesi3n focal. Por el contrario, c3lulas en suspensi3n muestran colocaci3n entre ErbB2 y β 1-integrina en toda la superficie celular, lo que muestra un rearrreglo en los dominios de membrana y una redistribuci3n de los receptores luego de que la c3lula se adhiere al sustrato. Esto es coherente con resultados de la literatura donde se demuestra que la adhesi3n celular mediada por β 1-integrina regula estos dominios y la distribuci3n de los l3pidos en la membrana (Guan, 2004; Pankov et al., 2005).

Teniendo esto en consideraci3n, se propone un modelo que integra los resultados obtenidos con los publicados en la literatura. Cuando las c3lulas se encuentran en suspensi3n, β 1-integrina esta inactiva y co-confinada con ErbB2 en *lipid rafts* (Figura 27-A) (Mocanu et al., 2005). Al unirse a un sustrato como fibronectina, β 1-integrina se activa y se libera de los *lipid rafts* para formar parte los complejos de adhesi3n focal, mientras que ErbB2 se mantiene formando *clusters* en dichos dominios lip3dicos (Figura 27-B) (Fazekas et al., 2008; Nagy et al., 2002). En c3lulas donde la expresi3n de ambos receptores es alta, el sistema se satura y pueden observarse la presencia de ambas prote3nas coexistiendo en *clusters* de membrana a3n cuando la c3lula se encuentra adherida al sustrato y los complejos de adhesi3n focal ensamblados (Figura 27-C). Aunque no es posible descartar la existencia de receptores en los complejos de adhesi3n focal maduros, estos no pueden ser detectados mediante las t3cnicas utilizadas.

Si bien se ha visto que β 1-integrina juega un papel crucial en el proceso de met1stasis en c3lulas tumorales mamarias ErbB2 positivas (Huck et al., 2010) y est1 propuesta como una mol3cula crucial en el proceso de resistencia a la terapia con Trastuzumab (Lesniak et al., 2008, 2009), no existe correlaci3n directa entre la resistencia a dicha droga y la heteroasociaci3n entre ErbB2 y β 1-integrina (Mocanu et al., 2005). Los resultados aqu3 presentados junto con los expuestos en la literatura no avalan la hipotesis de que la resistencia a esta terapia dada por la sobreexpresi3n β 1-integrina se deba a un efecto est3rico que interfiera la interacci3n del anticuerpo monoclonal con ErbB2, como ocurre con otras prote3nas como Muc4 (complejo de sialomucina) (Nagy et al., 2005; Price-Schiavi et al., 2002). De esta forma, proponemos que la interacci3n entre β 1-integrina y ErbB2 se produce a un nivel de integraci3n de se1ales, como la fosforilaci3n de Akt o ERK1/2, que evita la inhibici3n de las v3as proliferativas que Trastuzumab bloquea en c3lulas tumorales mamarias con sobreexpresi3n de ErbB2.

Capítulo 4:

DDR1 como Novedoso Regulador de la Señalización de ErbB2 Gatillada por HRG

Objetivo General

- Estudiar el efecto de los receptores de MEC sobre la señalización mediada por factores de crecimiento.

Objetivos Específicos

- Estudiar como la MEC modula la señalización mediada por HRG en células tumorales mamarias.
- Estudiar la interacción entre ErbB2 y DDR1 en células tumorales mamarias.

1. Introducción

1.1 La MEC regula las vías de señalización activadas por factores de crecimiento

Como se ha discutido en capítulos anteriores existe consenso en la literatura sobre la activación de proteínas asociadas a los complejos de adhesión focal por receptores hormonales o de factores de crecimiento. Se ha descrito cómo la activación de receptores de la familia de EGFR es capaz de fosforilar moléculas asociadas a los complejos de adhesión focal tales como FAK, ILK, Src y p130CAS, entre otras (Cabodi et al., 2010a; Ivaska y Heino, 2011; Kim et al., 2011b; Kuramochi et al., 2006; Pickup et al., 2014; Wang et al., 2009). Recíprocamente, la adhesión celular puede modular las vías de señalización activadas por factores de crecimiento, y es incluso necesaria para la óptima estimulación con factores de crecimiento como VEGF, PDGF, insulina, o EGF (Eliceiri, 2001). La MEC es capaz de interactuar con los receptores para factores de

crecimiento y regular así su activación y señalización. Los dominios FnIII de la fibronectina o tenascina C son capaces de unirse a VEGF y potenciar su actividad a través del receptor VEGFR2 (Wijelath et al., 2006). Asimismo, FnIII es capaz de unirse al ectodominio del FGFR1 y actuar como co-ligando para regular su actividad (Hu et al., 2009).

Las señales dadas por la activación *outside-in* de integrinas se superponen con aquellas gatilladas por receptores para factores de crecimiento, como ser la activación de Ras-MAPK, PI3K-Akt y las GTPasas pequeñas de la familia de Rho, lo que permite una “regulación fina” de las señales (Ivaska y Heino, 2011). Las integrinas son capaces de activar sinérgicamente vías de señalización asociadas al receptor de insulina, IGFR1, VEGFR, receptor para el TGF- β y PDGFR, entre otros (Kim et al., 2011b).

1.2 Las vías de señalización activadas por la unión de ligandos a receptores de la familia de EGFR están reguladas por la MEC

Como se comentó anteriormente, la MEC puede interactuar directamente con los receptores para factores de crecimiento. Muchas proteínas de la MEC como laminina, tenascina, trombospondina y fibrilina poseen dominios homólogos al EGF que, una vez solubilizados por la acción de metaloproteasas, son capaces de interactuar con EGFR y modular su actividad (Schenk et al., 2003).

Por otro lado, la agregación de integrinas puede inducir la activación a receptores de la familia de EGFR. La agregación de β 1-integrina en fibroblastos humanos, inducida tanto por fibronectina como con anticuerpos entrecruzantes, es capaz de inducir la fosforilación de MAPK a través de la activación de EGFR (Miyamoto et al., 1996). De forma similar, el entrecruzamiento de integrinas por tenascina C en células de músculo liso así como la unión de fibroblastos y células endoteliales a una matriz de fibronectina induce la fosforilación de EGFR (Carpenter, 1999; Jones et al., 1997; Moro et al., 1998). A su vez, cuando células epiteliales mamarias HB2¹⁴ son sembradas sobre una matriz de

¹⁴ HB2: línea celular originada por el subclonado de células epiteliales luminales mamarias MTSV1-7 e inmortalizadas por la introducción del gen que codifica para el antígeno T del virus de simio 40 (SV40) (Bartek et al., 1991).

laminina 5, esta es capaz de sensibilizar a las células a la estimulación con EGF, con el consecuente aumento de la fosforilación de EGFR y ErbB2 (Alexi et al., 2011).

Así como la activación de EGFR y sus vías de señalización son reguladas por la MEC, la actividad de ErbB2 también es modulada por integrinas. La interacción de $\alpha 6$ - $\beta 4$ -integrina con ErbB2 en células NIH-3T3 es capaz de incrementar la actividad quinasa de PI3K y, por ende, la invasividad de dichas células (Gambaletta et al., 2000). Asimismo, se ha demostrado que el agregado de los receptores $\alpha 6$ - $\beta 4$ -integrina y $\alpha 6$ - $\beta 1$ -integrina mediante el uso de anticuerpos contra $\alpha 6$ -integrina inducen la fosforilación de ErbB2 en células tumorales mamarias BT-474¹⁵ (Falcioni et al., 1997). Teniendo en cuenta la vasta evidencia existente sobre la modulación de ErbB2 por la MEC, se propuso estudiar el efecto de la activación de receptores de MEC en la modulación ErbB2, particularmente sobre activación de Akt mediada por HRG.

2. DDR1 regula la Activación de Akt Mediada por HRG a Través de la Interacción con ErbB2

2.1 Colágeno tipo I es capaz de modular la respuesta a HRG en células MCF7

Dado que ErbB2 no posee ligandos descriptos, para el estudio de la modulación de ErbB2 por la MEC es necesaria su activación mediante la heterodimerización con otro receptor de su familia y la estimulación con ligandos como EGF o HRG. El EGF se une a su receptor quien puede homodimerizar o formar heterodímeros EGFR-ErbB2 (Holbro y Hynes, 2004; Olayioye et al., 2000). HRG, por el contrario, se une con alta afinidad a ErbB3. Este receptor no posee dominio quinasa activo por lo cual depende de la interacción con otros receptores para fosforilarse, predominantemente ErbB2 (Sliwkowski et al., 1994). De esta forma, al estimular células tumorales mamarias de la línea MCF7 con HRG, este ligando induce específicamente la heterodimerización de ErbB3 con ErbB2 lo que conduce a la activación de ErbB2 sin la formación de otros dímeros funcionales como sucedería con EGFR cuando las células son estimuladas con EGF.

¹⁵ BT-474: línea celular de carcinoma ductal mamario con alta expresión de ErbB2, sensible al tratamiento con Trastuzumab (Lasfargues et al., 1978).

ErbB3 posee seis sitios de unión a PI3K que señalizan principalmente por la vía de Akt (Holbro et al., 2003; Stern, 2008; Stoica et al., 2003). Esto fue demostrado en células MCF7 mediante el uso de inhibidores farmacológicos y anticuerpos monoclonales bloqueantes (Capítulo 1, Figura 10). Con el objetivo de estudiar el efecto de la activación de β 1-integrina por la MEC sobre la fosforilación de Akt por HRG, células creciendo sobre PDL (como sustrato control), fibronectina o colágeno tipo I fueron estimuladas con HRG durante 5 minutos y se evaluó el estado de fosforilación de Akt tanto por microscopía confocal cuantitativa como por Western blot utilizando el anticuerpo contra Akt fosforilado D9E (Cell Signaling). Las integrinas capaces de unir fibronectina son aquellas formadas por subunidades β 1 (α V- β 1, α 5- β 1 y α 8- β 1) y β 3 (α II- β 3 y α V- β 3), mientras que las integrinas que participan de la unión a colágeno son únicamente heterodímeros de β 1-integrina (α 1- β 1, α 2- β 1, α 10- β 1 y α 11- β 1) (Humphries et al., 2006). Las células MCF7 expresan β 1-integrina (Capítulo 1, Figura 9) y α V-integrina, pero no β 3-integrina (Taherian et al., 2011), por lo cual la unión a fibronectina se debe principalmente a la activación de dímeros α V- β 1-integrina. Por el contrario, laminina une tanto dímeros formados por β 1 y β 4-integrina, por lo cual se utilizó fibronectina y colágeno tipo I para activar de forma selectiva β 1-integrina.

Tanto por microscopía confocal cuantitativa como por Western blot fue posible determinar que al estimular células crecidas sobre colágeno con HRG, a diferencia de aquellas en fibronectina, se observan niveles de fosforilación de Akt menores al control (Figura 28-A y B). Esto se contrapone con lo observado en otras líneas tumorales mamarias donde al crecer sobre laminina y ser estimuladas con EGF la fosforilación de Akt, así como de otras vías de señalización asociadas a EGFR y ErbB2, se ven aumentadas (Alexi et al., 2011). Dado que tanto fibronectina como colágeno son capaces de activar β 1-integrina, pero sólo éste último es ligando para DDR1, se hipotetizó que sea este receptor el cual se encuentre modulando la activación de Akt en este modelo de estudio.

Partiendo de la observación de que Akt fosforilado se ubica en regiones circunscriptas de la membrana, se decidió estudiar si estas estructuras tienen relación con los *clusters* de ErbB2 anteriormente descritos. Se estimularon células MCF7 expresando la proteína de fusión ErbB2-TagRFP con 1nM de HRG durante 5 minutos y se marcó con un anticuerpo contra Akt fosforilado. Se observó que la mayor señal de Akt fosforilado se

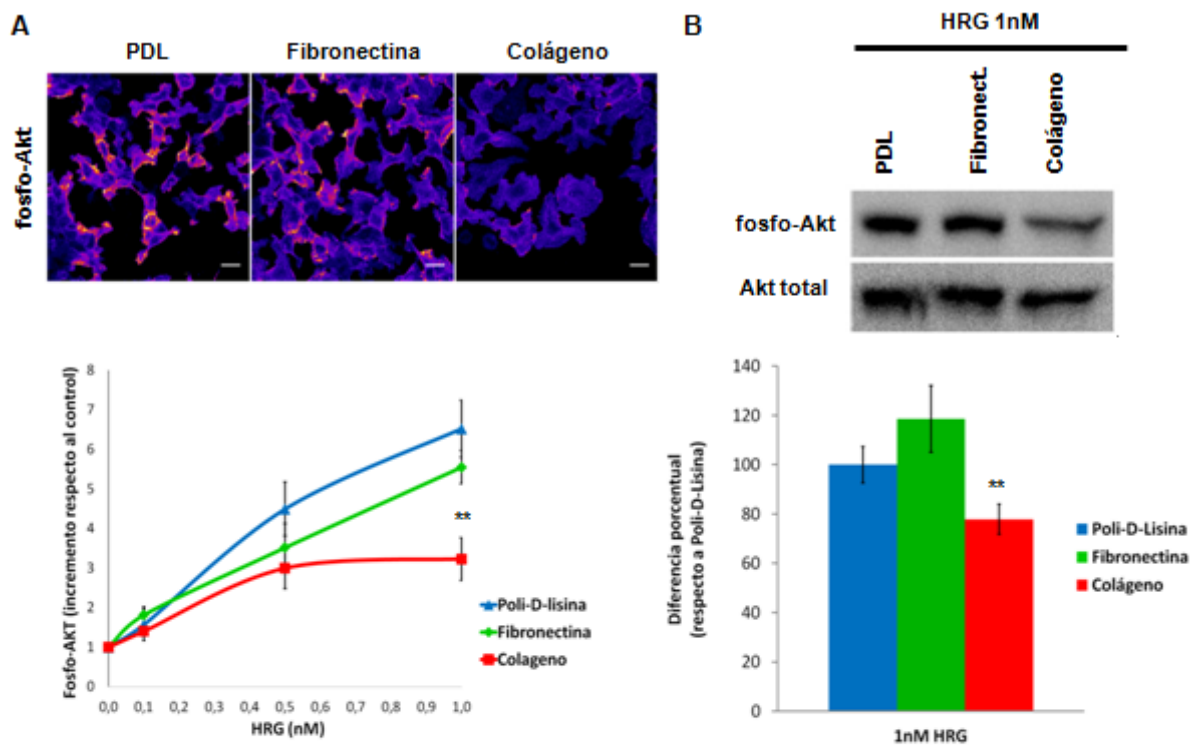


Figura 28. Efecto de la MEC sobre la fosforilación de Akt inducida por HRG. A- Células MCF7 sembradas sobre poli-D-lisina (PDL), fibronectina o colágeno tratadas con diferentes concentraciones de HRG durante 5 minutos, se fijaron con 4% PFA, 4% sacarosa en PBS y se tiñeron contra Akt fosforilado. Se adquirieron imágenes utilizando un microscopio confocal y se cuantificaron utilizando el software ImageJ. Se realizaron 3 experimentos independientes en los que se adquirieron y cuantificaron 10 imágenes cada uno. B- Células crecidas sobre diferentes sustratos se estimularon con 1 nM de HRG durante 5 minutos y fueron analizadas por Western blots para Akt fosforilado. Cuantificación de 3 experimentos independientes, \pm SEM. ** $p < 0,01$ vs. PDL y fibronectina. Barra de escala: 20 μ m.

detecta en dichos *clusters* de ErbB2 (Figura 29).

Se ha demostrado por experimentos de seguimiento de partículas individuales (*single-particle tracking*) que, inclusive sin estar unido a su ligando HRG, ErbB3 y ErbB2 se encuentran co-confinados en regiones conspicuas de la membrana (McCabe Pryor et al., 2015; Steinkamp et al., 2014). Estos dominios de membrana cumplirían la función de integrar físicamente la maquinaria de señalización a ser reclutada por dichas moléculas. De esta forma, al unir su ligando, ErbB3 tendría disponibilidad de proteínas

con las cuales interactuar y un contexto lipídico apropiado para la activación de PI3K, cuya función es necesaria para la fosforilación de Akt en este modelo (Capítulo 1, Figura 10). Esto a su vez es coherente con resultados de la literatura donde ErbB2 se localiza en *lipid rafts* (Mocanu et al., 2005). Estas regiones se encuentran enriquecidas en fosfatidilinositol (3,4) bifosfato y fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato, sustrato y producto respectivamente, de PI3K (Di Paolo y De Camilli, 2006). Además, estos dominios de membrana nuclean componentes de la maquinaria de señalización de la vía PI3K/Akt (Patra, 2008; Peres et al., 2003). De esta forma, los receptores no se encuentran dispersos en la membrana, sino en regiones circunscriptas de la misma, donde se observa tanto la forma fosforilada de Akt así como su maquinaria de señalización aguas arriba, dentro de las cuales se encuentra ErbB2.

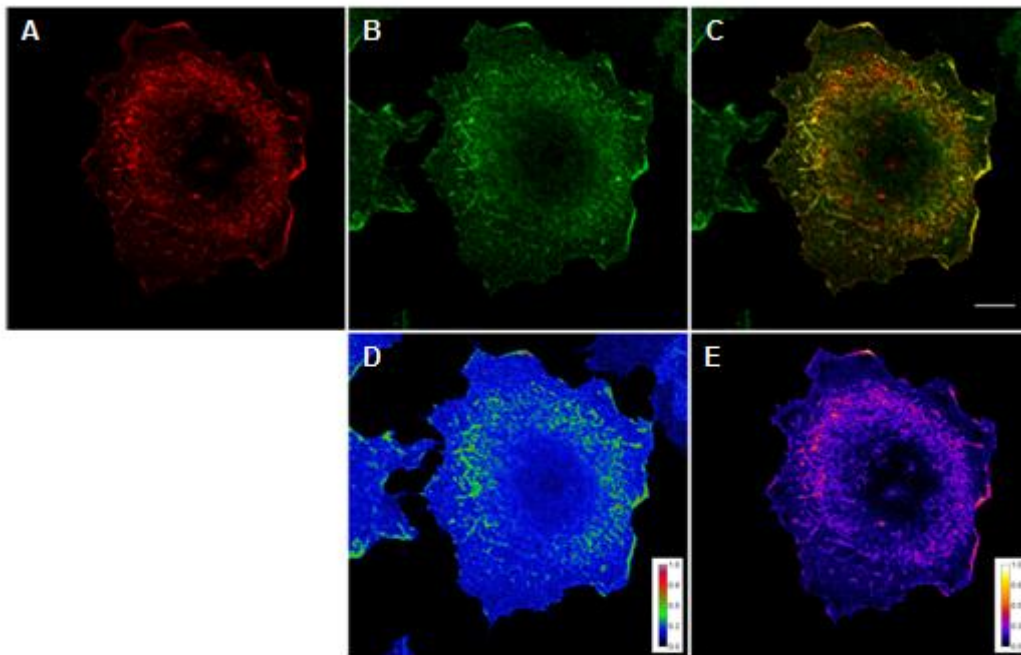


Figura 29. Localización física de la fosforilación de Akt inducida por HRG. Células MCF7 que expresan la proteína de fusión ErbB2-TagRFP. A- ErbB2-TagRFP. B- Inmunofluorescencia contra la forma fosforilada de Akt. C- Merge. D- Escala de colores que representa la intensidad de Akt fosforilado (relativizado al valor máximo). E- Mapa de Pearson que representa los pixeles colocalizantes entre ErbB2 y fosfo-Akt. Barra de escala: 10 μ m.

2.2 DDR1, a diferencia de β 1-integrina, es capaz de interactuar con ErbB2 en células tumorales mamarias

Como fue discutido anteriormente, existen dos principales familias de receptores de colágeno en células MCF7: β 1-integrina, que forma heterodímeros con diferentes subunidades α , y DDR1. Asimismo, dado que se observó una menor activación de Akt en células crecidas sobre colágeno se propuso que es DDR1 y no β 1-integrina el responsable de dicha regulación. Con el objetivo de estudiar la localización física de dichos receptores, se realizaron inmunomarcaciones para β 1-integrina y DDR1 en células MCF7 que expresan la proteína de fusión ErbB2-TagRFP. Fue posible observar que, al igual que ErbB2, DDR1 se encuentra en dominios conspicuos de membrana (Figura 30-A y B). Además, a diferencia de β 1-integrina, este receptor posee un alto nivel de colocalización con ErbB2 (Figura 30-C) el cual no se ve afectado por el tipo de sustrato: fibronectina o colágeno.

Con el objetivo de evaluar si esta asociación es un artefacto dado por la expresión exógena de ErbB2, necesaria para la detección por microscopía de fluorescencia en células MCF7, se repitió el experimento utilizando células SKBR3, las cuales poseen altos niveles endógenos de dicho receptor (Capítulo 1, Figura 9). Para esto se realizaron inmunomarcaciones para β 1-integrina y DDR1 de la misma forma que para MCF7, mientras que el ErbB2 endógeno se marcó utilizando el anticuerpo primario Trastuzumab conjugado con el fluoróforo Alexa488. Los resultados obtenidos en esta línea celular están en concordancia con los obtenidos para MCF7. Fue posible observar que ErbB2 y DDR1, pero no β 1-integrina, colocalizan en dominios de membrana (Figura 31-C), cuya coexistencia tampoco se vio afectada por el sustrato (Figura 31-A y B). Teniendo esto en cuenta, se propone que sería la interacción con DDR1, y no con β 1-integrina, la responsable de la modulación en la fosforilación de Akt inducida por HRG observada en colágeno.

Para estudiar la interacción física entre ErbB2 y los receptores de colágeno, se realizaron experimentos de *pull down*. Para esto, se cotransfectaron células COS-7 con la construcción ACP-ErbB2 junto con cada uno de los siguientes plásmidos:

- ErbB2-mYFP¹⁶
- β 1-integrina-ECFP
- DDR1-ECFP

Mediante la utilización de biotina-coA como sustrato de la enzima *ACPwtS*, es posible la transesterificación de dicha biotina a una serina en la secuencia consenso (ACP) de la proteína de fusión ACP-ErbB2 (Materiales y Métodos 7.2, Figura 8). De esta forma, el receptor en la membrana externa, pero no en el aparato de Golgi o retículo endoplásmico, es específicamente biotinilado lo que permite precipitarlo utilizando estreptavidina-sefarosa (Figura 32-A). La presencia de los receptores en el precipitado se determinó por Western blot por medio de anticuerpos específicos para β 1-integrina y DDR1, los que permiten detectar tanto la proteína endógena como la sobreexpresada, así como con un anticuerpo policlonal para GFP¹⁷.

El Western blot para GFP muestra bandas para ErbB2 y DDR1. Esto corrobora la homodimerización de ErbB2 descrita en la literatura, ya que ErbB2-mYFP se asocia con ACP-ErbB2 el cual es selectivamente biotinilado y precipitado (Figura 32-B). Por otro lado, es posible observar una banda para DDR1-ECFP tanto al revelar con un anticuerpo contra GFP como con un anticuerpo específico para DDR1, lo que sugiere que este receptor se asocia a ErbB2 en la membrana externa de las células (Figura 32-B). Asimismo, β 1-integrina no es detectable en el precipitado, lo que respalda la idea que la interacción sería sumamente lábil o nula. De esta forma se determinó que DDR1, pero no β 1-integrina, es capaz de interactuar con ErbB2 en la membrana de células COS-7 que sobreexpresan dichos receptores, ya que ambos receptores coprecipitan.

Para determinar si la interacción observada entre las proteínas de fusión ocurre también en la membrana de las células MCF7 y SKBR3, se realizaron inmunoprecipitaciones para ErbB2 y DDR1 con anticuerpos específicos. Con el objetivo de estudiar si existe interacción entre ambas proteínas a niveles de expresión de ErbB2 bajos, y dado que la técnica de Western blot tiene mayor sensibilidad que la inmunofluorescencia, se utilizaron células MCF7 no transfectadas para este experimento.

¹⁶ La cotransfección con ErbB2-mYFP se utilizó como control positivo ya que está descrita la homodimerización de dicho receptor (Nagy et al., 2010; Szabó et al., 2008).

¹⁷ Esto es posible ya que tanto ECFP como mYFP fueron desarrolladas a partir de mutaciones puntuales de GFP (Shaner et al., 2007), que son reconocidas por un anticuerpo policlonal contra esta proteína fluorescente.

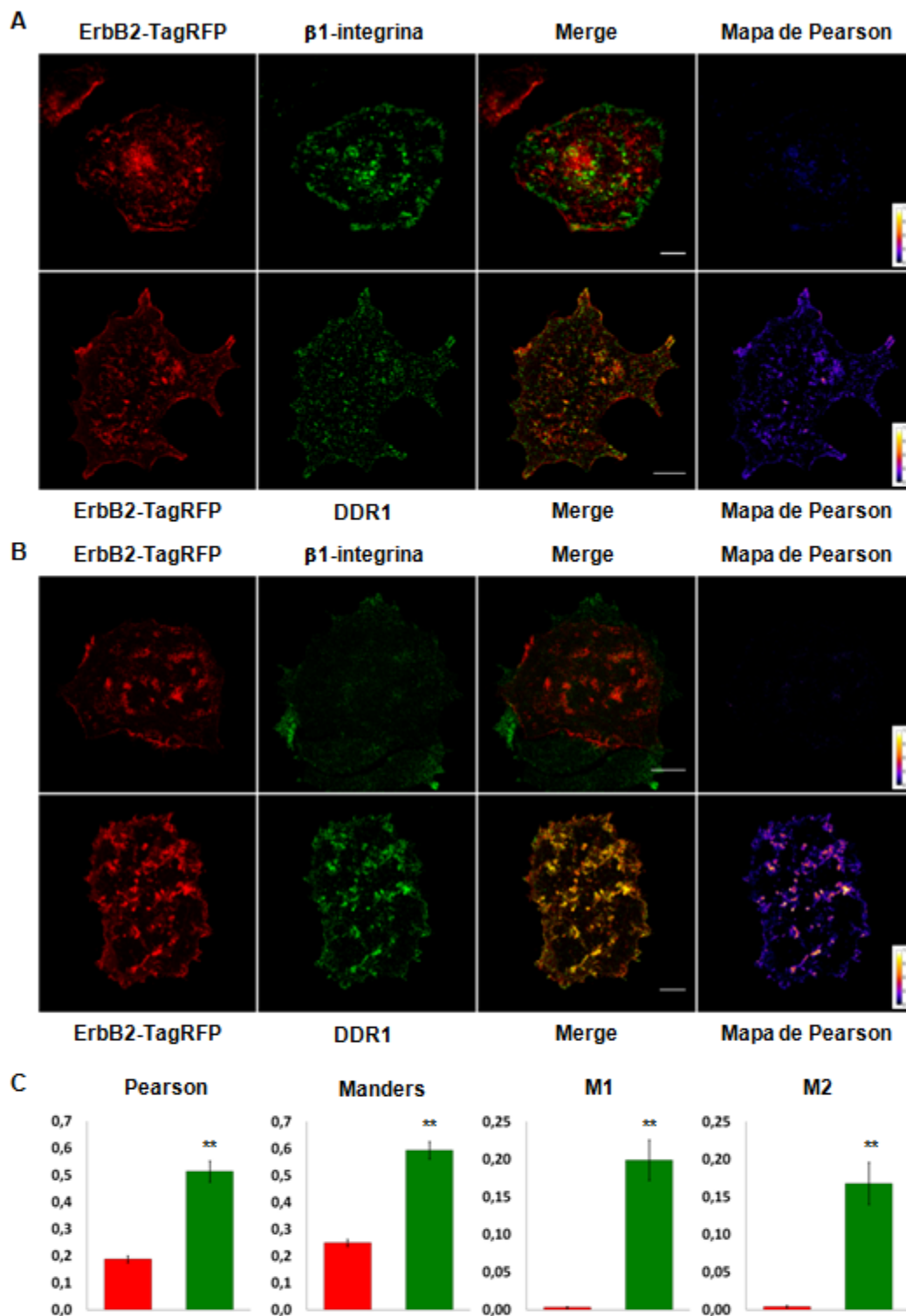


Figura 30. Colocalización de β 1-integrina y DDR1 con ErbB2 en células MCF7.
A- Inmunofluorescencia para DDR1 y β 1-integrina en células MCF7 que expresan la proteína de fusión ErbB2-TagRFP sembradas sobre una matriz de fibronectina. **B-** Células sembradas sobre colágeno. **C-** Cuantificación del coeficiente de correlación de Pearson, coeficiente de superposición de Manders, M1 y M2. β 1-integrina: barras rojas, DDR1: barras verdes. \pm SEM, n=23. ** p<0,01 vs. β 1-integrina. Barra de escala: 10 μ m

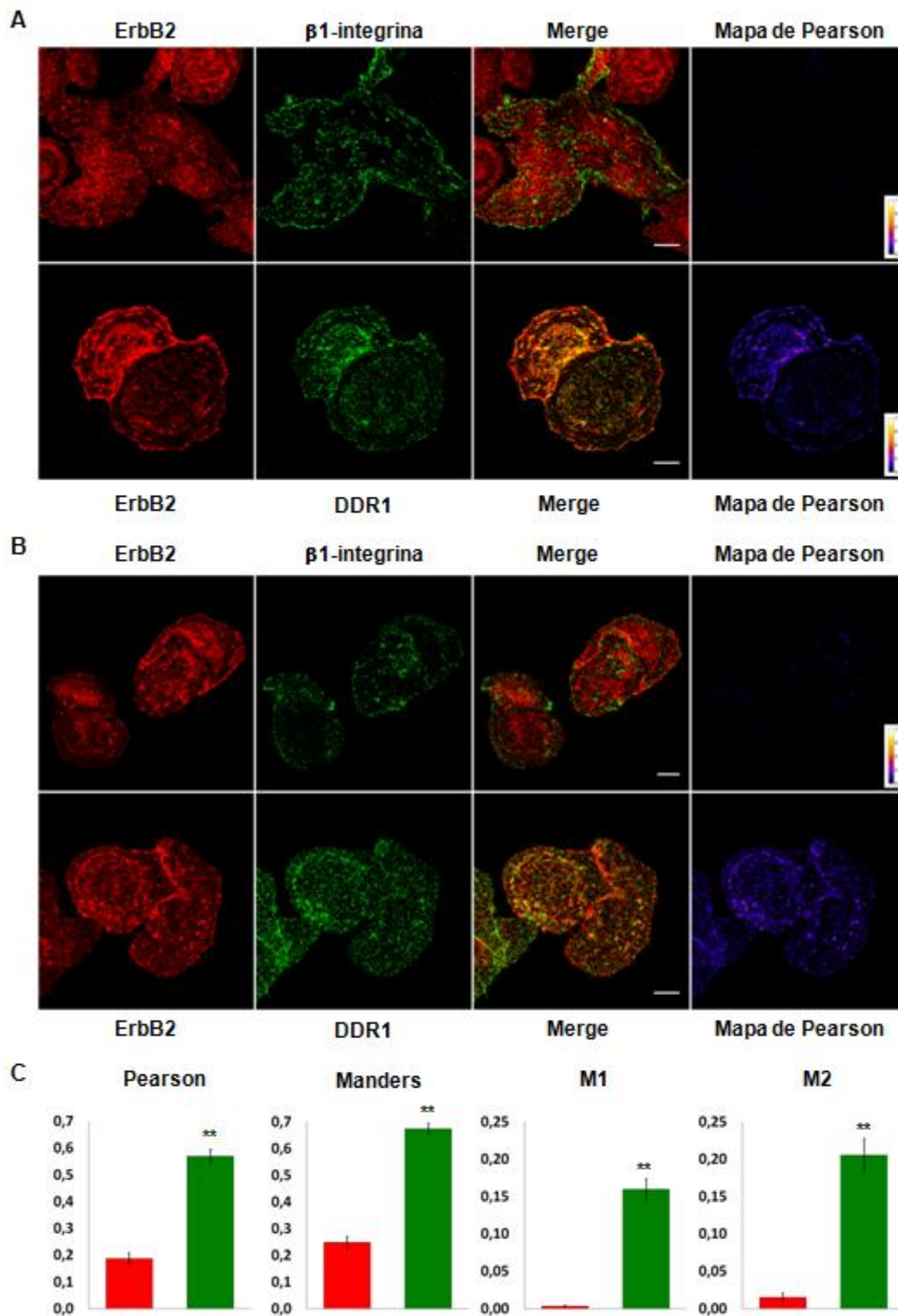


Figura 31. Colocalización de β 1-integrina y DDR1 con ErbB2 en células SKBR3.
A- Inmunofluorescencias para ErbB2, DDR1 y β 1-integrina en células SKBR3 sembradas sobre una matriz de fibronectina. **B-** Células SKBR3 sembradas sobre colágeno. **C-** Cuantificación del coeficiente de correlación de Pearson, coeficiente de superposición de Manders, M1 y M2. β 1-integrina: barras rojas, DDR1: barras verdes. \pm SEM, n=22. ** $p < 0,01$ vs. β 1-integrina. Barra de escala: 10 μ m

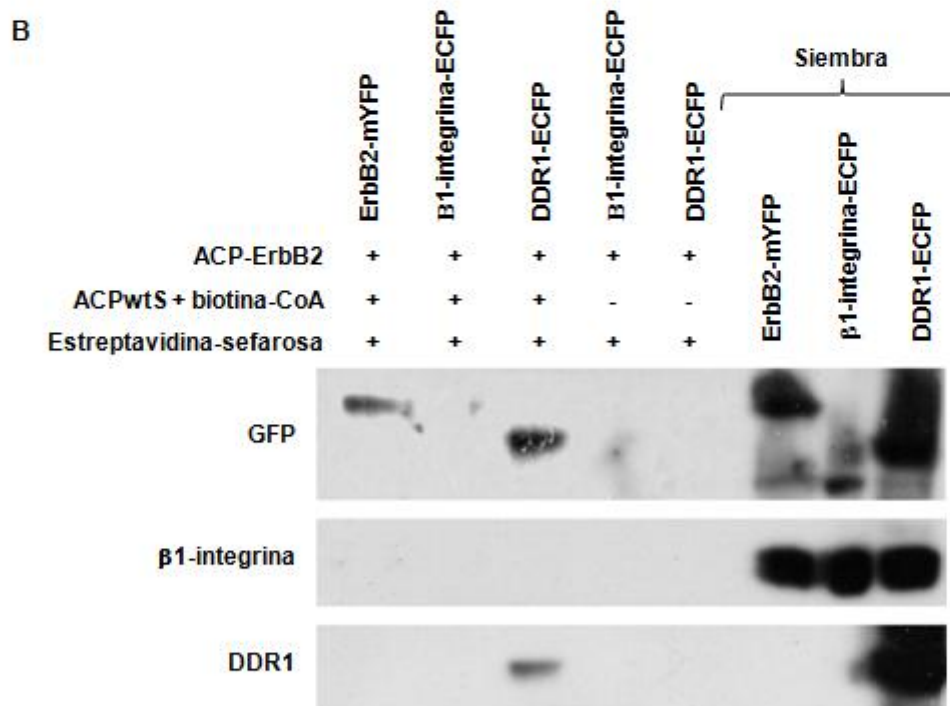
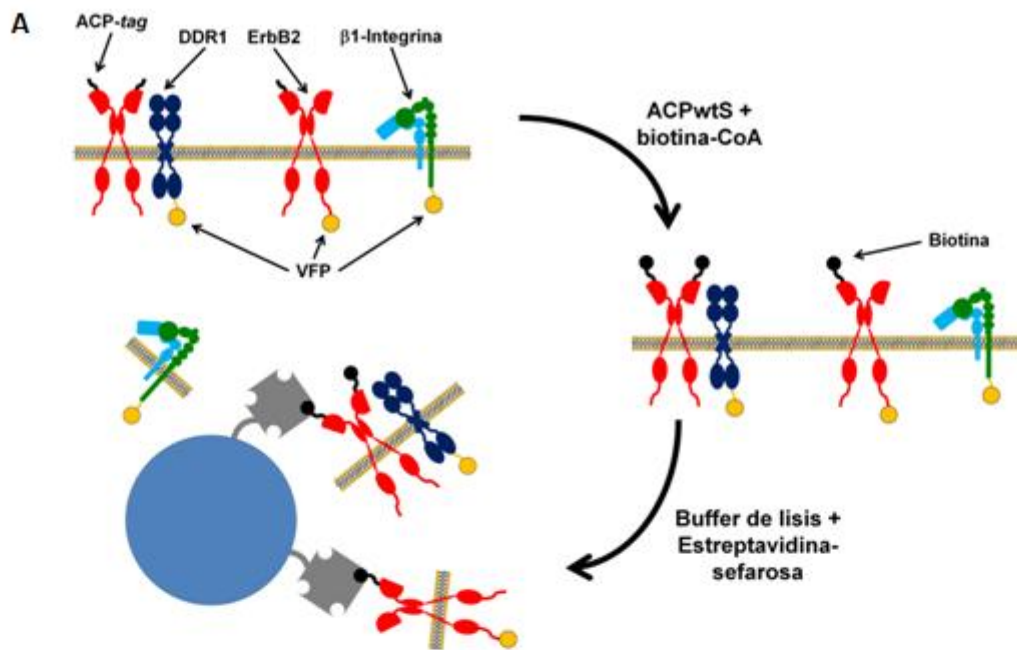


Figura 32. Ensayos de pull-down con ACP-ErbB2. A- Células Cos7 cotransfectadas con ErbB2 unido a un ACP-tag y ErbB2-mYFP (como control positivo), DDR1-ECFP o β 1-Integrin-ECFP (representadas en la figura como VFP, de *Visual Fluorescence Proteins*). Utilizando ACP-Sintasa purificada (ACPwtS) y biotina-CoA, el ErbB2 en la membrana extracelular fue específicamente biotinilado y se precipitó con estreptavidina-sefarosa. B- Western blot para GFP (revela tanto mYFP como ECFP), β 1-integrina y DDR1

Lisados celulares fueron incubados con Trastuzumab para precipitar ErbB2 o con un anticuerpo monoclonal específico contra DDR1 (D1G6, Cell Signalling). La precipitación de los inmunocomplejos se realizó utilizando proteína A-sefarosa. Dichos precipitados fueron desnaturalizados y las muestras se corrieron y reveladas para ambos receptores por Western blot.

Se pudo determinar que dicha interacción ocurre en células MCF7 (Figura 33-A). En este modelo, al inmunoprecipitar ErbB2 con Trastuzumab se observa una banda clara para DDR1, mientras que al inmunoprecipitar DDR1 la banda para ErbB2 no es visible. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que, dado los bajos niveles de expresión endógena de ErbB2 en MCF7, la cantidad de proteína precipitada es demasiado baja para ser detectada. Este mismo ensayo realizado en células SKBR3 permite evidenciar que ambas proteínas coinmunoprecipitan, aún cuando las diferencias en los niveles de expresión son altas (Figura 33-B). Estos resultados nos permiten concluir que ambos receptores interactúan en células tumorales mamarias independientemente de sus niveles de expresión.

2.3 DDR1 se coexpresa con ErbB2 en la glándula mamaria

Como se demostró anteriormente, ErbB2 y DDR1 coexisten en dominios conspicuos de membrana. A su vez, dicha interacción no se ve alterada por los niveles de expresión de ambas proteínas o la naturaleza de la MEC. Con el objetivo de ahondar aún más en dicha interacción, se estudió la coexpresión DDR1, ErbB2 y ErbB3 utilizando la base de datos COXPRESdb (<http://coxpresdb.jp/>).

COXPRESdb (siglas que provienen del inglés *COeXPRESsed gene databa*se) es una herramienta en línea que permite, entre otras cosas, correlacionar la expresión de varios genes entre sí y obtener datos de expresión génica en un determinado tejido (Obayashi et al., 2008). Esta base de datos fue creada en el año 2007, provee información sobre la expresión por *microarrays* de 40.813 genes (19.777 humanos y 21.036 de ratón) y permite generar redes de coexpresión en hasta 63 tejidos humanos. Actualmente, en su versión 6.0, la base de datos ampliada a 10 especies diferentes y con información tanto de *microarrays* como de RNAseq (Okamura et al., 2015).

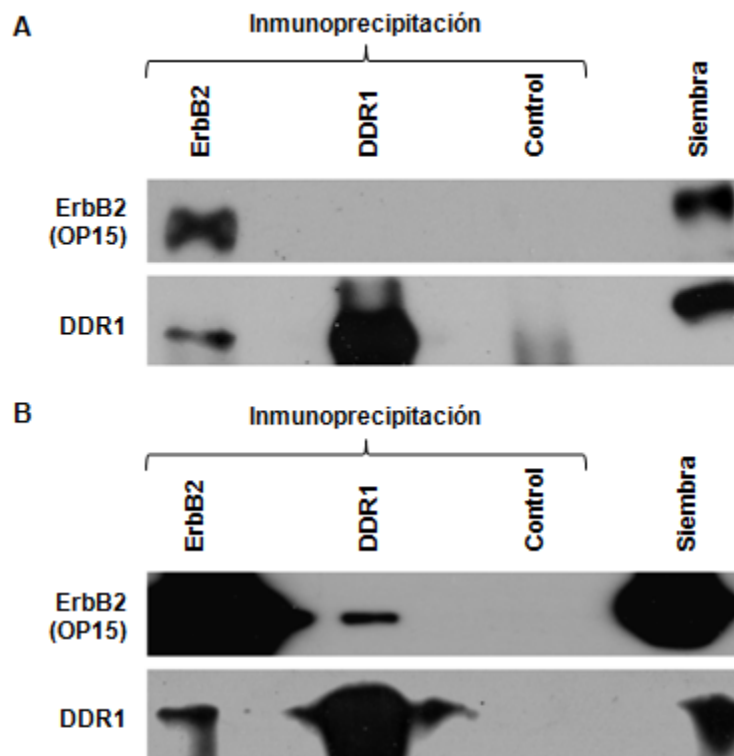


Figura 33. ErbB2 y DDR1 coimmunoprecipitan independientemente de sus niveles de expresión. Células MCF7 fueron lisadas en 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl y 1% NP40 con inhibidores de proteasas. 500 μ g de proteínas fueron incubadas con 10 μ g de Trastuzumab, 5 μ L de anticuerpo anti-DDR1 (D1G6, Cell Signaling) o 5 μ L de IgG control durante 16 horas a 4°C en agitación. Se utilizó proteína A-sefarosa para precipitar los inmunocomplejos y se corrieron Western blot para ErbB2 y DDR1. **A-** Células MCF7. **B-** Células SKBR3

Utilizando esta herramienta, se generaron gráficos de expresión para cada par de genes (ErbB2 vs. DDR1, ErbB3 vs. DDR1 y ErbB2 vs. ErbB3), donde se representó el logaritmo en base 2 de la expresión génica en cada tejido relativizada al valor promedio, y se determinó el coeficiente de correlación de Pearson para cada dupla. Como es posible observar en los gráficos de coexpresión generados a partir de *microarrays* de múltiples tejidos, la expresión de DDR1 correlaciona con la de ErbB2 (Figura 34-A, D y Tabla 5) y los máximos niveles de coexpresión se alcanzan en muestras de glándula mamaria normal.

Asimismo, la expresión de ErbB3 también correlaciona con la de DDR1 (Figura 34-

B, D y Tabla 5), inclusive a valores de correlación similares a los que tiene con ErbB2 (Figura 34-C y Tabla 5), cuya relación funcional ha sido extensamente estudiada. Por el contrario, β 1-integrina, producto del gen ITGB1, no es coexpresada con ErbB2 o ErbB3 (Tabla 5).

A lo largo de este capítulo se ha demostrado la coexistencia física entre ErbB2 y DDR1 en dominios conspicuos de membrana, los mismos en los que Akt es fosforilado luego de la estimulación con HRG, así como la interacción física entre dichos receptores. La coexpresión de DDR1, ErbB2 y ErbB3 aporta evidencias a nuestra hipótesis, en la cual este receptor de colágeno acta como regulador de la activación de ErbB2 por ErbB3, a través de su ligando HRG, con la consecuente fosforilación de Akt mediada PI3K.

Gen 1	Gen 2	r
ERBB2	DDR1	0,32
ERBB2	ITGB1	0,08
ERBB2	ERBB3	0,33
ERBB3	DDR1	0,37
ERBB3	ITGB1	0,08

Tabla 5. Coeficiente de correlación de Pearson para la expresión de DDR1, ITGB1, ERBB2 y ERBB3. Mientras la coexpresión de ErbB2 y el gen que codifica para β 1-integrina es baja, DDR1, ErbB2 y ErbB3 tiene valores de correlación similares entre sí. r: coeficiente de correlación de Pearson.

3. Conclusiones

Las integrinas juegan un papel crucial en la fisiología celular. Asimismo, su participación en la fisiopatología del cáncer ha cobrado importancia en los últimos años (Cabodi et al., 2010a, 2010b; Pontier y Muller, 2009). Se ha demostrado que las integrinas, principalmente β 1-integrina, participan en procesos de invasividad y resistencia

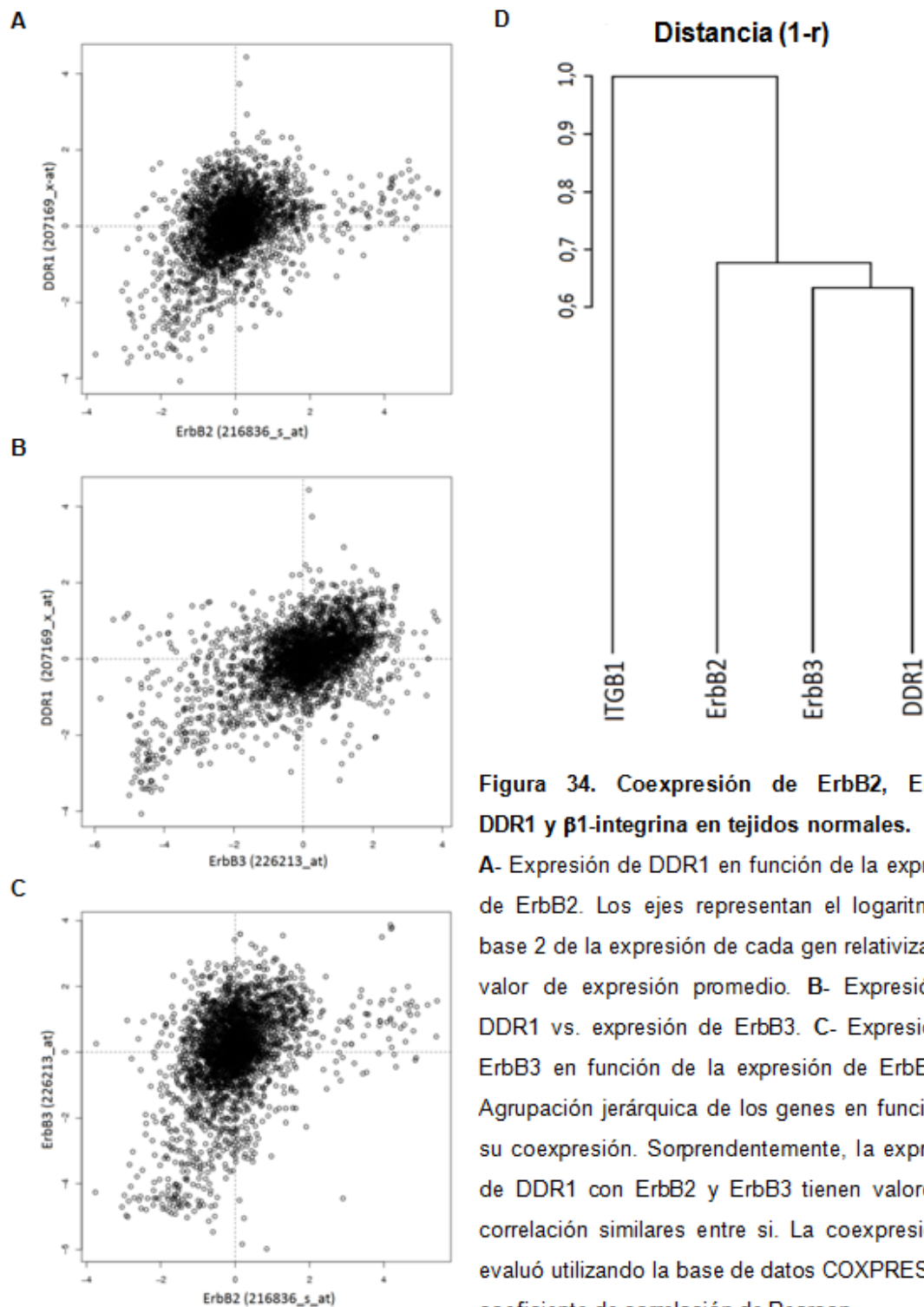


Figura 34. Coexpresión de ErbB2, ErbB3, DDR1 y β 1-integrina en tejidos normales.

A- Expresión de DDR1 en función de la expresión de ErbB2. Los ejes representan el logaritmo en base 2 de la expresión de cada gen relativizado al valor de expresión promedio. **B-** Expresión de DDR1 vs. expresión de ErbB3. **C-** Expresión de ErbB3 en función de la expresión de ErbB2. **D-** Agrupación jerárquica de los genes en función de su coexpresión. Sorprendentemente, la expresión de DDR1 con ErbB2 y ErbB3 tienen valores de correlación similares entre sí. La coexpresión se evaluó utilizando la base de datos COXPRESdb. r : coeficiente de correlación de Pearson.

a tratamientos como Trastuzumab y Tamoxifeno (Lesniak et al., 2009; Pontiggia et al., 2012; Sampayo, 2015), dándole mayor importancia a su regulación e interactómica, por lo que se las considera un potencial blanco terapéutico (Desgrosellier y Cheresch, 2010).

Otros receptores de matriz extracelular han captado la atención de los investigadores en los últimos años, entre ellos DDR1. Este inusual receptor tirosina-quinasa que al igual que ErbB2 forma dímeros en estado quiescente (Mihai et al., 2009), ha sido propuesto como marcador de mala prognosis en diferentes modelos tumorales (Leitinger, 2014; Miao et al., 2013; Yang et al., 2014). Por el contrario, en cáncer de mama, dada su complejidad y variabilidad según la población celular de la cual provenga el tumor, no existe una clara correlación entre la expresión de DDR1 y la prognosis de dicha enfermedad (Valiathan et al., 2012).

Los experimentos anteriormente mostrados revelan que el colágeno, pero no fibronectina, es capaz de regular la fosforilación de Akt inducida por HRG en células tumorales mamarias. Dicha fosforilación ocurre en dominios definidos de la membrana, donde se encuentran no solo la forma fosforilada de Akt, sino también ErbB2 y DDR1. Asimismo, se demostró también que DDR1 interactúa con ErbB2 en la membrana plasmática independientemente de sus niveles de expresión.

Por otro lado, se analizó la coexpresión de DDR1, ErbB2 y ErbB3 en bases de datos de tejidos normales. La expresión de DDR1 se correlaciona con la de ErbB2 y ErbB3. Llamativamente, la coexpresión de DDR1 con cada receptor tiene niveles similares a la determinada para ErbB2 y ErbB3 entre sí, los cuales tienen una relación funcional extensamente estudiada. En su conjunto, esta evidencia respalda la hipótesis postulada, en la cual DDR1 actúa como modulador de la vía PI3K/Akt activada por HRG.

Este trabajo propone una función novedosa para DDR1 como modulador de la función de ErbB2. Si bien es necesario ahondar en la relevancia biológica de los efectos aquí observados, los resultados muestran una interrelación física y funcional. Dicha interacción puede ser caracterizada por técnicas de microscopía avanzadas como FRET, STORM de dos colores o dcFCCS¹⁸, las cuales permitirán determinar si la interacción física es directa, mediada por otras proteínas o por el confinamiento en dominios lipídicos de la membrana. También será relevante estudiar los mecanismos por los cuales DDR1

¹⁸ dcFCCS: del inglés *dual colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*, es una técnica que permite estudiar cómo se correlacionan los cambios en la fluorescencia de dos proteínas marcadas en el tiempo (Fitzpatrick y Lillemeier, 2011).

regula la vía de PI3K/Akt y que proteínas están involucradas. Estos estudios permitirían un mayor entendimiento del sistema, lo cual puede tener, junto con el desarrollo de inhibidores farmacológicos específicos para DDR1 (Kim et al., 2013; Murray et al., 2015), gran potencialidad terapéutica.

Dada la heterogeneidad que existe entre tumores de mama y la dificultad que esto trae al momento del análisis y diagnóstico, es tal vez donde la expresión de DDR1 no deba ser considerada en forma aislada como un marcador de pronóstico, sino un componente más que debe ser interrelacionado con la expresión y/o activación de otras proteínas. Considerando la coexpresión ya demostrada en tejidos normales, es necesario ahora realizar más extensos y complejos estudios de bioinformática, que correlacionan no solo la expresión de ErbB2, ErbB3 y DDR1 en muestras de tumores mamarios, sino también otros factores como el subtipo (luminal A, luminal B, basal o HER2 positivo), terapias previas y pronóstico de la enfermedad. Es aquí donde el desarrollo de métodos bioestadísticos y el análisis en bases de datos de transcriptómica de tumores pueden generar avances cruciales en la capacidad diagnóstica para esta patología.

Conclusiones Finales y Discusión

La Matriz Extracelular

El microambiente tumoral juega un papel crucial en el desarrollo del cáncer y sus propiedades físicas y bioquímicas influyen sobre la progresión tumoral. La MEC es un soporte físico que regula la disponibilidad de hormonas y factores de crecimiento y actúa como un reservorio o barrera que permite la generación de gradientes. La MEC puede regular la mitosis, inclusive afectando la correcta localización de los centríolos lo que induzca una división celular asimétrica (Lu et al., 2012; Pickup et al., 2014). El entendimiento de su composición, topografía, regulación e interacción con las células que componen el tumor, tanto transformadas como células normales reclutadas por éstas (macrófagos, fibroblastos, etc.), puede contribuir a la comprensión de los procesos de invasión y metástasis así como al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La interacción entre la MEC, ligandos solubles y sus receptores de membrana constituyen un sistema complejo y dinámico que es factible de ser regulado en múltiples niveles, representando un gran desafío para su estudio dada su complejidad y heterogeneidad entre modelos de estudio.

En la actualidad existen fármacos en fase de ensayos clínicos cuyo blanco terapéutico son receptores de la MEC. Entre ellos puede destacarse un pentámero cíclico de secuencias RGD, el Cilengitide (EMD 121974) (Dechantsreiter et al., 1999). Esta molécula actúa como inhibidor competitivo específico para integrinas de unión a fibronectina y fue la primera de su tipo que mostró resultados en ensayos clínicos de fase 2 (Reardon et al., 2008). Otros compuestos, como el anticuerpo monoclonal bloqueante contra αV -integrina Intetumumab (CNTO 95) han sido llevados a estudios clínicos con resultados prometedores (Fang y DeClerck, 2013). La identificación de drogas que disrumen el contacto célula-MEC con acción terapéutica comprobada refuerza el paradigma actual de la oncología, donde el microambiente tumoral ha tomado protagonismo como un blanco terapéutico de gran potencialidad clínica.

Los Receptores de la Familia de ErbB y la MEC

Durante el presente trabajo de tesis se han relevado los conocimientos disponibles

sobre la interacción de las células en cultivo con ciertos componentes de la MEC, las proteínas de membrana que participan de estos procesos y los mecanismos moleculares que permiten integrar las señales extracelulares e internas para controlar procesos celulares complejos como la proliferación, la diferenciación o la migración celular, entre otros. El objeto de estudio de esta tesis ha sido la regulación de ErbB2 como elemento indispensable en la señalización de ErbB3 activado por HRG en células tumorales mamarias, así como su interacción con receptores encargados de sensar la MEC, particularmente β 1-integrina y DDR1.

ErbB2 cumple un papel crucial en la progresión tumoral, particularmente del cáncer de mama (Borg et al., 1994; Eroles et al., 2012; Hynes y Lane, 2005). Se ha probado que este receptor de la familia de EGFR interactúa con integrinas como α 5, β 4 y β 1-integrina, cuya integración de señales determina el fenotipo tumoral y regula procesos como migración y metástasis. Asimismo, ha sido objeto de discusión si la interacción entre ErbB2 y β 1-integrina ocurre por la regulación de vías de señalización comunes o a través de la heteroasociación física directa entre ellos. Se ha demostrado que en células en suspensión ErbB2 y β 1-integrina coexisten en regiones definidas de la membrana (Fazekas et al., 2008; Mocanu et al., 2005). Esto es contradictorio con nuestros resultados en células adheridas a superficies recubiertas con fibronectina o colágeno, donde se observó que β 1-integrina se encuentra formando complejos de adhesión focal físicamente separados de los *clusters* de ErbB2 (Figuras 23, 30 y 31).

En vista de los resultados expuestos en este trabajo, proponemos un modelo que permite consensuar los datos de la literatura con aquellos aquí exhibidos. Cuando las células se encuentran en suspensión, β 1-integrina y DDR1 están inactivos y coexistiendo con ErbB2 en complejos de membrana cuya identidad ha sido atribuida a *lipid rafts* en la literatura (Mocanu et al., 2005) (Figura 35-A). La activación de β 1-integrina por la unión a la MEC induce su agregación y acoplamiento a otras proteínas en complejos de adhesión focal. Si bien los focos de adhesión son estructuras dinámicas y complejas, ErbB2 no forma parte de ellas. En este trabajo hemos sido capaces de identificar un patrón constante en el cual ErbB2 se encuentra fuera de los complejos de adhesión focal en contacto con DDR1 independientemente de la identidad del sustrato sobre el cual se adhiera la célula (Figura 35-B).

La formación de los complejos de adhesión focal induce la fosforilación de

moléculas señalizadoras FAK, ILK o Src, entre otras, las cuales activan vías de señalización como ERK1/2 y Akt (Boudreau y Jones, 1999; Cabodi et al., 2010a; Mitra y Schlaepfer, 2006). Estas señales son necesarias para la supervivencia en células adherentes. La disrupción de estos complejos, como por ejemplo el tratamiento con Cucurbitacina I, compromete la viabilidad celular.

A diferencia de lo que sucede con β 1-integrina, se determinó que DDR1 permanece acoplado a ErbB2 en regiones específicas de la membrana (Figuras 30 y 31). Además, se comprobó la existencia de interacción física entre estos receptores, de forma independiente de los niveles de expresión de ambas proteínas (Figuras 32 y 33) lo que demuestra que dicha asociación es sumamente estable.

Asimismo, al sembrar células sobre una matriz de fibronectina esta induce el acoplamiento de β 1-integrina a complejos de adhesión focal sin la activación de DDR1. Cuando se estimulan dichas células con HRG, se promueve la formación de heterodímeros ErbB2-ErbB3 con la consecuente activación de PI3K y fosforilación de Akt (Figura 36-A). Por el contrario, la matriz de colágeno induce tanto el reclutamiento de β 1-integrina a los focos de adhesión como la activación de DDR1. Dicha activación inhibe parcialmente la fosforilación de Akt gatillada por HRG a través de una vía aún no descrita, como podría ser la inhibición de PI3K, la activación de PTEN¹⁹ o el reclutamiento de fosfatasas de Akt (Figura 36-B). De esta forma, proponemos que β 1-integrina podría actuar sobre ErbB2 durante la adhesión o migración modificando los *clusters* de membrana y con ello la estructura de esos complejos, como ha sido descrito para otros miembros de su familia de receptores como EGFR (Miyamoto et al., 1996). Además, la unión de β 1-integrina a sus ligandos activa cascadas de señales comunes con ErbB2 que podrían regular conjuntamente el destino celular y la expresión génica. Por el contrario, al interactuar con ErbB2, DDR1 podría cumplir una función de regulación fina de la activación de Akt a nivel de la membrana.

La vía PI3K/Akt es una vía de señalización aguas abajo de muchos oncogenes, como HER2/neu, cuyo producto proteico es el receptor tirosina-quinasa ErbB2. Esta vía es inductora de la proliferación celular y su activación contribuye a la progresión tumoral, migración, metástasis y, particularmente en el cáncer de mama, juega un papel

¹⁹ PTEN: del inglés *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*, es una fosfatasa que cataliza la defosforilación de PIP3 a PIP2, inhibiendo así el reclutamiento de Akt a la membrana y, por ende, su activación (Georgescu, 2010).

importante en la resistencia a terapias endócrinas (Fresno Vara et al., 2004; Xue y Hemmings, 2013). Todo esto ha llevado al desarrollo de estrategias terapéuticas que modulen o bloqueen dicha vía, como anticuerpos monoclonales bloqueantes o inhibidores específicos de su dominio quinasa (Yarden y Pines, 2012). Dada la importancia que la vía de Akt tiene en la progresión tumoral y el papel clave que cumple en la actividad oncogénica de ErbB2 (She et al., 2008), el estudio de su regulación es de gran relevancia tanto en el ámbito de la ciencia básica como en la oncología aplicada. En este trabajo proponemos un nuevo elemento regulador de la activación de Akt en células tumorales mamarias: el receptor tirosina-quinasa para colágeno DDR1.

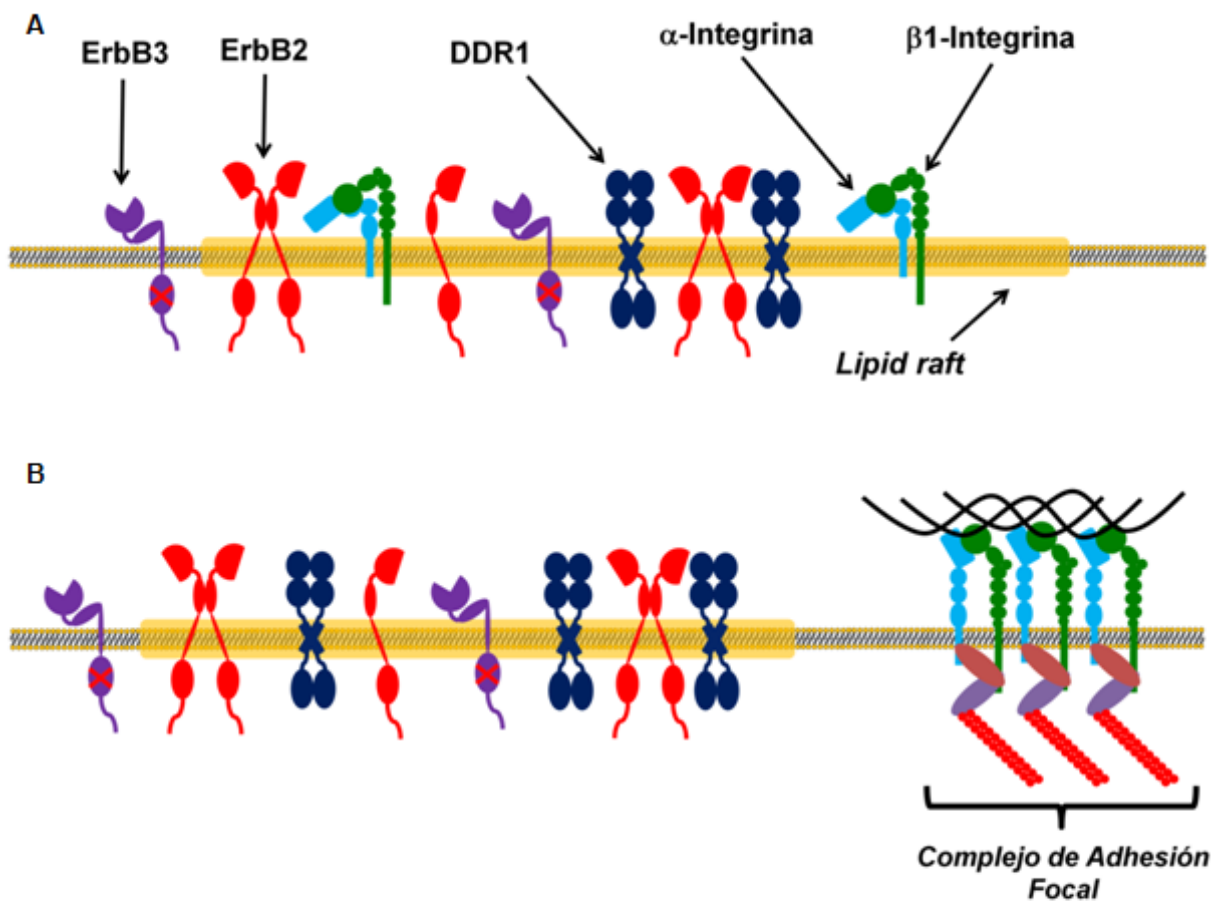


Figura 35. Modelo de *cluster* de membrana en células en suspensión y adheridas. A- En células en suspensión, todos los receptores coexisten en dominios de membrana definidos. B- Al unir su ligando y activarse las integrinas se liberan de dichas estructuras y forman parte de los complejos de adhesión focal.

DDR1 y la Glándula Mamaria

Análisis bioinformáticos mostraron que la expresión de ErbB2 y DDR1 presenta una alta correlación en la glándula mamaria. La expresión de ErbB2 es crucial en el desarrollo de esta glándula, participando de la morfogénesis de los ductos y el desarrollo lóbuloalveolar así como durante la lactancia (Andrechek et al., 2005; Jackson-Fisher et al., 2004; Jones y Stern, 1999; Niemann et al., 1998). Por otro lado, la pérdida de expresión de ErbB3 muestra un fenotipo similar al observado con células *knock out* para ErbB2, donde la formación de ductos y el desarrollo alveolar se ven comprometidos (Jackson-Fisher et al., 2008). En este proceso de desarrollo es crítica la activación de PI3K por ErbB3 (Lahlou et al., 2012). Se comprobó además que HRG es necesaria para la proliferación y diferenciación del epitelio mamario, especialmente en la formación de alvéolos secretorios (Jones et al., 1996). Estos hallazgos apoyan la idea de que la regulación de la fosforilación de Akt gatillada por HRG por DDR1, estudiada en esta tesis, sería activa durante el desarrollo de la glándula mamaria y su desregulación podría contribuir a la progresión tumoral.

Por el contrario, ratones *knock out* para DDR1 muestran una reducción en la elongación ductal pero con un epitelio mamario hiperproliferativo que compromete la diferenciación epitelial en los acinos y la secreción de leche, lo que conduce a una glándula con gran cantidad de alvéolos no funcionales (Vogel et al., 2001). Se ha demostrado también que la activación de DDR1 induce la expresión de MMP2, 7, 9 y 14 en diferentes modelos celulares (Valiathan et al., 2012). Dado que la elongación de los ductos requiere de la función de MMP para el remodelado de la MEC (Wiseman et al., 2003), DDR1 cumpliría un doble papel en el desarrollo de la glándula mamaria: modulando la proliferación celular estimulada por la activación de la vía ErbB2/ErbB3/PI3K y definiendo la arquitectura ducto-alveolar mediante la expresión de MMP. Asimismo, es posible que la regulación negativa de la fosforilación de Akt inducida por HRG observada en células MCF7 sea un mecanismo de regulación del programa de desarrollo de la glándula mamaria recapitulado o remanente en esta línea celular.

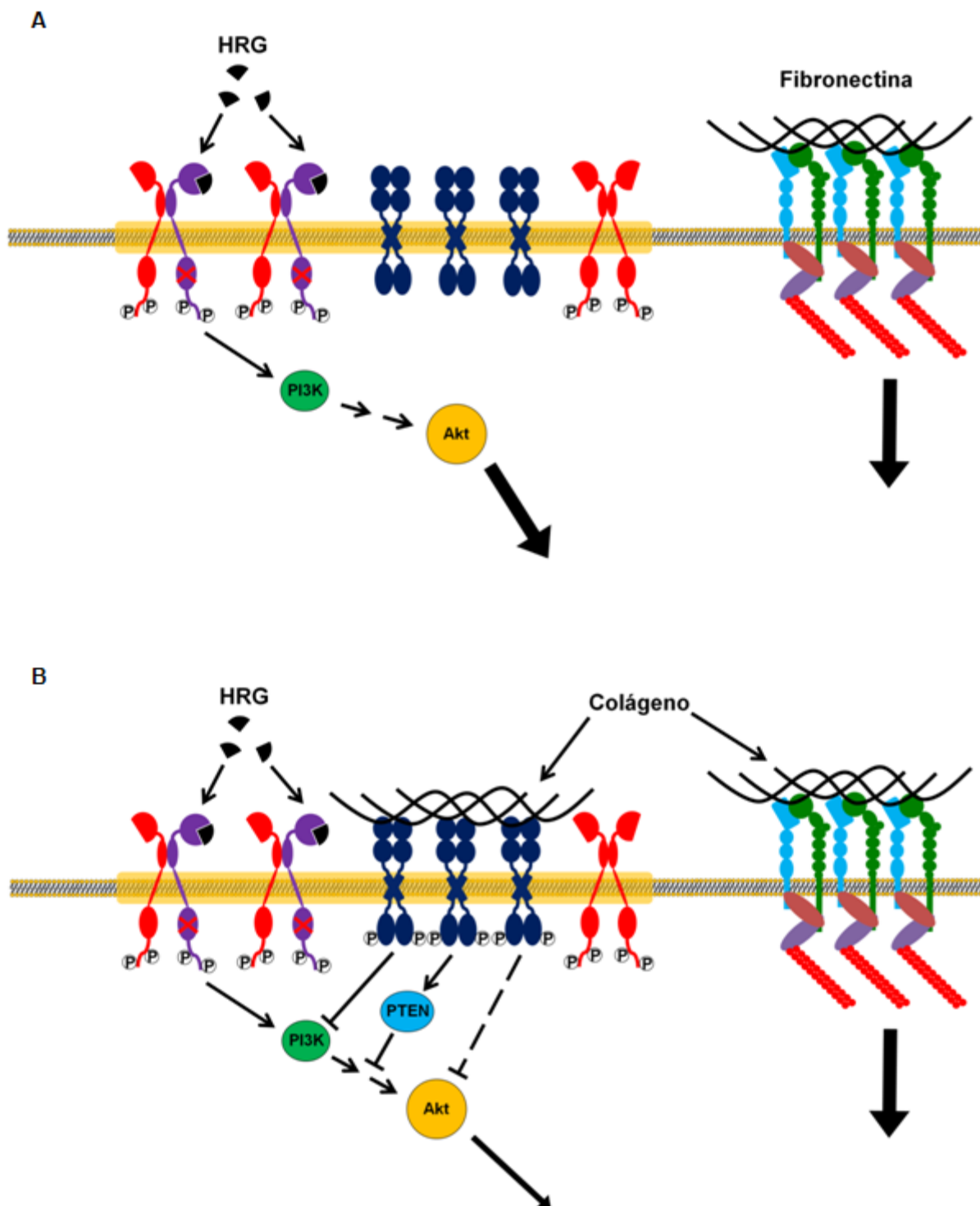


Figura 36. Modelo de activación de Akt mediada por HRG dependiente del sustrato. A- En células adheridas a fibronectina, HRG se une a ErbB3 el cual heterodimeriza con ErbB2 y activa PI3K, con la consecuente fosforilación de Akt. B- La unión de colágeno a DDR1 regula negativamente la fosforilación de Akt inducida por HRG en células MCF7. No es posible con los datos aquí expuestos determinar el mecanismo dicha regulación.

DDR1 en la Biología Tumoral

La expresión y activación de DDR1 en modelos de células tumorales muestra resultados contradictorios en la literatura. Este receptor puede estimular vías de supervivencia (Kim et al., 2011a), inducir la adhesión mediada por integrinas (Xu et al., 2012), promover la estabilización de E-cadherina y el fenotipo epitelial (Yeh et al., 2011), inducir la expresión de MMP (Leitinger, 2014) e inclusive es considerado un marcador de mala prognosis en tumores de pulmón de células pequeñas (Miao et al., 2013).

Teniendo esto en consideración, proponemos que sería posible que el fenotipo celular definiera la función de este receptor en la fisiología tumoral. La capacidad de inhibir la proliferación celular y estabilizar un fenotipo epitelial podría hacer de la expresión de DDR1 una característica represora de la progresión tumoral. Por el contrario, si las células tienen altos niveles de activación de vías proliferativas, como ocurre en tumores con sobreexpresión de EGFR o ErbB2, DDR1 perdería la capacidad de regularlas pero induciría un fenotipo invasivo al promover la expresión de MMP. De esta forma, la presencia de este receptor de colágeno le conferiría una ventaja adaptativa a las células tumorales. El modelo aquí planteado explicaría los resultados contradictorios observados en la literatura, donde DDR1 muestra funciones de inductor o supresor tumoral según las características particulares del modelo de estudio.

Perspectivas

Los resultados expuestos en esta tesis abren nuevos interrogantes relacionados a la integración funcional de las señales transducidas por ErbB2 y la MEC. No es posible determinar con los resultados aquí obtenidos si la asociación entre ErbB2 y DDR1 se debe a la formación de heterodímeros o si ambos receptores se encuentran formando parte de complejos macromoleculares más grandes, donde la interacción es mediada por otras proteínas o por el empaquetamiento de lípidos en la membrana, donde ambos receptores se verían restringidos físicamente.

Para caracterizar dicho complejo sería posible realizar experimentos de entrecruzamiento o *cross-linking* de receptores, seguido de una lisis a altas

concentraciones de detergentes e inmunoprecipitación. De esta forma, si ErbB2 y DDR1 se encuentran en dominios de membrana resistentes a la lisis suave (como los *lipid rafts*) pero no interactúan de forma directa, estos no estarían suficientemente cercanos para entrecruzarse y coinmunoprecipitar. Por el contrario, si se encontraran interactuando directamente o acoplados a complejos macromoleculares, los agentes entrecruzantes unirían covalentemente ambos receptores quienes coinmunoprecipitarán aún si el dominio lipídico se desensambla por la acción de detergentes.

Otra estrategia para la caracterización de dichos complejos sería el uso de técnicas de microscopía avanzada como FRET y STORM de dos colores. Experimentos de FRET permitirán determinar si las proteínas se encuentran a distancias menores a los 10 nm, lo que dará indicios de una interacción directa. Por otro lado, dado que STORM tiene una resolución lateral del orden de los 10nm, esta técnica permitiría no solo complementar los experimentos de FRET y evaluar colocalización a resoluciones mucho mayores a las logradas con un microscopio confocal convencional, el cual tiene una resolución lateral aproximada de 200nm, sino también estudiar la estructura y/o heterogeneidad dentro de los *clusters* de membrana donde estas proteínas se encuentran.

Por otro lado, sería de interés estudiar el mecanismo de regulación de la vía de Akt observada en células MCF7. Mediante el uso de siRNA o de novedosos inhibidores farmacológicos altamente específicos para esta familia de receptores (Kim et al., 2013; Murray et al., 2015), sería posible estudiar a qué nivel actuaría DDR1 como represor de dicha vía: interfiriendo la activación de PI3K a nivel de interacción entre receptores, modificando la relación PIP2/PIP3 al, por ejemplo, aumentar la actividad de PTEN, o activando fosfatasas específicas de Akt.

Asimismo, hemos hipotetizado que DDR1 participaría como promotor de la invasión y metástasis mediante la expresión de MMP. Esta misma estrategia permitiría estudiar si el silenciamiento o bloqueo de este receptor de colágeno en células ErbB2-positivas induce cambios en la expresión y/o activación de MMP. Dado que la activación de dichas proteasas es necesaria durante el proceso de invasión y metástasis, estos resultados contribuirían a la inclusión de la expresión de DDR1 como un marcador de mala prognosis en algunos modelos tumorales.

Por otro lado, sería posible evaluar si la expresión de DDR1 participa en procesos de invasión y metástasis tanto *in vitro* como *in vivo*. Para esto, podrían generarse en

líneas ErbB2-positivas *knock out* mediante la técnica de CRISPR-Cas9²⁰ para DDR1 y estudiar su capacidad invasiva por ensayos de *transwell* e invasión en modelos organotípicos²¹. Asimismo, utilizando estas líneas *knock out* para DDR1, sería posible evaluar si la expresión de este receptor en células ErbB2-positivas modifica la capacidad generar metástasis en ratones *nude*.

Los datos obtenidos tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* podrían ser complementados con estudios avanzados de bioinformática en bases de transcriptómica de tumores. Esto permitirá integrar datos de expresión de proteínas, activación de vías de señalización e inclusive datos clínicos, como la evolución de la enfermedad y sobrevida del paciente. Encontrar patrones donde la presencia de DDR1 se correlacione con la sobreexpresión de receptores, mutación de moléculas señalizadoras y/o activación de vías proliferativas en tumores agresivos, posibilitaría determinar de forma mas precisa en que contextos DDR1 puede considerarse un marcador de mala prognosis y, eventualmente, un potencial blanco terapéutico.

Este es un ejemplo de cómo, dada la complejidad intrínseca de una enfermedad como el cáncer, es necesario tener una visión sistémica de dicho proceso sin evaluar la función de una proteína en particular sino estudiando de forma integrada los diferentes componentes del tumor y como estos interactúan entre sí. Es en este contexto que, dado la heterogeneidad existente entre diferentes tumores, la medicina personalizada podría lograr avances en la terapéutica al estudiar cada caso en particular para generar terapias específicas según el patrón de expresión del tumor en particular y su evolución.

²⁰ CRISPR-Cas9: del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*. Esta es una técnica basada en un sistema inmunológico procarionte con el cual es posible editar, en células vivas, un fragmento del ADN con alta especificidad por acción de la nucleasa Cas9 (Barrangou et al., 2015), permitiendo hacer edición del ADN genómico de forma simple y con alta especificidad.

²¹ La técnica de invasión en modelos organotípicos se basa en generar una matriz tridimensional de colágeno tipo I (u otra proteína de matriz), sembrar las células sobre la superficie de esta y estudiar la cantidad de células que son capaces de penetrarla (Nyström et al., 2005).

Anexo: Acrónimos

3'UTR: del inglés *3' Untranslated Region*, región 3' no traducible de mensajeros de RNA.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ARN: Ácido Ribonnucleico.

ATP: del inglés *Adenosine Triphosphate*, adenosina trifosfato.

Blg-Cre: gen de la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la β -lactoglobulina.

BRCA1: *breast cancer 1*.

CD: del inglés *Cluster of Differentiation*.

CRISPR: del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas.

DAPI: 4',6-damino-2-fenilindol.

dcFCCS: del inglés *dual colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*, correlación cruzada de espectroscopía de fluorescencia para dos colores.

DDR: del inglés *Discoidin Domain Receptor*, receptor con dominio discoidina.

ECFP: *Enhanced Cyan Fluorescent Protein*, versión mejorada de la proteína fluorescente celeste.

EGF: del inglés *Epidermal Growth Factor*, factor de crecimiento epidérmico.

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*, versión mejorada de la proteína fluorescente verde.

EGFR: del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*. Receptor para el factor de crecimiento epidérmico.

ER: del inglés *Estrogen Receptor*, receptor de estrógeno.

ErbB: del inglés *avian erythroblastosis oncogene B*, oncogen B de la eritroblastosis aviar.

ERK: del inglés *Extracellular signal-regulated kinases*, quinasas reguladas por señales extracelulares.

EYFP: *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*, versión mejorada de la proteína fluorescente celeste.

FAK: del inglés *Focal Adhesion Kinase*, quinasa de los Complejos de Adhesión Focal.

FRET: del inglés *Förster Resonance Energy Transfer*, transferencia de energía por resonancia de Förster.

GAP: del inglés *GTPase-Activating Protein*, proteína de activación de la función GTPasa.

GEF: del inglés *GTP Exchange Factor*, factor intercambiador de GTP.

GSDIM: del inglés *Ground State Depletion Microscopy Followed by Individual Molecule Return*.

GSK3: del inglés *Glycogen synthase kinase 3*, quinasa de la glucógeno sintasa 3.

GTP: del inglés *Guanidine Triphosphate*, guanidina trifosfato.

HER: del inglés *Human Epidermal growth factor Receptor*, receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano.

HRG: *Heregulina-β1*

Ig-CAM: del inglés *Immunoglobulin superfamily Cell Adhesion Molecules*, moléculas de adhesión de la familia de la inmunoglobulinas.

IGFR: del inglés *Insulin-like Growth Factor Receptor*, receptor para el factor de crecimiento similar a la insulina.

ILK: del inglés *Integrin-linked Kinase*, quinasa asociada a integrinas.

IRES: del inglés *Internal Ribosome Entry Site*, sitio interno de entrada del ribosoma.

Jak: del inglés *Janus Kinase*, quinasa que fosforila a la proteína Janus.

KO: del inglés *Knock Out*.

MAPK: del inglés *Mitogen-activated protein kinase*, proteína quinasa activada por mitógenos.

MAT: *Microambiente tumoral*.

MEC: *Matriz extracelular*.

MMP: del inglés *Matrix Metalloproteases*, metaloproteasas de la matriz extracelular.

N&B: del inglés *Numbers and Brightness*.

NADH: *Nicotinamida adenin dinucleotido reducido (H)*.

NFκB: del inglés

p130CAS: del inglés *p130 Crk-associated substrate*.

PDGF: del inglés *Platelet Derived Growth Factor*, factor de crecimiento derivado de

plaquetas.

PDGFR: del inglés *Platelet Derived Growth Factor Receptor*, receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PDK1: del inglés *Phosphoinositide-dependent kinase*, quinasa dependiente de fosfoinosítidos

PI3K: del inglés *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3 Kinase*, quinasa que fosforila al 4,5-fosfoatidilinositol bifosfato en la posición 3.

PR: del inglés *Progesterone Receptor*, receptor de progesterona.

PRL: *Prolactina*.

PTEN: del inglés *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*.

RFP: *Red Fluorescent Protein*, proteína fluorescente roja.

RNAseq: del inglés *Ribonucleic acid sequencing*, secuenciación de ARN.

SFB: *suero fetal bovino*.

SH2: del inglés *Src Homology 2*, dominio homólogo a Src 2.

shRNA: del inglés *small hairpin Ribonucleic acid*, “pequeño rulo” de ARN.

siRNA: del inglés *small interference Ribonucleic acid*, ARN de interferencia pequeño.

STAT: del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*, transductor de señales y activador de la transcripción.

STORM: del inglés *Stochastic optical reconstruction microscopy*, microscopía de reconstrucción óptica estocástica.

TEB: del inglés *Terminal-end buds*, botones terminales.

TGF-β: del inglés *Transforming Growth Factor β*, factor de crecimiento transformante β.

VEGF: del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*, factor de crecimiento del endotelio vascular.

VEGFR: del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*, receptor para el factor de crecimiento del endotelio vascular.

VFP: *Visual Fluorescent Protein*, proteína fluorescente en el espectro visible.

Referencias Bibliográficas

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*.

Alexi, X., Berditchevski, F., y Odintsova, E. (2011). The effect of cell-ECM adhesion on signalling via the ErbB family of growth factor receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 568-573.

Altomare, D.A., y Testa, J.R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24, 7455-7464.

Alves, F., Vogel, W., Mossie, K., Millauer, B., Höfler, H., y Ullrich, A. (1995). Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. *Oncogene* 10, 609-618.

Andrechek, E.R., White, D., y Muller, W.J. (2005). Targeted disruption of ErbB2/Neu in the mammary epithelium results in impaired ductal outgrowth. *Oncogene* 24, 932-937.

Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K., y Juliano, R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 50, 197-263.

Armour, A.A., y Watkins, C.L. (2010). The challenge of targeting EGFR: experience with gefitinib in nonsmall cell lung cancer. *Eur. Respir. Rev.* 19, 186-196.

Arnaut, M.A., Goodman, S.L., y Xiong, J.-P. (2007). Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 495-507.

Arndt-Jovin, D.J., y Jovin, T.M. (1977). Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 585-589.

Askari, J.A., Buckley, P.A., Mould, A.P., y Humphries, M.J. (2009). Linking integrin conformation to function. *J. Cell Sci.* 122, 165-170.

Balko, J.M., Miller, T.W., Morrison, M.M., Hutchinson, K., Young, C., Rinehart, C., Sánchez, V., Jee, D., Polyak, K., Prat, A., et al. (2012). The receptor tyrosine kinase ErbB3 maintains the balance between luminal and basal breast epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 221-226.

Balkwill, F.R., Capasso, M., y Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 5591-5596.

Ball, R.K., Friis, R.R., Schoenenberger, C.A., Doppler, W., y Groner, B. (1988). Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J.* 7, 2089-2095.

Barker, K.T., Martindale, J.E., Mitchell, P.J., Kamalati, T., Page, M.J., Phippard, D.J., Dale, T.C., Gusterson, B.A., y Crompton, M.R. (1995). Expression patterns of the novel receptor-like tyrosine kinase, DDR, in human breast tumours. *Oncogene* 10, 569-575.

Barrangou, R., Birmingham, A., Wiemann, S., Beijersbergen, R.L., Hornung, V., y Smith, A. van B. (2015). Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 43, 3407-3419.

- Barrantes-Freer, A., Kim, E., Bielanska, J., Giese, A., Mortensen, L.S., Schulz-Schaeffer, W.J., Stadelmann, C., Brück, W., y Pardo, L. a (2013). Human glioma-initiating cells show a distinct immature phenotype resembling but not identical to NG2 glia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **72**, 307-324.
- Barrantes-Freer, A., Renovanz, M., Eich, M., Braukmann, A., Sprang, B., Spirin, P., Pardo, L.A., Giese, A., y Kim, E.L. (2015). CD133 Expression Is Not Synonymous to Immunoreactivity for AC133 and Fluctuates throughout the Cell Cycle in Glioma Stem-Like Cells. *PLoS One* **10**, e0130519.
- Barroso, M.M. (2011). Quantum dots in cell biology. *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 237-251.
- Bartek, J., Bartkova, J., Kyprianou, N., Lalani, E.N., Staskova, Z., Shearer, M., Chang, S., y Taylor-Papadimitriou, J. (1991). Efficient immortalization of luminal epithelial cells from human mammary gland by introduction of simian virus 40 large tumor antigen with a recombinant retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 3520-3524.
- Barthélémy, P., Leblanc, J., Goldbarg, V., Wendling, F., y Kurtz, J.-E. (2014). Pertuzumab: development beyond breast cancer. *Anticancer Res.* **34**, 1483-1491.
- Baulida, J., Kraus, M.H., Alimandi, M., Paolo, P., Fiore, D., y Carpenter, G. (1996). All ErbB Receptors Other Than the Epidermal Growth Factor Receptor Are Endocytosis Impaired. *J. Biol. Chem.* **271**, 5251-5257.
- de Beça, F.F., Caetano, P., Gerhard, R., Alvarenga, C.A., Gomes, M., Paredes, J., y Schmitt, F. (2013). Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J. Clin. Pathol.* **66**, 187-191.
- Bolte, S., y Cordelieres, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalisation analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224**, 13-232.
- Bon, G., Folgiero, V., Bossi, G., Felicioni, L., Marchetti, A., Sacchi, A., y Falcioni, R. (2006). Loss of $\alpha 4$ integrin subunit reduces the tumorigenicity of MCF7 mammary cells and causes apoptosis upon hormone deprivation. *Clin. Cancer Res.* **12**, 3280-3287.
- Borg, A., Baldetorp, B., Fernö, M., Killander, D., Olsson, H., Rydén, S., y Sigurdsson, H. (1994). ERBB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer. *Cancer Lett.* **81**, 137-144.
- Bossy-Wetzel, E., y Green, D.R. (2000). Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Methods Enzymol.* **322**, 15-18.
- Boudreau, N.J., y Jones, P.L. (1999). Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem. J.* **339** (Pt 3, 481-488.
- Boulter, E., Grall, D., Cagnol, S., y Van Obberghen-Schilling, E. (2006). Regulation of cell-matrix adhesion dynamics and Rac-1 by integrin linked kinase. *FASEB J.* **20**, 1489-1491.
- Brinckmann, J. (2005). Collagens at a glance. *Top. Curr. Chem.* **247**, 1-6.
- Brown, D. a, y London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 111-136.
- Cabodi, S., Tinnirello, A., Di Stefano, P., Bisar??, B., Ambrosino, E., Castellano, I., Sapino, A., Arisio, R., Cavallo, F., Forni, G., et al. (2006). p130Cas as a new regulator of mammary epithelial cell proliferation, survival, and HER2-Neu oncogene- dependent breast

tumorigenesis. *Cancer Res.* 66, 4672-4680.

Cabodi, S., Tinnirello, A., Bisaro, B., Tornillo, G., del Pilar Camacho-Leal, M., Forni, G., Cojoca, R., Iezzi, M., Amici, A., Montani, M., et al. (2010a). p130Cas is an essential transducer element in ErbB2 transformation. *FASEB J.* 24, 3796-3808.

Cabodi, S., del Pilar Camacho-Leal, M., Di Stefano, P., y Defilippi, P. (2010b). Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat. Rev. Cancer* 10, 858-870.

Calderwood, D.A. (2004). Integrin activation. *J. Cell Sci.* 117, 657-666.

Campbell, I.D., y Humphries, M.J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.

Carafoli, F., y Hohenester, E. (2013). Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1834, 2187-2197.

Carpenter, G. (1999). Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J. Cell Biol.* 146, 697-702.

Chang, C.-J., Chiang, C.-H., Song, W.-S., Tsai, S.-K., Woung, L.-C., Chang, C.-H., Jeng, S.-Y., Tsai, C.-Y., Hsu, C.-C., Lee, H.-F., et al. (2012). Inhibition of phosphorylated STAT3 by cucurbitacin I enhances chemoradiosensitivity in medulloblastoma-derived cancer stem cells. *Childs. Nerv. Syst.* 28, 363-373.

Chapman, R.S., Lourenco, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A.R., y Watson, C.J. (1999). Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev.* 13, 2604-2616.

Chen, J.C., Chiu, M.H., Nie, R.L., Cordell, G.A., y Qiu, S.X. (2005). Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 22, 386-399.

Chen, X., Bao, J., Guo, J., Ding, Q., Lu, J., Huang, M., y Wang, Y. (2012). Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. *Anticancer. Drugs* 23, 777-787.

Chidlow, J.H., y Sessa, W.C. (2010). Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc. Res.* 86, 219-225.

Chung, S.O., Kim, Y.J., y Park, S.U. (2015). An updated review of Cucurbitacins and their biological and pharmacological activities. *EXCLI J.* 14, 562-566.

Citri, A., y Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 505-516.

La Clair, J.J., Foley, T.L., Schegg, T.R., Regan, C.M., y Burkart, M.D. (2004). Manipulation of carrier proteins in antibiotic biosynthesis. *Chem. Biol.* 11, 195-201.

Clark, E. a, King, W.G., Brugge, J.S., Symons, M., y Hynes, R.O. (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J. Cell Biol.* 142, 573-586.

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., y Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status

and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 66, 9339-9344.

Coltharp, C., y Xiao, J. (2012). Superresolution microscopy for microbiology. *Cell. Microbiol.* 14, 1808-1818.

Daugherty, R.L., y Gottardi, C.J. (2007). Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)*. 22, 303-309.

Dawson, J.P., Berger, M.B., Lin, C.-C., Schlessinger, J., Lemmon, M.A., y Ferguson, K.M. (2005). Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7734-7742.

Dechantsreiter, M.A., Planker, E., Mathä, B., Lohof, E., Hölzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S.L., y Kessler, H. (1999). N -Methylated Cyclic RGD Peptides as Highly Active and Selective $\alpha V \beta 3$ Integrin Antagonists. *J. Med. Chem.* 42, 3033-3040.

Desgrosellier, J.S., y Cheresh, D. a (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 10, 9-22.

DeVita, V.T., y Chu, E. (2008). A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res.* 68, 8643-8653.

Diamandis, E.P., y Christopoulos, T.K. (1991). The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin. Chem.* 37, 625-636.

Digman, M. a, Wiseman, P.W., Choi, C., Horwitz, A.R., y Gratton, E. (2009). Stoichiometry of molecular complexes at adhesions in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2170-2175.

Drees, B.E., Andrews, K.M., y Beckerle, M.C. (1999). Molecular dissection of zyxin function reveals its involvement in cell motility. *J. Cell Biol.* 147, 1549-1559.

Dunn, K.W., Kamocka, M.M., y McDonald, J.H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C723-C742.

Earle, W.R., Nettleship, A., Schilling, E.L., Stark, T.H., Straus, N.R., Brown, M.F., y Shelton, E. (1943). Production of Malignancy in Vitro. V. Results of Injections of Cultures into Mice. *J Natl Cancer Inst* 4, 213-227.

Eliceiri, B.P. (2001). Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ. Res.* 89, 1104-1110.

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., y Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* 38, 698-707.

Falcioni, R., Antonini, a, Nisticò, P., Di Stefano, S., Crescenzi, M., Natali, P.G., y Sacchi, a (1997). Alpha 6 beta 4 and alpha 6 beta 1 integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines. *Exp. Cell Res.* 236, 76-85.

Fang, H., y DeClerck, Y.A. (2013). Targeting the Tumor Microenvironment: From Understanding Pathways to Effective Clinical Trials. *Cancer Res.* 73, 4965-4977.

Fässler, R., y Meyer, M. (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev.* 9, 1896-1908.

Fazekas, Z., Petrás, M., Fábián, A., Pályi-Krekk, Z., Nagy, P., Damjanovich, S., Vereb, G., y Szöllosi, J. (2008). Two-sided fluorescence resonance energy transfer for assessing

molecular interactions of up to three distinct species in confocal microscopy. *Cytometry. A* 73, 209-219.

Ferreira, D., Atega, F., y Chaves, R. (2013). The Importance of Cancer Cell Lines as in vitro Models in Cancer Methyloome Analysis and Anticancer Drugs Testing. *Oncogenomics Cancer Proteomics- Nov. Approaches Biomarkers Discov. Ther. Targets Cancer* 139-166.

Fitzpatrick, J.A.J., y Lillemeier, B.F. (2011). Fluorescence correlation spectroscopy: Linking molecular dynamics to biological function in vitro and in situ. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 650-660.

Folgiero, V., Avetrani, P., Bon, G., Di Carlo, S.E., Fabi, A., Nisticò, C., Vici, P., Melucci, E., Buglioni, S., Perracchio, L., et al. (2008). Induction of ErbB-3 expression by alpha6beta4 integrin contributes to tamoxifen resistance in ERbeta1-negative breast carcinomas. *PLoS One* 3, e1592.

Fournier, A.K., Campbell, L.E., Castagnino, P., Liu, W.F., Chung, B.M., Weaver, V.M., Chen, C.S., y Assoian, R.K. (2008). Rac-dependent cyclin D1 gene expression regulated by cadherin- and integrin-mediated adhesion. *J. Cell Sci.* 121, 226-233.

Franke, T.F. (2008). Intracellular signaling by Akt: bound to be specific. *Sci. Signal.* 1, pe29.

Frantz, C., Stewart, K.M., y Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 4195-4200.

Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., y González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* 30, 193-204.

Frisch, S.M., y Francis, H. (1994a). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124, 619-626.

Frisch, S.M., y Francis, H. (1994b). Disruption of epithelial cell-matrix interaction induces apoptosis. *J. Cell. Biol.* 124, 619-626.

Fu, H.L., Valiathan, R.R., Arkwright, R., Sohail, A., Mihai, C., Kumarasiri, M., Mahasenan, K. V., Mobashery, S., Huang, P., Agarwal, G., et al. (2013a). Discoidin domain receptors: Unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 288, 7430-7437.

Fu, H.L., Sohail, A., Valiathan, R.R., Wasinski, B.D., Kumarasiri, M., Mahasenan, K. V., Bernardo, M.M., Tokmina-Roszyk, D., Fields, G.B., Mobashery, S., et al. (2013b). Shedding of discoidin domain receptor 1 by membrane-type matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 288, 12114-12129.

Fukata, M., Nakagawa, M., Kuroda, S., y Kaibuchi, K. (1999). Cell adhesion and Rho small GTPases. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 2, 4491-4500.

Gambaletta, D., Marchetti, a, Benedetti, L., Mercurio, a M., Sacchi, a, y Falcioni, R. (2000). Cooperative signaling between alpha(6)beta(4) integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion. *J. Biol. Chem.* 275, 10604-10610.

Gan, H.K., Cvrljevic, A.N., y Johns, T.G. (2013). The epidermal growth factor receptor

variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J.* 280, 5350-5370.

Gazdar, A.F., Girard, L., Lockwood, W.W., Lam, W.L., y Minna, J.D. (2010). Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 1310-1321.

Geissman, T.A. (1963). New Substances of Plant Origin. *Annu. Rev. Pharmacol.* 4, 305-316.

George, N., Pick, H., Vogel, H., Johnsson, N., y Johnsson, K. (2004). Specific labeling of cell surface proteins with chemically diverse compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 8896-8897.

Georgescu, M.-M. (2010). PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer* 1, 1170-1177.

Gerlier, D., y Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* 94, 57-63.

GILMAN, A. (1946). Therapeutic applications of chemical warfare agents. *Fed. Proc.* 5, 285-292.

Gilmore, a P. (2005). anoikis. *Cell Death Differ.* 12 *Suppl* 2, 1473-1477.

Giudice, J., Jares-Erijman, E.A., y Leskow, F.C. (2013). Insulin receptor membrane retention by a traceable chimeric mutant. *Cell Commun. Signal.* 11, 45.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.

Gonzalez, D.M., y Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* 7, re8.

González Wusener, A.E., González, Á., Nakamura, F., Arregui, C.O., Gonzalez Wusener, A.E., Gonzalez, A., Nakamura, F., y Arregui, C.O. (2015). PTP1B triggers integrin-mediated repression of myosin activity and modulates cell contractility. *Biol. Open* 5, 1-13.

Guan, J.-L. (2004). Cell biology. Integrins, rafts, Rac, and Rho. *Science* 303, 773-774.

Guedj, M., Marisa, L., de Reynies, a, Orsetti, B., Schiappa, R., Bibeau, F., MacGrogan, G., Lerebours, F., Finetti, P., Longy, M., et al. (2012). A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene* 31, 1196-1206.

Guiu, S., Michiels, S., André, F., Cortes, J., Denkert, C., Di Leo, a, Hennessy, B.T., Sorlie, T., Sotiriou, C., Turner, N., et al. (2012). Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann. Oncol.* 23, 2997-3006.

Guo, G., Gong, K., Wohlfeld, B., Hatanpaa, K.J., Zhao, D., y Habib, A.A. (2015). Ligand-Independent EGFR Signaling. *Cancer Res.* 75, 3436-3441.

Guo, J., Zhao, W., Hao, W., Ren, G., Lu, J., y Chen, X. (2014). Cucurbitacin B induces DNA damage, G2/M phase arrest, and apoptosis mediated by reactive oxygen species (ROS) in leukemia K562 cells. *Anticancer. Agents Med. Chem.* 14, 1146-1153.

Guo, W., Pylayeva, Y., Pepe, A., Yoshioka, T., Muller, W.J., Inghirami, G., y Giancotti, F.G. (2006). Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary

tumorigenesis. *Cell* 126, 489-502.

Gupta, P., y Srivastava, S.K. (2014). Inhibition of HER2-integrin signaling by Cucurbitacin B leads to in vitro and in vivo breast tumor growth suppression. *Oncotarget* 5, 1812-1828.

Hellyer, N.J., Kim, M.S., Koland, J.G., City, I., Hellyer, N.J., Kim, M.S., Koland, J.G., City, I., Hellyer, N.J., Kim, M.S., et al. (2001). Heregulin-dependent activation of phosphoinositide 3-kinase and Akt via the ErbB2/ErbB3 co-receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 42153-42161.

Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76.

Hirsch, E., Barberis, L., Brancaccio, M., Azzolino, O., Xu, D., Kyriakis, J.M., Silengo, L., Giancotti, F.G., Tarone, G., Fässler, R., et al. (2002). Defective Rac-mediated proliferation and survival after targeted mutation of the beta1 integrin cytodomain. *J. Cell Biol.* 157, 481-492.

Holbro, T., y Hynes, N.E. (2004). ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 195-217.

Holbro, T., Beerli, R.R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C.F., y Hynes, N.E. (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.

Hsu, H.-S., Huang, P.-I., Chang, Y.-L., Tzao, C., Chen, Y.-W., Shih, H.-C., Hung, S.-C., Chen, Y.-C., Tseng, L.-M., y Chiou, S.-H. (2011). Cucurbitacin I inhibits tumorigenic ability and enhances radiochemosensitivity in nonsmall cell lung cancer-derived CD133-positive cells. *Cancer* 117, 2970-2985.

Hsu, Y.-C., Huang, T.-Y., y Chen, M.-J. (2014). Therapeutic ROS targeting of GADD45 γ in the induction of G2/M arrest in primary human colorectal cancer cell lines by cucurbitacin E. *Cell Death Dis.* 5, e1198.

Hu, Y., Guimond, S.E., Travers, P., Cadman, S., Hohenester, E., Turnbull, J.E., Kim, S.-H., y Bouloux, P.-M. (2009). Novel mechanisms of fibroblast growth factor receptor 1 regulation by extracellular matrix protein anosmin-1. *J. Biol. Chem.* 284, 29905-29920.

Huang, C., Park, C.C., Hilsenbeck, S.G., Ward, R., Rimawi, M.F., Wang, Y., Shou, J., Bissell, M.J., Osborne, C.K., y Schiff, R. (2011). B1 Integrin Mediates an Alternative Survival Pathway in Breast Cancer Cells Resistant To Lapatinib. *Breast Cancer Res.* 13, R84.

Huang, Y., Arora, P., McCulloch, C. a, y Vogel, W.F. (2009). The collagen receptor DDR1 regulates cell spreading and motility by associating with myosin IIA. *J. Cell Sci.* 122, 1637-1646.

Huck, L., Pontier, S.M., Zuo, D.M., y Muller, W.J. (2010). beta1-integrin is dispensable for the induction of ErbB2 mammary tumors but plays a critical role in the metastatic phase of tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15559-15564.

Humphries, J.D., Byron, A., y Humphries, M.J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* 119, 3901-3903.

- Hynes, N.E., y Lane, H. a (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 5, 341-354.
- Hynes, N.E., y Watson, C.J. (2010). Mammary gland growth factors: roles in normal development and in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003186.
- Inman, J.L., Robertson, C., Mott, J.D., y Bissell, M.J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* 142, 1028-1042.
- Irwin, M.E., Mueller, K.L., Bohin, N., Ge, Y., y Boerner, J.L. (2011). Lipid raft localization of EGFR alters the response of cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *J. Cell. Physiol.* 226, 2316-2328.
- Ishdorj, G., Johnston, J.B., y Gibson, S.B. (2011). Cucurbitacin-I (JSI-124) activates the JNK/c-Jun signaling pathway independent of apoptosis and cell cycle arrest in B leukemic cells. *BMC Cancer* 11, 268.
- Ivaska, J., y Heino, J. (2011). Cooperation between integrins and growth factor receptors in signaling and endocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 291-320.
- Iwanski, G.B., Lee, D.H., En-Gal, S., Doan, N.B., Castor, B., Vogt, M., Toh, M., Bokemeyer, C., Said, J.W., Thoennissen, N.H., et al. (2010). Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. *Br. J. Pharmacol.* 160, 998-1007.
- Jackson, J.G. (2004). Blockade of Epidermal Growth Factor- or Heregulin-Dependent ErbB2 Activation with the Anti-ErbB2 Monoclonal Antibody 2C4 Has Divergent Downstream Signaling and Growth Effects. *Cancer Res.* 64, 2601-2609.
- Jackson-Fisher, A.J., Bellinger, G., Ramabhadran, R., Morris, J.K., Lee, K.-F., y Stern, D.F. (2004). ErbB2 is required for ductal morphogenesis of the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17138-17143.
- Jackson-Fisher, A.J., Bellinger, G., Breindel, J.L., Tavassoli, F.A., Booth, C.J., Duong, J.K., y Stern, D.F. (2008). ErbB3 is required for ductal morphogenesis in the mouse mammary gland. *Breast Cancer Res.* 10, R96.
- Jacquier, V., Prummer, M., Segura, J.-M., Pick, H., y Vogel, H. (2006). Visualizing odorant receptor trafficking in living cells down to the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14325-14330.
- Jares-Erijman, E.A., y Jovin, T.M. (2003). FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* 21, 1387-1395.
- Jares-Erijman, E.A., y Jovin, T.M. (2006). Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 409-416.
- Jhaveri, K., y Esteva, F.J. (2014). Pertuzumab in the Treatment of HER2+ Breast Cancer. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 12, 591-598.
- Johnson, J.D., EDMAN, J.C., y RUTTER, W.J. (1993). A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5677-5681.
- Jones, F.E., y Stern, D.F. (1999). Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation.

Oncogene 18, 3481-3490.

Jones, F.E., Jerry, D.J., Guarino, B.C., Andrews, G.C., y Stern, D.F. (1996). Heregulin induces in vivo proliferation and differentiation of mammary epithelium into secretory lobuloalveoli. *Cell Growth Differ.* 7, 1031-1038.

Jones, P.L., Crack, J., y Rabinovitch, M. (1997). Regulation of Tenascin-C, a Vascular Smooth Muscle Cell Survival Factor that Interacts with the alphaV-beta3 Integrin to Promote Epidermal Growth Factor Receptor Phosphorylation and Growth. *J. Cell Biol.* 139, 279-293.

Jordan, C.T., Guzman, M.L., Noble, M., Craig T. Jordan, Guzman, M.L., y Noble, M. (2006). Cancer Stem Cells. *new Engl. J. Med. Rev.* 355, 1253-1261.

Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., y Boot-Handford, R.P. (2007). Collagens at a glance. *J. Cell Sci.* 120, 1955-1958.

Kang, L., Guo, Y., Zhang, X., Meng, J., y Wang, Z.-Y. (2011). A positive cross-regulation of HER2 and ER- α 36 controls ALDH1 positive breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 262-268.

Kato, K., Kano, Y., y Noda, Y. (2011). Rho-associated kinase-dependent contraction of stress fibres and the organization of focal adhesions. *J. R. Soc. Interface* 8, 305-311.

Kenny, P.A., Lee, G.Y., Myers, C.A., Neve, R.M., Semeiks, J.R., Spellman, P.T., Lorenz, K., Lee, E.H., Barcellos-Hoff, M.H., Petersen, O.W., et al. (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol. Oncol.* 1, 84-96.

Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F.R.R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S., y Brenner, H.J.J. (1979). Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur. J. Cancer* 15, 659-670.

Khokha, R., y Werb, Z. (2011). Mammary gland reprogramming: Metalloproteinases couple form with function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1-19.

Kim, H.-G., Tan, L., Weisberg, E.L., Liu, F., Canning, P., Choi, H.G., Ezell, S.A., Wu, H., Zhao, Z., Wang, J., et al. (2013). Discovery of a potent and selective DDR1 receptor tyrosine kinase inhibitor. *ACS Chem. Biol.* 8, 2145-2150.

Kim, H.G.H.-G., Hwang, S.Y.S.-Y., Aaronson, S. a., Mandinova, A., y Lee, S.W. (2011a). DDR1 receptor tyrosine kinase promotes prosurvival pathway through Notch1 activation. *J. Biol. Chem.* 286, 17672-17681.

Kim, S.H., Turnbull, J., y Guimond, S. (2011b). Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* 209, 139-151.

Kinoshita, K. (2009). COXPRESdb gene coexpression database for Human , mouse and rat Today ' s topic.

Klebe, R., y Ruddle, F. (1969). Neuroblastoma: Cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J. Cell Biol.* 43.

Klinowska, T.C., Alexander, C.M., Georges-Labouesse, E., Van der Neut, R., Kreidberg, J.A., Jones, C.J., Sonnenberg, A., y Streuli, C.H. (2001). Epithelial development and

differentiation in the mammary gland is not dependent on alpha 3 or alpha 6 integrin subunits. *Dev. Biol.* 233, 449-467.

Kong, Y., Chen, J., Zhou, Z., Xia, H., Qiu, M.-H., y Chen, C. (2014). Cucurbitacin E induces cell cycle G2/M phase arrest and apoptosis in triple negative breast cancer. *PLoS One* 9, e103760.

Koo, D.H.H., McFadden, C., Huang, Y., Abdulhusein, R., Friese-Hamim, M., y Vogel, W.F. (2006). Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1. *FEBS Lett.* 580, 15-22.

Korkaya, H., Liu, S., y Wicha, M.S. (2011). Review series Breast cancer stem cells , cytokine networks , and the tumor microenvironment. *J. Clin. Invest.* 121, 3804-3809.

Kreso, A., y Dick, J.E. (2014). Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* 14, 275-291.

Kular, J.K., Basu, S., y Sharma, R.I. (2014). The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J. Tissue Eng.* 5.

Kuramochi, Y., Guo, X., y Sawyer, D.B. (2006). Neuregulin activates erbB2-dependent src/FAK signaling and cytoskeletal remodeling in isolated adult rat cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41, 228-235.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lahlou, H., Müller, T., Sanguin-Gendreau, V., Birchmeier, C., y Muller, W.J. (2012). Uncoupling of PI3K from ErbB3 impairs mammary gland development but does not impact on ErbB2-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 72, 3080-3090.

Lasfargues, E.Y., Coutinho, W.G., y Redfield, E.S. (1978). Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 61, 967-978.

de Laurentiis, A., Donovan, L., y Arcaro, A. (2007). Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *Open Biochem. J.* 1, 12-32.

Lee, D.H., Iwanski, G.B., y Thoennissen, N.H. (2010). Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. *ScientificWorldJournal.* 10, 413-418.

Leitinger, B. (2011). Transmembrane collagen receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 265-290.

Leitinger, B. (2014). Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 310, 39-87.

Lemeer, S., Bluwstein, A., Wu, Z., Leberfinger, J., Müller, K., Kramer, K., y Kuster, B. (2012). Phosphotyrosine mediated protein interactions of the discoidin domain receptor 1. *J. Proteomics* 75, 3465-3477.

Lemmon, M.A. (2007). Activation and Inhibition of the EGF Receptor. *FASEB J* 21, A46 - b - .

Lemmon, M.A. (2008). Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp. Cell Res.* 315, 638-648.

- Lemmon, M. a., Bu, Z., Ladbury, J.E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., Engelman, D.M., y Schlessinger, J. (1997). Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J.* 16, 281-294.
- Lesniak, D., Sabri, S., Xu, Y., Thoms, J., Deschenes, J., Mackey, J., Lai, R., y Abdulkarim, B. (2008). β 1-integrin: A novel predictive biomarker and a target in HER-2-overexpressing trastuzumab resistant women with breast cancer. *Cancer Res.* 68, 5826 - .
- Lesniak, D., Xu, Y., Deschenes, J., Lai, R., Thoms, J., Murray, D., Gosh, S., Mackey, J.R., Sabri, S., y Abdulkarim, B. (2009). B1-Integrin Circumvents the Antiproliferative Effects of Trastuzumab in Human Epidermal Growth Factor Receptor-2-Positive Breast Cancer. *Cancer Res.* 69, 8620-8628.
- Leung, C.T., y Brugge, J.S. (2012). Outgrowth of single oncogene-expressing cells from suppressive epithelial environments. *Nature* 482, 410-413.
- Levitz, S.M., y Diamond, R.D. (1985). A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J. Infect. Dis.* 152, 938-945.
- Levitzki, A., y Klein, S. (2010). Signal transduction therapy of cancer. *Mol. Aspects Med.* 31, 287-329.
- Li, Z. (2013). CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp. Hematol. Oncol.* 2, 17.
- Li, N., Zhang, Y., Naylor, M.J., Schatzmann, F., Maurer, F., Wintermantel, T., Schuetz, G., Mueller, U., Streuli, C.H., y Hynes, N.E. (2005). Beta1 integrins regulate mammary gland proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli. *EMBO J.* 24, 1942-1953.
- Lingwood, D., y Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 46-50.
- Lodish, H., Berk, A., y Kaiser, C. et al. (2013). *Molecular Cell Biology* (New York, NY: W. H. Freeman).
- Lopez-Haber, C., y Kazanietz, M.G. (2013). Cucurbitacin I inhibits Rac1 activation in breast cancer cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism and independently of Janus tyrosine kinase 2 and P-Rex1. *Mol. Pharmacol.* 83, 1141-1154.
- Lu, P., Weaver, V.M., y Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* 196, 395-406.
- Lui, V.W.Y., Yau, D.M.S., Wong, E.Y.L., Ng, Y.-K., Lau, C.P.-K., Ho, Y., Chan, J.P.L., Hong, B., Ho, K., Cheung, C.S., et al. (2009). Cucurbitacin I elicits anoikis sensitization, inhibits cellular invasion and in vivo tumor formation ability of nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 30, 2085-2094.
- Manders, E.M., Stap, J., Brakenhoff, G.J., van Driel, R., y Aten, J. a (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 103 (Pt 3, 857-862.
- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., y Ate, J. a. (1993). Measurement of co-localisation of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* 169, 375-382.
- Manning, B.D., y Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261-1274.

- Manuscript, A., Mimeault, M., y Batra, S.K. (2014). Molecular Biomarkers of Cancer Stem/Progenitor Cells Associated with Progression, Metastases, and Treatment Resistance of Aggressive Cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23, 234-254.
- Marti, A., Feng, Z., Altermatt, H.J., y Jaggi, R. (1997). Milk accumulation triggers apoptosis of mammary epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 158-165.
- Masters, J.R. (2002). HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat. Rev. Cancer* 2, 315-319.
- Mattoon, D., Lemmon, M. a, Schless-, J., Klein, P., y Schlessinger, J. (2004). A structure-based model for ligand binding and dimerization of EGF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101.
- McCabe Pryor, M., Steinkamp, M.P., Halasz, A.M., Chen, Y., Yang, S., Smith, M.S., Zahoransky-Kohalmi, G., Swift, M., Xu, X.-P., Hanein, D., et al. (2015). Orchestration of ErbB3 signaling through heterointeractions and homointeractions. *Mol. Biol. Cell* 26, 4109-4123.
- McDonald, P.C., Fielding, A.B., y Dedhar, S. (2008). Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology. *J. Cell Sci.* 121, 3121-3132.
- Mehra, R., Serebriiskii, I.G., Dunbrack, R.L., Robinson, M.K., Burtneess, B., y Golemis, E.A. (2011). Protein-intrinsic and signaling network-based sources of resistance to EGFR- and ErbB family-targeted therapies in head and neck cancer. *Drug Resist. Updat.* 14, 260-279.
- Miao, L., Zhu, S., Wang, Y., Li, Y., Ding, J., Dai, J., Cai, H., Zhang, D., y Song, Y. (2013). Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer and promotes cell invasion via epithelial-to-mesenchymal transition. *Med. Oncol.* 30, 626.
- Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L. a, Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, a M., Gambhir, S.S., y Weiss, S. (2005). Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Sci. (Washington, DC, United States)* 307, 538-544.
- Mihai, C., Chotani, M., Elton, T.S., y Agarwal, G. (2009). Mapping of DDR1 Distribution and Oligomerization on the Cell Surface by FRET Microscopy. *J. Mol. Biol.* 385, 432-445.
- Mitra, S.K., y Schlaepfer, D.D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 516-523.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J.S., y Yamada, K.M. (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell Biol.* 135, 1633-1642.
- Mocanu, M.-M.M., Fazekas, Z., Petrás, M., Nagy, P., Sebestyén, Z., Isola, J., Tímár, J., Park, J.W., Vereb, G., y Szöllosi, J. (2005). Associations of ErbB2, β 1-integrin and lipid rafts on Herceptin (Trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines. *Cancer Lett.* 227, 201-212.
- Moro, L., Venturino, M., Bozzo, C., Silengo, L., Altruda, F., Beguinot, L., Tarone, G., y Defilippi, P. (1998). Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 17, 6622-6632.

- Motoyama, T., Hojo, H., y Watanabe, H. (1986). Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas. *Acta Pathol. Jpn.* 36, 65-83.
- Mouw, J.K., Ou, G., y Weaver, V.M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 771-785.
- Murray, C.W., Berdini, V., Buck, I.M., Carr, M.E., Cleasby, A., Coyle, J.E., Curry, J.E., Day, J.E.H., Day, P.J., Hearn, K., et al. (2015). Fragment-Based Discovery of Potent and Selective DDR1/2 Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* 6, 798-803.
- Nagy, P., Vereb, G., Sebestyén, Z., Horváth, G., Lockett, S.J., Damjanovich, S., Park, J.W., Jovin, T.M., y Szöllösi, J. (2002). Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J. Cell Sci.* 115, 4251-4262.
- Nagy, P., Friedländer, E., Tanner, M., Kapanen, A.I., Carraway, K.L., Isola, J., y Jovin, T.M. (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.
- Nagy, P., Claus, J., Jovin, T.M., y Arndt-Jovin, D.J. (2010). Distribution of resting and ligand-bound ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases in living cells using number and brightness analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16524-16529.
- Naipauer, J., Gattelli, A., Degese, M.S.S., Slomiansky, V., Wertheimer, E., Lamarre, J., Castilla, L., Abba, M., Kordon, E.C.C., y Coso, O.A. a (2013). The use of alternative polyadenylation sites renders integrin $\beta 1$ (Itgb1) mRNA isoforms with differential stability during mammary gland development. *Biochem. J.* 454, 345-357.
- Naylor, M.J., Li, N., Cheung, J., Lowe, E.T., Lambert, E., Marlow, R., Wang, P., Schatzmann, F., Wintermantel, T., Schüetz, G., et al. (2005). Ablation of beta1 integrin in mammary epithelium reveals a key role for integrin in glandular morphogenesis and differentiation. *J. Cell Biol.* 171, 717-728.
- Neuhaus, B., Bühren, S., Böck, B., Alves, F., Vogel, W.F., y Kiefer, F. (2011). Migration inhibition of mammary epithelial cells by Syk is blocked in the presence of DDR1 receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3757-3770.
- Niemann, C., Brinkmann, V., Spitzer, E., Hartmann, G., Sachs, M., Naundorf, H., y Birchmeier, W. (1998). Reconstitution of mammary gland development in vitro: Requirement of c- met and c-erbB2 signaling for branching and alveolar morphogenesis. *J. Cell Biol.* 143, 533-545.
- Nisticò, P., Di Modugno, F., Spada, S., y Bissell, M.J. (2014). $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins: from breast development to clinical practice. *Breast Cancer Res.* 16, 459.
- Nyström, M.L., Thomas, G.J., Stone, M., Mackenzie, I.C., Hart, I.R., y Marshall, J.F. (2005). Development of a quantitative method to analyse tumour cell invasion in organotypic culture. *J. Pathol.* 205, 468-475.
- Obayashi, T., Hayashi, S., Shibaoka, M., Saeki, M., Ohta, H., y Kinoshita, K. (2008). COXPRESdb: a database of coexpressed gene networks in mammals. *Nucleic Acids Res.* 36, D77-D82.
- Okamura, Y., Aoki, Y., Obayashi, T., Tadaka, S., Ito, S., Narise, T., y Kinoshita, K. (2014). COXPRESdb in 2015: coexpression database for animal species by DNA-microarray and

RNAseq-based expression data with multiple quality assessment systems. *Nucleic Acids Res.* **43**, D82-D86.

Okamura, Y., Aoki, Y., Obayashi, T., Tadaka, S., Ito, S., Narise, T., y Kinoshita, K. (2015). COXPRESdb in 2015: coexpression database for animal species by DNA-microarray and RNAseq-based expression data with multiple quality assessment systems. *Nucleic Acids Res.* **43**, D82-D86.

Okutani, D., Lodyga, M., Han, B., y Liu, M. (2006). Src protein tyrosine kinase family and acute inflammatory responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **291**, L129-L141.

Olayioye, M. a, Neve, R.M., Lane, H.A., y Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* **19**, 3159-3167.

Osborne, C.K., y Schiff, R. (2011). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu. Rev. Med.* **62**, 233-247.

Pancholi, S., Lykkesfeldt, A.E., Hilmi, C., Banerjee, S., Leary, A., Drury, S., Johnston, S., Dowsett, M., y Martin, L.-A. (2008). ERBB2 influences the subcellular localization of the estrogen receptor in tamoxifen-resistant MCF-7 cells leading to the activation of AKT and RPS6KA2. *Endocr. Relat. Cancer* **15**, 985-1002.

Pankov, R. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* **115**, 3861-3863.

Pankov, R., Markovska, T., Hazarosova, R., Antonov, P., Ivanova, L., y Momchilova, A. (2005). Cholesterol distribution in plasma membranes of beta1 integrin-expressing and beta1 integrin-deficient fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **442**, 160-168.

Di Paolo, G., y De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-657.

Paplomata, E., y O'Regan, R. (2014). The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **6**, 154-166.

Park, C.J.C.C., Zhang, H., Pallavicini, M., Gray, J.W., Baehner, F., Park, C.J.C.C., Bissell, M.J., Park, J., y Bissell, M.J. (2006). $\beta 1$ Integrin Inhibitory Antibody Induces Apoptosis of Breast Cancer Cells, Inhibits Growth, and Distinguishes Malignant from Normal Phenotype in Three Dimensional Cultures and In vivo. *Cancer Res.* **66**, 1526-1535.

Park, J.G., Frucht, H., LaRocca, R. V, Bliss, D.P., Kurita, Y., Chen, T.R., Henslee, J.G., Trepel, J.B., Jensen, R.T., y Johnson, B.E. (1990). Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res.* **50**, 2773-2780.

Park, J.S., Chu, J.S., Tsou, A.D., Diop, R., Tang, Z., Wang, A., y Li, S. (2011). The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β . *Biomaterials* **32**, 3921-3930.

Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* **116**, 1409-1416.

Parsons, M., Messent, A.J., Humphries, J.D., Deakin, N.O., y Humphries, M.J. (2008). Quantification of integrin receptor agonism by fluorescence lifetime imaging. *J. Cell Sci.* **121**, 265-271.

Patra, S.K. (2008). Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1785**, 182-206.

- Pauley, R.J., Soule, H.D., Tait, L., Miller, F.R., Wolman, S.R., Dawson, P.J., y Heppner, G.H. (1993). The MCF10 family of spontaneously immortalized human breast epithelial cell lines: models of neoplastic progression. *Eur. J. Cancer Prev.* 2 *Suppl* 3, 67-76.
- Peres, C., Yart, A., Perret, B., Salles, J.P., y Raynal, P. (2003). Modulation of phosphoinositide 3-kinase activation by cholesterol level suggests a novel positive role for lipid rafts in lysophosphatidic acid signalling. *FEBS Lett.* 534, 164-168.
- Pickup, M.W., Mouw, J.K., y Weaver, V.M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* 15, 1243-1253.
- Politi, K., Ayeni, D., y Lynch, T. (2015). The Next Wave of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Enter the Clinic. *Cancer Cell* 27, 751-753.
- Pontier, S.M., y Muller, W.J. (2009). Integrins in mammary-stem-cell biology and breast-cancer progression--a role in cancer stem cells? *J. Cell Sci.* 122, 207-214.
- Pontiggia, O., Sampayo, R., Raffo, D., Motter, A., Xu, R., Bissell, M.J., De Kier Joffé, E.B., y Simian, M. (2012). The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: A role for soluble stromal factors and fibronectin through β 1 integrin. *Breast Cancer Res. Treat.* 133, 459-471.
- Del Pozo, M. a (2004). Integrin signaling and lipid rafts. *Cell Cycle* 3, 725-728.
- Price-Schiavi, S.A., Jepson, S., Li, P., Arango, M., Rudland, P.S., Yee, L., y Carraway, K.L. (2002). Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int. J. Cancer* 99, 783-791.
- Reardon, D.A., Fink, K.L., Mikkelsen, T., Cloughesy, T.F., O'Neill, A., Plotkin, S., Glantz, M., Ravin, P., Raizer, J.J., Rich, K.M., et al. (2008). Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol.* 26, 5610-5617.
- Reichardt, H.M., Horsch, K., Gröne, H.J., Kolbus, a., Beug, H., Hynes, N., y Schütz, G. (2001). Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 519-527.
- Reis-Sobreiro, M., Roué, G., Moros, a, Gajate, C., de la Iglesia-Vicente, J., Colomer, D., y Mollinedo, F. (2013). Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J.* 3, e118.
- Reyes-Uribe, E., Serna-Marquez, N., y Perez Salazar, E. (2015). DDRs: receptors that mediate adhesion, migration and invasion in breast cancer cells. *AIMS Biophys.* 2, 303-317.
- Richert, M.M., Schwertfeger, K.L., Ryder, J.W., y Anderson, S.M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 227-241.
- Rietveld, A., y Simons, K. (1998). The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1376, 467-479.
- Rios, J.L., Andujar, I., Escandell, J.M., Giner, R.M., Recio, M.C., Ríos, J.L., Andújar, I., Escandell, J.M., Giner, R.M., y Recio, M.C. (2012). Cucurbitacins as inducers of cell death

and a rich source of potential anticancer compounds. *Curr Pharm Des* 18, 1663-1676.

Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J., y Minor, L. (2015). *Cell Viability Assays*.

Romer, L.H., Birukov, K.G., y Garcia, J.G.N. (2006). Focal adhesions: Paradigm for a signaling nexus. *Circ. Res.* 98, 606-616.

Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* 79, 34-74.

Ross, D.D., Joneckis, C.C., Ordóñez, J. V, Propidium, D., Viable, I., Number, C., Ordonez, V., Sisk, A.M., Wu, R.K., Hamburger, A.W., et al. (1989). Estimation of Cell Survival by Flow Cytometric Quantification of Fluorescein Diacetate / Propidium Iodide Viable Cell Number. *Cancer Res.* 49, 3776-3782.

Rossi, M., Carioli, G., Bonifazi, M., Zambelli, A., Franchi, M., Moja, L., Zambon, A., Corrao, G., La Vecchia, C., Zocchetti, C., et al. (2016). Trastuzumab for HER2+ metastatic breast cancer in clinical practice: Cardiotoxicity and overall survival. *Eur. J. Cancer* 52, 41-49.

Rowlands, A.S., George, P.A., y Cooper-White, J.J. (2008). Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C1037-C1044.

Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1* (CSHL Press).

Sambrook, J., y Russell, D.W. (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent e. Coli: «ultra-competent» cells. *CSH Protoc.* 2006.

Sampayo, R. (2015). Descripción de un sistema de reciprocidad dinámica entre el receptor de estrógeno alfa y la integrina beta 1 en células de cáncer de mama humano. University of Buenos Aires.

Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., y Sheetz, M.P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015-1026.

Schenk, S., Hintermann, E., Bilban, M., Koshikawa, N., Hojilla, C., Khokha, R., y Quaranta, V. (2003). Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J. Cell Biol.* 161, 197-209.

Schermelleh, L., Heintzmann, R., y Leonhardt, H. (2010). A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 190, 165-175.

Schiller, H.B., y Fässler, R. (2013). Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions. *EMBO Rep.* 14, 509-519.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open source platform for biological image analysis. *Nat. Methods* 9, 676-682.

Schneller, M., Vuori, K., y Ruoslahti, E. (1997). $\alpha 3$ integrin associates with activated insulin and PDGF receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J.* 16, 5600-5607.

- Scott, J.A., y Yap, A.S. (2006). Cinderella no longer: alpha-catenin steps out of cadherin's shadow. *J. Cell Sci.* 119, 4599-4605.
- Shaner, N.C., Patterson, G.H., y Davidson, M.W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J. Cell Sci.* 120, 4247-4260.
- She, Q.B., Chandarlapaty, S., Ye, Q., Lobo, J., Haskell, K.M., Leander, K.R., DeFeo-Jones, D., Huber, H.E., y Rosen, N. (2008). Breast tumor cells with P13K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One* 3.
- Shimizu, H., Koyama, N., Asada, M., y Yoshimatsu, K. (2002). Aberrant expression of integrin and erbB subunits in breast cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 21, 1073-1079.
- Simons, K., y Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., y Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63, 5821-5828.
- Sithanandam, G., y Anderson, L.M. (2008). The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 15, 413-448.
- Skloot, R. (2010). *The Immortal Life of Henrietta Lacks* (United States: Pan Macmillan).
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783-792.
- Sliwkowski, M.X., Schaefer, G., Akita, R.W., Lofgren, J. a., Fitzpatrick, V.D., Nuijens, A., Fendly, B.M., Cerione, R. a., Vandlen, R.L., y Carraway, K.L. (1994). Coexpression of erbB2 and er6B3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J. Biol. Chem.* 269, 14661-14665.
- Soltysova, A., Altanerova, V., y Altaner, C. (2005). Cancer stem cells. *Neoplasma* 52, 435-440.
- Sørli, T., Wang, Y., Xiao, C., Johnsen, H., Naume, B., Samaha, R.R., y Børresen-Dale, A.-L. (2006). Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics* 7, 127.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., y Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1409-1416.
- Soung, Y.H., Clifford, J.L., y Chung, J. (2010). Crosstalk between integrin and receptor tyrosine kinase signaling in breast carcinoma progression. *BMB Rep.* 43, 311-318.
- Steinkamp, M.P., Low-Nam, S.T., Yang, S., Lidke, K. a, Lidke, D.S., y Wilson, B.S. (2014). erbB3 is an active tyrosine kinase capable of homo- and heterointeractions. *Mol. Cell. Biol.* 34, 965-977.
- Stern, D.F. (2008). ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13, 215-223.

- Stoica, G.E., Franke, T.F., Wellstein, A., Morgan, E., Czubyko, F., List, H.-J., Reiter, R., Martin, M.B., y Stoica, A. (2003). Heregulin-beta1 regulates the estrogen receptor-alpha gene expression and activity via the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 22, 2073-2087.
- Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J. Cancer Sci. Ther.* 1, 1-4.
- Sun, J., Blaskovich, M. a, Jove, R., Livingston, S.K., Coppola, D., y Sebt, S.M. (2005). Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene* 24, 3236-3245.
- Szabó, A., Horváth, G., Szöllosi, J., y Nagy, P. (2008). Quantitative characterization of the large-scale association of ErbB1 and ErbB2 by flow cytometric homo-FRET measurements. *Biophys. J.* 95, 2086-2096.
- Taherian, A., Li, X., Liu, Y., y Haas, T.A. (2011). Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. *BMC Cancer* 11, 293.
- Tang, C., Ang, B.T., y Pervaiz, S. (2007). Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB J.* 21, 3777-3785.
- Tanner, M., Kapanen, A.I., Junttila, T., Raheem, O., Grenman, S., Elo, J., Elenius, K., y Isola, J. (2004). Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* 3, 1585-1592.
- Tarone, G., Hirsch, E., Brancaccio, M., De Acetis, M., Barberis, L., Balzac, F., Retta, S.F., Botta, C., Altruda, F., Silengo, L., et al. (2000). Integrin function and regulation in development. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 725-731.
- TILL, J.E., y McCULLOCH, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14, 213-222.
- Toker, A., y Yoeli-Lerner, M. (2006). Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res.* 66, 3963-3966.
- Topper, Y.J., y Freeman, C.S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.* 60, 1049-1106.
- Trempe, G.L. (1976). Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res.* 33-41.
- Tseng, L.-M., Huang, P.-I., Chen, Y.-R., Chen, Y.-C., Chou, Y.-C., Chen, Y.-W., Chang, Y.-L., Hsu, H.-S., Lan, Y.-T., Chen, K.-H., et al. (2012). Targeting signal transducer and activator of transcription 3 pathway by cucurbitacin I diminishes self-renewing and radiochemoresistant abilities in thyroid cancer-derived CD133+ cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341, 410-423.
- Tseng, P.-H., Wang, Y.-C., Weng, S.-C., Weng, J.-R., Chen, C.-S.C.-Y.C.-S., Brueggemeier, R.W., Shapiro, C.L., Chen, C.-S.C.-Y.C.-S., Dunn, S.E., Pollak, M., et al. (2006). Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor. *Mol. Pharmacol.* 70, 1534-1541.
- Valiathan, R.R., Marco, M., Leitinger, B., Kleer, C.G., y Fridman, R. (2012). Discoidin domain receptor tyrosine kinases: New players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 295-321.

- Vaz-Luis, I., Winer, E.P., y Lin, N.U. (2013). Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: does estrogen receptor status define two distinct subtypes? *Ann. Oncol.* *24*, 283-291.
- Villalta, J.I., Galli, S., Iacaruso, M.F., Arciuch, V.G.A., Poderoso, J.J., Jares-Erijman, E.A., y Pietrasanta, L.I. (2011). New algorithm to determine true colocalization in combination with image restoration and time-lapse confocal microscopy to map Kinases in mitochondria. *PLoS One* *6*, 1-16.
- Villarino, A. V., Kanno, Y., Ferdinand, J.R., y O'Shea, J.J. (2014). Mechanisms of Jak/STAT Signaling in Immunity and Disease. *J. Immunol.* *194*, 21-27.
- Vogel, W.F., Alves, F., Aszódi, A., Alves, F., Pawson, T., Vogel, W.F., y Aszo, A. (2001). Discoidin Domain Receptor 1 Tyrosine Kinase Has an Essential Role in Mammary Gland Development. *Society* *21*, 2906-2917.
- Vogel, W.F., Abdulhusein, R., y Ford, C.E. (2006). Sensing extracellular matrix: An update on discoidin domain receptor function. *Cell. Signal.* *18*, 1108-1116.
- Wang, S.E., Xiang, B., Zent, R., Quaranta, V., Pozzi, A., y Arteaga, C.L. (2009). Transforming growth factor ?? induces clustering of HER2 and integrins by activating Src-focal adhesion kinase and receptor association to the cytoskeleton. *Cancer Res.* *69*, 475-482.
- Watson, C.J. (2006). Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res.* *8*, 203.
- Watson, C.J., y Khaled, W.T. (2008). Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* *135*, 995-1003.
- Weaver, V.M., Lelièvre, S., Lakins, J.N., Chrenek, M.A., Jones, J.C.. R., Giancotti, F., Werb, Z., y Bissell, M.J. (2002). B4 Integrin-Dependent Formation of Polarized Three-Dimensional Architecture Confers Resistance To Apoptosis in Normal and Malignant Mammary Epithelium. *Cancer Cell* *2*, 205-216.
- Weigelt, B., Mackay, A., A'hern, R., Natrajan, R., Tan, D.S.P., Dowsett, M., Ashworth, A., y Reis-Filho, J.S. (2010). Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* *11*, 339-349.
- Wierzbicka-Patynowski, I., y Schwarzbauer, J.E. (2003). The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J. Cell Sci.* *116*, 3269-3276.
- Wijelath, E.S., Rahman, S., Namekata, M., Murray, J., Nishimura, T., Mostafavi-Pour, Z., Patel, Y., Suda, Y., Humphries, M.J., y Sobel, M. (2006). Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. *Circ. Res.* *99*, 853-860.
- Wiseman, B.S., Sternlicht, M.D., Lund, L.R., Alexander, C.M., Mott, J., Bissell, M.J., Soloway, P., Itohara, S., y Werb, Z. (2003). Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J. Cell Biol.* *162*, 1123-1133.
- Witkowska-Zimny, M., Walenko, K., Wałkiewicz, A.E., Pojda, Z., Przybylski, J., y Lewandowska-Szumieł, M. (2012). Effect of substrate stiffness on differentiation of umbilical cord stem cells. *Acta Biochim. Pol.* *59*, 261-264.

- Wolf-Yadlin, A., Kumar, N., Zhang, Y., Hautaniemi, S., Zaman, M., Kim, H.-D., Grantcharova, V., Lauffenburger, D. a, y White, F.M. (2006). Effects of HER2 overexpression on cell signaling networks governing proliferation and migration. *Mol. Syst. Biol.* 2, 54.
- Worthylake, R., Opresko, L.K., y Wiley, H.S. (1999). ErbB-2 Amplification Inhibits Down-regulation and Induces Constitutive Activation of Both ErbB-2 and Epidermal Growth Factor Receptors. *J. Biol. Chem.* 274, 8865-8874.
- Xu, H., Bihan, D., Chang, F., Huang, P.H., Farndale, R.W., y Leiting, B. (2012). Discoidin Domain Receptors Promote $\alpha1\beta1$ - and $\alpha2\beta1$ -Integrin Mediated Cell Adhesion to Collagen by Enhancing Integrin Activation. *PLoS One* 7.
- Xue, G., y Hemmings, B.A. (2013). PKB/Akt-Dependent Regulation of Cell Motility. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 105, 393-404.
- Yang, J., Liu, J., Zhong, M., Chen, Y., Song, M., y Du, Y. (2014). Discoidin domain receptors: A promoter of the aggressive behavior of ameloblastomas. *IUBMB Life* 66, 292-299.
- Yap, A.S., y Kovacs, E.M. (2003). Direct cadherin-activated cell signaling: A view from the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 160, 11-16.
- Yarden, Y., y Pines, G. (2012). The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat. Rev. Cancer* 12, 553-563.
- Yeh, Y., Wu, C.-C., Wang, Y., y Tang, M.-J. (2011). DDR1 triggers epithelial cell differentiation by promoting cell adhesion through stabilization of E-cadherin. *Mol. Biol. Cell* 22, 940-953.
- Yeh, Y.-C., Lin, H.-H., y Tang, M.-J. (2012). A tale of two collagen receptors, integrin 1 and discoidin domain receptor 1, in epithelial cell differentiation. *AJP Cell Physiol.*
- Yersal, O. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J. Clin. Oncol.* 5, 412.
- Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21, 497-503.
- Yurchenco, P.D., Smirnov, S., y Mathus, T. (2002). Analysis of basement membrane self-assembly and cellular interactions with native and recombinant glycoproteins. *Methods Cell Biol.* 69, 111-144.
- Zhou, Z., Cironi, P., Lin, A.J., Xu, Y., Hrvatin, S., Golan, D.E., Silver, P. a., Walsh, C.T., y Yin, J. (2007). Genetically encoded short peptide tags for orthogonal labelling by Sfp and AcpS phosphopantetheinyl transferases. *ACS Chem. Biol.* 2, 337-346.
- Zinchuk, V., Zinchuk, O., y Okada, T. (2007). Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem. Cytochem.* 40, 101-111.
- Ziomkiewicz, I., Loman, A., Klement, R., Fritsch, C., Klymchenko, A.S., Bunt, G., Jovin, T.M., y Arndt-Jovin, D.J. (2013). Dynamic conformational transitions of the EGF receptor in living mammalian cells determined by FRET and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Cytometry. A* 83, 794-805.