

INFORME DE SEGUIMIENTO TÉCNICO AYUDAS- CONTRATO

TÍTULO DEL PROYECTO:	Receptores ErbB y sus ligandos, y señalización por Erk5 en cáncer.
NOMBRE Y APELLIDOS:	Dr. Juan Carlos Montero
CENTRO:	Lab. 15 Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca
DIRECTOR DE PROYECTO:	Dr. Atanasio Pandiella
PERIODO INFORME:	octubre 2007- marzo 2008 (III semestre)
PATROCINADOR:	Fundación María García Estrada

Informe preparado por María de la Mora, mayo 2008

INTRODUCCIÓN

La presencia de receptores tirosina quinasa de la familia ErbB y sus ligandos, sobre todo **ErbB2**, han sido ampliamente estudiados en cáncer de mama, y su sobre-expresión se ha correlacionado negativamente con el pronóstico (Slamon et al., 1987); la expresión y el papel de las **neuregulinas** (NRGs) se ha relacionado con un porcentaje significativo de pacientes con cáncer de mama (Dunn et al., 2004).

El proyecto del Dr. Montero proponía estudiar diferentes aspectos relacionados con la biología de este sistema de ligandos y receptores en diferentes modelos animales y tumores de pacientes con cáncer de mama.

Para entender la importancia de estas moléculas en cáncer de mama hay que recordar el ejemplo de Herceptina, que es un fármaco diseñado para pacientes con cáncer de mama que tienen sobre- expresado la proteína ErbB2. En aquéllos tipos de cáncer de mama en los cuales no existe sobre-expresión de los receptores ErbB, pero se expresó NRG y se trataron con Herceptina, los pacientes vieron aumentado el tiempo de progresión de la enfermedad y la supervivencia.

De manera muy simplificada, este sistema de ligandos y receptores funciona de la siguiente manera: la molécula de NRG se une al receptor de membrana Erb2. En respuesta a esta unión interviene ERK5, que se traslada al núcleo celular y genera la consiguiente respuesta en la expresión de genes.

OBJETIVOS

El proyecto presentado por el Dr. Montero persigue dos objetivos concretos:

- **Objetivo I:** Si existe correlación entre la expresión de proneuregulina-alfa-2c (**proNRG α 2c**) y la **respuesta clínica** en cáncer de mama; profundizar en la estructura y función biológica de esta proteína en tumores y estudiar la importancia clínica de esta expresión en el tratamiento.
- **Objetivo II:** Estudiar el papel de la ruta de **Erk5** en la **génesis/progresión** de tumores **de mama** utilizando muestras de pacientes y diferentes modelos animales.

DESARROLLO Y RESULTADOS OBTENIDOS

Objetivo I:

Durante este último semestre los experimentos se han centrado fundamentalmente en ensayos bioquímicos necesarios para poder definir y describir las funciones de las distintas partes de la molécula proneuregulina-alfa-2c (proNRG α 2c).

Para ello en el laboratorio existen técnicas que eliminan la distintas partes de la molécula, en este caso concreto resultando 4 estructuras distintas proNRG Δ Ig, proNRG Δ extra, proNRG Δ intra y proNRG β 3 simil, y comparándolas con la molécula completa (proNRG α 2c).

Los experimentos realizados resumidos son los siguientes:

- Expresión en células HEK-293 para producir cada una de las moléculas en las cantidades necesarias.
- Inmunoprecipitación con anticuerpos.
- Ensayos de bioactividad, para comprobar la capacidad de cada una de las proteínas de activar cascada de señales y fosforilar ErbB2. Sólo uno de los candidatos tuvo bioactividad. Para medir la causa de esta perdida de actividad en 2 de las formas se realizó:
 - Ensayo de proteinasa K: degrada las proteínas expuestas en el exterior de la célula y permite comprobar si el mecanismo de pérdida de actividad se debe a que no son capaces de migrar a la superficie celular. (proNRG α 2c y proNRG Δ Ig son capaces de situarse en la membrana plasmática, sin embargo, los mutantes proNRG Δ extra, proNRG Δ intra y proNRG β 3 simil quedan retenidos intracelularmente)
- Experimentos de asociación a membranas: excepto uno de ellos, los demás se asocian a membranas. En el caso de la molécula entera, proNRG α 2c, el dominio transmembrana es suficiente para asociación a membranas, pero además requiere otros dominios para que la proteína se exporte a la membrana plasmática.
- Localización subcelular por técnicas de inmunofluorescencia: sobre células 293-HEK la proNRG α 2c, y los mutantes proNRG Δ extra y proNRG Δ Ig se encuentran localizados en la membrana plasmática, además estos mutantes se encuentran en acúmulos intracelulares que colocalizan con el aparato de Golgi. En cambio, el mutante proNRG Δ intra colocaliza con el aparato Golgi y con el retículo endoplásmico, además, el mutante proNRG β 3 simil se localiza en el núcleo.
- Eliminación del péptido señal, para concluir que no es necesario para que se exporten a la superficie celular.

La descripción bioquímica la continuarán durante el siguiente semestre.

Objetivo II

Experimentos en ratones: análisis de muestras de tumores de mama procedentes de ratones, que ya tenían preparados del semestre anterior según dos modelos: sobre expresan ErbB2 y sobre expresan la proNRG α 2c y su relación con la expresión de Erk5.

En los primeros se observó ligera activación de Erk5, y en los segundos ya habían confirmado que la NRG confiere ventaja proliferativa para el tumor in vivo, es decir, los tumores crecieron más en estos ratones.

Han realizado por técnicas de western blot estudio de tejido obtenido de estos ratones, concluyendo por ahora que hay mayor expresión y activación de Erk5 en los tumores de mama de los ratones que sobre expresan ErbB2 que en la mama normal.

Experimentos en muestras de pacientes: Ya habían iniciado el análisis de la presencia, localización subcelular, y activación de Erk5 en biopsias procedentes de tejido tumoral mamario humano. Para ello (y para los estudios patológicos en animales) cuentan con la colaboración del Servicio de Patología del Hospital Universitario de Salamanca.

La expresión de Erk5 y su activación fue variable en los diferentes tumores, siendo prácticamente nula en la mama normal. Analizado la expresión de ErbB2 y su estado de fosforilación en estos tumores vieron que solamente en algunos tumores en los que había sobre expresión ErbB2 había activación de Erk5, además había activación de Erk5 en tumores en los que no había sobre expresión de ErbB2, lo cual está indicando que la activación de Erk5 en estos tumores puede ser debida a otras vías independientes de ErbB2.

Se proponen ahora relacionar estos resultados con parámetros clínicos.

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Durante este semestre han presentado la revisión sobre NRG y cáncer en la publicación:

Montero, J.C., R. Rodriguez-Barrueco, A. Ocaña, E. Díaz-Rodríguez, A. Esparis-Ogando, and A. Pandiella. "*Neuregulins and Cancer*". Clin Cancer Res. (En prensa) 2008.