

**INFORME FINAL AYUDAS- CONTRATO**

<b>TÍTULO DEL PROYECTO:</b>	RECEPTORES ERBB Y SUS LIGANDOS, Y SEÑALIZACIÓN POR ERK5 EN CÁNCER
<b>NOMBRE Y APELLIDOS:</b>	<b>Juan Carlos Montero González</b>
<b>CENTRO:</b>	Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca)
<b>DIRECTOR DE PROYECTO:</b>	Atanasio Pandiella Alonso
<b>CONVOCATORIA:</b>	2006-2008
<b>PERIODO INFORME:</b>	marzo 2008-septiembre 2008 Final (2 años)
<b>PATROCINADOR:</b>	Fundación María García Estrada

Introducción y resumen del Proyecto:

- ❖ OBJETIVOS PLANTEADOS en la memoria original.
- ❖ DESARROLLO Y RESULTADOS OBTENIDOS.
- ❖ NUEVAS LÍNEAS O TRABAJOS INICIADOS (en caso de haber empezado algún trabajo que no se reflejara en la memoria original)
- ❖ CONCLUSIONES.
- ❖ OBJETIVOS PARA EL PRÓXIMO SEMESTRE.
- ❖ PUBLICACIONES Y CONGRESOS en este periodo.

Incluir firma o visto bueno del investigador responsable.  
Se recomienda una extensión máxima de 10 folios.

Vº Bº

Fdo. Atanasio Pandiella (Director del proyecto)

## **Receptores ErbB y sus ligandos, y señalización por Erk5 en cáncer.**

### **RESUMEN:**

Los receptores tirosina quinasa de la familia ErbB (EGFR, ErbB2, ErbB3, y ErbB4) y sus ligandos participan en diferentes procesos fisiológicos, y su funcionamiento anómalo puede causar cáncer (Yarden y Sliwkowski, 2001).

En el presente proyecto proponemos estudiar diferentes aspectos relacionados con la biología de este sistema de ligandos y receptores, para lo cual utilizaremos líneas celulares de cáncer de mama, diferentes modelos animales, y tumores procedentes de pacientes con cáncer de mama.

Se estudiará el papel del procesamiento proteolítico de la proneuregulina-alfa2c (proNRG $\alpha$ 2c) en la estimulación de receptores ErbB, y se evaluarán los dominios estructurales de las neuregulinas (NRGs) que son importantes en su acción biológica, utilizando mutantes de NRG con deleciones de diferentes regiones. También pretendemos estudiar la expresión e importancia clínica de las NRGs en cáncer de mama de pacientes que han sido tratados con o sin Herceptina. Analizaremos si hubo mayor sensibilidad a Herceptina en aquellos pacientes en los cuales observemos expresión de NRG.

Además, se analizará el papel de la ruta de Erk5 en la génesis/progresión de tumores de mama utilizando muestras de pacientes, así como diferentes modelos animales. Expresaremos en tejido mamario y de forma regulable una forma constitutivamente activa de la quinasa reguladora de Erk5, denominada MEK5DD, y realizaremos estudios patológicos y bioquímicos de expresión y activación de Erk5. Además, analizaremos el efecto de la activación de ErbB2 en mama sobre los niveles de Erk5 activo.

## INTRODUCCIÓN:

### **Dominios de proNRG $\alpha$ 2c importantes en su acción biológica.**

En esta sección proponemos estudiar la importancia de los diferentes dominios de las proNRGs en la correcta salida de la proteína hacia la superficie celular, y en sus funciones biológicas. Para ello usaremos como modelo la proNRG $\alpha$ 2c, una isoforma transmembrana de NRG. Esta proNRG posee una estructura general análoga a la mayoría de las NRGs transmembrana. En su ectodominio destaca una región de homología a Ig, seguida del dominio tipo EGF. A continuación se encuentra la región “linker” de unión al segmento transmembrana, al cual sigue la cola citosólica. Estructuralmente, es también importante mencionar que casi todas las NRGs transmembrana no poseen una secuencia señal en su región N-terminal por lo cual su asociación a membrana y correcto “sorting” han de deberse a otras regiones de la proteína, probablemente a la zona transmembrana.

Para analizar los dominios de proNRG importantes en su correcta salida hacia la membrana plasmática, realizaremos deleciones de dominios extracelulares e intracelulares de proNRG $\alpha$ 2c y analizaremos su exposición en la superficie celular utilizando ensayos de protección a proteasas (proteínasa K), inmunoprecipitación y biotinylación de superficie, cuando estas sean posible. Estos estudios serán complementados con fraccionamiento celular y análisis (en los diferentes mutantes) de la proporción de proNRG $\alpha$ 2c presente en la membrana plasmática respecto a la proporción retenida dentro de la célula. En principio planeamos analizar mutantes de deleción de (i) el dominio extracelular, (ii) el dominio intracelular, (iii) el dominio transmembrana e intracelular, (iv) la región del “linker”, (v) el dominio Ig y N-terminal. La localización subcelular de estos mutantes también se analizará mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos anti-proNRG (generados en nuestro laboratorio contra el extremo C-terminal), o anti-NRG (generados en nuestro laboratorio contra el dominio EGF de las neuregulinas), en aquellos mutantes que carezcan de la región intracelular.

Por otro lado, si proNRG $\alpha$ 2c carece de secuencia señal en la zona N-terminal y es dirigida a la membrana plasmática, es posible que otros miembros de la familia del EGF puedan comportarse de manera análoga. Para analizar esta hipótesis crearemos un

mutante de proTGF $\alpha$  en el cual sea delecionada su secuencia señal. Se expresará en células CHO o 293 y su distribución subcelular se analizará mediante técnicas convencionales (fraccionamiento subcelular, experimentos de protección a proteasas, inmunofluorescencia).

La capacidad de cada uno de los mutantes de proNRG $\alpha$ 2c para estimular proliferación se analizará mediante transfección en células MCF7, que responden mitogénicamente a la adición de NRG soluble. Expresaremos cada uno de los mutantes utilizando el sistema regulable de la tetraciclina. Así, si los mutantes tienen o no efecto sobre la proliferación de células MCF7 podrá ser analizado en el mismo clon, en ausencia y presencia de la forma mutante. En cada uno de estos mutantes estudiaremos, además de su efecto sobre proliferación, la capacidad de activación de los receptores ErbB2, ErbB3, y ErbB4, presentes en células MCF7. Esto se analizará mediante inmunoprecipitación de cada receptor seguido de Western blot con anti-PY. Además, investigaremos las rutas de transducción de señales implicadas en la estimulación de la proliferación. Se medirá la fosforilación de Erk1/2, de Erk5, y de Akt (con anticuerpos fosfoespecíficos), y mediante el uso de drogas inhibitoras o de formas dominante-negativas de estas moléculas se analizará su participación en la respuesta proliferativa.

### **Importancia de la ruta de Erk5 en cáncer de mama.**

Estudios de nuestro grupo (Esparís-Ogando et al., 2002) y de otros (Kato et al., 1998), han indicado que la ruta de Erk5 participa en la proliferación de células de cáncer de mama. Es más, nuestros datos indican que Erk5 se encuentra constitutivamente activo en células que sobreexpresan ErbB2. En el momento actual, y debido a estos precedentes, consideramos importante profundizar en cuál es la participación de la ruta de Erk5 en el desarrollo de tumores de mama in vivo. En primer lugar, y debido a la aparente conexión entre ErbB2 y Erk5, en lo que se refiere a la proliferación de células de cáncer de mama, analizaremos in vivo el resultado de la activación de ErbB2 sobre la activación de Erk5, e intentaremos analizar si la neutralización de la ruta de Erk5 afecta a la génesis/progresión de tumores de mama en los cuales ErbB2 se encuentre hiperactivo. Para analizar estas cuestiones pretendemos usar diferentes modelos animales. Uno de los modelos animales se basa en la sobreexpresión de ErbB2 en mama, que son comercialmente disponibles.

En tejido obtenido de tumores mamarios de estos ratones se analizará la expresión y grado de activación de Erk5 mediante Western blotting según ya hemos descrito (Esparís-Ogando et al., 2002).

Además, pretendemos analizar 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) contamos con la colaboración del Servicio de Patología de nuestro Centro. Dicho Servicio coordina el uso del banco de tumores presente en el Centro, cuyas muestras usaremos para nuestro análisis. Planeamos analizar unas 100 muestras de tumores mamarios, desde lesiones premalignas hasta carcinomas invasivos, y estudiaremos la expresión de Erk5 usando un anticuerpo anti-Erk5 que hemos desarrollado en nuestro laboratorio, y que reconoce Erk5 en inmunofluorescencia. Como control de especificidad, otra sección de la muestra se incubará con anticuerpo previamente preabsorbido con el péptido contra el cual se ha generado el anticuerpo. Las secciones serán también teñidas con anticuerpo anti-fosfo Erk5, que también hemos diseñado en el laboratorio (Esparís-Ogando et al., 2002). Los datos de inmunohistoquímica, junto con los datos clínicos de seguimiento de las pacientes de las que provienen estas muestras, permitirán acercarse a la importancia que la expresión de Erk5 pueda tener en la progresión/pronóstico del cáncer de mama.

#### **OBJETIVOS:**

- 1.- Evaluar los dominios estructurales de las NRGs que son importantes para su acción biológica.
- 2.- Estudiar el papel de la ruta de Erk5 en la génesis/progresión de tumores de mama utilizando muestras de pacientes y diferentes modelos animales.

#### **RESULTADOS (1º objetivo):**

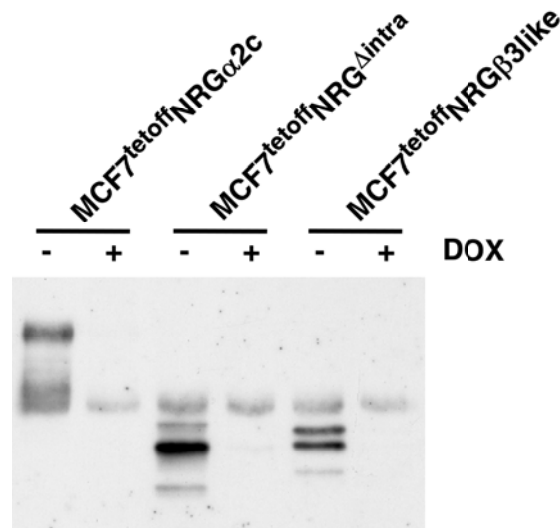
En el semestre anterior analizamos los diferentes mutantes en los dominios estructurales de las NRGs, para poder identificar tanto dominios importantes para su asociación a membrana, como para su correcta exportación a la membrana plasmática. Mediante experimentos de protección de proteasas, inmunofluorescencia y fraccionamiento subcelular habíamos determinado que proNRG $\alpha$ 2c, proNRG $\Delta$ Ig, y proNRG $\Delta$ extra son capaces de situarse en la membrana plasmática, sin embargo, los mutantes proNRG $\Delta$ intra

y proNRG $\beta$ 3 simil, quedaban retenidos intracelularmente. También concluimos que el dominio transmembrana de la proNRG $\alpha$ 2c es suficiente para asociarse a membranas, y que además se requieren otros dominios para que la proteína se exporte correctamente a la superficie celular. Por otro lado, con el mutante de proTGF $\alpha$  sin el péptido señal, pudimos concluir que el péptido señal no es necesario para que estos factores se exporten a la membrana plasmática. En este semestre hemos seguido analizando estos mutantes de proNRG para averiguar si son capaces de retener actividad biológica en los diferentes sitios donde quedan retenidos (tanto en la membrana plásmatica, como en compartimentos intracelulares), al igual que ocurre con formas mutantes de proEGF que quedan retenidas intracelularmente y son capaces de ser biológicamente activas tanto en esta localización como en la membrana plasmática.

En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio establecimos un sistema para evaluar las propiedades biológicas de las proNRGs usando células MCF7. Estas células expresan receptores ErbBs análogos a los que se expresan en el epitelio de la mama normal, y responden mitogénicamente a NRG soluble. Además la expresión de proNRG $\alpha$ 2c en estas células estimula fuertemente su proliferación.

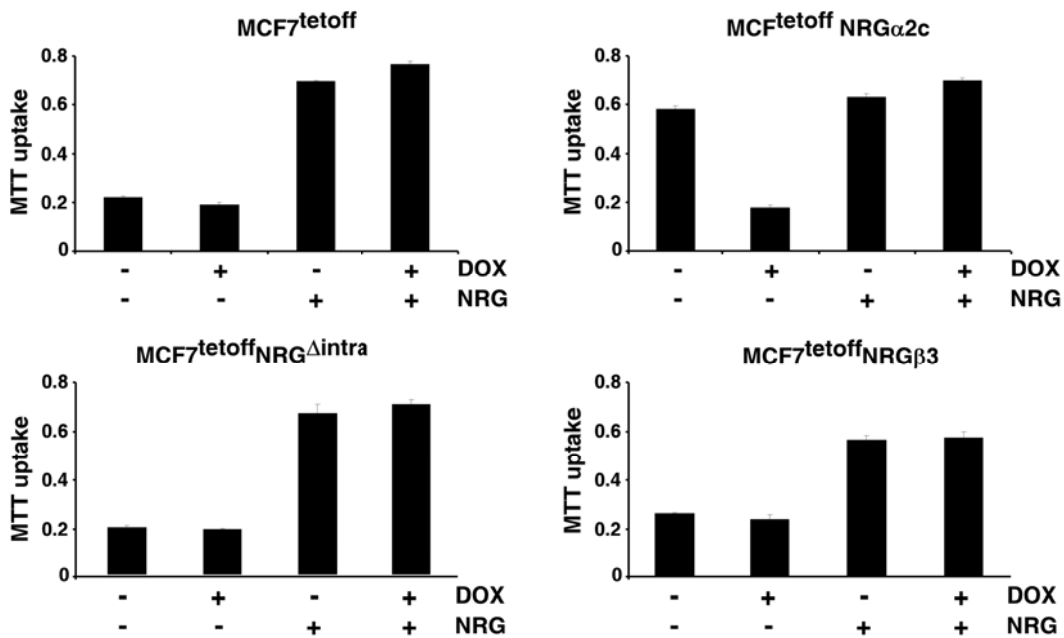
En primer lugar decidimos explorar si el mutante proNRG $\Delta^{intra}$ , el cual queda retenido en compartimentos intracelulares, tiene un comportamiento análogo a los mutantes de proEGF, y averiguar si el mutante proNRG $\beta$ 3simil es activo en términos de proliferación. Para poder estudiar la actividad biológica generamos clones expresores de los diferentes mutantes de proNRG (proNRG $\Delta^{intra}$ , proNRG $\beta$ 3simil) y el tipo silvestre (proNRG $\alpha$ 2c) en células MCF7TetOff, en las cuales la expresión de estos mutantes pueden ser regulados a voluntad mediante la adicción de doxiciclina, evitando así las diferencias clonales que pueden existir entre diferentes clones. Para obtener los diferentes clones, transfectamos con lipofectamina el cADN de cada uno de los mutantes en la línea celular MCF7TetOff, y seleccionamos los clones positivos añadiendo al medio de cultivo el antibiótico G418. La positividad (expresión de proNRG) de los diferentes clones fue analizada mediante Western blot usando el anticuerpo anti-ectodominio de proNRG. Los clones que fueron positivos se crecieron en ausencia o presencia de doxiciclina en el medio de cultivo, y se analizó la expresión de proNRG mediante Western blot, para así de esta manera poder comprobar en cuales

de ellos podíamos reprimir la expresión de la proteína. De todos los clones que fueron positivos para las diferentes formas de proNRG, y que además podíamos reprimir, solamente nos quedamos con aquéllos que tenían igual expresión (ver figura).



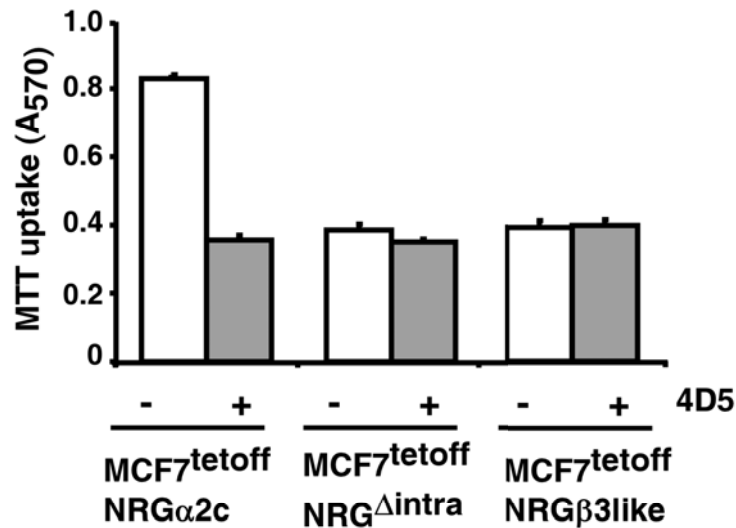
Para analizar la proliferación de los clones llevamos a cabo un ensayo de metabolización del MTT. En este experimento hemos usado NRG exógena como control de la máxima proliferación inducida por factores de crecimiento. Para llevar a cabo este experimento hemos plaqueado, en placas multi-pocillo, 20.000 células por pocillo y por cuadruplicado, de cada uno de los mutantes de proNRG, en medio de cultivo con suero. Al día siguiente, el medio de cultivo ha sido reemplazado por medio sin suero en el cual hemos añadido o no doxyciclina, o NRG soluble. A los tres días hemos medido la proliferación de estas células de una manera indirecta usando para ello el colorante MTT. Como podemos observar en la figura, las células MCF7TetOff-NRG $\alpha$ 2c proliferan de manera muy eficiente en medio sin suero, además esta proliferación fue fuertemente inhibida cuando se le añadió doxyciclina al medio de cultivo. La tasa de proliferación obtenida por la expresión de proNRG $\alpha$ 2c fue análoga a la obtenida cuando en el medio de cultivo se le suplementó NRG soluble exógena, y la acción de esta última fue similar en células tratadas con doxyciclina. Esto nos está indicando que esta droga no afecta a la respuesta de las células a NRG, y demuestra que la disminución en la proliferación en presencia de doxyciclina es debida a la expresión

de proNRG $\alpha$ 2c. En contraste a las células MCF7TetOff-NRG $\alpha$ 2c, células expresoras de proNRG $\Delta$ <sup>intra</sup>, o proNRG $\beta$ 3simil, no son capaces de proliferar en medio de cultivo sin suero, además esto fue corroborado ya que su proliferación no disminuyó cuando fueron tratadas con doxiciclina. En cambio, la estimulación de estas células con NRG soluble exógena produjo un incremento en la proliferación que fue similar al obtenido en las células MCF7TetOff-NRG $\alpha$ 2c.

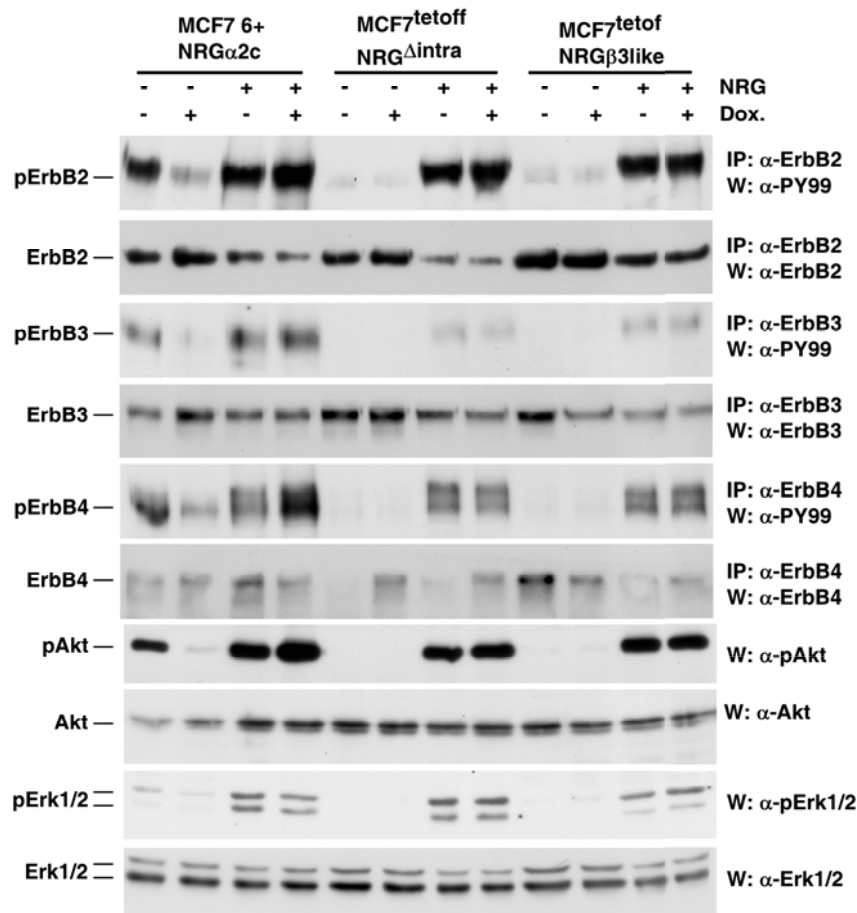


También usamos el 4D5, un anticuerpo monoclonal diseñado contra el ectodominio de ErbB2, y que es capaz de prevenir la proliferación de las células MCF7TetOff-NRG $\alpha$ 2c. El tratamiento con este anticuerpo previno la proliferación de estas células, en cambio no afectó a la proliferación de las células MCF7TetOff-NRG $\Delta$ <sup>intra</sup> y MCF7TetOff- $\beta$ 3simil (ver figura). La inhibición de la proliferación de las células MCF7TetOff-NRG $\alpha$ 2c alcanzó valores análogos a los obtenidos en células MCF7TetOff-NRG $\Delta$ <sup>intra</sup> y MCF7TetOff- $\beta$ 3simil. Estos experimentos nos están indicando que solamente la proNRG $\alpha$ 2c, la cual está localizada principalmente en la membrana plasmática, es capaz de retener actividad biológica. En cambio, los otros dos

mutantes que quedan retenidos en compartimentos intracelulares no son capaces de retener actividad biológica.

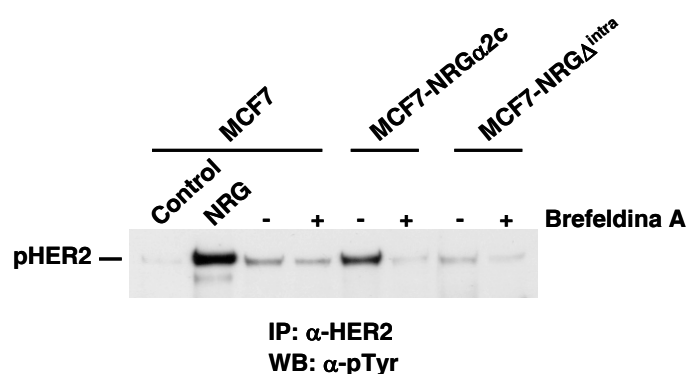


Para analizar si estas diferencias biológicas en términos de proliferación reflejan diferencias en señalización, exploramos el estado de activación de los receptores ErbBs y las vías de señalización activadas por éstos, y relacionadas con supervivencia y proliferación en células MCF7. ErbB2, ErbB3 y erbB4 fueron constitutivamente fosforilados en residuos de tirosina en células MCF7TetOff-NRG $\alpha$ 2c pero no en las otras dos líneas celulares (MCF7TetOff-NRG $\Delta$ <sup>intra</sup> y MCF7TetOff- $\beta$ 3simil). De manera análoga a los receptores ErbBs, la fosforilación basal de Akt en serina 473 y la fosforilación de Erk1/2, fue solamente detectada en células MCF7TetOff-NRG $\alpha$ 2c y no en las otras dos líneas. Estas diferencias en la activación basal tanto de receptores ErbBs como de las vías de Akt y Erk1/2 no fueron debidas a que estas células no responden a NRG, ya que cuando ésta fue añadida de manera exógena, las células MCF7TetOff-NRG $\Delta$ <sup>intra</sup> y MCF7TetOff- $\beta$ 3simil respondieron de manera normal activando los receptores ErbBs y fosforilando Akt y Erk1/2. La activación basal tanto de receptores ErbBs como de Akt y Erk1/2 disminuyó cuando en el medio de cultivo se le añadió doxiclina, y se restableció al añadir NRG exógena soluble.

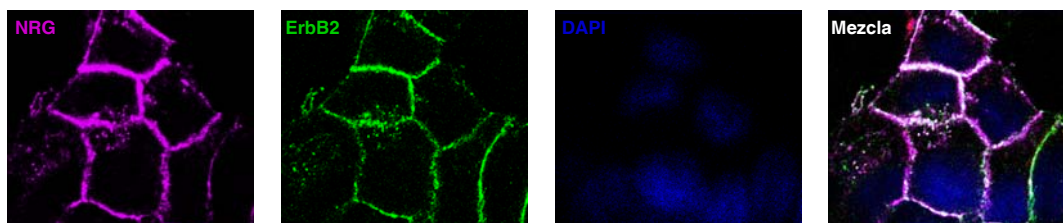


Todos estos datos nos estaban indicando que la proNRG $\alpha$ 2c solamente es capaz de activar a los receptores ErbBs y a sus vías de señalización cuando está situada en la membrana plasmática, y no en compartimentos intracelulares. Aún así cabe la posibilidad de que estos mutantes que hemos generado de manera artificial tengan su estructura dañada y no sean capaces de activar a los receptores ErbBs. Para poder verificar si la proNRG en compartimentos intracelulares es capaz de activar a sus receptores, hemos realizado dos experimentos diferentes. Por un lado hemos tratado células MCF7TetOff-NRG $\alpha$ 2c con Brefeldina A. Con este tratamiento conseguimos retener en compartimentos intracelulares la forma silvestre de NRG y los receptores ErbBs. Por otro lado hemos realizado experimentos de inmunofluorescencia en el que queremos ver si hay colocalización de proNRG y ErbB2 fosforilado. Si hubiera colocalización de las dos proteínas podríamos concluir que la proNRG tipo silvestre es capaz de activar a los receptores ErbBs en compartimentos intracelulares.

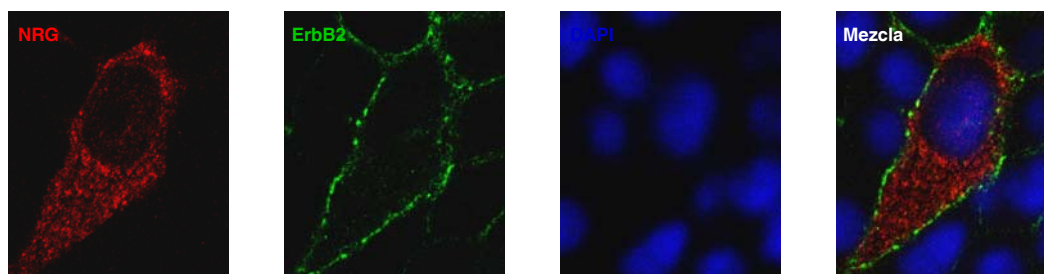
Para llevar a cabo la primera aproximación, células MCF7-NRG $\alpha$ 2c se trataron durante toda la noche con y sin Brefeldina A en medio sin suero. Al día siguiente estas células se lisaron y el extracto celular se usó para detectar fosforilación de ErbB2 mediante experimentos de Western blot. Como se puede observar en la figura, en células sin tratar, ErbB2 está fosforilado, pero esta fosforilación se pierde cuando se trata a las células con Brefeldina A, indicándonos que la proNRG en compartimentos intracelulares no es capaz de activar a sus receptores ErbBs. Para poder verificar que las bandas que corresponden a proNRG se encuentran en compartimentos intracelulares realizamos un experimento de protección de proteasas en células tratadas o sin tratar con Brefeldina A. El tratamiento con Brefeldina A produjo la acumulación de proNRG en compartimentos intracelulares ya que el tratamiento con proteinasa K no fue capaz de degradarla. Como he mencionado anteriormente, otra forma de comprobar si la NRG puede activar a los receptores ErbBs, es ver si estas proteínas colocalizan mediante experimentos de inmunofluorescencia. Para ello se realizó un experimento de inmunofluorescencia en células MCF7-NRG $\alpha$ 2c y MCF7-NRG $\Delta$ <sup>intra</sup>, en el que se marcó por un lado NRG, y por otro el receptor ErbB2, usando anticuerpos específicos para cada molécula. Como se puede observar en la figura, en células MCF7-NRG $\alpha$ 2c la NRG y ErbB2 colocalizan principalmente en la membrana plasmática, y apenas se observa colocalización en compartimentos intracelulares. Además, en células MCF7-NRG $\Delta$ <sup>intra</sup>, ErbB2 se encuentra localizado en la membrana, en cambio la NRG se localiza en el interior celular. En ninguna de las dos líneas se ve colocalización de ErbB2 y NRG en compartimentos intracelulares. Estos datos nos están indicando que solamente se produce la activación de los receptores ErbBs en la membrana plasmática, y no en compartimentos intracelulares, ya que ambas proteínas están principalmente localizadas en la superficie celular.



### MCF7-NRG $\alpha$ 2c



### MCF7-NRG $\Delta$ intra



**El segundo de los objetivos del proyecto es:**

2.- Estudiar el papel de la ruta de Erk5 en la génesis/progresión de tumores de mama utilizando muestras de pacientes y diferentes modelos animales.

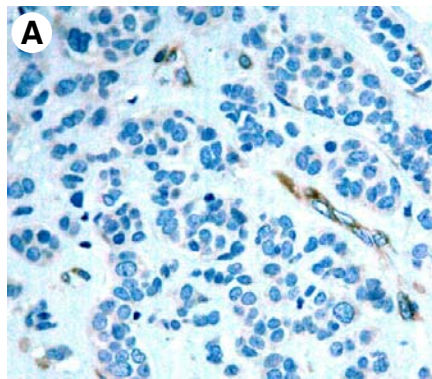
### **RESULTADOS (2º Objetivo):**

En el semestre anterior analizamos la expresión y activación de Erk5 en los tumores de mama de los ratones FVB/neu, y observamos que en estos había mayor expresión y activación que en la mama normal. También analizamos la expresión y la activación de Erk5 en tumores de pacientes, viendo que su expresión y activación fue variable, siendo prácticamente nula en la mama normal.

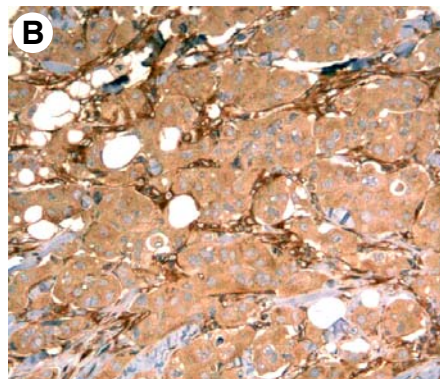
En este semestre hemos seguido analizando en tumores procedentes de pacientes la expresión de Erk5, pero mediante inmunohistoquímica, debido a que no tenemos suficiente material para poder analizarlo mediante experimentos de Western blot. Esta última técnica nos permite saber si está fosforilado y por lo tanto activo, en cambio

mediante inmunohistoquímica podemos conocer la expresión de Erk5 en las diferentes células del tejido tumoral y en donde se localiza, pero no si está activo.

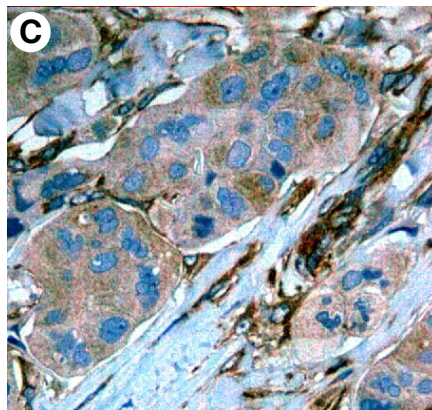
Un total de 85 tumores mamarios recopilados desde 1999 a 2005 fueron obtenidos al azar desde el departamento de Patología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Después de la eliminación quirúrgica del tumor los pacientes recibieron tratamiento adyuvante dependiendo de sus parámetros clínicos y patológicos. La expresión de Erk5 fue analizada en estos tumores mediante inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti Erk5 que reconoce la región C-terminal generado en nuestro laboratorio. El análisis cuantitativo de Erk5 fue realizado basándonos en el porcentaje de células positivas e intensidad de tinción, y fue definido de la siguiente manera: 0, tinción no apreciable (0 a <10%); 1, tinción de intensidad débil (entre el 10% y el 30%); 2, tinción de intensidad intermedia (30% al 60%); y 3, tinción de fuerte intensidad (>60%). La tinción de la mama normal fue definida con una puntuación de 1. Los tumores los consideramos positivos (Erk5 alto) cuando tienen una puntuación de 2 a 3, y negativos con una puntuación de 0 a 1. Usando una distribución two-tier (alto/bajo) en el cual valores iguales o por encima del 2 fueron considerados positivos, encontramos niveles altos de Erk5 en 17 pacientes (20% de los pacientes). En tejido mamario normal la tinción de Erk5 fue débil (puntuación de 1) y coincidió con el citoplasma de las células epiteliales. En las células tumorales se observaron dos patrones de tinción para Erk5. Uno correspondiente a una señal citoplásmica difusa, y otro representado por un depósito perinuclear de Erk5 (ver figura). También, se observó tinción citoplasmática de Erk5 en la mayoría de las células endoteliales y en los fibroblastos del estroma.



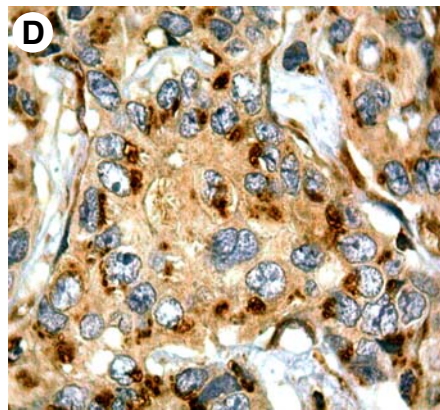
**Erk5 bajo**



**Erk5 alto**



**Citoplasmático difuso**



**Acumulación perinuclear**

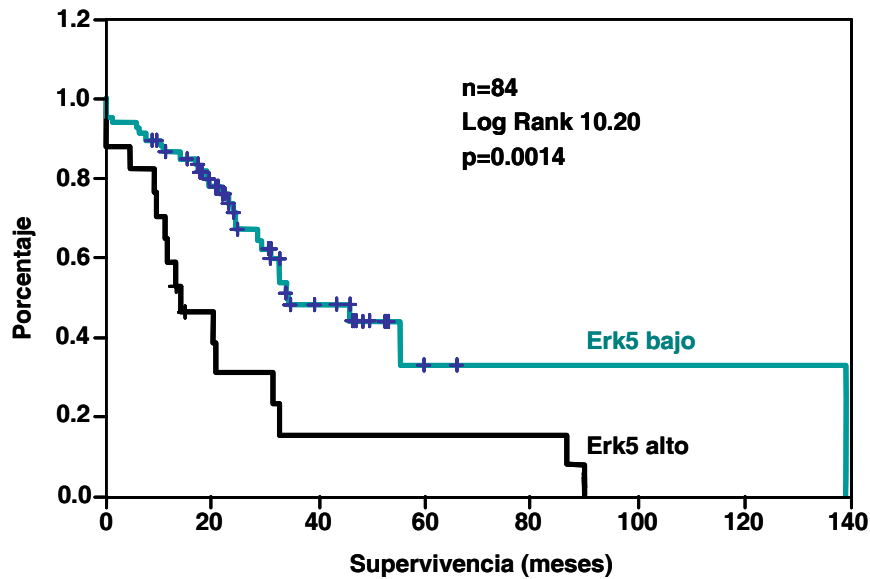
Debido a la importancia que tiene Erk5 en proliferación celular, revisamos las características clínicas de nuestra serie de pacientes, y estudiamos si alguna de estas características como la edad, grado del tumor, tamaño del tumor, presencia de receptores hormonales y nódulos linfáticos axilares, correlacionaban con la cantidad de Erk5 que habíamos determinado en los tumores mediante inmunohistoquímica (ver tabla I). No observamos correlación con ninguno de los parámetros, con la excepción de una correlación positiva para la expresión del receptor de progesterona ( $p=0.028$ ).

**Tabla 1. Pacientes y características del tumor (n=84).**

<b>Pacientes edad (n=81)</b>	<b>mediana 58 (rango 31-89)</b>
<b>Grado (n=77)</b>	
1-2	32
3	45
<b>Diámetro tumor (mm) (n=72)</b>	<b>mediana 26.5 (rango 8-75 mm)</b>
<b>ER (n=84)</b>	
<b>Positivo</b>	<b>52</b>
<b>Negativo</b>	<b>32</b>
<b>PR (n=84)</b>	
<b>Positivo</b>	<b>49</b>
<b>Negativo</b>	<b>35</b>
<b>HER2 FISH (n=84)</b>	
<b>Positivo</b>	<b>24</b>
<b>Negativo</b>	<b>60</b>
<b>Nódulos linfáticos (n=77)</b>	
<b>Positivo</b>	<b>51</b>
<b>Negativo</b>	<b>26</b>

Para explorar si Erk5 está asociado con un fenotipo mas agresivo, estudiamos el pronóstico de estos pacientes con respecto a los niveles de Erk5. Los pacientes con altos niveles de Erk5 tuvieron un peor pronóstico (Disease Free Survival), comparándolo con los pacientes con niveles bajos (test de log-rank 10.20 p=0.0014). La media de tiempo DFS fue 34,33 (95% CI:18,52-50,14) meses para pacientes con niveles bajos, comparado con 14,13 (95% CI:3,78-24,48) meses para pacientes con niveles altos (ver figura).

	Riesgo de recaída mediana en meses			
Erk5 bajo	67	29	34.33	95% IC (18.52-50.14)
Erk5 alto	17	15	14.13	95% IC (3.78-24.48)



También llevamos a cabo un análisis univariante para estudiar variables que podrían ser asociadas con pronóstico. En este análisis solamente el receptor de estrógeno, ErbB2 medido mediante FISH, y Erk5 fueron factores pronósticos (ver tabla 2). Además, un análisis multivariante indicó que Erk5 fue un factor pronóstico independiente (ver tabla 3).

**Tabla 2. Asociación entre variables clínico-patológicas y expresión de Erk5.**

**Variables clínico-patológicas**

Edad	0.156*
Grado tumor	0.608*
Tamaño tumor	0.201*
ER	0.145#
PR	0.024#†
Nódulos linfáticos axilares	0.078#

\*Mann-Whitney U test

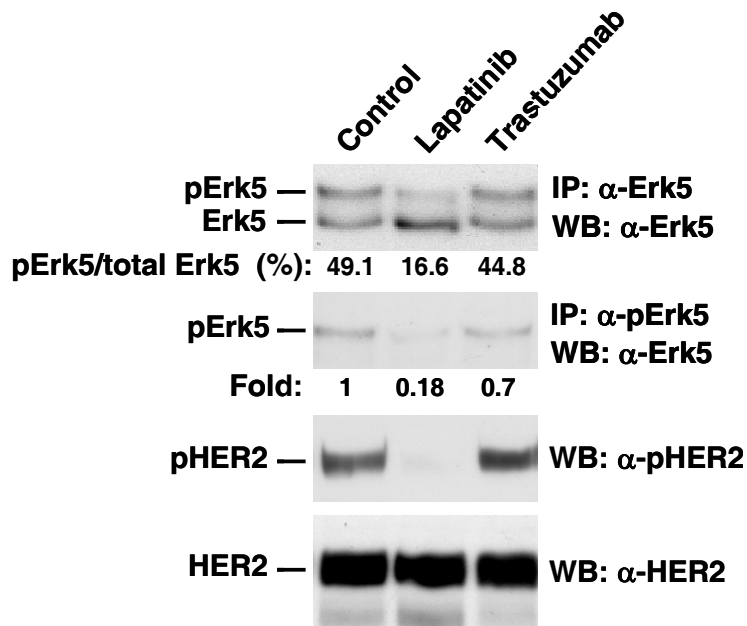
#Fisher exact test

† Statistically significant

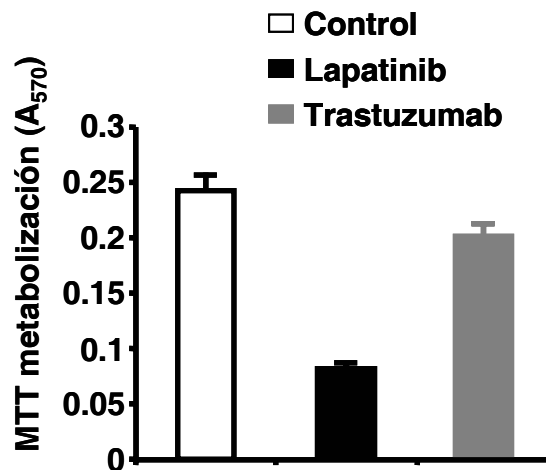
**Table 3 A. Association Of Erk5 With Disease Free Survival In 84 Breast Cancer Patients Using The Univariate Proportional Hazards Model (Cox Analysis).**

	<b>Relative risk</b>	<b>95% CI</b>	<b>p</b>
<b>Erk5</b> negative expression vs. positive	2.786	(1.389-5.587)	0.004
<b>HER2 FISH</b> amplification vs. no amplification	1.935	(1.011-3.704)	0.046
<b>Tumor size</b> <3 vs. >3 cm	2.035	(0.967-4.280)	0.061
<b>Axillary lymph nodes</b> Positive vs. negative	1.821	(0.721-4.600)	0.205
<b>Tumor Grade</b> I,II vs. III	1.663	(0.765-3.618)	0.199
<b>Estrogen Receptors</b> Positive vs. negative	0.421	(0.214-0.832)	0.013
<b>Progesterone Receptors</b> Positive vs. negative	0.580	(0.285-1.180)	0.133
<b>Age</b> <60 vs. >60 years	0.627	(0.309-1.274)	0.197

Debido a la importancia que tiene Erk5 en el pronóstico de los pacientes, decidimos analizar si la expresión de Erk5/pErk5 puede regular la respuesta a tratamientos que son usados en clínica contra el cáncer de mama. Primero exploramos si el tratamiento con agentes que tienen como diana a receptores ErbBs, tienen efecto en los niveles o la actividad de Erk5. Hemos utilizado células BT474, las cuales sobreexpresan ErbB2 y tienen Erk5 constitutivamente activo. Estas células las hemos tratado con Lapatinib, una molécula inhibidora de ErbB2, y Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra su ectodominio. Como se puede observar en la figura el tratamiento con Lapatinib tuvo un fuerte efecto en la fosforilación de ErbB2, y además disminuyó los niveles de pErk5. En cambio, el Trastuzumab no inhibió la fosforilación de ErbB2 y tampoco bajó los niveles de pErk5.

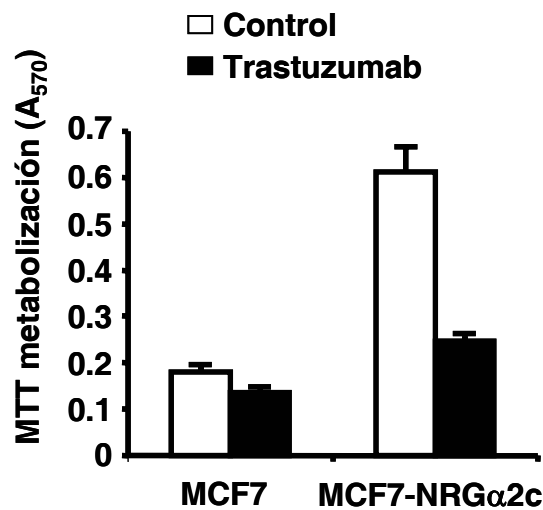
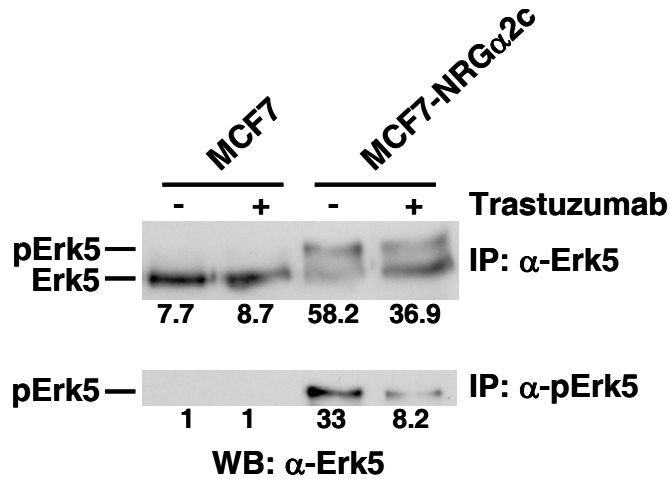


En experimentos de proliferación solamente el Lapatinib tuvo un fuerte efecto sobre la proliferación de la células BT474.



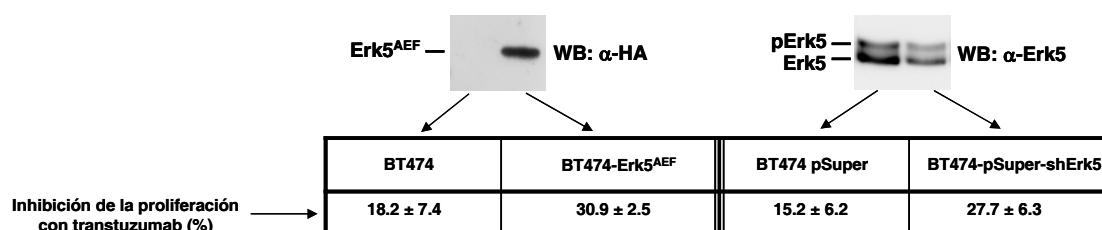
Debido a que el Trastuzumab no tuvo efecto en la activación de Erk5 en células BT474, decidimos utilizar una línea celular en la que este fármaco fuera altamente sensible. Para ello utilizamos una línea celular de cáncer de mama que no sobreexpresa ErbB2, pero que expresa Neuregulina (MCF7-NRG $\alpha$ 2c), y en la que Erk5 está constitutivamente activo. Trastuzumab no afectó a la proliferación de células MCF7 parentales, pero sí

disminuyó la proliferación de células MCF7 expresoras de NRG $\alpha$ 2c (MCF7-NRG $\alpha$ 2c) (ver figura), y además disminuyó la fosforilación de Erk5 (ver figura).



También hemos investigado la acción de Trastuzumab en células BT474, en la que hemos eliminado la actividad de Erk5 mediante la expresión de una forma dominante negativo, o mediante la disminución de sus niveles con ARN de interferencia. Mediante experimentos bioquímicos comprobamos que las células estaban transfectadas con la forma dominante negativo, y que en las células transfectadas con el RNA de interferencia se produjo una disminución en los niveles de Erk5 (Ver figura). Estas células tranfectadas con el dominante negativo o con el RNA de interferencia fueron plaqueadas y tratadas con Trastuzumab para llevar a cabo un ensayo de proliferación

mediante MTT. Como se puede observar, la inhibición de la proliferación de las células BT474 a tres días de tratamiento con Trastuzumab fue de  $18,2 \pm 7,4\%$  (media  $\pm$  desviación típica), mientras que en las células BT474-Erk5<sup>AEF</sup> la inhibición de la proliferación fue de  $30,9 \pm 2,5\%$ . Respecto a los experimentos de interferencia, en las células BT474 no interferidas, Trastuzumab disminuyó su proliferación en  $15,2 \pm 6,2\%$ , mientras que en las células BT474 interferidas, la inhibición de la proliferación fue de  $27,7 \pm 6,3\%$ .



**NUEVAS LÍNEAS O TRABAJOS INICIADOS** (en caso de haber empezado algún trabajo que no se reflejara en la memoria original)

### CONCLUSIONES:

- Solamente la proNRG $\alpha$ 2c, la cual esta localizada principalmente en la membrana plasmática, es capaz de retener actividad biológica. En cambio, los otros dos mutantes que quedan retenidos en compartimentos intracelulares no presentan actividad biológica.
- La proNRG $\alpha$ 2c solamente es capaz de activar a los receptores ErbBs y a sus vías de señalización cuando está localizada en la membrana plasmática, y no en compartimentos intracelulares.
- Erk5 está sobreexpresado en el 20% de los pacientes con cáncer de mama analizados. En el tejido mamario normal la tinción de Erk5 fue débil (puntuación de 1) y coincidió con el citoplasma de las células epiteliales.
- En las células tumorales se observaron dos patrones de tinción para Erk5. Uno correspondiendo a una señal citoplásmica difusa, y otro representado por un depósito perinuclear de Erk5.

- Erk5 está asociado con un fenotipo mas agresivo. Los pacientes con altos niveles de Erk5 tienen peor pronóstico que aquellos que tienen niveles bajos de Erk5. Además Erk5 fue un factor pronóstico independiente.
- La expresión de Erk5/pErk5 puede regular la respuesta a tratamientos que son usados en clínica contra el cáncer de mama.

#### **OBJETIVOS PARA EL PRÓXIMO SEMESTRE:**

- En estos momentos hemos enviado para publicación un artículo con titulo: Expression of Erk5 in early stage breast cancer and association with disease free survival.

Estamos pendientes de la resolución, y si hubiera que hacer cambios los realizaríamos en este periodo. Además, estamos preparando otro artículo con titulo: proNeuregulin- $\alpha$ 2c targeting is critical for its juxtacrine action and is controlled by multiple domains, que será enviado en unos meses.

En el futuro continuaremos con estas líneas de trabajo.

#### **PUBLICACIONES Y CONGRESOS en este periodo:**