



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

Regulación del receptor ErbB2 y su
relación con la diferenciación
neuroendocrina en el cáncer de próstata

TESIS DOCTORAL

María Alicia Cortés

2010



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

Facultad de Medicina

Campus Universitario

28871 Alcalá de Henares (Madrid)

Teléfono: 91 885 4869 Fax: 91 885 4585

Begoña Colás Escudero y María Pilar López Ruiz
Profesoras titulares del Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular de la Universidad de Alcalá

INFORMAN:

Que el trabajo titulado "REGULACIÓN DEL RECEPTOR ErbB2 Y SU RELACIÓN CON LA DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA" realizado por María Alicia Cortés ha sido llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá bajo su dirección y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que la interesada opte al grado de Doctor.

Alcalá de Henares, 9 de septiembre de 2010

Dra. Begoña Colás Escudero

Dra. María Pilar López Ruiz



Universidad
de Alcalá

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

Facultad de Medicina

Campus Universitario

28871 Alcalá de Henares (Madrid)

Teléfono: 91 885 4869 Fax: 91 885 4585

María José Carmena Sierra

Directora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la
Universidad de Alcalá

INFORMA:

Que la tesis que lleva el título "REGULACIÓN DEL RECEPTOR ErbB2 Y SU RELACIÓN CON LA DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA" realizada por María Alicia Cortés ha sido llevada a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá bajo la dirección de **Begoña Colás Escudero** y **María Pilar López Ruiz** y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que la interesada opte al grado de Doctor.

Alcalá de Henares, 9 de septiembre de 2010

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. J. Carmena Sierra'.

Dra. María José Carmena Sierra

Todo aquel que está seriamente comprometido con el cultivo de la ciencia, llegará a convencerse de que en todas las leyes del universo, está manifiesto un espíritu infinitamente superior al hombre y ante el cual, nosotros con nuestros poderes, debemos sentirnos humildes.

Anónimo

A mis padres Tuti y Kiko
Mis hermanos Pato, José, Lupe, Juan y Miguel
A Emanuel Agustín

Son muchas las personas que han aportado a la realización de esta tesis doctoral, tanto por su saber científico como por su saber humano. No alcanzarían hojas para expresar mi agradecimiento a todos ustedes.

Tengo que agradecer a los que han permitido el financiamiento de mi estancia aquí a la Universidad de Alcalá con la Beca Cervantes por la que he pisado el suelo de Alcalá de Henares. Más importante aún, a las Dras. Begoña Colás y Pilar López Ruiz que me han mantenido dentro de sus puertas, confiando en mí como apoyo a la investigación dentro de sus proyectos. Lo que ha permitido que yo pueda estar hoy aquí terminando la tesis.

A todos los profesores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular que me hicieron sentir como una más de esta gran familia. Gracias por sus apoyos en los pasillos y en las clases de prácticas.

A la Dra. Begoña Colás por haberme introducido dentro del mundo científico que desconocía, gracias por haberme permitido formar parte de este laboratorio. Y sobre todo, gracias por ser mi madre en momentos complicados, por haberme abierto el corazón y tu casa cuando sabes que necesito del calor familiar.

A la Dra. Pilar López Ruiz por haber confiado en mi sonrisa, por haberme enseñado y haber estado sentada al lado mío acabando los ensayos de *Binding*. Gracias por estar siempre dispuesta a lo que necesite tanto para echarme una mano en los experimentos como para escucharme y ser mi otra mami aquí en España.

Al Dr. Antonio Chiloeches y al Dr. Santiago Roperero por haberme resuelto tantas dudas y aportado muchos conocimientos para la elaboración de este trabajo.

A Angélica por haber sido mi ángel guardián durante todos estos años.

A Juan y Guillermo de la Instalación Radiactiva por haber compartido horas largas y estar siempre presentes para lo que necesitaba.

A Isabel y todas ustedes que han pertenecido a la Unidad de Cultivo durante estos años, por soportarme todos los días allí dentro y por darme su confianza.

A todos los del módulo I gracias por ayudarme siempre con una sonrisa e incluirme como una entre ustedes. En especial gracias a Alberto y Lilian por ayudarme en la puesta a punto del *Binding*, gracias por ese apoyo incondicional.

María Alicia Cortés

A la gente del módulo III de los que me llevo amigos, gracias por el apoyo científico y porque aunque están lejos han sabido estar siempre muy cerca gracias a todos. Arantxa gracias por estar siempre dispuesta a solucionarme los problemas y por enseñarme las Inmunos.

A los vecinos de enfrente del módulo II, por estar siempre dispuestos a darme una mano. Gracias porque me hicieron sentir siempre que no existía el pasillo y que formábamos un gran laboratorio.

A los vecinos de al lado y abajo gracias por todas las tardes, mañanas y noches compartidas juntos, me los llevo a cada uno en mi corazón. Gracias a todas la manos que me ayudaron con los experimentos.

A mis compañeros de mesada Carmen, Javi, Andrés y Ariel gracias por aguantarme cada uno como pudo, gracias porque de cada uno he aprendido mucho y gran parte de este trabajo es también de ustedes. A ti Rosa porque de tu dedicación y trabajo, sale esta tesis.

A Rima gracias por compartir conmigo tu casa y cada vez que ponga la estrella en el árbol de navidad sonreiré pensando en ti. A Soraya gracias por regalarme tu sonrisa y hacerme las cenas preocupándote por mi, te debo una visita. A Ximena gracias por ser un gran apoyo aquí y te debo miles.

A mi amigo/a ya sabes que no puedo expresarte mi agradecimiento con palabras estoy siempre en deuda contigo.

A la gran familia del Hemisferio Sur, tanto a mi familia de Posadas como a mi familia adoptiva de Goya, gracias por ser el puente que hace que no me sienta sola, gracias por ser el combustible que me devuelve a España feliz, esta tesis no se hubiera escrito sin ustedes. Gracias a mis hermanos por ese abrazo de oso que me protege. Gracias a papá y mamá que apoyaron siempre este proyecto y me dieron alas.

A Emanuel por caminar conmigo todos los días y ser mi guía.

A vos que estás leyendo esta tesis te llevo en mi corazón y quiero decirte GRACIAS.

Mali

María Alicia Cortés

SUMMARY.....	1
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCIÓN	9
1. PROSTATA.....	11
1.1 Regulación hormonal en el tejido prostático.....	14
1.1.1 Los andrógenos y su receptor.....	14
1.1.2 Factores de crecimiento y la interacción epitelio- estroma.....	15
2. CANCER DE PROSTATA.....	17
2.1 Epidemiología	17
2.2 Aspectos clínicos	18
2.3 Aspectos moleculares y progresión del cáncer de próstata.....	19
2.3.1 Mecanismos moleculares implicados en la resistencia a los andrógenos.....	19
2.3.1.1 Papel de los factores de crecimiento	21
2.3.1.2 Papel de la diferenciación neuroendocrina (NE).....	23
3. EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y SUS RECEPTORES.....	26
3.1 Estructura y activación de los receptores.....	27
3.2 Mecanismos que regulan a los receptores ErbBs	29
3.2.1 Endocitosis y degradación de EGFR y ErbB2.....	30
3.2.1.2 La chaperona Hsp90	33
3.2.2 Regulación de la síntesis de ErbB2	34
3.3 Vías de transducción de señales.....	35
3.3.1 Señalización celular por la vía de Ras/MAPK-Erk.....	37
3.3.2 Señalización celular por la vía de la PI3K/Akt.....	39
3.3.2.1 Señalización celular por la vía de NFκB	44
3.4 Receptores ErbBs y cáncer.....	47
3.4.1 EGFR/ErbB1	47

3.4.2 ErbB2	48
3.4.3 ErbB3 y ErbB4	49
3.5 Receptores ErbBs y cáncer de próstata	50
OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. MATERIALES	59
2. MÉTODOS	62
2.1 Cultivos celulares.....	62
2.2 Obtención de los extractos celulares.....	63
2.3 Inmunoprecipitación.....	64
2.4 Inmunodetección de proteínas (Western blot)	65
2.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)	65
2.4.2 Transferencia	65
2.4.3 Inmunodetección con anticuerpos específicos.....	65
2.5 Transfección de ARN de interferencia.....	68
2.6 Ensayo de la actividad transcripcional de NFκB	69
2.7 Extracción de ARN y retrotranscripción.....	70
2.7.1 PCR cualitativa.....	71
2.7.2 PCR a tiempo real.....	72
2.8 Análisis del ciclo celular y del potencial de membrana mitocondrial con sonda TMRM por citometría de flujo	73
2.9 Técnica de TUNEL para la detección de la fragmentación del ADN por citometría de flujo:	74
2.10 Análisis de la fragmentación de PARP por western blot.....	75
2.11 Determinación de los niveles del receptor ErbB2 en la superficie celular por citometría de flujo	75
2.12 Inmunofluorescencia.....	76
2.13 Análisis de los datos.	77
RESULTADOS	79
1. IMPLICACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR Y EN LA DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA DE CÉLULAS LNCAP	81

2. CAMBIOS EN LOS RECEPTORES EGFR Y ERBB2 EN EL TRATAMIENTO COMBINADO DE EGF Y LY29, EN LÍNEAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA	84
2.1 Niveles y actividad de EGFR y ErbB2	84
2.2 Localización y dimerización de ErbB2 en las células LNCaP	90
3. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL AUMENTO DE ERBB2 EN LAS LNCAP, TRAS EL TRATAMIENTO CON EGF Y LY29.....	94
3.1 Importancia del aumento de ErbB2 en el proceso de diferenciación neuroendocrina	94
3.2 Importancia del aumento de ErbB2 en la supervivencia celular	97
4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE MEDIAN EL AUMENTO DE ERBB2 INDUCIDO POR EL EGF EN PRESENCIA DE LY29.....	98
4.1 Implicación de Akt.....	98
4.2 Implicación de PI3K.....	99
4.3 Implicación de otras dianas del LY29.....	102
5. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL AUMENTO DE ERBB2 EN EL TRATAMIENTO DE EGF EN PRESENCIA DE LY29	104
5.1 Endocitosis y degradación de ErbB2.....	104
5.2. Síntesis de ErbB2	112
5.2.1 Implicación de Hsp90 en el aumento del ARN mensajero de ErbB2	114
5.2.2 Contribución de la vía MAPK/Erk al aumento del ARN mensajero de ErbB2	115
6. IMPLICACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS LNCAP INDUCIDA POR EGF EN PRESENCIA DE LY29	121
DISCUSIÓN	125
CONCLUSIÓN	141
BIBLIOGRAFÍA	145

Summary

María Alicia Cortés

Prostate cancer is one of the most common malignancies among men in Europe. Because the tumor is initially androgen-dependent in the majority of cases, endocrine manipulation is the first-line therapy for metastatic and locally advanced cancers and often leads to remission or stabilization of the disease. This period of remission, however, is invariably followed by tumor relapse, and available treatment options are only palliative. Patients with metastatic prostate cancer develop an androgen-refractory phenotype that leads to disease progression and eventual death. Therefore, an understanding of what drives progression to androgen independence is critical. In fact, the prostate is known to be dependent not exclusively on androgens but also on growth factors and neuropeptides secreted by neuroendocrine (NE) cells that maintain normal prostate function and play a role in the development of pathological conditions. Long-term androgen ablation therapy tends to select prostate tumor populations that are enriched in NE cells. Those tumors with an increased NE cell population are often more aggressive and have a poorer prognosis. Therefore, it has been hypothesized that NE cells can lead to the development and growth of androgen-refractory prostate tumors through the secretion of neuropeptides that induce the proliferation of adjacent carcinoma cells in an androgen-depleted condition. Hence, our objective was to study the molecular mechanisms of NE differentiation in LNCaP cells.

We present evidence that EGF prevents NE differentiation in LNCaP cells induced by androgen depletion. In these cells, the constitutive activation of Akt supports this effect of EGF because abrogation of PI3K/Akt signalling with LY294002 (LY29) alters the EGF-induced NE differentiation-inhibitory response toward cell survival and NE cell differentiation. The primary focus of this investigation was to study the molecular mechanisms involved in the treatment of LNCaP cells with EGF

and LY29 as well as the relationship to NE cell differentiation and cell survival since both have been implicated in the progression of prostate cancer.

Our group has shown, by western blotting, that treatment with EGF+LY29 increases ErbB2 levels. We have also shown an increase of ErbB2/EGFR heterodimer formation, receptor phosphorylation, ErbB2 plasma membrane localization and active signalling of the MAPK-Erk1/2 pathway. We found that EGF+LY29 did not modify EGFR levels, suggesting the existence of ErbB2/EGFR heterodimers that maintain EGFR levels. Furthermore, we found the levels of ErbB2 to be dependent on EGFR phosphorylation. In fact, incubation of cells LNCaP with ZD1839 prior to EGF+LY29 treatment markedly inhibited EGFR phosphorylation and reduced ErbB2 levels.

ErbB2 is responsible for NE differentiation but not cell survival under our experimental conditions. This is consistent with results showing that the down-regulation of the ErbB2 gene by small interfering RNA suppressed EGF+LY29-induced NE differentiation in LNCaP cells. Furthermore, we found that the treatment of these cells with IL-6 and forskoline increased ErbB2 protein levels.

ErbB2 over-expression is due to increased protein synthesis and cell surface localization. Quantitative real-time (qPCR) and semi-quantitative RT-PCR showed increased levels of ErbB2 mRNA in LNCaP cells induced by EGF+LY29 treatment. Immunofluorescence and flow cytometric analysis showed increased localization of ErbB2 on the cell surface.

Surprisingly, the above-mentioned increase of ErbB2 is PI3K-independent. Our results indicate that the treatment with EGF and LY29 up-regulates ErbB2 via mechanisms involving Hsp90, Erk1/2 and probably NFkB.

Abreviaturas

María Alicia Cortés

ADN: ácido desoxirribonucleico	GTP: guanosina trifosfato
ADP: adenosina bifosfato	H89: inhibidor de MSK-1
AR: receptor de andrógenos	HB-EGF: factor de crecimiento epidérmico unido a heparina
ARN: ácido ribonucleico	Hsp90: proteína del choque térmico 90
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	IKB: quinasa inhibidora de NFκB
ATP: adenosina trifosfato	IKK: complejo quinasa de IκB
BSA: albúmina sérica bovina	IL-6: interleuquina 6
Crg: cromogranina	LY29: LY294002 (inhibidor de PI3K)
DMSO: dimetil sulfóxido	MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
DS: desvío estándar	MEK: MAP quinasa-quinasa (quinasa de ERK)
EGF: factor de crecimiento epidérmico	mTOR: serina/ treonina quinasa sensible a rapamicina
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico	NE: neuroendocrina
ErbB2: receptor 2 de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico	NFκB: factor de transcripción nuclear kappa B
ErbBs: familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico	NRGs: neurregulinas
Erk: quinasa regulada por señales extracelulares	NSE: enolasa específica de neuronas
ESM: error estándar de la media	p110: subunidad catalítica de la PI3K
GD: geldanamicina (inhibidor de Hsp90)	P44-42: anticuerpo reconoce la fosforilación de Erk1/2
GDP: guanosina bifosfato	p85: subunidad reguladora de la PI3K
Grb-2: proteína de unión a los receptores de factores de crecimiento tipo 2	

PBS: tampón fosfato salino	Ser: serina
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	SFB: suero fetal bovino
PD: PD184161 (inhibidor de MEK)	SH2: dominios de homología a Src-2
PDK: quinasa dependiente de fosfoinosítidos	Sos: factor intercambiador de nucleótidos de guanina
PH: dominio de homología a pleckstrina	STATs: transductor de la señal y activador de la transcripción
PI3K: proteína fosfoinosítido -3-quinasa	TBB: inhibidor de CK2
PIP₂: fosfoinositol bifosfato	TGFα: factor de crecimiento transformante alfa
PIP₃: fosfoinositol trifosfato	Thr: treonina
PKB/Akt: proteína quinasa B	Tyr: Tirosina
PKR: serina/ treonina quinasa inducida por interferón	W: wortmanina (inhibidor de PI3k)
PLC: fosfolipasa C de fosfatidil inositol	
PSA: antígeno prostático específico	
PTB: dominio de unión a fosfotirosina	
PTEN: proteína tirosina fosfatasa	
RAF: MAP quinasa-quinasa-quinasa (proteína quinasa de MEK)	
Ras: proteína de unión GTP/GDP	
RPMI: Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo)	
RT: retrotranscripción	

Introducción

María Alicia Cortés

1. PROSTATA

La próstata es la glándula masculina encargada de la producción del fluido seminal. Su desarrollo y funcionamiento está condicionado por los niveles hormonales de andrógenos. Solo hay tres procesos patológicos que afectan a la glándula con mayor frecuencia: inflamación, hiperplasia y tumores ⁽¹⁾.

Anatomía e Histología

La próstata del adulto normal pesa aproximadamente 20 gramos. Es un órgano retroperitoneal que rodea a la vejiga y la uretra. Tiene forma de pirámide invertida, su base se sitúa alrededor del cuello de la vejiga y la primera parte de la uretra, su cara anterior limita con el espacio retropúbico y la cara posterior se encuentra delante del recto (Figura 1A)⁽²⁾. El parénquima prostático puede dividirse en cuatro zonas: zona periférica (ZP), zona central (ZC), zona transicional (ZT) y periuretral (Figura 1B). La mayoría de las hiperplasias aparecen en la zona transicional y periuretral provocando obstrucción de la uretra, mientras que la mayoría de los carcinomas, se ubican en la zona periférica por ello pueden ser localizados a través del tacto rectal ⁽¹⁾.

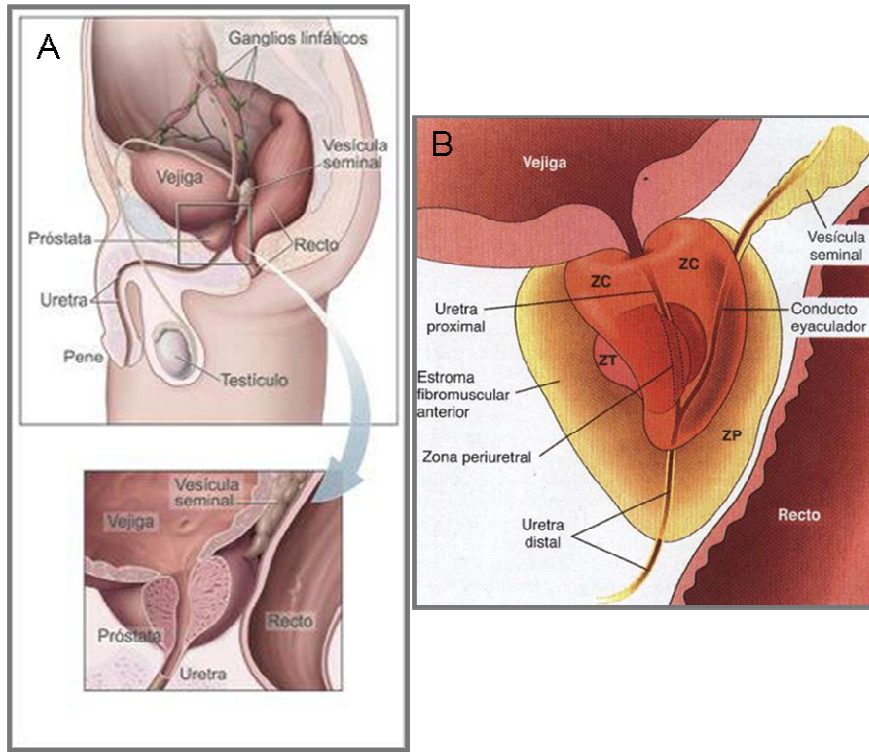


Figura 1: Anatomía del sistema reproductor masculino. A) Localización de la próstata en el sistema reproductor masculino. **B)** Regiones del parénquima prostático. Tomado de Cotran, RS y col.⁽¹⁾

Histológicamente, la próstata está formada por glándulas túbulo-acinares ramificadas comunicadas entre sí por ductos, a través de los cuales se vierten las secreciones a la uretra (Figura 2). Estas glándulas están contenidas en un esqueleto fibroso denominado estroma, formado principalmente por células musculares lisas y fibroblastos. Las glándulas y los ductos están tapizados por células epiteliales. Este epitelio suele ser cilíndrico simple o pseudo-estratificado. Se pueden distinguir 3 tipos diferentes de células epiteliales: basales, secretoras o exocrinas y neuroendocrinas (Figura 2).

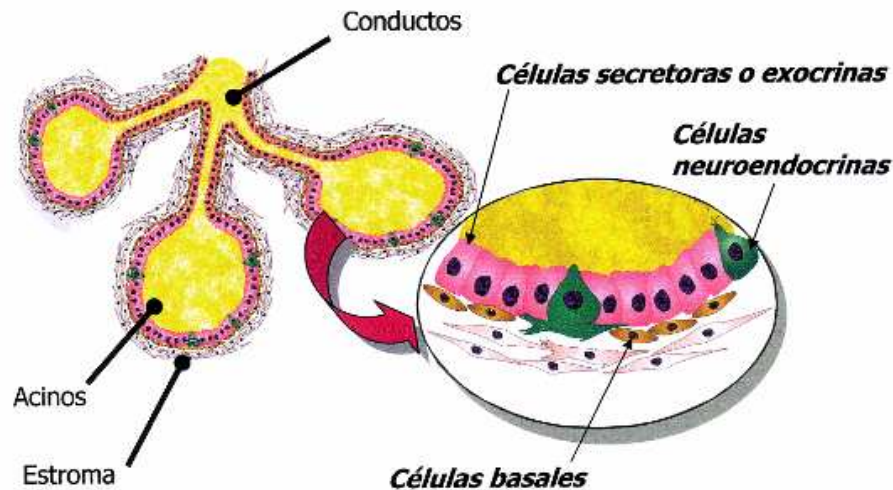


Figura 2: Histología de la Próstata. La próstata está formada por glándulas y ductos contenidos en un estroma fibroso. En la sección aumentada se observa el epitelio que tapiza estos compartimentos y que está formado por células epiteliales basales, secretoras y neuroendocrinas. Tomado de Zapata, P.D. ⁽³⁾

Las **células basales** tienen un aspecto similar a fibroblastos y están muy poco diferenciadas. Se caracterizan porque no expresan el antígeno prostático específico (PSA) ni la fosfatasa ácida prostática y se las puede diferenciar por su tinción inmunohistoquímica positiva contra las citoqueratinas 5 y 15 ⁽⁴⁻⁶⁾.

Las **células epiteliales** secretoras presentan un aspecto cilíndrico. Estas células, totalmente diferenciadas, expresan el receptor de andrógenos, enzimas como el PSA ⁽⁵⁾ y la fosfatasa ácida prostática ⁽⁶⁾. Se las diferencia por su tinción inmunohistoquímica contra las citoqueratinas 8 y 18 ⁽⁴⁾.

Las **células neuroendocrinas**, son las que se encuentran en menor cantidad y se distribuyen irregularmente a lo largo de todo el epitelio. La citoqueratina 5 se utiliza para su reconocimiento. Se caracterizan porque secretan en forma autocrina y paracrina una gran variedad de neuropéptidos entre los que se encuentran: cromogranina A (CrgA), así

como cromogranina B (CrgB) y cromogranina C (CrgC); enolasa específica de neuronas (NSE); proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) y somatostatina. Una característica importante es que carecen del receptor de andrógenos. Presentan al microscopio un aspecto granular y una morfología similar a las neuronas, emiten prolongaciones a modo de dendritas o axones que conectan con células adyacentes. Son células bien diferenciadas y no proliferan ⁽⁷⁻⁸⁾.

1.1 Regulación hormonal en el tejido prostático

Inicialmente se pensaba que los andrógenos eran los únicos responsables de la regulación del crecimiento prostático. En la actualidad, se sabe que además de los andrógenos existen una gran diversidad de hormonas peptídicas, factores de crecimiento e interacciones entre el epitelio y el estroma, que controlan y mantienen el funcionamiento normal de la próstata.

1.1.1 Los andrógenos y su receptor

Los andrógenos son hormonas esteroideas producidos en forma de **testosterona** por las células de Leydig de los testículos. Son liberados a la circulación sistémica unidos a la albúmina y a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) ⁽⁹⁻¹⁰⁾. Además, los andrógenos adrenales, secretados por la glándula suprarrenal contribuyen a los efectos androgénicos en el cuerpo, aunque en menor proporción.

El receptor de andrógenos (AR) es una proteína que media la acción de la testosterona actuando como un factor de transcripción ⁽⁹⁾. El AR se encuentra en muchos tejidos tanto en la mujer como en el hombre, pero en

el sexo masculino es más abundante. Es un miembro de la superfamilia de receptores esteroideos y en su estructura se distinguen tres dominios importantes: un dominio N-terminal de activación transcripcional, un dominio central de unión al ADN y un dominio C-terminal de unión a esteroides ⁽¹¹⁾.

La testosterona entra en la célula para ejercer su acción biológica, una vez dentro, es convertida en dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 α -reductasa. El AR es capaz de unir a la testosterona y a la DHT pero esta última se une con mayor afinidad (aproximadamente 10 veces más). Antes de su unión al ligando, el AR se encuentra en estado inactivo unido a proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70 y Hsp56) ⁽¹²⁾. Cuando el AR se une a la DHT, se produce un cambio conformacional y se disocia de estas proteínas, produciéndose su activación por fosforilación. Así se une a un sitio específico del ADN activando la transcripción de los genes de respuesta a andrógenos ⁽⁹⁾.

En la próstata se han identificado varios genes regulados por el AR entre los que cabe destacar: PSA, calicreina (proteasa prostática), fosfatasa ácida prostática, factores de crecimiento y sus receptores ⁽¹³⁾. Siendo estos últimos mediadores directos de la acción de los andrógenos y responsables de mediar las interacciones entre el epitelio y el estroma ⁽¹⁴⁾.

1.1.2 Factores de crecimiento y la interacción epitelio- estroma

Como se ha indicado anteriormente en la glándula prostática existen dos compartimentos bien diferenciados aunque relacionados entre sí, el epitelio y el estroma. Para el mantenimiento de la estructura y función de la próstata, se establece un equilibrio entre estos dos compartimentos, regulado por los andrógenos y por los factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento presentes en la próstata pertenecen a las siguientes familias: familia del **factor de crecimiento epidérmico** (EGF y TGF- α), familia del **factor de crecimiento de fibroblastos** (b-FGF y KGF), familia del **factor de crecimiento transformante β** (TGF- β 1, 2 y 3) y la familia del **factor de crecimiento similar a la insulina** (IGF-I, IGF-II y IGF-BP). Estos no solo regulan la proliferación celular, sino también la diferenciación y la apoptosis. Así se mantiene el número de células gracias a la acción de factores de crecimiento que inhiben proliferación, como el TGF- β y factores mitogénicos como son el IGF I-II, TGF α , b-FGF y KGF (Figura 3).

Por otra parte, las células neuroendocrinas (NE) secretan péptidos, neuropéptidos y otras moléculas bioactivas que actúan en forma paracrina y/o autocrina, regulando las secreciones de las células epiteliales y células NE vecinas, así como la proliferación y la diferenciación celular (Figura 3). Estas células presentan prolongaciones extendidas hacia el lumen de las glándulas que les permiten por un lado, detectar cambios de pH, concentración de proteínas, neuropéptidos u hormonas del contenido luminal y por otro lado a través de señales determinadas, les permiten modificar o regular la secreción de las células exocrinas ⁽¹⁵⁻¹⁶⁾.

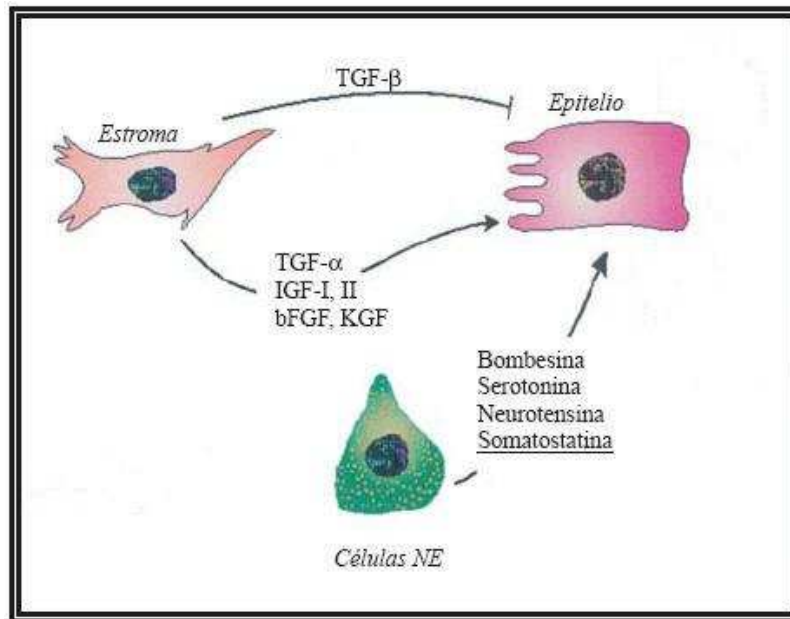


Figura 3: Interacción epitelio-estroma y participación de las células NE en la próstata normal. Tomando de Zapata, P.D. y col. ⁽¹⁶⁾

2. CANCER DE PROSTATA

2.1 Epidemiología

En el hombre el cáncer de próstata es muy frecuente, situándose en segundo lugar después del cáncer de pulmón, según datos de la Organización Mundial de la Salud (*International Agency for Research on Cancer*). La incidencia mundial en el año 2008 fue de 913.770 casos, sin embargo la mortalidad no es alta comparada con el cáncer de pulmón. En los países que integran la Unión Europea y en especial España, el cáncer de próstata es el cáncer más frecuente en el hombre seguido del cáncer de pulmón. En el año 2008 hubo 338.700 casos de cáncer de próstata en la Unión Europea. En España la incidencia fue de 25.231 casos y se prevé

que en el 2010 el número de casos sea de 26.192. Se estima que para este año, el cáncer de próstata siga siendo el de mayor incidencia en la población masculina española y europea ⁽¹⁷⁾.

El cáncer de próstata está directamente relacionado con la edad siendo el 75% de los casos, pacientes con 65 años o más. Además existen otros factores de riesgo como la historia familiar, la raza ⁽¹⁸⁾ y factores ambientales como la presencia de altas concentraciones de Cadmio ⁽¹⁹⁻²⁰⁾, entre otros.

2.2 Aspectos clínicos

El diagnóstico del cáncer de próstata se realiza mediante el tacto rectal y la determinación del PSA sanguíneo. Se sabe que el PSA es un buen marcador del cáncer de próstata debido a que aumenta en sangre conforme se desarrolla el tumor, por lo cual se utiliza para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del paciente ⁽²¹⁾.

Existen cuatro tratamientos para el cáncer de próstata y dependiendo del estadio de la enfermedad se suelen combinar para obtener mayor eficacia, ellos son:

- Ablación androgénica (eliminación de los andrógenos o inhibición de la producción de testosterona con análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante LHRH)

- Radioterapia

- Quimioterapia

- Prostatectomía radical

La elección del tratamiento se realiza de acuerdo a la edad del paciente, estadio clínico de la enfermedad, niveles de PSA y el grado del tumor. Clínicamente, la elección de la terapia adecuada puede tener como objetivo impedir el desarrollo del carcinoma, curar al paciente, evitar la

enfermedad diseminada o únicamente atenuar los síntomas y prolongar la vida ⁽²²⁾.

El tratamiento mas utilizado por ser menos invasivo y tener buenos resultados, es la ablación androgénica. Aunque en muchos casos la regresión del cáncer es transitoria, debido a que después de la terapia se producen metástasis y el cáncer se vuelve independiente de los andrógenos ⁽²³⁾.

2.3 Aspectos moleculares y progresión del cáncer de próstata

El 99% de los tumores de próstata se desarrollan en las células epiteliales de la glándula prostática y se denominan adenocarcinomas prostáticos. Muchos eventos moleculares ocurren en la formación y progresión del cáncer de próstata, destacando: la metilación anormal del ADN, la activación de protoncogenes, la inactivación de mecanismos de reparación del ADN, la inactivación de genes supresores de tumores y un incremento en la síntesis y actividad de factores de crecimiento y sus receptores ⁽²⁴⁾.

2.3.1 Mecanismos moleculares implicados en la resistencia a los andrógenos

La terapia de ablación androgénica provoca disminución solamente de las células sensibles a andrógenos por lo que la progresión del cáncer después de esta terapia, puede deberse al crecimiento de las células minoritarias que no necesitan andrógenos ⁽²³⁾. Interesantemente, estudios en pacientes demostraron que el AR se encuentra expresado en casi todos los canceres de próstata antes y después de la ablación androgénica ⁽²⁵⁻²⁸⁾. El PSA, el cual es un gen de respuesta a andrógenos, se detecta en la

mayoría de los carcinomas independientes de andrógenos, indicando que la vía de señalización del AR es funcional en esos tumores ⁽²³⁾.

Se postulan cinco mecanismos por los cuales las células del tumor de próstata, pueden crecer en ausencia de andrógenos (Figura 4):

1. La amplificación del gen AR que incrementa la sensibilidad a los bajos niveles de andrógenos producidos por las glándulas adrenales y a pocas cantidades de testosterona.
2. Mutaciones del AR que afectan al dominio de unión al ligando, disminuyendo su especificidad, por lo que podría ser activado por diferentes esteroides no androgénicos y además por antagonistas androgénicos.
3. La activación constitutiva de moléculas reguladas por debajo del AR. Por ejemplo, las alteraciones de la vía de Bcl-2 que provocan supervivencia en ausencia de andrógenos.
4. Activación del AR en ausencia de ligando: modificaciones en la expresión o función de genes de las vías de señalización reguladas por factores de crecimiento o citoquinas que pueden causar activación del AR en ausencia de ligando.
5. Adquisición por parte de las células tumorales del fenotipo neuroendocrino (NE), proceso conocido como diferenciación NE. Estas células secretan neuropéptidos responsables de estimular el crecimiento epitelial en ausencia de andrógenos ⁽²⁹⁾.

Todos estos mecanismos no son mutuamente excluyentes por lo que puede haber mas de un mecanismo implicado en el desarrollo del tumor independiente de andrógenos ⁽²³⁾.

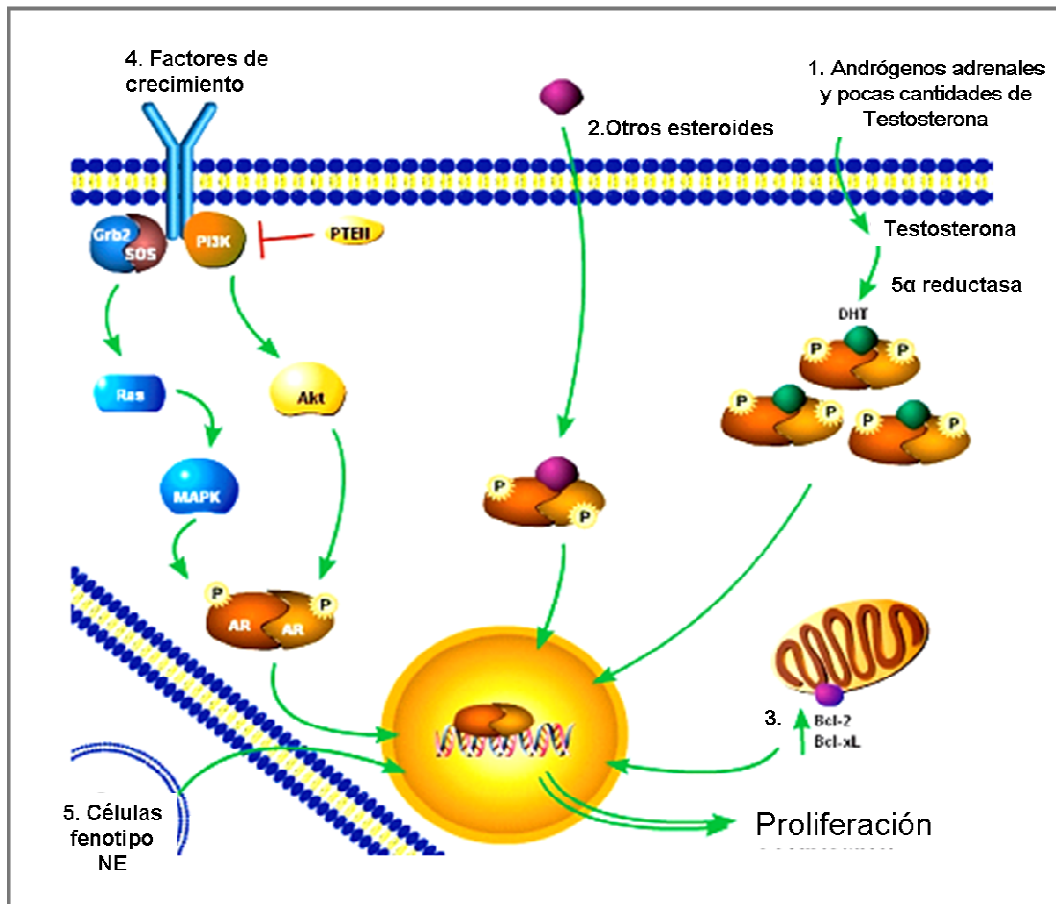


Figura 4: Mecanismos postulados que provocan crecimiento de las células en ausencia de andrógenos. Adaptado de Pienta, K.J. y col. (29)

2.3.1.1 Papel de los factores de crecimiento

Durante el desarrollo del cáncer de próstata y especialmente en la fase de resistencia a los andrógenos, el equilibrio entre el epitelio y el estroma se pierde alterándose la forma y el lugar de secreción de los factores de crecimiento así como la expresión de sus receptores. El epitelio comienza

a secretar factores de crecimiento que actúan en forma autocrina, predominando los efectos mitogénicos sobre los inhibidores del crecimiento, se potencia la angiogénesis y la metástasis. Así es como el TGF- β estimula el crecimiento celular, en contraste con lo que ocurre en situación normal (Figura 5).

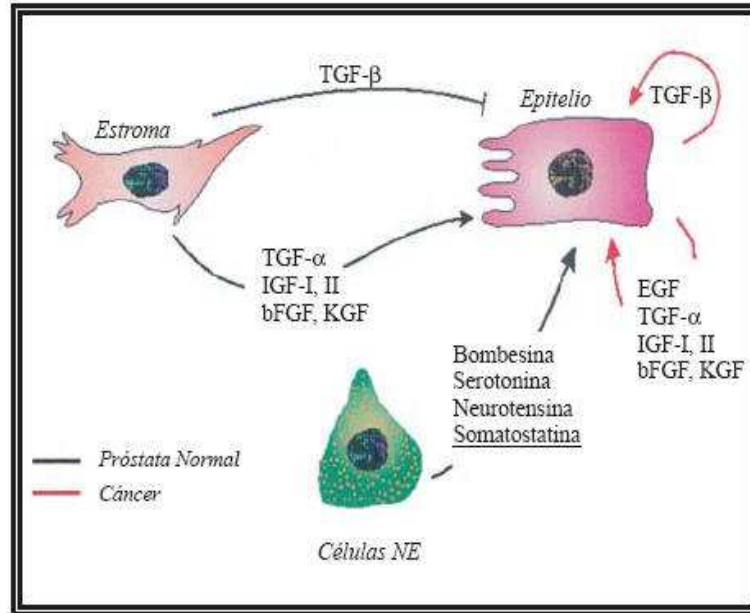


Figura 5: Factores de crecimiento en la próstata normal comparado con el cáncer.

Tomado de Zapata, P.D. y col. ⁽¹⁶⁾

La mayoría de estos factores de crecimiento se unen a receptores con actividad tirosina quinasa estimulando vías de señalización que controlan la proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular. A su vez, los factores de crecimiento secretados en el tumor, activan en forma directa el receptor de andrógenos en ausencia de ligando, en concreto el IGF-1, el KGF y principalmente el EGF ⁽³⁰⁾. También se encontró aumento de los receptores tirosina quinasa en tumores independientes de andrógenos, especialmente el receptor ErbB2 ⁽³¹⁾.

Esto lleva a una pérdida del balance epitelio-estroma y permitirá a la célula epitelial crecer con bajos niveles de andrógenos o sin ellos.

2.3.1.2 Papel de la diferenciación neuroendocrina (NE)

La potencial malignidad de la diferenciación NE se debe a la capacidad de estas células para estimular la proliferación de las células adyacentes y prevenir la apoptosis. La adquisición del fenotipo NE induce la secreción de neuropéptidos que actuarían de forma paracrina y/o autocrina y serían capaces de estimular la proliferación, diferenciación y secreción de las células adyacentes.

Actualmente, comprender la biología y los mecanismos que controlan la aparición de estas células, se ha convertido en uno de los principales objetivos en la oncología prostática, siendo muchas las preguntas todavía sin respuestas. Existen evidencias en modelos animales y en muestras de pacientes, de que las células tumorales pueden sufrir un proceso de trans-diferenciación adquiriendo el fenotipo NE ⁽³²⁾.

Es necesario destacar que aunque las células NE normales y las células tumorales con fenotipo NE expresan marcadores neuroendocrinos, existen entre ellas varias diferencias importantes. Las células NE de la próstata normal, expresan marcadores de célula basal (citoqueratina 5), no proliferan, no son agresivas y presentan una morfología típica con extensiones tipo dendritas. Sin embargo, las células tumorales con fenotipo NE, expresan marcadores de células secretoras (citoqueratina 18), pueden proliferar y presentan un fenotipo agresivo expresando proteínas antiapoptóticas. Estas células no se diferencian morfológicamente del resto de las células que las rodean.

Las diferencias entre las células NE y las células con fenotipo NE pueden ser debidas a que se originan en forma diferente ⁽³²⁾. Las células NE de la

próstata normal así como las células basales y las células epiteliales secretoras, proceden de las células madres pluripotenciales (Figura 6), aunque, cabe la posibilidad de que las células NE, pertenezcan a un linaje diferente con un origen neurológico. Por el contrario, se ha visto que las células tumorales con fenotipo NE, a menudo expresan PSA, proteína típica de células epiteliales, lo que sugiere que estas células manifiestan un fenotipo intermedio entre células NE y epiteliales lo que indica que pueden originarse a partir de células epiteliales exocrinas durante la progresión tumoral ⁽³³⁾. Se ha propuesto, que las células del adenocarcinoma, bajo ciertas condiciones, pueden sufrir trans-diferenciación que da como resultado células con fenotipo NE ⁽³²⁾. De hecho, se encontró células con fenotipo NE en metástasis ósea de cáncer de próstata, pero no en el foco primario del tumor, sugiriendo que ocurre trans-diferenciación en las células de próstata metastásicas.

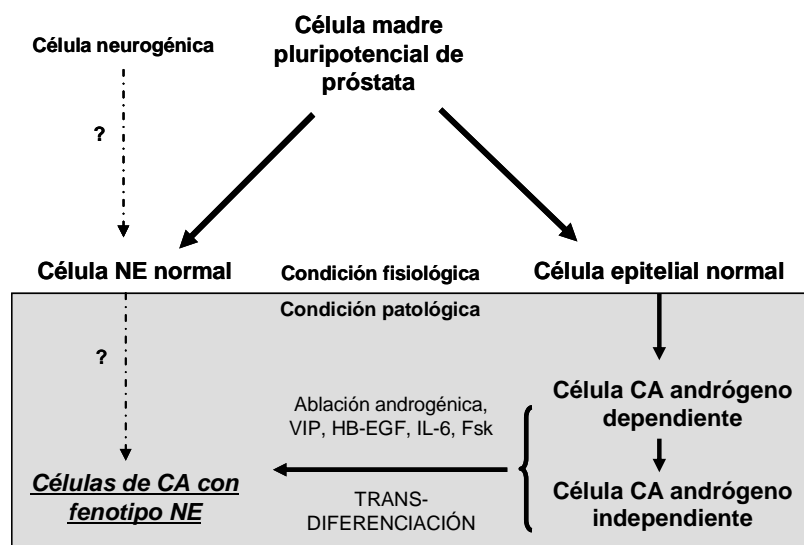


Figura 6: Modelo del origen de las células del cáncer de próstata con fenotipo NE.

Adaptado de Yuan, T.C. y col. ⁽³²⁾

Para estudiar en profundidad los mecanismos moleculares responsables de la diferenciación NE se ha utilizado como modelo *in vitro* la línea celular de cáncer de próstata sensible a andrógenos LNCaP. En estas células, la ablación de andrógenos conduce a la trans-diferenciación adquiriendo morfología neuronal con expresión de NSE, CrgA, gastrina y neurotensina. Este fenotipo NE se revierte con el tratamiento de DHT. Estos resultados sugieren que los genes de respuesta a andrógenos activados por el AR suprimen la diferenciación NE ⁽³²⁾. Estas células adquieren también este fenotipo NE en presencia de neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) ⁽³⁴⁾, factores de crecimiento como el HB-EGF y citoquinas como interleuquina-6 (IL-6) ⁽³⁵⁾ y agentes farmacológicos como la Forskolina ⁽³⁶⁾ (Figura 6). Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que la eliminación del suero fetal bovino del medio del cultivo induce la adquisición de un fenotipo NE, proceso que es inhibido por el EGF a través de la activación de las vías de señalización de la PI3K/Akt y MAPK/Erk ⁽³⁷⁾. Datos opuestos se han publicado en la línea andrógeno independiente DU145 de cáncer de próstata, en la cual el EGF, a través de EGFR, induce el fenotipo NE ⁽³⁸⁾.

La hipótesis que se deduce de estos estudios sería que ligeros cambios químicos en el microambiente celular, facilitarían la adquisición del fenotipo NE por parte de ciertas células tumorales. Esta conversión conllevaría la secreción de neuropéptidos, que actuarían de forma paracrina y autocrina estimulando la proliferación, diferenciación y secreción en células adyacentes. La propagación de células NE carentes de receptor de andrógenos, podría ser determinante en el paso del carcinoma prostático a la fase independiente de andrógenos. Por lo tanto, estas células y sus productos de secreción pueden convertirse en la diana de futuras estrategias terapéuticas.

3. EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO Y SUS RECEPTORES

Los receptores ErbBs/HER que pertenecen al subgrupo de la superfamilia de receptores tirosina quinasa (RTKs), se localizan en la membrana celular y una vez activos, son capaces de regular vías de señalización implicadas en proliferación, diferenciación, movilidad y supervivencia celular.

Son cuatro miembros los que conforman esta familia: EGFR (también llamado ErbB1 o HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). De todos ellos solo ErbB2 carece de ligando conocido y ErbB3 no tiene actividad tirosina quinasa.

Estos receptores van a ser activados por un gran cantidad de ligandos con una gran homología entre ellos, según la afinidad por cada uno de los receptores ErbBs (Tabla 1), los ligandos se clasifican en tres grandes grupos ⁽³⁹⁾:

- ✓ Grupo 1: EGF, TGF α y anfirregulinas.
- ✓ Grupo 2: HB-EGF, betacelulina (BTC) y epirregulina.
- ✓ Grupo 3: neurregulinas (NRGs), también llamadas herregulinas o factores de diferenciación neu. En este grupo se encuentran NRG 1, 2, 3 y 4.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	
Receptor ErbB	EGF, TGF α y anfirregulinas	HB-EGF, BTC y epirregulina	NRG1/2	NRG3/4
EGFR	x	x		
ErbB3			x	
ErbB4		x	x	x

Tabla 1: Afinidad de cada grupo de ligandos por los receptores ErbBs.

Están marcados los grupos o ligandos que se unen a cada uno de los receptores ErbBs.

3.1 Estructura y activación de los receptores

Los cuatro receptores ErbBs tienen una estructura similar formada por un dominio extracelular que une el ligando (a excepción de ErbB2), un dominio transmembrana y una porción intracelular que tiene el dominio tirosina quinasa altamente conservado (a excepción de ErbB3). El receptor ErbB3 pierde su actividad tirosina quinasa por sustitución de aminoácidos críticos en este dominio (Figura 7) ⁽⁴⁰⁾.

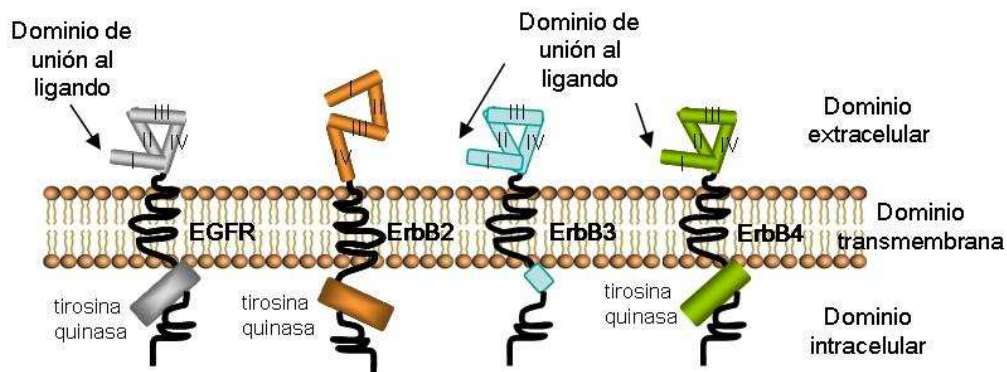


Figura 7: Estructura de los Receptores ErbBs. En la figura se muestran los cuatro miembros de la familia ErbBs y sus tres dominios. El dominio extracelular está dividido en 4 subdominios (I, II, III y IV) y comprende la zona de unión al ligando (a excepción de ErbB2) y la zona de dimerización. El dominio intracelular contiene la actividad tirosina quinasa (a excepción de ErbB3).

Hay que destacar que el dominio extracelular se puede dividir a su vez, en 4 subdominios que le permiten por un lado, la unión al ligando y por otro lado, la unión a otro receptor de la familia, permitiendo la dimerización. La conformación cerrada de los receptores EGFR, ErbB3 y ErbB4 se consigue mediante la unión del subdominio II y IV (Figura 8). Una vez que el ligando se une al subdominio I se produce un cambio conformacional, el ligando aproxima el subdominio I al III haciendo de puente ⁽⁴¹⁾. De esta manera queda expuesto el subdominio II, que le permite unirse a otro receptor ⁽⁴²⁾.

Si la dimerización se produce con el mismo receptor, se denomina **homodimerización** y si se une a otro receptor, **heterodimerización**. La dimerización estimula la actividad tirosina quinasa por interacción asimétrica de los dominios quinasa (el N-terminal de un receptor interacciona con el C-terminal de otro receptor), provocando la transfosforilación de los residuos tirosina. Esto constituye una plataforma para la unión y activación de proteínas, estimulando de esta manera, cascadas de señalización.

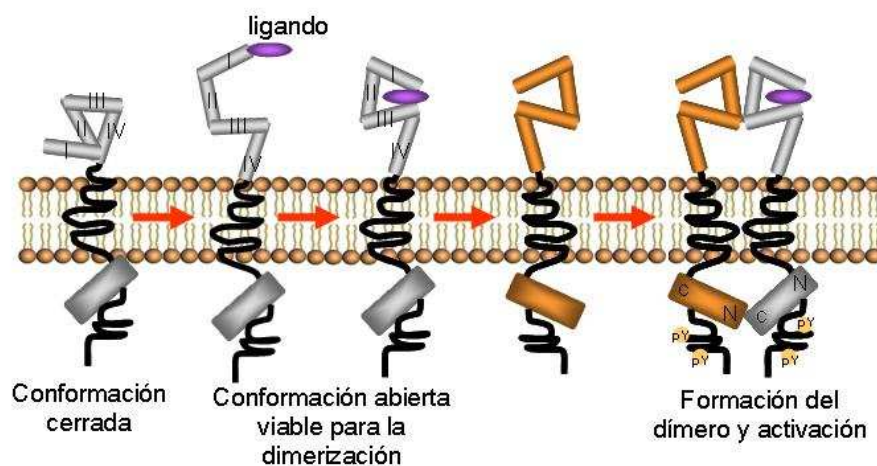


Figura 8: Cambio conformacional del Receptor ErbB cuando se une al ligando. Al subdominio I y III, se une en forma bivalente el ligando; mientras que los dominios II y IV ricos en cisteínas se unen entre sí por puentes disulfuros. De estos últimos, el dominio II es el que permite la interacción receptor- receptor, mientras que el dominio IV permite la conformación cerrada o inactiva del receptor. Finalmente, la unión con otro receptor provoca la transfosforilación de residuos tirosina, estado activo del dímero.

El receptor ErbB2 no experimenta el cambio conformacional de los otros receptores, sino que se encuentra siempre en una conformación de dimerización. Estudios cristalográficos han mostrado que el dominio extracelular de ErbB2 (Figura 9A) mimetiza a la conformación de EGFR unido a EGF (Figura 9B). Presentando una conformación “abierta” como si

tuviese el ligando siempre unido, es decir, el extremo I está unido al extremo III en ausencia de ligando ⁽⁴³⁾. Siempre que ErbB2 esté presente en la célula, es la pareja predilecta para dimerizar con los otros receptores de la familia ErbBs.

El receptor ErbB3 aunque carece de actividad quinasa, es capaz de unirse al ligando, heterodimerizar con ErbB2 u otro miembro de los ErbBs y activar vías de señalización.

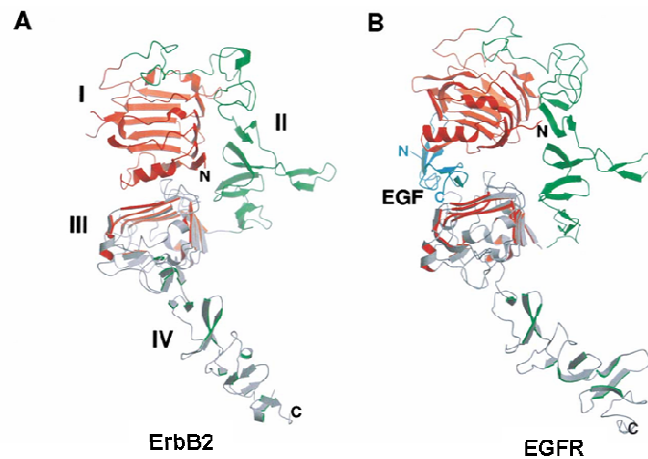


Figura 9: Modelo molecular basado en la estructura cristalizada del dominio extracelular de ErbB2 y EGFR. A) Modelo de ErbB2 en donde se muestran la posición de los subdominios I, II, III y IV. **B)** Modelo de EGFR en posición abierta unido a EGF. Adaptado de Burgess, A.W. y col. ⁽⁴³⁾

3.2 Mecanismos que regulan a los receptores ErbBs

La localización en la superficie celular de los receptores ErbBs permite la unión al ligando y la activación de vías de señalización celular, por lo que la endocitosis y la degradación de los receptores son procesos importantes para su regulación. Otros mecanismos que permiten el control de la cantidad de receptores ErbBs son la transcripción y la síntesis proteica.

Especial atención merece ErbB2, que al formar heterodímeros con EGFR modifica su endocitosis y degradación.

3.2.1 Endocitosis y degradación de EGFR y ErbB2

La permanencia en la membrana celular de los receptores ErbBs depende del cociente degradación/ reciclaje. El receptor EGFR inactivo, presenta un rápido reciclaje con baja degradación, por lo que permanece en la superficie celular (Figura 10), algo similar ocurre con ErbB2. Sin embargo, cuando EGF se une a EGFR, se activa el receptor y a las tirosinas fosforiladas se unen moléculas de ubiquitina provocando su internalización, asociación con endosomas y su posterior degradación. En estas condiciones aumenta la degradación con respecto al reciclaje, lo que conduce a una disminución del receptor en la superficie celular (Figura 10). A su vez, la internalización y degradación del receptor activo depende de dos factores: A) tipo de ligando que esté activando el receptor y B) tipo de receptor que esté formado el dímero.

A. Diferencias entre los ligandos TGF α y EGF: Debido a que en los endosomas, el pH es ligeramente ácido (6,0-6,5), algunos ligandos como el TGF α , se disocian de su receptor a ese pH provocando la desfosforilación de EGFR y su rápido reciclaje a la membrana plasmática. En cambio el EGF al tener una alta afinidad por EGFR, se queda unido al mismo y permanece en los endosomas que se fusionan con lisosomas donde se degrada el receptor y el ligando (Figura 11A) ⁽⁴⁴⁾.

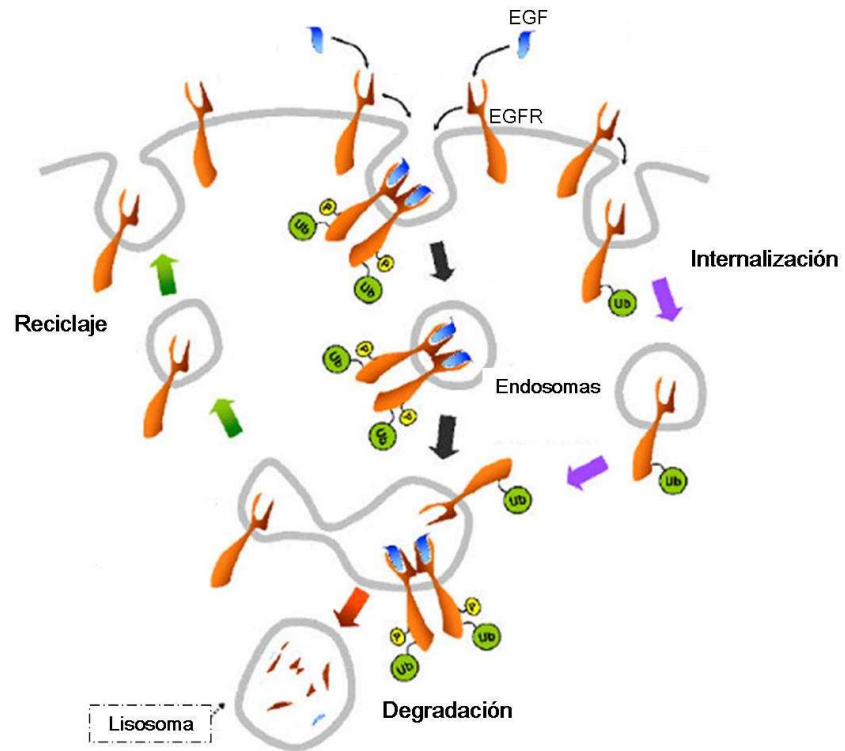


Figura 10: Modelo de endocitosis de EGFR activado por EGF. Con las **flechas lilas** se representa la endocitosis de EGFR sin ligando, donde una vez internalizado se recicla (**flechas verdes**). Con las **flechas negras** se representa la endocitosis de EGFR unido a EGF, su ubiquitinilación, internalización en endosomas y degradación. Adaptado de Fry, W.H. y col. ⁽⁴⁵⁾

B. Dimerización de EGFR con ErbB2: La formación de los heterodímeros EGFR- ErbB2, provoca la permanencia del complejo receptor-ligando en la membrana celular cuando EGFR es activado por EGF ⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾. Se sostiene que ErbB2 junto a EGFR se internaliza y se recicla rápidamente (Figura 11B) ⁽⁴⁸⁾. Sin embargo es importante indicar que en algunos casos ErbB2 previene la internalización de EGFR ⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾. En cualquiera de los casos, la mayor disponibilidad de EGFR en presencia de ErbB2, repercute en la potenciación de la vía de señalización celular. Los mecanismos por los cuales ErbB2 afecta la endocitosis de EGFR no están claros aún. Es posible que en presencia de altas concentraciones de ErbB2, los heterodímeros ErbB2-EGFR sean retenidos en la membrana por mecanismos que implican la asociación de ErbB2 con otras proteínas ⁽⁵¹⁾.

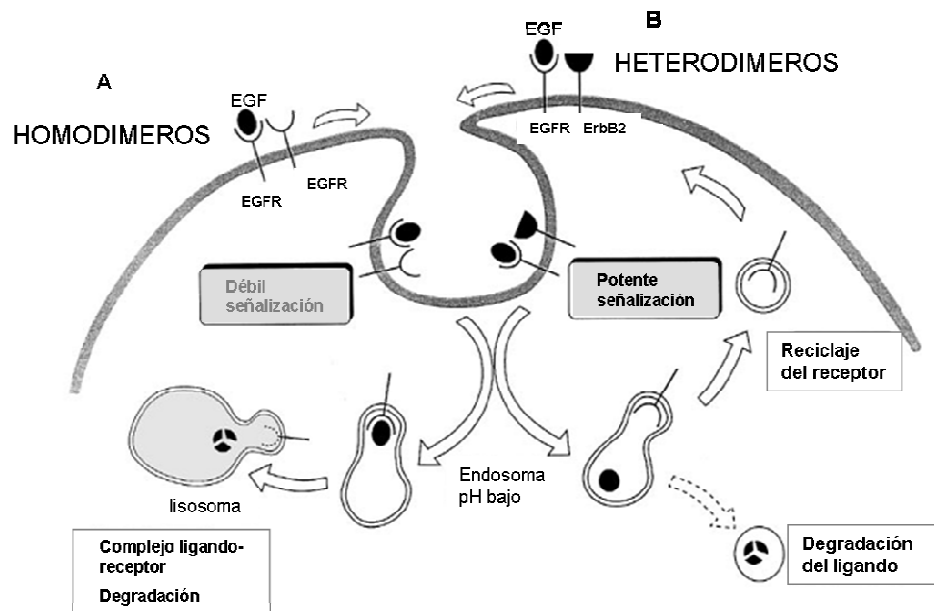


Figura 11: Diferente internalización de homo y hetero-dímeros. A) activación de homodímeros EGFR con EGF, internalización del complejo y degradación. B) activación de heterodímeros EGFR-ErbB2 con EGF, reciclaje de los receptores y degradación del ligando. Adaptado de Lenferink, A.E. y col. ⁽⁴⁶⁾

3.2.1.2 La chaperona Hsp90

La proteína del choque térmico 90 (Hsp90) es una chaperona que permite el correcto plegamiento y el ensamblado de complejos multiméricos. En la actualidad se conocen más de 200 proteínas clientes de Hsp90 muchas de las cuales son esenciales en los procesos de señalización y en la respuesta adaptativa de las células en momentos de stress ⁽⁵²⁾. Algunas proteínas que se unen a Hsp90 son: los receptores ErbBs, el receptor de andrógenos, Src, Ras, RAF-1, MEK y Akt ⁽⁵³⁾, CK2 ⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾, PDK1 ⁽⁵⁶⁾ y factores de transcripción como NFκB ⁽⁵⁷⁾.

Hsp90 se une a sus proteínas dianas formando un complejo con otras chaperonas y co-chaperonas y su ciclo funcional, requiere la unión e hidrólisis del ATP. Su actividad va a estar regulada por fosforilación, acetilación y nitrosilación ⁽⁵²⁾. La geldanamicina es un inhibidor de Hsp90 debido que bloquea el sitio de unión del ATP anulando la actividad de la chaperona. De los cuatro receptores ErbBs solo EGFR y ErbB2 necesitan de Hsp90, aunque la regulación que ejerce Hsp90 sobre estos dos receptores es distinta. En el proceso de maduración de EGFR y ErbB2 en el retículo endoplasmático, Hsp90 permanece unido al dominio quinasa de ambos receptores. Sin embargo, solo el receptor ErbB2 necesita de Hsp90 para su permanencia en la membrana plasmática y mientras esta chaperona esté unida, lo protege de la degradación. La chaperona Hsp90 es indispensable para la estabilización de ErbB2. Se ha visto que la inhibición de Hsp90 con geldanamicina, produce ruptura del extremo C-terminal de ErbB2 lo que ocasiona una acelerada endocitosis y degradación del receptor ⁽⁵⁸⁻⁵⁹⁾. Por otro lado, Hsp90 actúa también como un regulador negativo de la actividad de ErbB2 en la membrana celular. Se ha demostrado, que esta chaperona impide la activación de ErbB2 dificultando la dimerización con otros ErbBs ⁽⁶⁰⁾. A su vez, impide la

fosforilación de ErbB2 por Src, en el residuo Tyr877, necesario para su activación ⁽⁶¹⁾. En resumen, la unión de ErbB2 con Hsp90 es altamente dinámica debido que por un lado, Hsp90 es necesaria para la estabilización y localización de ErbB2 en la membrana celular y por otro lado, Hsp90 tiene que disociarse del receptor para permitir la dimerización con otros ErbBs y su activación.

3.2.2 Regulación de la síntesis de ErbB2

En muchos tipos de tumor el aumento de ErbB2 en la superficie celular es el resultado de la amplificación del gen *erbB2/neu* situado en el cromosoma 17q. También se ha descrito que mutaciones en esta región aumentan la expresión de ErbB2 en diversos tumores como en el cáncer de mama ⁽⁶²⁾.

El aumento de la actividad transcripcional del gen *erbB2/neu* puede ser debida a la mayor actividad de su promotor. La actividad del promotor para ErbB2 está controlada por distintos factores de transcripción que aumentan o disminuyen la expresión del gen. Entre los **factores de transcripción activadores** se destacan: **AP-2** ⁽⁶³⁾, **EGR2** ⁽⁶⁴⁾ y miembros de la familia **Ets** ⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾. Así mismo, **NFκB** activa el promotor de ErbB2, en combinación con PARP-1, en tejido sinovial reumatoide⁽⁶⁸⁾. Por otro lado, dentro de los **factores de transcripción represores** del gen *erbB2/neu* se destaca un miembro de la familia Forkhead: **FOXP3** ⁽⁶⁹⁾ y **Wwox** ⁽⁷⁰⁾. Esto indica que tanto el aumento de activadores como la pérdida de represores pueden aumentar la expresión de ErbB2 en el tumor.

3.3 Vías de transducción de señales

La unión de un ligando a un receptor ErbB induce la formación de dímeros con otro ErbB, activación de la actividad tirosina quinasa intrínseca y fosforilación de residuos de tirosina situados en el dominio intracelular. Estas tirosinas fosforiladas son puntos de unión para moléculas de señalización que contienen dominios de homología a Src (SH2) y dominios de unión a fosfotirosina (PTB). Estos dominios reconocen específicamente la secuencia de 5 a 8 aminoácidos que rodea a cada fosfotirosina. La unión de moléculas de señalización, las cuales son influenciadas por la composición del dímero, activará diferentes rutas de transducción de señales ⁽⁷¹⁾. Las vías de señalización activadas por el dímero ErbB2-EGFR mejor caracterizadas son (Figura 12): la vía de Ras/MAPK-Erk, la vía de la PI3K/PKB (Akt), la vía de la PLC-PKC y los factores de transcripción STATs que son directamente fosforilados por EGFR ⁽⁷²⁾.

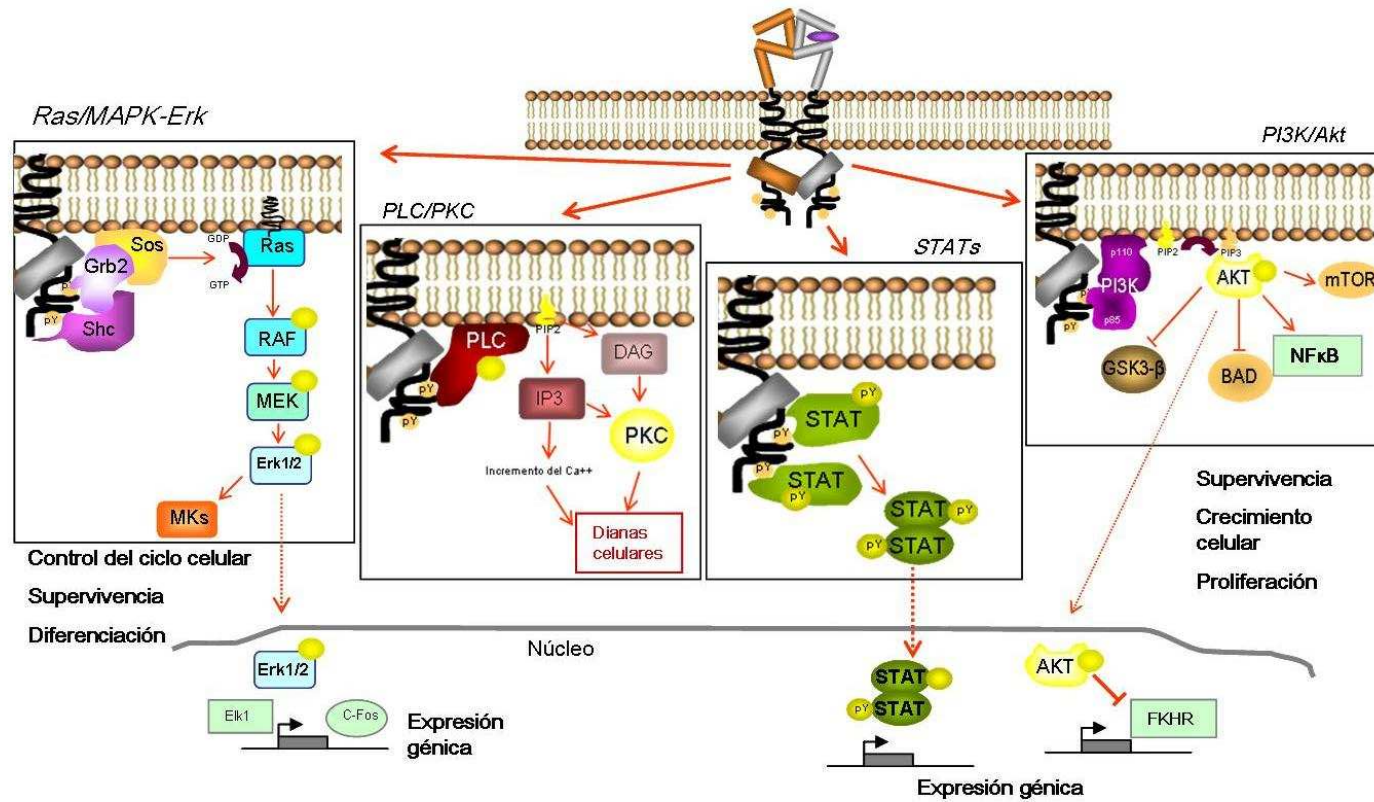


Figura 12: Vías de señalización activadas por los receptores ErbBs. La unión del ligando al receptor induce la formación de Homo y/o Heterodímeros y se fosforilan las tirosinas del extremo C- terminal. De esta manera se reclutan proteínas que activan las vías de señalización Ras/Mapk-Erk, PI3K/Akt, PLC/PKC y STATs. Esto induce proliferación y crecimiento celular, diferenciación y supervivencia.

3.3.1 Señalización celular por la vía de Ras/MAPK-Erk

Todos los ErbBs tienen la capacidad de activar la vía de Ras/MAPK-Erk, directamente a través del dominio SH2 de la proteína Grb2 o indirectamente a través del dominio PTB mediante un adaptador Shc (Figura 13). Grb2 se asocia a Sos (factor intercambiador de nucleótidos de guanina) que activa a la proteína GTPasa pequeña Ras, favoreciendo el intercambio de GDP por GTP. La activación de Ras, provoca la unión y activación de la serina/treonina-quinasa RAF (MAPKKK). RAF en su estado inactivo se encuentra en el citoplasma, al unirse a Ras-GTP se sitúa en la membrana celular, adoptando una conformación intermedia con activación parcial ⁽⁷³⁾. Otras quinasas (PAK-3, Src entre otras) catalizan la fosforilación de RAF en múltiples sitios, lo que deja a RAF en un estado activo estable, situándose en el citoplasma ⁽⁷⁴⁾. RAF activo une y fosforila a la quinasa de especificidad dual MEK1/2 (MAPKK), la cual fosforila y activa a la quinasa regulada por señales extracelulares Erk1/2 (MAPK-p44/42). La amplificación de la cascada es tal, que se estima que solo el 5% de Ras activado es suficiente para activar todas las moléculas de Erk1/2 ⁽⁷⁵⁾.

Erk1/2 es distribuida por toda la célula, pero tras su estimulación, una población significativa se localiza en el núcleo celular. Esta redistribución celular de Erk1/2 se divide en dos fases: primero, a los 2 minutos de estimulación mitogénica hay una rápida localización nuclear. El mecanismo por el cual entra al núcleo se cree que es por difusión pasiva a través del nucleoporo porque no poseen la secuencia de importación nuclear (NLS) ⁽⁷⁶⁾. Segundo, transcurridas 3 a 6 horas de estimulación mitogénica, se sigue acumulando la proteína activa en el núcleo, mientras que se agota en el compartimento citoplasmático. Tanto en el núcleo como el citoplasma Erk1/2 puede ser desactivada por desfosforilación.

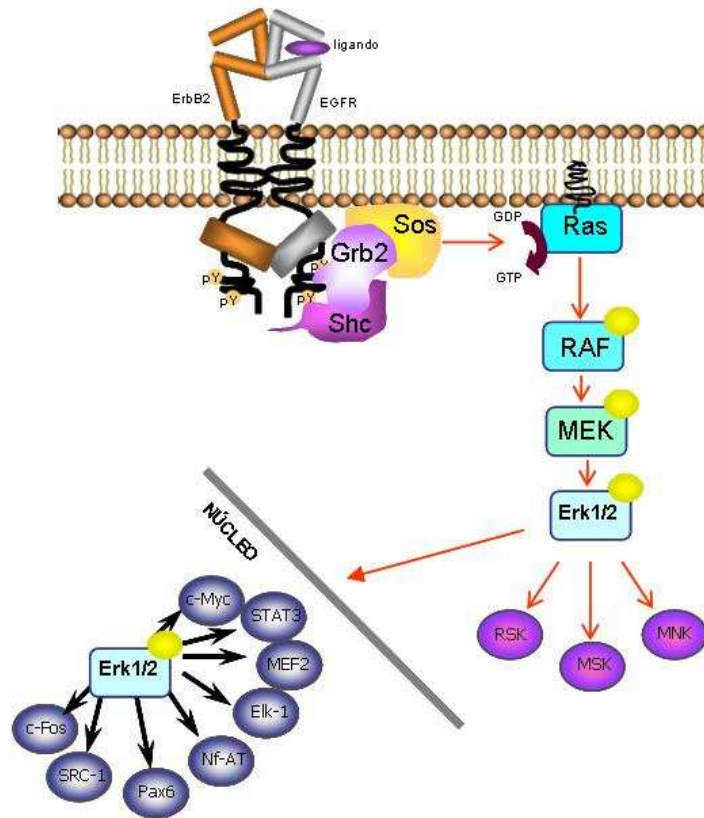


Figura 13: Vía de las Ras/MAPK-Erk1/2. La unión de Grb2 a los receptores ErbBs induce su asociación con Sos permitiendo la forma Ras-GTP activa. Ras une a RAF permitiendo su localización en la membrana y su activación por fosforilaciones. RAF activa a MEK y ésta activa a Erk. Erk tiene muchos sustratos pero se destacan las MSK, RSK y MNK en el citosol y muchos factores de transcripción en el núcleo celular.

Las enzimas MAPK fosfatasa (MKP) encargadas de la desactivación de Erk1/2, son un subgrupo de la familia de las proteínas fosfatasa de especificidad dual (DUSP). Las que se ubican en el núcleo son MKP-1, MKP-2, DUSP2/PAC1 y DUSP5 y en el citoplasma MKP-3, MKP-4 y MKP-X/DUSP7 ⁽⁷⁷⁾. La activación de Erk1/2 provoca fosforilación de múltiples sustratos: incluyendo varias proteínas de membrana (CD120a, Syk y

calnexina), factores de transcripción (SRC-1, Pax6, Nf-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc y STAT3), proteínas del citoesqueleto (neurofilamentos y paxilina) y todas las proteínas quinasas activadas por MAPKs (MKs) ⁽⁷⁸⁾. Dentro de la familia de las MKs encontramos a las tres subfamilias RSK, MSK y MNK todas son sustratos de Erk1/2, aunque solo las RSKs son exclusivamente activadas por Erk1/2 ⁽⁷⁹⁾. Estas proteínas tienen múltiples funciones, participando en la regulación transcripcional, en el control del ciclo celular, en la supervivencia y en la diferenciación celular ⁽⁷⁸⁾.

3.3.2 Señalización celular por la vía de la PI3K/Akt

Las fosfatidilinositol 3 fosfato quinasas (PI3K), son una familia de enzimas que fosforilan lípidos. Existen tres clases de PI3K: clase I, II y III, su clasificación se basa en la estructura de la enzima y en el sustrato lipídico (Tabla 2).

Clasificación de PI3K		Sustrato lipídico	Subunidad catalítica	Subunidad reguladora
PI3K clase I	PI3K clase IA	PIP(4,5) Fosfatidil-inositol 4,5 bisfosfato	p110 α (PIK3CA) p110 β (PIK3CB) p110 δ (PIK3CD)	p85 p50 p55
	PI3K clase IB		p110 γ (PIK3CG)	P101 p87
PI3K clase II		PI Fosfatidil-inositol	PI3K-C2 α PI3K-C2 β PI3K-C2 γ	
PI3K clase III		PI Fosfatidil-inositol	VPS34	VPS15

Tabla 2: Clasificación de PI3K ⁽⁸⁰⁻⁸¹⁾.

- ✓ La PI3K clase I que se subdivide a su vez en clase IA y IB, representa la vía de señalización más importante de los receptores de superficie. La PI3K clase IA es activada por los receptores tirosina quinasa y la clase IB es activada por receptores acoplados a proteínas G.
- ✓ La PI3K clase II representa una ruta alternativa activada por los receptores de superficie.
- ✓ La PI3K clase III es la principal vía de regulación del transporte vesicular, su componente principal es el complejo VPS34 (*vacuolar protein sorting 34*) también llamado PIK3C3⁽⁸¹⁾.

La PI3K de la clase IA está compuesta por una sub-unidad catalítica de 110kDa (p110) y una sub-unidad reguladora que posee un dominio SH2 lo que le permite su unión a los receptores ErbBs activados. La unión de la sub-unidad reguladora provoca un cambio conformacional de la p110 y su activación. La subunidad catalítica p110 también se puede activar uniéndose directamente a Ras-GTP (Figura 14)⁽⁸²⁾. Una vez activa, la PI3K fosforila al fosfatidil-inositol 4, 5-bifosfato (PIP2) en la posición 3' para formar el fosfatidil-inositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3). Este fosfolípido une moléculas con dominios FYVE de unión a lípidos o con dominios homólogos a pleckstina (PH) como es el caso de PDK-1 (quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1) y Akt (PKB).

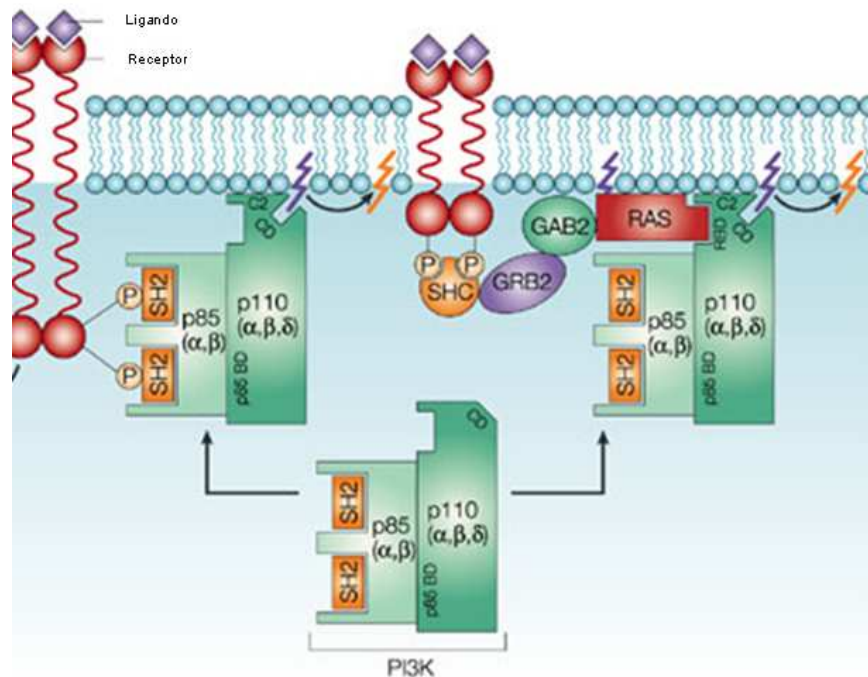


Figura 14: Activación de PI3K clase IA. Esquema de la activación de PI3K clase IA por receptores tirosina quinasa. Cuando el ligando se une al receptor se fosforilan tirosinas de ambos receptores, esto conduce al anclaje de la subunidad reguladora p85 (PI3K), que induce el cambio conformacional de la subunidad catalítica p110 y su activación. La p110 también se puede activar uniéndose directamente a Ras-GTP. La PI3K activa transforma el PIP2 (lila) a PIP3 (naranja). Tomado de Vivanco, I. y col. ⁽⁸³⁾

La serina/treonina quinasa Akt es el principal efector de PI3K. Akt se encuentra en el citosol en una conformación inactiva, al unirse a los PIP3 a través de sus dominios PH se trasloca a la membrana celular y cambia de conformación. Permite que PDK-1 fosforile su dominio catalítico en el residuo treonina 308 (Thr308). Su activación máxima se logra mediante la fosforilación en el dominio regulador del residuo Serina 473 (Ser473) por el complejo mTOR-Rictor ⁽⁸²⁾. Se conocen tres isoformas de Akt denominadas Akt1, Akt2 y Akt3 ampliamente expresadas tanto en tejidos normales como en tumores. En las células de cáncer de próstata PC3 y

DU145 se encuentran las tres isoformas y en las células LNCaP solamente Akt1 y Akt2 ⁽⁸⁴⁾. Estas isoformas desempeñan funciones específicas y en algunos casos funciones opuestas ⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾. Una vez que Akt se activa, fosforila proteínas tanto en el citosol como en el núcleo celular controlando la supervivencia, la proliferación y el crecimiento celular (Figura 15).

✓ Akt promueve **supervivencia celular** inactivando **BAD** (proteína pro-apoptótica) y fosforilando a **FKHR** (factores de transcripción de la familia *forkhead*) previniendo su entrada en el núcleo celular. La activación de los genes diana de FKHR incluye proteínas pro-apoptóticas como BIM y el ligando FAS. A su vez, induce degradación de la proteína pro-apoptótica p53 a través de la activación por fosforilación de **MDM2**. Por otro lado, Akt fosforila el complejo IKK y activa a la proteína anti-apoptótica **NFκB**.

✓ Akt promueve la **proliferación celular** aumentando los niveles de ciclina D1 necesarios en la transición de la fase G1/S. La **GSK3β** activa, promueve la degradación de la ciclina D1. Akt fosforila a la GSK3β y provoca su inhibición. A su vez Akt controla los inhibidores de ciclinas como p27^{kip1} cuya transcripción es mediada por FKHR. Akt al inhibir FKHR promueve la disminución de p27.

✓ Akt cumple un importante papel en el **crecimiento celular** activando a la serina/treonina quinasa **mTOR** que regula la traducción de proteínas ^(80, 83).

La importancia de la ruta PI3K/Akt en los procesos celulares se ha visto confirmada por la acción supresora de tumores de la fosfatasa lipídica (PTEN); ésta fosfatasa desfosforila la posición 3' del PIP3 originando el PIP2 y anulando así las acciones de PI3K (Figura 15). Mutaciones en PTEN conducen a la progresión del tumor como ocurre en gliomas ⁽⁸⁸⁾, cáncer de próstata ⁽⁸⁹⁾, cáncer de mama ⁽⁹⁰⁾, cáncer de pulmón ⁽⁹¹⁾, melanomas ⁽⁹²⁾ y leucemias ⁽⁹³⁾ entre muchos otros. PI3K es inhibida *in vitro*

por agentes químicos ampliamente utilizados como son LY294002 (IC₅₀ 1,4µM) y wortmanina (IC₅₀ 2-4 nM). El LY294002 fue descrito por Vlahos en 1993 como un derivado del querceptin con mayor especificidad ⁽⁹⁴⁾. Es un inhibidor competitivo de la PI3K que se une reversiblemente al sitio de unión del ATP. No se utiliza *in vivo* porque tiene efectos tóxicos indeseables y por ser poco soluble en medio acuoso. A partir de su estructura, se crearon otros inhibidores como son: SF1126 (en fase clínica I) y SF1101, que se utilizan actualmente como antitumorales en ensayos *in vivo*, con una mejor farmacocinética y farmacodinamia que el LY294002⁽⁹⁵⁾. La wortmanina es un metabolito extraído del hongo *Penicillium wortmanni* que se une a la PI3K de forma covalente en la zona de intercambio con el ATP ⁽⁹⁶⁾, no se utiliza en clínica por causar toxicidad hepática y además se caracteriza por tener una baja estabilidad y pobre solubilidad en medio acuoso ⁽⁹⁷⁾. Se utiliza para ensayos *in vitro*, aunque por su baja estabilidad su uso se limita a ensayos de tiempos cortos.

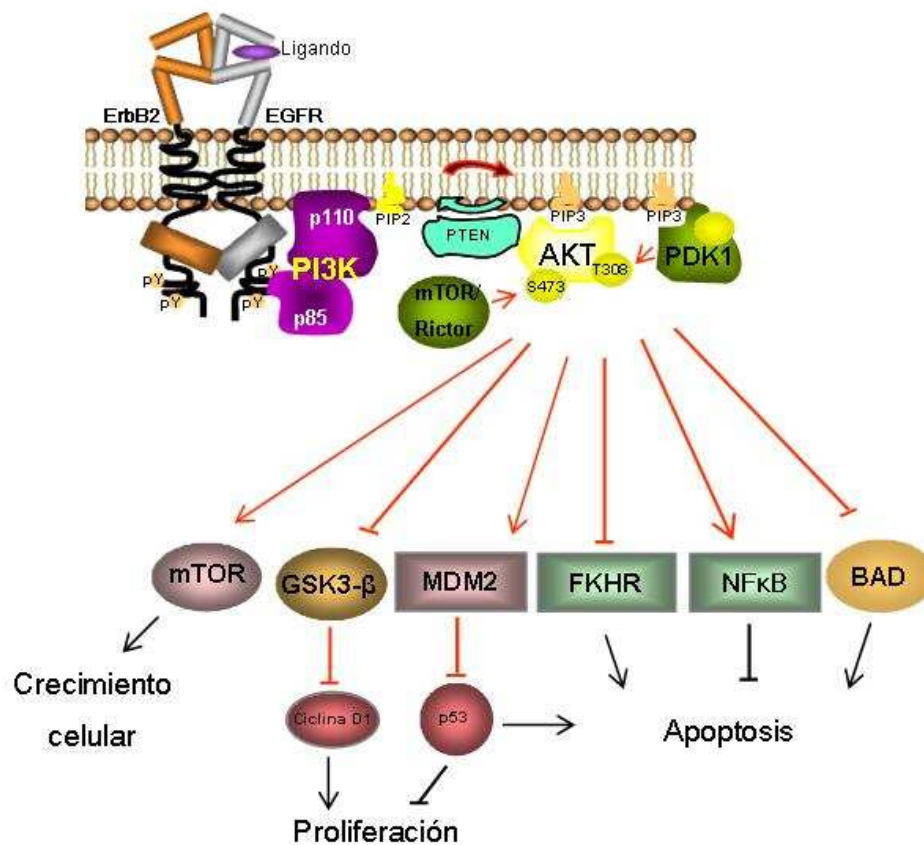


Figura 15: Vía de la PI3K/Akt. La activación de PI3K genera los PIP3 que sirven de anclaje tanto para Akt como para PDK1. Así Akt es fosforilada en la Thr308 por PDK-1 y en la Ser473 por mTOR/rictor. Akt activa fosforila a BAD, NFκB, FKHR y MDM2 induciendo supervivencia celular; por otro lado al fosforilar a MDM2 y GSK3-β induce proliferación celular. La fosforilación de mTOR promueve el crecimiento celular.

3.3.2.1 Señalización celular por la vía de NFκB

El factor de transcripción NFκB fue descubierto como una proteína nuclear de las células B que se une al promotor de la cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas. Posteriormente, se observó que se ubica en el citoplasma de todas las células. La familia NFκB está compuesta por 5 miembros en mamíferos: Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NFκB1 (P50 y su

precursor p105), NF κ B2 (P52 y su precursor p100). En el extremo amino terminal conservan una región de homología a Rel responsable de la unión al ADN, de la dimerización y de la unión con las proteínas inhibidoras I κ B (inhibidor de κ B). Solo RelA, B y c-Rel tienen un dominio de activación C-terminal, esta región interacciona con componentes la maquinaria transcripcional. Los otros dos miembros de la familia p50 y p52 tienen un dominio de unión al ADN pero carecen del dominio de activación. Los miembros de la familia pueden formar homo o heterodímeros, los heterodímeros RelA (p65)-p50 son los más abundantes. En estado inactivo el dímero NF κ B se encuentra unido a las proteínas inhibidoras I κ B y se localiza en el citosol. Una vez que la célula es estimulada por factores de crecimiento, citoquinas, entre otros, se produce la fosforilación de las proteínas I κ B por el complejo quinasa de I κ B (complejo IKK). Este complejo está formado por tres subunidades, la IKK α y la IKK β tienen actividad quinasa y la IKK γ o NEMO actúa como subunidad reguladora. La fosforilación de I κ B favorece su degradación lo que produce la liberación del heterodímero NF κ B, seguida de su translocación al núcleo celular. Una vez en el núcleo se producen acetilaciones y fosforilaciones que la activan completamente uniéndose y regulando la transcripción de numerosos genes (Figura 16) ⁽⁹⁸⁾.

En el cáncer de próstata la señalización por NF κ B, está implicada en los procesos de independencia de andrógenos, supervivencia, proliferación y transformación celular. Se demostró que, solo en las líneas celulares independientes de andrógenos PC3 y DU145, NF κ B se encuentra constitutivamente activa y aumenta (en combinación con AP-1) la transcripción de los genes de IL-6, molécula implicada en la diferenciación NE y la independencia de andrógenos. Sin embargo, en la línea LNCaP dependiente de andrógenos, NF κ B no se encuentra activa en situación basal ⁽⁹⁹⁾. La activación constitutiva de NF κ B, en células independiente de

andrógenos, se debe a la activación constitutiva del complejo IKK y constituye una vía de supervivencia para las células PC3 y DU145 ⁽¹⁰⁰⁾.

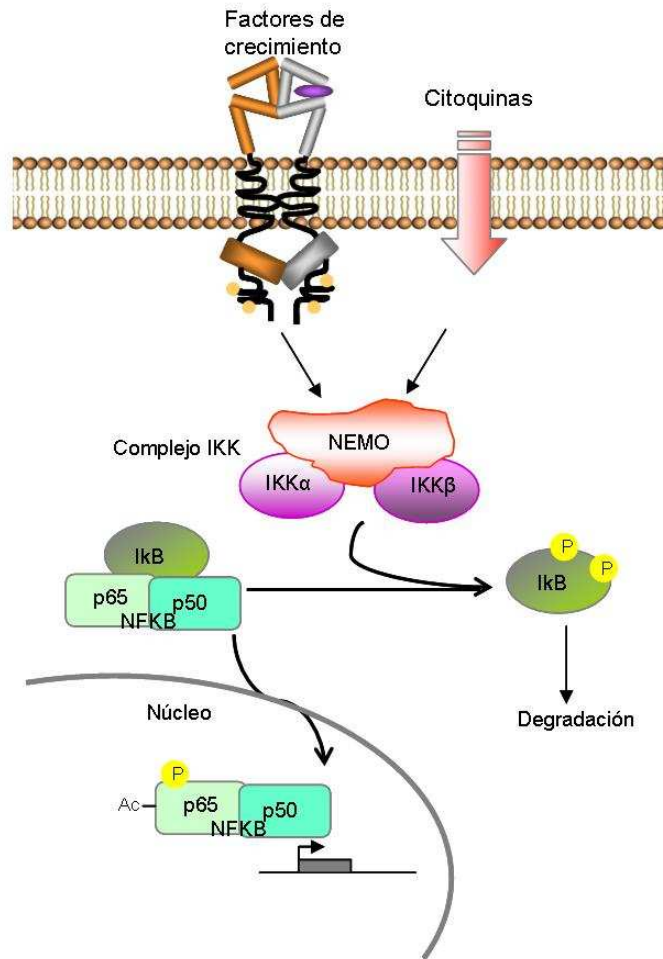


Figura 16: Vía de señalización NFκB. La activación de NFκB por factores de crecimiento y citoquinas se produce por activación del complejo IKK, que fosforila a las IκB provocando su degradación. De esta manera, el dímero NFκB se trasloca al núcleo en donde se activa por acetilación y fosforilación.

3.4 Receptores ErbBs y cáncer

Los receptores ErbBs están implicados en el desarrollo de tumores malignos regulando diversos procesos celulares (proliferación, adhesión, migración, supervivencia y diferenciación celular) que participan tanto en el inicio, como en la progresión tumoral. Las principales alteraciones de los ErbBs descritas en los tumores humanos son: el aumento de expresión de los receptores, mutaciones que permiten su activación constitutiva y la activación del receptor por ligandos liberados por las células tumorales y estromales que rodean al tumor.

3.4.1 EGFR/ErbB1

EGFR fue el primer receptor tirosina quinasa implicado en el cáncer. El aumento en los niveles de EGFR es, por lo general, la alteración más común tanto en tumores sólidos como en líneas celulares tumorales. Este aumento puede deberse a mutaciones que incrementan la transcripción del gen, a un aumento en la traducción del ARNm o a una mayor estabilidad de la proteína ⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾. Varios estudios sugieren que la expresión de EGFR es mayor en el tumor metastásico que en el tumor primario y está asociado al aumento del riesgo de recaída, tanto en el cáncer de mama como en una gran cantidad de tumores ⁽¹⁰⁴⁾. Resultados *in vitro* sugieren, que este aumento en los niveles de EGFR va acompañado de un aumento en los niveles del correspondiente ligando que activaría al receptor y provocaría transformación tumoral. Así es como en cáncer de mama, el aumento de EGFR y del TGF α están significativamente correlacionados con un mal pronóstico ⁽¹⁰⁵⁾.

También se han detectado formas mutantes del receptor. La mutación más frecuente es la denominada EGRvIII, que genera un receptor con pérdida del dominio extracelular, que es constitutivamente activo en ausencia de ligando. Esta mutación se encuentra principalmente en el 50% de los gliomas, así como también en los tumores de mama, ovario y estómago⁽¹⁰⁶⁾.

3.4.2 ErbB2

En el caso de ErbB2 la principal alteración encontrada en los tumores es el aumento de los niveles de dicho receptor. Este aumento se ha detectado en diferentes tipos de tumores como en el cáncer de mama ⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁸⁾, próstata ⁽¹⁰⁹⁾, gástrico ⁽¹¹⁰⁾, endometrio, vejiga, ovario y pulmón ⁽¹¹¹⁾, glándula salival ⁽¹¹²⁾, colorrectal ⁽¹¹³⁾, pancreático ⁽¹¹⁴⁾, tiroides ⁽¹¹⁵⁾ y riñón ⁽¹⁰²⁾.

El 90% de los tumores de mama que sobreexpresan ErbB2 presentan amplificación del gen. Existe correlación entre el aumento del receptor con parámetros como: tamaño y propagación del tumor a nódulos linfáticos, mayor grado de diferenciación, mayor porcentaje de células en fase S, disminución de los receptores de hormonas esteroideas y aumento de la supervivencia celular ^(108, 116). Los niveles de ErbB2 sirven como factor pronóstico para una gran cantidad de tumores ⁽¹¹⁷⁾. En el cáncer de mama el aumento de ErbB2 reduce tanto la eficacia de la quimioterapia, como la respuesta a la terapia hormonal anti-estrogénica ^(107, 118). Sin embargo, se ha observado que en un grupo reducido de tumores como los de pulmón, mesénquima, esófago y vejiga, el aumento de ErbB2 no se debe a la amplificación génica sino a modificaciones de la transcripción o de los procesos post-transcripcionales ⁽¹¹⁹⁾.

El efecto oncogénico de ErbB2 puede deberse a la activación de su dominio tirosina quinasa en ausencia de ligando. En tejidos en cultivo, con altos niveles de expresión de ErbB2, se observa homodimerización constitutiva y como consecuencia transformación tumoral ⁽¹²⁰⁾. Sin embargo es más probable que el receptor ErbB2 forme heterodímeros con otros receptores de la familia ErbBs, potenciando señales celulares. Esta mayor potenciación de los heterodímeros con ErbB2 se debe a que en presencia de este receptor los receptores no se degradan, sino que se reciclan a la membrana.

3.4.3 ErbB3 y ErbB4

La presencia de ErbB3 y ErbB4 es de suma importancia para la activación de vías de señalización de receptores ErbBs. Tanto ErbB3 como ErbB4 poseen sitios de unión para la subunidad reguladora p85 de PI3K. Es posible que la activación directa de la vía PI3K/Akt explique los efectos altamente mitogénicos del dímero ErbB2-ErbB3. En efecto, la presencia de ErbB3 junto con la activación sostenida de PI3K, implica la resistencia a los fármacos contra EGFR en el cáncer de mama. El incremento en la expresión de ErbB3, se ha observado en varios tumores como son el cáncer de mama, cáncer gástrico y colon, cáncer de próstata, entre otros⁽¹¹⁷⁾.

El rol de ErbB4 en la oncogénesis es menos claro y parece estar implicado en la inhibición del crecimiento, más que en el aumento de la proliferación. Por lo que es frecuente encontrar disminución de la expresión de ErbB4 en tumores de mama y próstata ⁽¹⁰⁴⁾, en contraposición con los otros miembros de la familia ErbBs.

3.5 Receptores ErbBs y cáncer de próstata

Numerosos grupos de investigación han demostrado la implicación directa de los ErbBs y sus ligandos en la progresión del cáncer de próstata, sobre todo en la transición del tumor a la fase independiente de andrógenos ⁽³¹⁾. Los receptores ErbBs que se expresan en la próstata son EGFR, ErbB2 y ErbB3 tanto en el tejido normal, como en el cáncer ⁽¹²¹⁻¹²²⁾. Hasta ahora muchas investigaciones intentan estudiar si la expresión de ErbB2 se correlaciona con un mal pronóstico, dada su similitud con el cáncer de mama en su dependencia hormonal así como en otras características fisiológicas. Hoy se sabe que en el tumor de próstata avanzado los niveles de ErbB2 aumentan en la fase independiente de andrógeno de la enfermedad y este aumento se correlaciona con el aumento de grado de Gleason, por lo que predice mayor agresividad tumoral ⁽¹²³⁾. A si mismo se ha visto, un aumento del dominio extracelular de ErbB2 en el suero de los pacientes y una correlación con la extensión de la enfermedad ⁽¹²⁴⁾. Estudios *in vitro* demuestran que ErbB2 regula los niveles del receptor de andrógenos en el tumor prostático. En líneas LNCaP clon C-81 que sobreexpresan ErbB2 se vio aumento del antígeno prostático específico, gen de respuesta a andrógenos ⁽¹²⁵⁾.

La fase independiente de andrógenos del cáncer de próstata está íntimamente relacionada con la adquisición del fenotipo neuroendocrino de las células del tumor. Hasta ahora no queda claro el papel que tiene ErbB2 en el proceso de diferenciación neuroendocrina. Por un lado, se conoce que la célula neuroendocrina de la próstata normal expresa ErbB2 ⁽¹²⁶⁾. Por otro lado, la interleuquina 6 que induce diferenciación neuroendocrina en las células LNCaP necesita de la presencia de ErbB2, lo que sugiere la participación de este receptor en la adquisición del fenotipo neuroendocrino en las células cancerígenas ⁽¹²⁷⁾. Sin embargo, en estudio

de tumores de próstata metastásico, se observó aumento en la expresión de ErbB2, sin observarse aumento de CrgA, marcador de diferenciación neuroendocrina ⁽¹²³⁾. La falta de conclusiones sobre si el aumento de ErbB2 está relacionado con la diferenciación neuroendocrina, puede deberse a que en el tumor coexisten diversos clones celulares que pueden expresar marcadores neuroendocrinos distintos y con distinta intensidad. Aunque está aceptada la CrgA como marcador por excelencia, puede que existan células con fenotipo neuroendocrino que expresen en mayor medida otro marcador distinto a la CrgA.

Objetivos

María Alicia Cortés

El EGF impide la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP provocada por la eliminación de andrógenos. Este efecto del EGF está modulado por la actividad de la vía PI3K/Akt. La activación constitutiva de esta vía de señalización por falta de PTEN, permite que el EGF estimule la proliferación de las células LNCaP, bloqueando el proceso de diferenciación neuroendocrina. Por el contrario, en presencia de inhibidores de ésta vía, el EGF induce supervivencia celular, permitiendo la diferenciación neuroendocrina. Por lo tanto, era necesario comprender los mecanismos moleculares responsables de este cambio en los efectos del EGF al inhibir la vía de la PI3K/Akt, ya que en estas condiciones las células tumorales sobreviven y adquieren el fenotipo neuroendocrino, dos procesos de enorme trascendencia para la progresión tumoral prostática.

Teniendo en cuenta estos resultados de nuestro grupo de investigación y los antecedentes expuestos en la introducción, el objetivo general de esta tesis es:

Determinar los mecanismos moleculares puestos en juego por el EGF al inhibir PI3K/Akt que son responsables de la supervivencia de las células LNCaP y de la adquisición del fenotipo NE.

Para la consecución de este objetivo:

Estudiaremos los posibles cambios en el sistema de señalización del EGF analizando los niveles de los receptores EGFR y ErbB2, su grado de fosforilación y la activación de la ruta MAPK/Erk.

Disecionaremos la vía PI3K/Akt para determinar qué elementos de la misma, están implicados en los efectos descritos.

Materiales y Métodos

María Alicia Cortés

1. MATERIALES

Cultivos celulares

- Frascos de cultivos, placas y multiplacas de plástico esterilizadas de dos marcas comerciales: Nunc™ Brad Products y Falcon Becton Dickinson.
- Materiales para el procesamiento de las células: PBS, tripsina-EDTA, suero fetal bovino (SFB), antibióticos y medio de cultivo RPMI-1640 (Invitrogen).

Tratamientos celulares

✓ Inhibidores:

-**LY294002** [2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one]
(Calbiochem)

-**LY303511** [2-Piperazinyl-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one] (Calbiochem)

-**Wortmanina** (Wortmannin- Sigma)

-**Geldanamicina** (Geldanamycin- Stressgen)

-**PD184161** [2-(2-Chloro-4-iodo-phenylamino)-N-cyclopropylmethoxy-3,4-difluoro-5-bromo-benzamide] (cedido por el Dr. Antonio Chiloeches)

-**ZD1839** (Iressa®; Cedido por el Dr. R. Colomer)

-**Forskolina** (Forskolin, *Coleus Forskohlii*- Merck)

-**TBB** (4, 5, 6, 7-tetrabromo-2-azabenzimidazol) (Calbiochem)

-**Rapamicina** (Rapamycin- Calbiochem)

-**H89** (cedido por el Dr. Antonio Chiloeches)

✓ Péptidos:

EGF (Sigma); **Interleukina-6** (Sigma), **TNF- α** (cedido por la Dra. Marina Lassa)

Análisis de proteínas

Para la extracción de proteínas se utilizó: Tritón X-100, O-vanadato de sodio, Inhibidor de Tripsina, Fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) todos de SIGMA.

- Para la cuantificación de proteínas se utilizó el reactivo Protein Assay de BioRad y Albúmina sérica bovina (BSA) de SIGMA.

Anticuerpos

Se detallan en la Tabla 3

Tabla 3 que se encuentra mas adelante en la sección Métodos.

- Para los ensayos de **Inmunoprecipitación** se utilizó Proteína G-Sepharosa (Sigma) y distintos anticuerpos descritos en la Tabla 3.

- Para el **ensayo de la actividad promotora**, se utilizó el kit comercial Luciferase Reporter Assay System de Promega y un luminómetro FB12 (Berthold) del departamento de Fisiología (UAH).

- Para los ensayos de **inmunodetección de proteínas por Western blot** se utilizó un equipo de electroforesis vertical y electro transferencia. Los geles se formaron con Acrilamida/bis-Acrilamida 40% (ratio 37.5:1). El marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards -dual color), el tampón de migración Tris-Glicina-SDS 10X y el tampón de transferencia Tris-Glicina 10X todos de BioRad. Las membranas de PVDF, el reactivo quimioluminiscente ECL™Western Blotting Detection Reagents y las placas radiográficas de alta sensibilidad, especiales para quimioluminiscencia Hyperfilm™ ECL™ fueron de Amersham Life Science.

- Para los ensayos de **Citometría de Flujo**, se utilizó el citómetro de flujo modelo FACScalibur de Beckton Dickinson (Unidad de cultivos, UAH) y los materiales utilizados en las técnicas fueron:

- Para el análisis del **ciclo celular**, se utilizó Nonidet P40 (Roche), Ribonucleasa A (RNasa A) (Sigma) y Ioduro de propidio de Molecular Probes (Invitrogen life Technologies).
- Para la determinación de la **expresión del receptor ErbB2 en la superficie celular**: como anticuerpo primario el Trastuzumab anti-humano (Herceptin) y como anticuerpo secundario se utilizó Alexa Fluor®488 goat anti-human IgG (H+L) de Molecular Probes (Invitrogen life Technologies).
- Para el análisis del **potencial de la membrana mitocondrial**: se utilizó la sonda TMRM (tetramethylrhodamine, methyl ester, perchlorate) de Molecular Probes (Invitrogen).
- Para el análisis de la **fragmentación del ADN (TUNEL)**: se utilizó el Kit comercial Fluorescein-FragEL™ de Oncogene.

- Para la **extracción de ARN** se utilizó el reactivo comercial Trizol reagent (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante, la cuantificación se realizó en el NanoDrop (Unidad de Biología molecular, UAH). Para la realización de la **RT-PCR cualitativa**, se utilizó la transcriptasa reversa y todos los reactivos de Promega. Para la reacción de amplificación se utilizó la TAQ polimerasa de Biotools, dNTPs de Promega y los cebadores de invitrogen.

- Para la realización de la **PCR a tiempo real**, se utilizó para la RT la transcriptasa reversa de Promega y para la PCR, la mezcla de reacción optimizada Fast Start Taqman Probe Master, así como diversas sondas de hidrólisis comerciales Universal ProbeLibrary Set, Human de Roche.

- Para los ensayos de **transfección** se utilizó el medio Opti-MEN (Invitrogen), como agente de transfección para plásmidos se utilizó lipofectamina y el reactivo PLUS ambos de Invitrogen. En el caso de las transfecciones de ARN se utilizó oligofectamina (Oligofectamine™ Reagent -Invitrogen).
- El resto de **reactivos químicos** utilizados fueron de alta pureza y calidad adquiriéndose de distintas casas comerciales: Sigma, Roche Molecular Biochemicals, Invitrogen, Merck, Boehringer Mannheim, Calbiochem, Fluka y Panreac.

2. MÉTODOS

2.1 Cultivos celulares

Se ha utilizado principalmente la línea celular tumoral prostática humana **LNCaP** (ATCC CRL-1740). Esta línea celular procede de una metástasis en un ganglio linfático supraclavicular de un adenocarcinoma prostático ⁽¹²⁸⁾. Estas células expresan antígeno prostático específico (PSA), fosfatasa ácida prostática, testosterona -5 α -reductasa y el receptor de andrógenos (AR) por lo que se consideran sensibles a dicha hormona. Clínicamente representan la etapa dependiente de andrógenos.

Además, se han utilizado las líneas celulares tumorales prostáticas **PC-3** (ATCC CRL-1435) y **DU145** (ATCC HTB-81) obtenidas también de la American Type Culture Collection y procedentes de una metástasis ósea de adenocarcinoma de próstata grado IV y de una metástasis en cerebro de un adenocarcinoma de próstata respectivamente.

Las líneas celulares se cultivaron en un medio RPMI-1640 con 2mM de L-glutamina. En todos los casos, los medios contenían antibióticos (0,25 mg/ml de penicilina; 0,25 mg/ml de estreptomicina y 2,5 mg/ml de fungizona) y suero fetal bovino (SFB) al 10%, excepto en el caso de las LNCaP, donde la concentración de SFB fue del 7%. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% CO₂. El medio se cambió cada 2 o 3 días hasta alcanzar un 90% de confluencia, momento en que las células se disociaron de su soporte con tripsina 0,05% - EDTA 0,02% en PBS 1X.

2.2 Obtención de los extractos celulares

Las células se lavaron con PBS 1X frío y posteriormente se lisaron con Tritón X-100 al 1% en un **tampón base** que contenía:

-Tris-HCl 50 mM pH 7,5

-NaCl 140 mM

-EDTA 1 mM

-Inhibidores: inhibidor de tripsina 0,3 mg/ml; PMSF 0,1 mM inhibidor de serina proteasas y O-vanadato de sodio 0,5 mM inhibidor de tirosina fosfatasas

Los extractos celulares se mantuvieron en este tampón durante 30 minutos a 4 °C en rotación y a continuación se centrifugaron a 12000xg durante 10 minutos a 4°C, recogiendo los sobrenadantes para la inmunoprecipitación o para la inmunodetección de proteínas. La cuantificación de proteínas presentes en la muestra, se realizó mediante el método de Bradford ⁽¹²⁹⁾. Como estándar se utilizó una solución de albúmina sérica bovina (1 µg/µl).

2.3 Inmunoprecipitación

Antes de proceder a la inmunoprecipitación de la proteína de interés, preincubamos el extracto celular (obtenido como se indica en el apartado anterior) con proteína G-Sepharosa para eliminar uniones inespecíficas. Para ello, la proteína G-Sepharosa (35µl por muestra) se lavó 3 veces con el tampón base (detallado en el apartado anterior), centrifugándose cada vez a 4000xg durante 2 minutos a 4 °C. A continuación, se añadió el extracto celular (1 mg de proteína) y se incubó durante 1 hora a 4°C en rotación. Posteriormente, se centrifugó a 4000xg durante 3 minutos a 4°C, separando la proteína G del sobrenadante.

Este sobrenadante fue el que se utilizó para inmunoprecipitar la proteína de interés incubándolo con el anticuerpo específico (2 µg) durante toda la noche en rotación a 4 °C. Después de esta incubación, se agregó a los complejos antígeno-anticuerpo formados, nueva proteína G, incubando en rotación durante 1 hora a 4 °C.

Pasado este tiempo, se centrifugó a 4000xg durante 2 minutos a 4°C para separar el inmunoprecipitado (IP) del sobrenadante. El IP se lavó 3 veces con tampón base, centrifugándolo de nuevo a 4000xg a 4°C durante 2 minutos cada vez. En el último lavado se elimina todo el sobrenadante aspirándose con una aguja y al precipitado se añadió 50 µl del tampón de carga 2X (Laemmli buffer) (Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%; 2-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0,004%). Seguidamente, se calentó a 100°C durante 5 minutos, para desnaturalizar las proteínas y separar los complejos proteína-anticuerpo de la proteína G. Se centrifugó nuevamente a 12000xg durante 2 minutos y se recogió 50µl del sobrenadante (proteínas inmunoprecipitadas) que se cargó en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS para proceder a la inmunodetección de proteínas.

2.4 Inmunodetección de proteínas (Western blot)

La separación y detección de las proteínas a estudio, se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior identificación con anticuerpos específicos.

Preparación de la muestra:

Los extractos celulares (50- 75 µg de proteínas, según la proteína a analizar) se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C durante 5 minutos en tampón de carga 4X (Tris-HCl 250 mM (pH 6,8), SDS 8%, glicerol 40%, 2-mercaptoetanol 20% y azul de bromofenol 0,008%) y se centrifuga a 12000xg durante 1min.

2.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

Se depositaron las muestras y el marcador de peso molecular en geles de poliacrilamida-SDS. La migración se llevó a cabo a 150 voltios en tampón TGS (Tris 25 mM; Glicina 192 mM y SDS 0,1% pH 8,3).

2.4.2 Transferencia

Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF mediante la aplicación de una diferencia de potencial de 110 voltios durante 90 minutos a 4 °C o 65 mA toda la noche a temperatura ambiente, en tampón TG (Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; metanol 20%).

2.4.3 Inmunodetección con anticuerpos específicos

Al finalizar la transferencia la membrana se incubó en una solución de bloqueo con leche desnatada o albúmina sérica bovina (BSA) en

tampón TTBS (Tris 0,1mM; ClNa 1,5 mM y 0,05% Tween-20 o TBS sin Tween-20), con el fin de bloquear los sitios de unión inespecífica de la membrana. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo específico de la proteína que queríamos detectar (condiciones de dilución e incubación en la Tabla 3 para cada anticuerpo utilizado). Tras esta incubación se lavó la membrana 3 veces durante 10 minutos cada uno con TTBS o TBS. A continuación, se incubó la membrana con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (HRP) detallado en la Tabla 3. Se lavó la membrana 3 veces durante 20 minutos con TTBS o TBS. Al finalizar los lavados se incubó la membrana con un reactivo quimioluminiscente como sustrato de la peroxidasa. Para visualizar los resultados se impresionaron placas radiográficas de alta sensibilidad. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas, se realizó con el programa Image J.

Tabla 3

Anticuerpo (Ac)	Bloqueo*	Ac. Primario	Ac. Secundario**
P-EGFR (Y1068) (cell signalling)	5% BSA en TTBS	1/500 con 5%BSA en TTBS (ON a 4°C)	Rabbit 1/10.000 con 5%BSA en TTBS
EGFR (BD transduction)	5% Leche en TTBS	1/500 con 5%Leche en TTBS (ON a 4°C)	Mouse 1/10.000 con 5%Leche en TTBS
P-ErbB2 (Y1248) Ab18 clone PN2A (NeoMarkers)	5% Leche en TTBS	1/200 con 5%Leche en TTBS (2h a TA)	Mouse 1/3.000 con 5%Leche en TTBS
P-ErbB2 (Y877) (SAB)	5% Leche en TTBS	1/500 con 5% Leche en TTBS (1h a TA)	Rabbit 1/10.000 con 5%Leche en TTBS

Anticuerpo (Ac)	Bloqueo*	Ac. Primario	Ac. Secundario**
ErbB2 Ab15 clone 3B5 (NeoMarkers)	5% Leche en TTBS	1/200 con 5%Leche en TTBS (1h a TA)	Mouse 1/10.000 con 5%Leche en TTBS
P-44/42 (T202/Y204) E10 (cell signalling)	5% Leche en TTBS	1/500 con 5%Leche en TTBS (1h a TA)	Mouse 1/3.000 con 5% Leche en TTBS
Erk2 (Santa Cruz)	5% Leche en TTBS	1/10.000 con 5%Leche en TTBS (1h a TA)	Rabbit 1/20.000 con 5%Leche en TTBS
C-RAF (BD transducction)	5% Leche en TTBS	1/1.000 en 2%Leche en TTBS (ON a 4°C)	Mouse 1/10.000 con 5%Leche en TTBS
Hsp90 (BD transduction)	5% leche en TTBS	1/500 con 5% leche en TTBS (1h a TA)	Mouse 1/10.000 con 5% leche en TTBS
PARP (Poly ADP- ribose Polymerase) (BD Pharmigen)	5% leche en TTBS	1/1000 con 5% leche en TTBS (1h a TA)	Mouse 1/10.000 con 5% leche en TTBS
AKT 1/2/3 (H136) (Santa Cruz)	5% leche en TTBS	1/1000 con 2% leche en TTBS (1h a TA)	Rabbit 1/20.000 con 5% leche en TTBS
AKT 1 (2H10) (cell signaling)	5% leche en TTBS	1/1000 con 5% BSA en TTBS (ON a 4°C)	Mouse 1/10.000 con 5% leche en TTBS
AKT 2 (5B5) (cell signaling)	5% leche en TTBS	1/1000 con 5% leche en TTBS (ON a 4°C)	Rabbit 1/10.000 con 5% leche en TTBS
P-AKT (S473) (cell signaling)	5% leche en TTBS	1/500 con 5% leche en TTBS (1h a TA)	Rabbit 1/10.000 con 5% leche en TTBS
P-AKT1/2/3 (T308)-R (Santa Cruz)	5% leche en TBS. ON a 4°C	1/500 con 5% leche en TBS (ON a 4°C)	Rabbit 1/10.000 con 5% leche en TBS

Anticuerpo (Ac)	Bloqueo*	Ac. Primario	Ac. Secundario**
NSE Ab-1 (E27) (Neo Markers)	5% leche en TTBS	1/200 con 5% leche en TTBS (1h a TA)	Mouse 1/10.000 con 5% leche en TTBS
β -tubulina (clon TUB2.1) (Sigma)	5% leche en TTBS	1/2000 con 5% leche en TTBS (1h a TA)	Mouse 1/20.000 con 5% leche en TTBS

Tabla 3: Anticuerpos utilizados. Se detalla en esta tabla las condiciones de incubación para cada anticuerpo. * El bloqueo se realiza 1 hora a temperatura ambiente (TA) o toda la noche (ON) a 4°C en aquellos que no se aclara específicamente la condición. ** Los anticuerpos secundarios utilizados son:

- anti-mouse IgG Peroxidase Conjugate (Sigma-Aldrich)
- anti-Rabbit IgG (Goat) Peroxidase Conjugate (Calbiochem)

En todos los casos el anticuerpo secundario se incubó 1h a TA.

2.5 Transfección de ARN de interferencia

Se sembraron células LNCaP a una densidad de 150.000 células en placas p35 y después de 48 horas de crecimiento, se transfectaron con ARN pequeños de interferencia específicos para el gen cuya expresión se desea atenuar. Como control, se transfectaron células con ARN que no inhibe la expresión de ningún gen humano y al que denominamos *Scrambled* (SC). Como agente de transfección se utilizó oligofectamina. Se diluyeron 100 pmoles de los distintos ARN en 185 μ l de medio Opti-MEM libre de suero y de antibióticos, por otro lado, se diluyeron 4 μ l de Oligofectamina en 15 μ l de medio Opti-MEN. Posteriormente, se mezclaron ambas soluciones y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. Después, el medio RPMI-1460, en el que habían sido sembradas las células, se reemplazó por 800 μ l de medio Opti-MEM más los 200 μ l de la

mezcla de transfección, incubándose a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se suplementó el medio de la transfección con 500 µl de medio RPMI-1460 con SFB 3X sin antibióticos. Transcurridas 72 horas de incubación al cual se consigue la máxima inhibición de la expresión del gen de interés, las células se procesaron para los distintos experimentos.

2.6 Ensayo de la actividad transcripcional de NFκB

Se transfectó el plásmido pGL3 que contiene x3NFκB-Tk-Luc asociado al gen reportero de luciferasa. Posee un tándem de tres repeticiones del motivo de unión a NFκB del gen H-2k, incluido en el promotor de la timidina quinasa cedido amablemente por el Dr. Antonio Chiloeches. Este plásmido se transfectó junto con, el vector que contiene el gen de luciferasa del género *Renilla* controlada por el promotor de timidina quinasa (pRL-TK-*Renilla*). Como agente de transfección se utilizó lipofectamina y el reactivo PLUS.

Para ello, se sembraron células LNCaP a una densidad de 200.000 células por pocillo en placas p35. Después de 48 horas de crecimiento, se diluyó 0,2 µg del plásmido pGL3-3xNFκB-Tk-Luc y 0,02ug del vector pRL-TK-*Renilla* en 100 µl de medio Opti-MEM que contenía 4 µl de reactivo PLUS por cada punto y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. La proporción que se transfecta de NFκB y *Renilla* es 10:1. Por otro lado, la lipofectamina manteniendo una proporción 20:1 con respecto a la cantidad de plásmido, se diluyó en 100 µl de medio Opti-MEM. Transcurridos los 15 minutos de incubación, se mezclaron ambas soluciones y se incubó otros 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se reemplazó el medio en el que habían sido sembradas las células por 800 µl de Opti-MEM y se agregó 200 µl de la mezcla de transfección durante 3 horas a 37 °C.

Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio de transfección y se añadió medio RPMI-1460 con 7% de SFB y sin antibiótico.

A las 24 horas de transfección se reemplazó el medio por RPMI sin SFB. Transcurridas 24 horas se realizaron los tratamientos según se detalla en cada experimento.

A las 24 horas de tratamiento, se lisaron las células y se cuantificó la actividad luciferasa en un luminómetro FB12, utilizando el kit comercial Dual-Luciferase Reporter Assay System siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, se representó la relación entre la actividad luciferasa y la actividad luciferasa *Renilla*, corregido con la cantidad de proteínas.

2.7 Extracción de ARN y retrotranscripción

Para el aislamiento del ARN total, se utilizó el reactivo comercial Trizol Reagent siguiendo indicaciones del fabricante y se cuantificó utilizando el NanoDrop. La integridad del ARN se analizó por observación en UV. de las bandas características en electroforesis en geles de Agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Una vez aislado, cuantificado el ARN y analizado la integridad del ARN, se procedió a la retrotranscripción del mismo utilizando una mezcla de reacción compuesta por una solución tampón (Tris-HCl 7,5 mM pH 9; KCl 5 mM; (NH₄)SO₄ 2 mM; MgCl₂ 3 mM), y los reactivos comerciales: RNasin, como inhibidor de RNasas (20 unidades), cebadores hexámeros con secuencias aleatorias denominadas *random primers* (5 pmoles), la retrotranscriptasa MMLV (200 unidades), dNTPs (0,2 mM), así como 2 µg de ARN. Para las PCR cualitativas se agregó DTT (5 mM).

Para evitar la formación de estructuras secundarias en el ácido nucleico aislado, la mezcla de ARN y los *Random primers* fueron previamente desnaturalizados calentando a 72 °C durante 10 minutos.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a 37 °C durante 60 minutos, seguidos de 5 minutos a 95 °C para inactivar la retrotranscriptasa. Posteriormente, 5 µl de cada retrotranscripto fue utilizado como matriz para las reacciones de amplificación.

2.7.1 PCR cualitativa

Los retrotranscriptos obtenidos en el apartado anterior son utilizados para la amplificación por PCR cualitativa. Para ello, utilizamos una mezcla de reacción compuesta por una solución tampón (Tris-HCl 7,5 mM pH 9; KCl 5 mM; (NH₄)SO₄ 2 mM; MgCl₂ 1 mM), y DNA polimerasa (1 unidad) y dNTPs (0.4 mM). Los cebadores específicos fueron utilizados a una concentración final de 0.4 mM (Tabla 4).

	ErbB2	p110α
Cebador derecho	GGG CTG GCC CGA TGT ATT TGA T	ATC TTT TCT CAA TGA TGC TTG GCT
Cebador izquierdo	ATA GAG GTT GTC GAA GGC TGG GC	CTA GGG TGT TTC GAA TGT ATG

Tabla 4: cebador derecho e izquierdo

La amplificación se realizó con un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 7 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales constó de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C (ErbB2), 56 °C (p110α) o 59 °C (actina) y 30 segundos a 72 °C. Finalmente

un ciclo de 7 minutos a 72 °C. El termociclador utilizado fue Applied Biosystems 2720 thermal cycler.

La amplificación de los genes específicos, se analizó por migración del DNA en geles de poliacrilamida/TAE teñidos con bromuro de etidio, las bandas obtenidas se detectaron mediante luz UV.

2.7.2 PCR a tiempo real

Los retrotranscriptos obtenidos según se describe en el apartado correspondiente son utilizados para la amplificación por PCR a tiempo real. Para ello, utilizamos la mezcla de reacción optimizada Fast Start Taqman Probe Master, la cual es una solución tampón que contiene una Taq-polimerasa químicamente modificada que se activa por calor, dNTPs y MgCl₂. Además, utilizamos dos sondas de hidrólisis comerciales a una concentración final de 0,2 µM (Universal Probe Library Set Human, Roche), una para el gen de interés y otra para el gen de referencia. Estas sondas presentan el fluoróforo de marcaje FAM y el quencher TAMRA. Los cebadores específicos fueron obtenidos comercialmente de Invitrogen y fueron utilizados a una concentración final de 1 µM (Tabla 5).

	ErbB2 variante 1	CrgB	18 S (gen de referencia)
Sonda de hidrólisis	CTT CCT GC	CCT CCT GG	GAA GGC AG
Cebador derecho	CCC TGC ACC TCC TGG ATA	CAC TGG CAT GGA ATT GAC AG	TCG GGA GTG GGT AAT TTG C
Cebador izquierdo	GGG AAA CCT GGA ACT CAC CT	CAG CCA ACG CTG CTT CTC	GGA GAG GGA GCC TGA GAA AC

Tabla 5: Sonda, Cebador Derecho, Cebador Izquierdo.

La amplificación se realizó con un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales constó de 15 segundos a 95 °C y 60 segundos a 60 °C. El termociclador utilizado fue Applied Biosystem 7500 Fast Real Time PCR System (Unidad de Biología molecular- UAH).

Se llevó a cabo una cuantificación relativa de la expresión génica del gen específico utilizando el método de la “curva estándar”.

2.8 Análisis del ciclo celular y del potencial de membrana mitocondrial con sonda TMRM por citometría de flujo

Después de los respectivos tratamientos se recogió el sobrenadante de las placas de cultivo y las células adheridas se disociaron con tripsina 0,05% - EDTA 0,02% durante 5 minutos a 37 °C. Se anuló el efecto de la tripsina añadiendo medio completo (medio con SFB). A continuación, se centrifugaron a 800xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en medio completo. Posteriormente, se separan las células en dos tubos de citómetro.

- a) Para el *ciclo celular* se añadió NP40 0,5%, RNasa-A 64 µg/ml. Se incubó 30 minutos a 4°C. Posteriormente antes de pasar las muestras por el contador, se le añadió yoduro de propidio 50µg/ml.
- b) En otro tubo se añadió la *sonda TMRM* a una concentración de 200 nM y se incubó 30 minutos a 37 °C con CO₂ 5%. Posteriormente, traspasamos los tubos a un termobloque a 37°C para evitar las variaciones de temperatura durante el análisis en el citómetro.

Por último, las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo modelo FACScalibur de Beckton Dickinson. Los datos obtenidos se analizaron mediante los programas informáticos WinMDI y Cylchred.

La TMRM es una sonda con carga positiva y lipofílica que atraviesa la membrana celular y se une a la membrana mitocondrial interna con carga negativa (población TMRM positiva). En la apoptosis, se produce una caída del potencial eléctrico mitocondrial por pérdida del gradiente electroquímico, con la consecuente pérdida de carga negativa de la membrana interna. La sonda TMRM entonces, no se une y difunde de la célula (población TMRM negativa). Se representa la población TMRM negativa como el porcentaje del total de la población celular.

En el análisis del ciclo celular representamos la población de menor cantidad de ADN que la población G1, se la denomina población subG0/G1. Esta población representa las células con fragmentación de ADN por ello tienen menos cantidad. Proceso que sucede en la apoptosis. Se representó el porcentaje de la población subG0/G1 con respecto a la población total.

2.9 Técnica de TUNEL para la detección de la fragmentación del ADN por citometría de flujo:

Durante el proceso de la apoptosis se produce fragmentación del ADN por endonucleasas que generan en el extremo 3' de estos fragmentos grupos hidroxilos (-OH) libres. En la técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling*), una desoxi-nucleotidil transferasa terminal (TdT) se une a los fragmentos de ADN que exponen los grupos -OH y cataliza la adición de desoxinucleótidos conjugados con fluoresceína.

Una vez realizados los correspondientes tratamientos, se procedió a realizar la técnica, con el kit comercial Fluorescein-FragEL™ siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo modelo FACScalibur de Beckton Dickinson (Unidad de cultivos, UAH y los datos obtenidos se analizaron mediante el programa WinMDI. La población con ADN fragmentado se representa como el porcentaje TUNEL positiva (población con mayor fluorescencia) referido a la población total.

2.10 Análisis de la fragmentación de PARP por *western blot*

La separación y detección específica de PARP se realizó según se describe en el apartado de *western blot*. La proteína PARP de 116 KDa, en el proceso de la apoptosis se fragmenta mediante la acción de las caspasas 3 y 7, generando dos fragmentos de 89 y 24 KDa ⁽¹³⁰⁾. Por lo tanto, la detección del fragmento de 89 KDa consideramos será indicativo de muerte celular.

2.11 Determinación de los niveles del receptor ErbB2 en la superficie celular por citometría de flujo

Para detectar ErbB2 utilizamos un anticuerpo humanizado Trastuzumab que se une a la porción externa del receptor y un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo que permitirá su visualización. No se fijan las células ni se permeabilizan, por ello el anticuerpo solo se unirá a ErbB2 unido a la membrana celular y no a ErbB2 ubicado en otros compartimentos de la célula.

Una vez realizados los correspondientes tratamientos, se lavaron las células con PBS 1X y se disociaron con tripsina 0,05%- EDTA 0,02% en PBS 1X durante 5 minutos a 37 °C, neutralizando posteriormente la tripsina con medio completo. Las células se contaron en cámara de Neubauer. A continuación, se centrifugaron a 800xg durante 5 minutos a 4 °C. Eliminandose el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado celular con una solución de albúmina al 1% en PBS 1X (PBS/BSA1%). Se volvió a centrifugar a 800xg durante 5 minutos a 4 °C, se aspiró el sobrenadante, se añadió por cada 200.000 células 0,5 µg del anticuerpo Trastuzumab durante 30 minutos a 4 °C en rotación. Finalizada la incubación, se centrifugó a 800xg durante 5 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS/BSA1%. Repitiéndose este lavado dos veces, eliminando el sobrenadante al final. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-humano Alexa Fluor®488 (1:400 en PBS/BSA1%) durante 30 minutos a 4 °C en rotación. Se realizaron dos lavados con PBS/BSA1% y se resuspendieron en PBS. Por último, las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo modelo FACScalibur de Beckton Dickinson (Unidad de cultivos, UAH). Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa WinMDI. Se representa la cantidad de ErbB2 unido en la membrana celular en un histograma (número de células (eje Y) *versus* fluorescencia FL1 (eje X)). Donde el aumento de fluorescencia refleja una mayor cantidad de ErbB2 en la membrana celular y se observa como un desplazamiento de la gráfica hacia la derecha en el eje X.

2.12 Inmunofluorescencia

La localización subcelular de ErbB2 y cromogranina A (CrgA), se determinó utilizando Trastuzumab y anti-CrgA (NeoMarkers) así como los anticuerpos secundarios conjugados fluorescentes. Con este fin, tras los

diferentes tratamientos, las células se fijaron con para-formaldehído al 4% en PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó tres veces con PBS 1X y se permeabilizó con Tritón X-100 al 0,1% en PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar nuevamente con PBS 1X, se bloqueó con BSA al 1% en PBS 1X durante 30 minutos a 37 °C. Se incubó con el anticuerpo primario (1:100) diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido este tiempo se lavó tres veces con PBS 1X. La detección del anticuerpo unido se realizó incubando durante 1 hora a 37 °C con un anticuerpo secundario (anti-ratón Alexa® 633 para CrgA y anti-humano Alexa® 488 para Trastuzumab) en una dilución 1:2000 en solución de bloqueo. Para la tinción de los núcleos, se procedió a tratar con RNasaA a una concentración de 100 µg/ml durante 25 minutos a temperatura ambiente, con el fin de evitar tinción del ARN y posteriormente, se incubó con yoduro de propidio a una concentración de 2,5 µg/ml durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se montaron en portaobjetos y se analizaron mediante un microscopio confocal Leica TCS-SL (Unidad de cultivos- UAH).

2.13 Análisis de los datos.

Para el procesamiento de los datos se utilizaron dos programas informáticos: GraphPad Prism4 y Microsoft Office Excel/2003.

Para el análisis estadístico, se utilizó el test de la t-Student, excepto en el caso del análisis de los resultados de la PCR en tiempo real, en cuyo caso se utilizó la prueba de Wilcoxon para muestras apareadas. Las diferencias se consideraron significativas cuando el p-valor fue inferior a 0,05.

Resultados

María Alicia Cortés

1. IMPLICACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR Y EN LA DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA DE CÉLULAS LNCAP

La vía PI3K/Akt es necesaria para la supervivencia de la línea celular de cáncer de próstata LNCaP. Nuestro grupo de investigación ha publicado recientemente que la vía PI3K/Akt modula el efecto del EGF sobre la proliferación y diferenciación en dicha línea celular ⁽³⁷⁾. Para profundizar en este estudio, analizamos el efecto que tiene la inhibición esta vía, ya sea en ausencia o en presencia de EGF, sobre la supervivencia y la diferenciación NE en células LNCaP. Para ello, tratamos las células con LY294002 (LY29) con o sin EGF y analizamos la muerte celular mediante tres técnicas (ver Materiales y Métodos): la técnica de TUNEL, utilizando la sonda TMRM y la fragmentación de PARP (*poly ADP-ribose polymerase*). Como se observa en la Figura 17, el tratamiento de las células con LY29 provocó un aumento significativo tanto de células TUNEL positivas, como de TMRM negativas e indujo la fragmentación de PARP, todos ellos indicadores de muerte celular. Sin embargo, la presencia del EGF atenuó significativamente la muerte celular observada, indicando que el EGF induce supervivencia celular activando otras vías de señalización que reemplazan a la vía de PI3K/Akt.

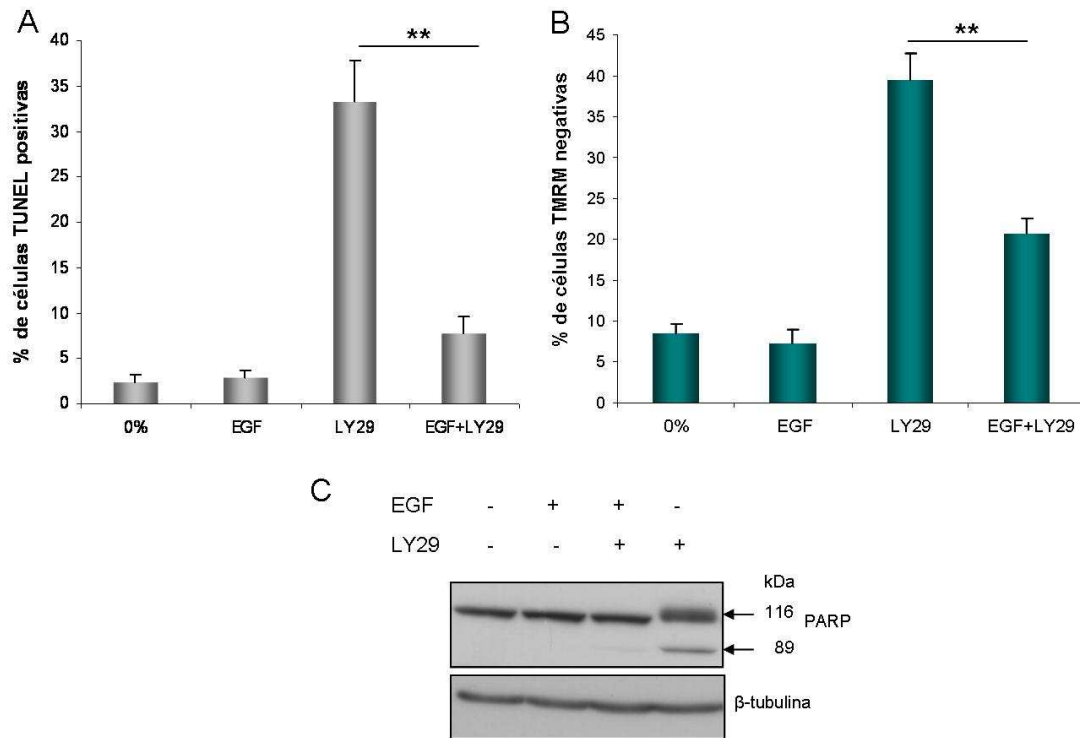


Figura 17: Efecto sobre la supervivencia celular del tratamiento con EGF, al inhibir PI3K/Akt. Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero (0%) durante 24hs. Se trataron con o sin EGF (10^{-8} M) en presencia o ausencia de LY29 (20 μ M). A las 24hs, se analizó la supervivencia celular: **A)** por la técnica de TUNEL; **B)** utilizando la sonda TMRM. Se muestra la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes (** $p < 0,01$). **C)** analizando la fragmentación de PARP por *western blot* y como control de carga β -tubulina. Se muestra un experimento representativo de cuatro experimentos independientes.

Igualmente nuestro grupo de investigación demostró que el EGF impedía la diferenciación neuroendocrina, provocada por la privación androgénica (37). Sin embargo, este efecto desaparece al añadir LY29. Como observamos en la Figura 18A, el tratamiento con EGF más LY29 provocó un aumento de los niveles de enolasa específica neuronal (NSE) de aproximadamente el 100%, así como un aumento significativo (test de

Wilcoxon ** $p < 0,01$) del ARN mensajero de cromogranina B (CrgB) (Figura 18B).

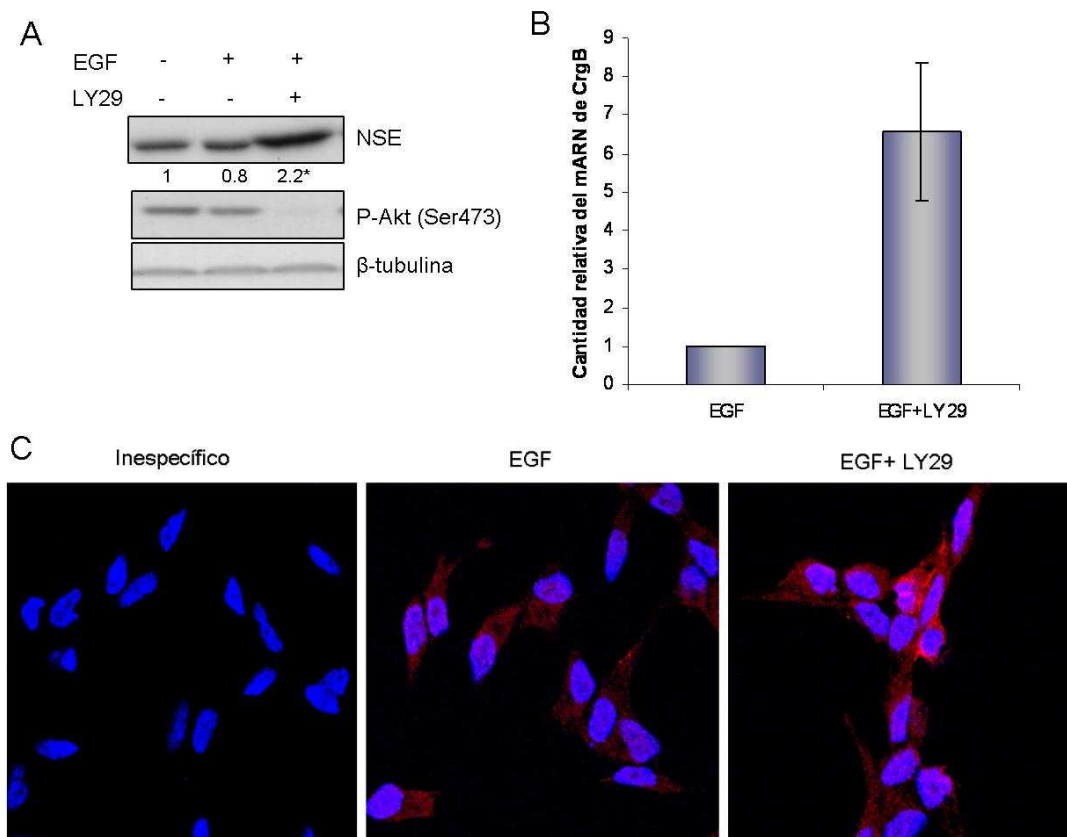


Figura 18: Efecto sobre la diferenciación NE del tratamiento con EGF, al inhibir PI3K/Akt. Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero (0%) durante 24hs. Se trataron con o sin EGF ($10^{-8}M$) en presencia o ausencia de LY29 ($20\mu M$). Transcurridas 24hs, **A**) los extractos celulares se analizaron por *western blot* con anticuerpos contra: NSE, P-Akt (Ser473) y β -tubulina. (* $p < 0,1$ versus EGF). **B**) Se aisló el ARN para su posterior análisis por PCR en tiempo real. El gráfico se corresponde al cociente de CrgB con respecto a su control 18S ($Ct \pm DS$) obtenido de 3 experimentos independientes. **C**) Se fijaron las células, se permeabilizaron y se incubaron con el anticuerpo contra CrgA y un secundario marcado. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. En A y C se muestra un experimento representativo de tres independientes.

A su vez, observamos en la Figura 18C, un aumento de la fluorescencia en células marcadas con cromogranina A (CrgA). Todos ellos marcadores de diferenciación neuroendocrina (NE). Como control de la eficacia del LY29 inhibiendo PI3K, analizamos la fosforilación de Akt en la Ser473.

En conjunto estos datos preliminares indican, que en la línea de cáncer de próstata sensible a andrógenos LNCaP, el EGF impide la muerte celular provocada por la inhibición de la vía PI3K/Akt, induciendo diferenciación NE.

A partir de estos resultados, nos planteamos estudiar los mecanismos moleculares puestos en juego por el EGF al inhibir PI3K/Akt y que son responsables de la supervivencia y de la adquisición del fenotipo NE en las células LNCaP.

2. CAMBIOS EN LOS RECEPTORES EGFR Y ERBB2 EN EL TRATAMIENTO COMBINADO DE EGF Y LY29, EN LÍNEAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA

2.1 Niveles y actividad de EGFR y ErbB2

El EGF induce la activación de EGFR que forma dímeros con ErbB2, el cual tiene un claro papel oncogénico, mediando los efectos del EGF. Por ello, decidimos estudiar los posibles cambios en dichos receptores; en concreto, los niveles proteicos de EGFR y ErbB2, su grado de fosforilación y la activación de vías de señalización. Como se observa en la Figura 19A, el tratamiento con EGF disminuyó un 90% los niveles de EGFR, sin afectar drásticamente los niveles de ErbB2. El descenso de EGFR es esperable y puede ser debido a la degradación inducida por el ligando, mecanismo al

que es resistente ErbB2⁽⁴⁴⁾. Sin embargo, el tratamiento con EGF más LY29, aumentó significativamente (* $p < 0,1$) los niveles de EGFR con respecto al tratamiento con EGF, pero sobre todo, incrementó drásticamente los niveles de ErbB2; en concreto, fueron tres veces superiores (***) $p < 0,001$) a los niveles controles y a los detectados en presencia de EGF. El tratamiento con LY29 no modificó significativamente (ns $p > 0,5$) los niveles de EGFR ni de ErbB2. Seguidamente analizamos, si el aumento de ErbB2 inducido por el EGF más LY29 iba acompañado de una mayor activación del receptor. Analizamos la fosforilación de EGFR, ErbB2 y la actividad de MAPK/Erk una de las vías de señalización activadas por EGF. Como se observa en la Figura 19B, el tratamiento con EGF más LY29 aumentó la fosforilación de los residuos Tyr1068 de EGFR y Tyr1248 de ErbB2 (residuos de autofosforilación) y la fosforilación del residuo Tyr877 de ErbB2 (fosforilado por Src). Se observó también, un aumento en la fosforilación de los residuos de Erk1/2 (P-44/42) indicadores de activación.

A su vez, quisimos verificar si el aumento de ErbB2 requiere de la activación de EGFR. Para ello utilizamos un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de EGFR el ZD1839 (Iressa®). En la Figura 19C observamos que, el ZD1839 disminuye los niveles de ErbB2 observados en el tratamiento de EGF más LY29, lo que indica que el incremento de ErbB2 detectado tras el tratamiento con EGF más LY29, requiere de la actividad tirosina quinasa de EGFR.

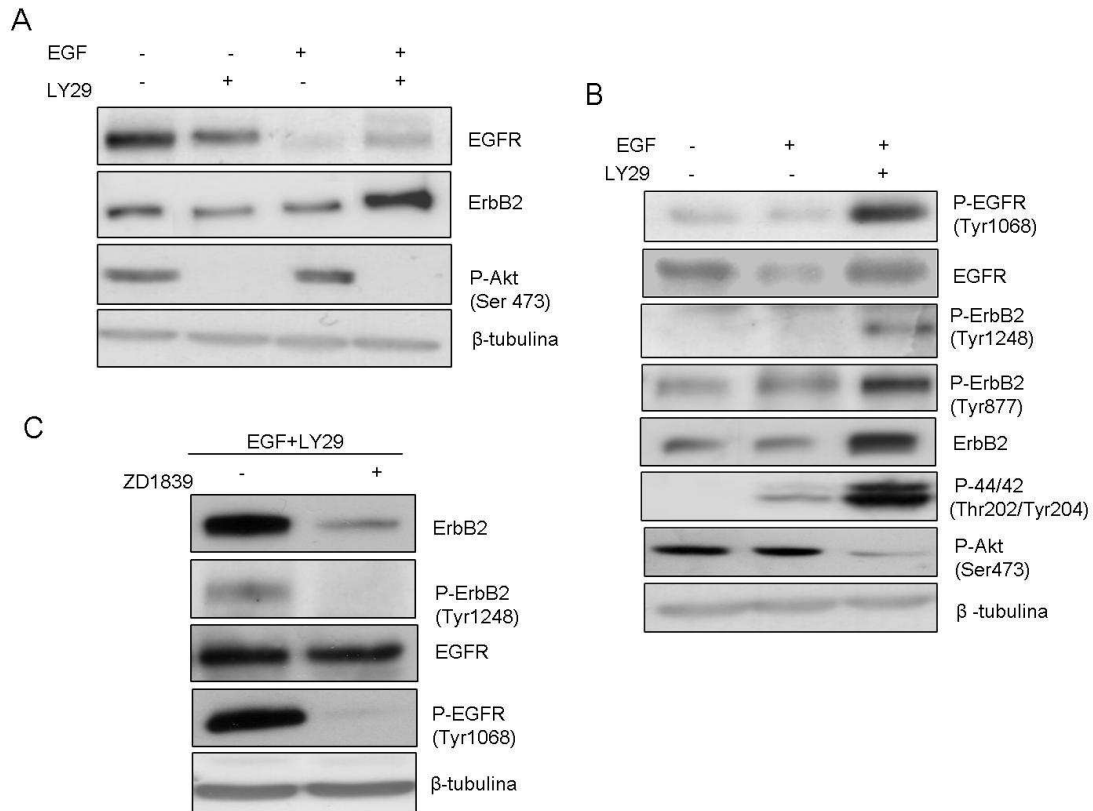


Figura 19: Efecto sobre EGFR y ErbB2 del tratamiento con EGF y LY29. Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs. Se trataron con o sin EGF (10^{-8} M) en presencia o ausencia de LY29 (20 μ M) (**A y B**) o con EGF+LY29 tanto en ausencia como en presencia del ZD1839 (5 μ M) (**C**). A las 24hs, se aislaron los extractos celulares y se analizaron, por *western blot*, los niveles de EGFR y ErbB2, la fosforilación de EGFR en el residuo Tyr1068, la fosforilación de ErbB2 en los residuos Tyr1248 y Tyr877I, la fosforilación de P-44/42 en los residuos Thr202/Tyr204, P-Akt en el residuo Ser473 y β-tubulina. Se muestran un experimento representativo de cuatro independientes.

Para analizar si el aumento de ErbB2 y la activación de MAPK/Erk eran dependientes de la dosis de LY29 y del tiempo de incubación, realizamos en primer lugar, una curva dosis/efecto con concentraciones crecientes de LY29 presencia de EGF. Observamos en la Figura 20, que el aumento de los niveles de ErbB2 es dependiente de la dosis de LY29 aumentando

hasta 4,6 veces con 20 μM de LY29. Este aumento se corresponde a la disminución de la fosforilación de Akt en el residuo Ser473. Conforme disminuye la fosforilación de Akt aumentan los niveles de ErbB2. El aumento en la fosforilación de Erk1/2 se observa a la dosis de 10 μM siendo mayor a la dosis de 20 μM , coincidiendo con el máximo aumento de ErbB2.

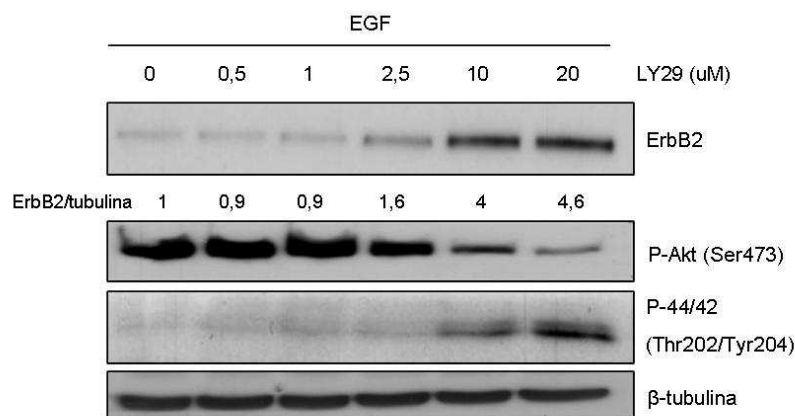


Figura 20: Efecto sobre los niveles de ErbB2 y la fosforilación de Erk1/2 a distintas dosis de LY29 en presencia de EGF: Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs. Se trataron con EGF (10^{-8}M) en presencia de LY29 a distintas dosis (0,5- 1- 2,5- 10- 20 μM). A las 24hs, se aislaron los extractos celulares se analizaron, por *western blot*, los niveles de ErbB2, la fosforilación de P-44/42 en los residuos Thr202/Tyr204, P-Akt en el residuo Ser473 y β -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Para analizar el efecto del tiempo de tratamiento sobre los niveles de ErbB2 se realizó una cinética de tiempos, con la dosis de 20 μM de LY29. Se observa en la Figura 21, que el tratamiento combinado de EGF y LY29 aumenta los niveles de ErbB2 a las 18 horas, alcanzando un pico máximo entre las 24 y 48 horas que se mantiene constante hasta las 96 horas.

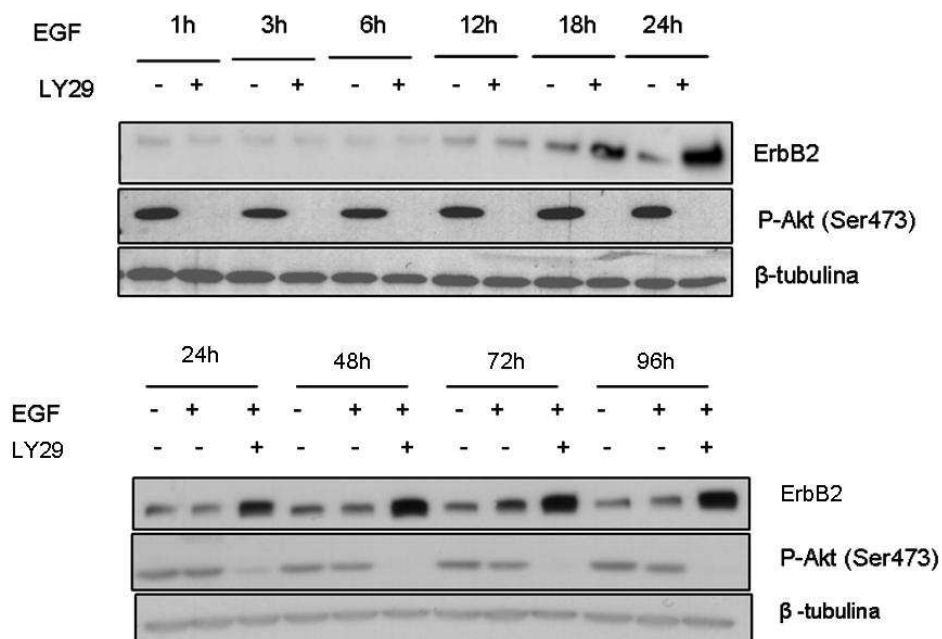


Figura 21: Cinética de los niveles de ErbB2 inducido por el EGF, al tratar con LY29: Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs. Se trataron con o sin EGF (10^{-8} M) en presencia o ausencia de LY29 ($20 \mu\text{M}$) durante los tiempos citados. El tratamiento con EGF+ LY29 se recordó cada 24hs. Los extractos celulares se aislaron en cada tiempo y se analizaron por *western blot* los niveles de ErbB2, P-Akt (Ser473) y β -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

La estimulación de Erk fue también dependiente del tiempo de incubación. Como podemos observar en la Figura 22, el tratamiento combinado de EGF y LY29 aumentó la fosforilación de Erk1/2 aproximadamente a las 12 horas y se mantuvo en forma sostenida hasta las 24 horas. Estos resultados indican que el aumento de los niveles de ErbB2 observados tras el tratamiento de EGF más LY29 es dependiente de la dosis del LY29 y del tiempo de incubación. Además y en concordancia con el aumento de ErbB2, aumenta la actividad de la vía MAPK/Erk.

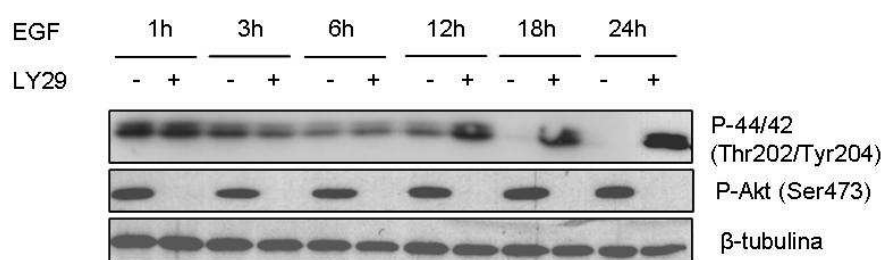
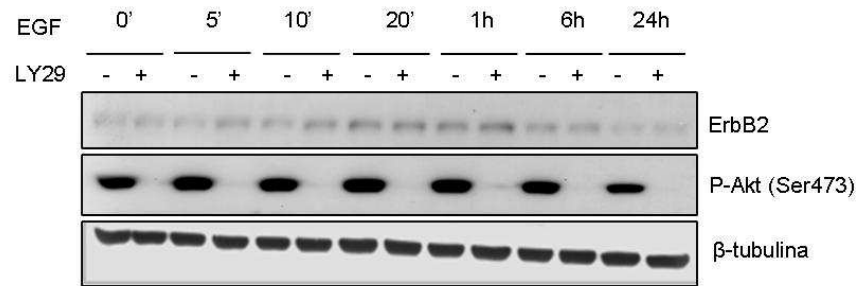


Figura 22: Cinética de la fosforilación de Erk1/2 inducido por el EGF, al tratar con

LY29: Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs. Se trataron con o sin EGF (10^{-8} M) en presencia o ausencia de LY29 (20 μ M) durante los tiempos citados. Se aislaron los extractos celulares se analizaron por *western blot* la fosforilación de P-44/42 (Thr202/Tyr204), P-Akt (Ser473) y β -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Seguidamente, verificamos si este efecto del EGF en presencia de LY29 sobre los niveles ErbB2, era específico de las células LNCaP o si ocurría también en otras líneas celulares de cáncer de próstata como las líneas independientes de andrógenos PC3 (sin PTEN) y DU145 (con PTEN). Para ello, tratamos las células con EGF en ausencia y en presencia de LY29 a distintos tiempos y se analizó por *western blot* los niveles de ErbB2. Observamos que tanto en la línea PC3 como en la línea DU145 (Figura 23), los niveles de ErbB2 fueron similares tanto en las células tratadas con EGF o EGF más LY29. Por lo que es evidente que el tratamiento combinado de EGF más LY29 no aumentó los niveles de ErbB2 en estas líneas celulares siendo este proceso específico de las células LNCaP.

Línea celular PC3



Línea celular DU145

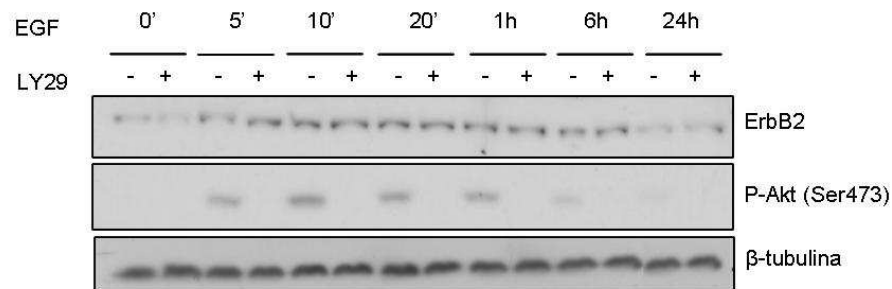


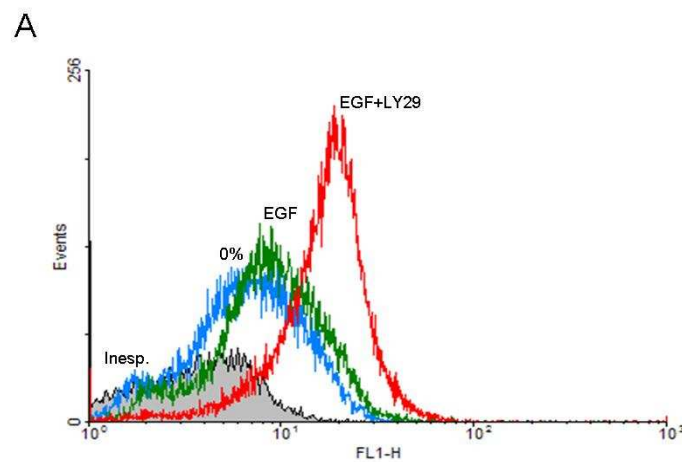
Figura 23: Efecto de los niveles de ErbB2 en las líneas celulares PC3 y DU145 inducido por el EGF, al tratar con LY29: Se cultivaron las células PC3 y DU145 (300.000 células por placa) en RPMI con 10% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs. Se trataron con EGF ($10^{-8}M$) en ausencia o presencia de LY29 (20 μM) durante los tiempos citados. Se aislaron los extractos celulares se analizaron por *western blot* los niveles de ErbB2, P-Akt (Ser473) y β-tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

2.2 Localización y dimerización de ErbB2 en las células LNCaP

ErbB2 se localiza en la membrana celular en donde forma homo o heterodímeros e induce activación de vías de señalización. Por lo tanto, para ampliar el estudio de la funcionalidad de ErbB2, en nuestras condiciones

experimentales, analizamos si el aumento de ErbB2 se corresponde con una mayor presencia de este receptor en la membrana celular. Para ello, se marcó el receptor ErbB2 presente en la membrana celular con el anticuerpo Trastuzumab que reconoce la porción extracelular de ErbB2 y se analizó por citometría de flujo. Como se observa en la Figura 24A, en el tratamiento combinado de EGF más LY29 (curva roja), la mediana de fluorescencia detectada aumentó significativamente en comparación a la detectada en presencia de EGF (curva verde) o en condiciones basales (células sin SFB, curva azul), lo que indicaría un aumento de ErbB2 en la membrana celular.

Con el fin de confirmar estos datos se analizó la localización subcelular de ErbB2 mediante inmunofluorescencia (Figura 24B), marcando ErbB2 como explicamos anteriormente, pero en este caso permeabilizamos las células para que el Trastuzumab penetre en todos los compartimentos celulares. Observamos en la primera columna de la Figura 24B, que en el tratamiento con EGF, la fluorescencia se distribuyó uniformemente por toda la célula, mientras que la presencia del LY29, hace que ésta se localice preferentemente en la membrana celular (tercera columna de la Figura 24B).



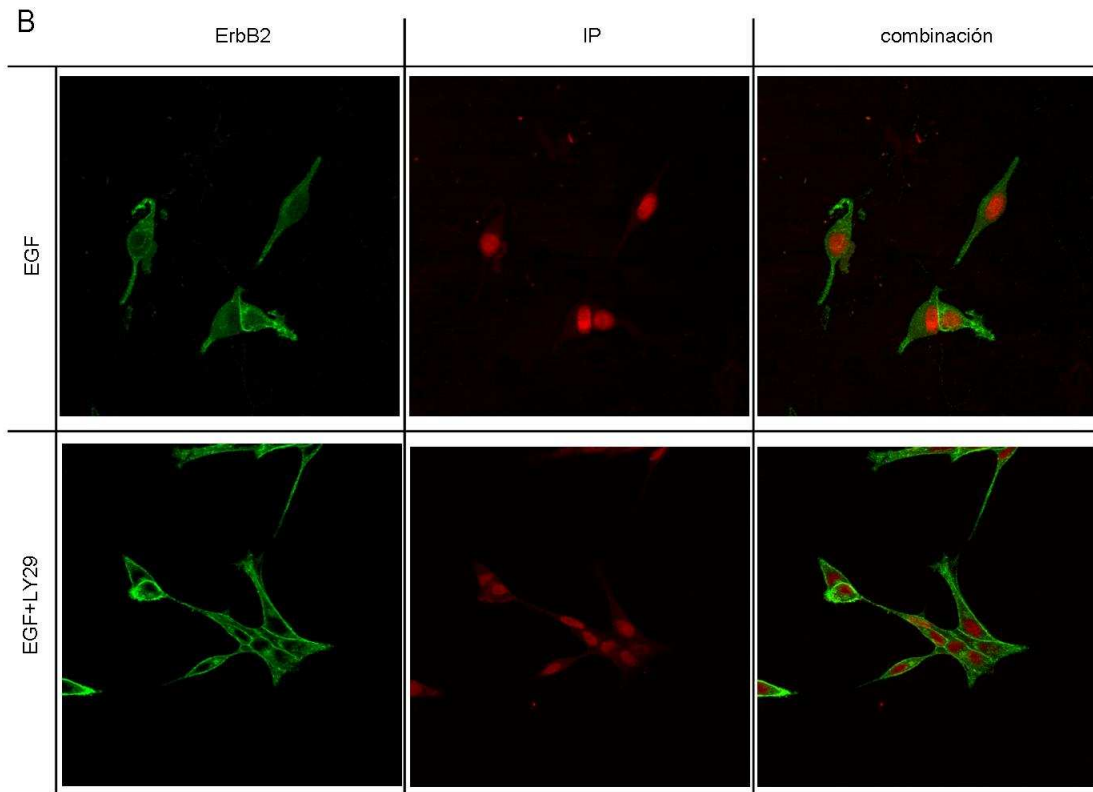


Figura 24: Efecto sobre la localización subcelular de ErbB2 inducida por el EGF, al tratar con LY29. Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero (0%) durante 24hs. Se dividieron en tres lotes: células sin tratar (curva azul), EGF (10^{-8} M) (curva verde), EGF+LY29 (20 μ M) (curva roja) durante 24hs. **A)** se levantaron las células, se incubaron con el Trastuzumab y un anticuerpo secundario anti-humano. **B)** Se fijaron las células, se permeabilizaron y se incubaron con el mismo anticuerpo que anteriormente. Para visualizar el núcleo, se tiñó con Ioduro de Propidio (IP). Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Una vez demostrado que, el EGF más LY29, aumentaba los niveles y la fosforilación de ErbB2, favoreciendo además, su localización en la membrana celular decidimos comprobar, si como era esperable, la formación de heterodímeros ErbB2-EGFR estaba aumentada. Para analizar la interacción entre ErbB2 y EGFR se inmunoprecipitó ErbB2 y se analizó la presencia de EGFR en el inmunoprecipitado. Como se muestra

en la Figura 25, la inmunoprecipitación de ErbB2, en células tratadas con EGF más LY29, arrastró una mayor cantidad de EGFR que la observada en células controles o tratadas con EGF, lo que indicó que, en estas condiciones, había una mayor formación de heterodímeros EGFR-ErbB2.

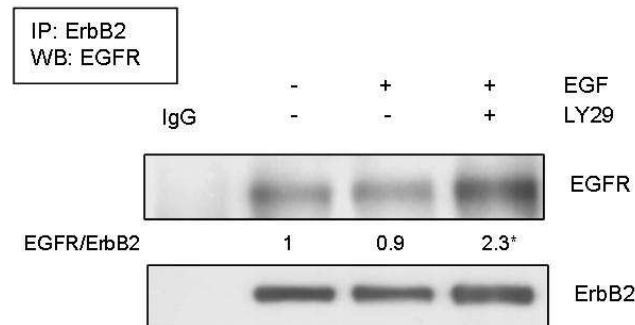


Figura 25: Efecto del EGF al tratar con LY29, sobre la formación de heterodímeros

ErbB2-EGFR: Se cultivaron células LNCaP (1.500.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs. Se trataron con EGF (10^{-8} M) en presencia o ausencia de LY29 (20 μ M). A las 24hs, se obtuvieron los extractos celulares de los cuales se inmunoprecipitó con un anticuerpo contra ErbB2. Se analizó por *western blot* la presencia de EGFR y ErbB2. Se muestra un experimento representativo de tres independientes. (* $p < 0,1$ versus EGF).

Estos resultados en conjunto indican que, el tratamiento de las células LNCaP con EGF más LY29 aumenta significativamente los niveles de ErbB2, su localización en la membrana plasmática y su capacidad de formar heterodímeros con EGFR, lo que podría contribuir a la activación sostenida de la vía de señalización MAPK/Erk. Este efecto es dependiente de la dosis de LY29 y se mantiene en el tiempo siendo específico de las células LNCaP ya que no se observa en las líneas prostáticas PC3 ni en las DU145 que son independientes de andrógenos.

3. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL AUMENTO DE ERBB2 EN LAS LNCAP, TRAS EL TRATAMIENTO CON EGF Y LY29

A continuación nos planteamos estudiar el significado biológico del aumento de ErbB2 que observamos en nuestras condiciones experimentales. El tratamiento de las células LNCaP con LY29 provoca muerte celular, proceso que es revertido en presencia del EGF que induce además, en estas condiciones, diferenciación neuroendocrina. Por lo tanto, decidimos analizar si estos efectos eran mediados por el incremento de ErbB2.

3.1 Importancia del aumento de ErbB2 en el proceso de diferenciación neuroendocrina

Estudiamos si el aumento de la expresión de ErbB2 y la diferenciación NE observada, al tratar las células LNCaP con EGF más LY29, eran procesos directamente relacionados. Para ello tras silenciar la expresión de ErbB2, en células tratadas con EGF más LY29, mediante interferencia por ARN se estudiaron los cambios producidos en los marcadores de diferenciación NE: NSE, CrgB y CrgA. Como se observa en la Figura 26A, la interferencia por ARN disminuyó los niveles de ErbB2 completamente y provocó un descenso del 40% de la proteína NSE. De la misma manera observamos en la Figura 26B, que el ARN mensajero de CrgB disminuyó significativamente un 33% (** $p < 0,01$ según el test de Wilcoxon). A su vez, el silenciamiento de ErbB2 disminuyó la fluorescencia de las células marcadas con CrgA (Figura 26C).

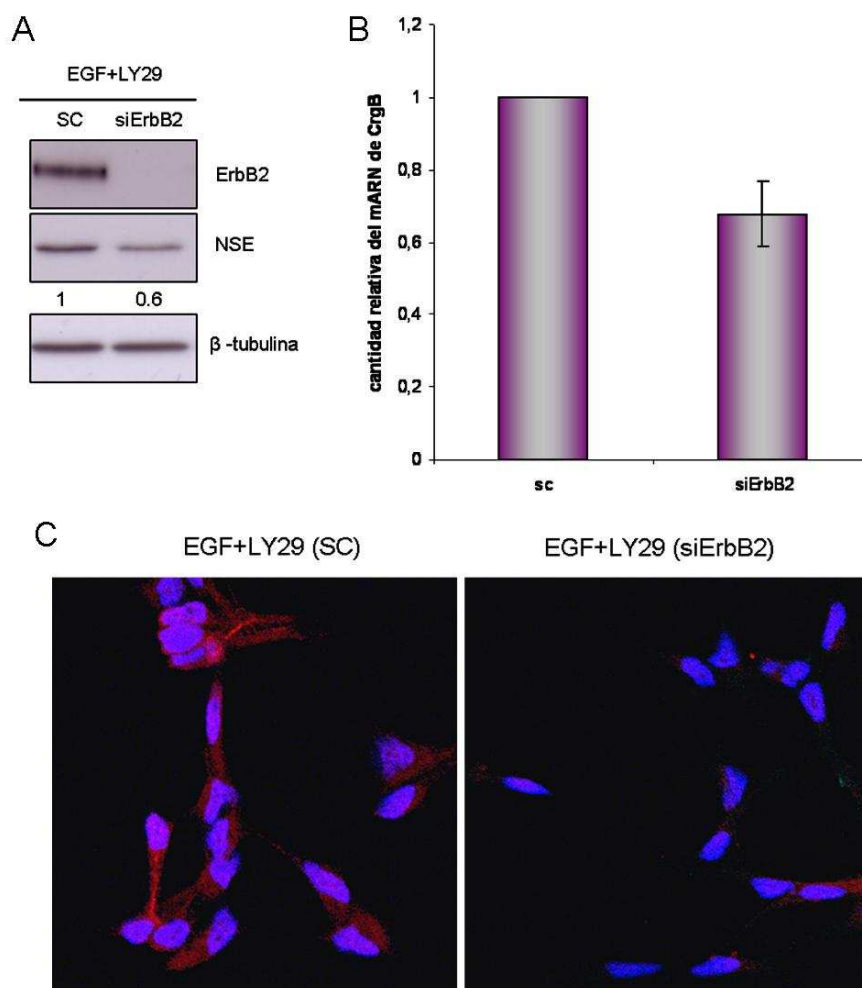


Figura 26: Efecto del silenciamiento de ErbB2 en los marcadores de diferenciación

NE. Se cultivaron células LNCaP (150.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs, se transfectaron con un siARN control (SC) y siARN para el gen ErbB2 (siErbB2). A las 24hs de transfección se reemplazó el medio completo por medio sin suero. Transcurridas 24hs, se trataron con EGF (10^{-8} M)+LY29 (20 μ M). Transcurridas 24hs: **A**) Se aislaron los extractos celulares se analizaron por *western blot* los niveles de NSE, ErbB2 y β -tubulina. **B**) Se aisló el ARN para su posterior análisis por PCR en tiempo real. El gráfico se corresponde al cociente de CrgB con respecto a su control 18S (Ct \pm DS) obtenido de 3 experimentos independientes. **C**) Se fijaron las células, se permeabilizaron y se incubaron con un anticuerpo contra CrgA y un secundario marcado. Los núcleos se tiñeron con DAPI. En A y C se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Nos planteamos que el aumento de ErbB2 podía ser un marcador de diferenciación neuroendocrina. Por ello decidimos tratar a las células con inductores de diferenciación como son la forskolina (Fsk) y la interleuquina 6 (IL-6) y analizar la expresión de ErbB2, comparando con el tratamiento con EGF y con EGF más LY29. Como se observa en la Figura 27, todos los tratamientos que inducen diferenciación NE aumentan los niveles de ErbB2, siendo el más potente el tratamiento con EGF+LY29 (4,6 veces), seguido de la Fsk (3,2 veces) y la IL-6 (1,9 veces).

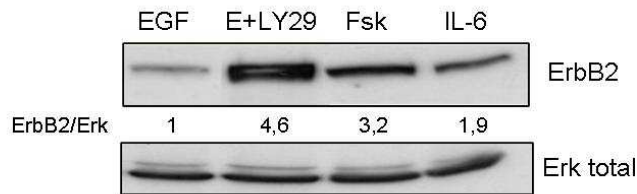


Figura 27: Expresión de ErbB2 con tratamientos inductores de diferenciación NE.

Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs. Se trataron con EGF (10^{-8} M), EGF+LY29 (20 μ M), Fsk (10 μ M), IL-6 (100 U/ml). A las 72hs, se aislaron los extractos celulares y se analizaron, por *western blot*, los niveles de ErbB2 y Erk total. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Estos datos indican que el EGF en presencia del LY29 está induciendo, en las células LNCaP, el fenotipo neuroendocrino mediante el aumento sostenido de los niveles de ErbB2. El aumento de este receptor es provocado por otros tratamientos inductores de diferenciación neuroendocrina lo que le convierte en un potencial indicador de este proceso.

3.2 Importancia del aumento de ErbB2 en la supervivencia celular

Estudiamos si el aumento de ErbB2 era directamente responsable de la supervivencia celular observada al tratar las células LNCaP con LY29 en presencia de EGF. Para ello se silenció la expresión de ErbB2 como en el apartado anterior y se estudió la muerte celular. Como se muestra en la Figura 28, el silenciamiento de ErbB2 no modificó ni la población subG0/G1, ni la población TMRM negativas en ninguno de los tratamientos analizados. Estos resultados parecen indicar que el aumento de los niveles de ErbB2, no están implicados en la supervivencia celular inducida por el EGF en presencia de LY29.

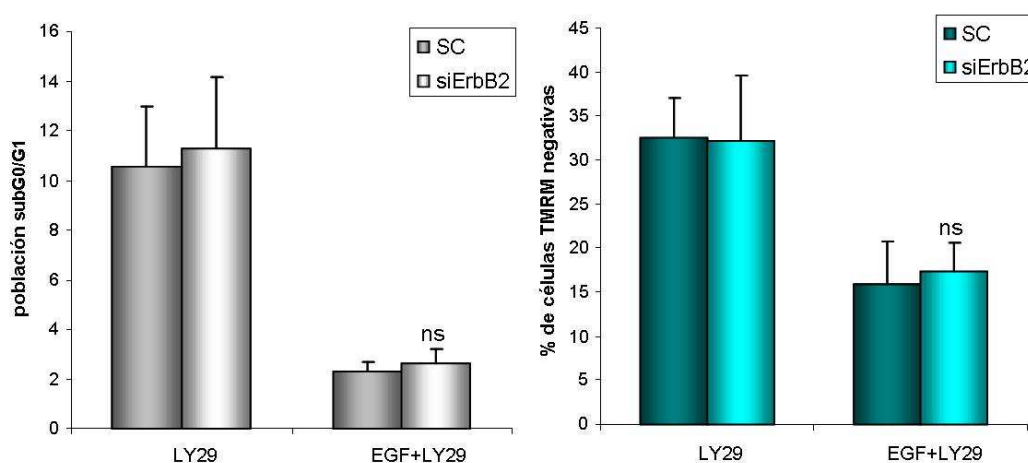


Figura 28: Efecto del silenciamiento de ErbB2 en la supervivencia celular. Se cultivaron células LNCaP (150.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs, se transfectaron con siARN control (SC) y con siARN para el gen ErbB2 (siErbB2). A las 24hs de la transfección, se reemplazó el medio completo por medio sin suero. A las 24hs, se trataron con EGF (10^{-8} M)+LY (20 μ M). A las 24hs, Se analizó la muerte celular por citometría de flujo tanto con la técnica de ciclo celular (representando la población subG0/G1) como con la sonda TMRM. Se muestra la media \pm ESM de tres experimentos independientes (ns $p > 0,5$ versus SC)

4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE MEDIAN EL AUMENTO DE ERBB2 INDUCIDO POR EL EGF EN PRESENCIA DE LY29

Nuestros resultados indican que el aumento de ErbB2 guarda relación directa con la adquisición de un fenotipo NE. Dada la importancia de este proceso en la progresión del cáncer de próstata y su potencial implicación en la independencia androgénica decidimos diseccionar la vía PI3K/Akt para estudiar que elementos de esta vía eran responsables del aumento de este receptor. El LY29 es un inhibidor de la vía PI3K/Akt ampliamente utilizado, ya que al actuar sobre PI3K afecta a la quinasa Akt que es su principal efector. Por lo que comenzamos estudiando si Akt estaba implicada en el aumento de ErbB2 inducido por EGF más LY29 en las células LNCaP.

4.1 Implicación de Akt

Comenzamos estudiando la implicación de las isoformas de Akt (Akt1 y Akt2) presentes en las LNCaP. Para ello, silenciamos cada una de las isoformas mediante interferencia por ARN (siAkt) en presencia de EGF. Como se puede observar en la Figura 29, el silenciamiento de las dos isoformas fue eficaz, disminuyendo drásticamente sus niveles en comparación con el control. Sin embargo, no se observó un aumento de ErbB2 con la inhibición de ninguna de las isoformas. Al contrario, observamos que el tratamiento con EGF disminuyó un 50% los niveles de ErbB2 al silenciar Akt1 y un 70% al silenciar conjuntamente las dos isoformas de Akt (Akt1+2), sin observarse cambios significativos al silenciar la isoforma Akt2.

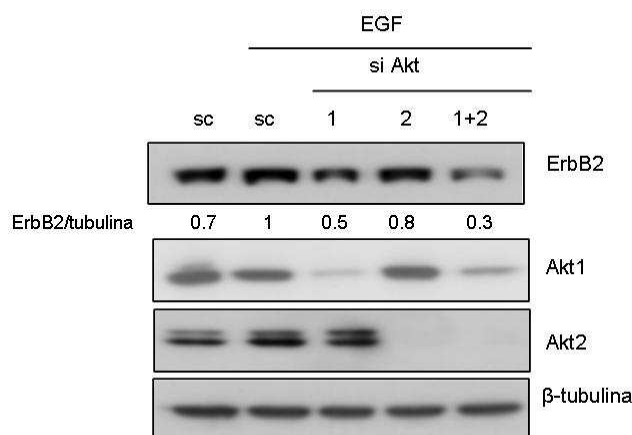


Figura 29: Efecto del EGF al silenciar las isoformas de Akt sobre los niveles de ErbB2. Se transfectaron células LNCaP con un siARN control (SC) o un siARN para las isoformas Akt1 y Akt2. A las 48 horas, se trataron con EGF (10^{-6} M). A las 24hs, se aislaron los extractos celulares se analizaron, por *western blot*, los niveles de ErbB2, Akt1, Akt2 y β -tubulina. Se representa un experimento de cuatro independientes.

Estos datos demuestran que el aumento de ErbB2 observado en el tratamiento con EGF+LY29, no parece depender de Akt. Pensamos entonces que el aumento de ErbB2, podría deberse solamente al bloqueo de PI3K.

4.2 Implicación de PI3K

Para estudiar la implicación de PI3K sobre los niveles de ErbB2 silenciamos la expresión de la subunidad catalítica (p110) de PI3K mediante interferencia por ARN. En las LNCaP, de las tres isoformas de PI3K que componen la clase IA solo la p110 α se regula por receptores tirosina quinasa, mientras que la p110 β y p110 δ se encuentran constitutivamente activas ⁽¹³¹⁾. Por ello elegimos para nuestro estudio, silenciar la subunidad catalítica p110 α (PI3K). Así se transfectaron células

LNCaP con un siARN contra p110 α (PI3K) en presencia de EGF. Como control del silenciamiento se muestra en la Figura 30A, que disminuyó el ARN mensajero de la p110 α (PI3K) que se reflejó en una menor fosforilación de Akt en sus residuos treonina 308 y serina 473 (Figura 30B). Sin embargo, en estas condiciones no se observó un aumento de ErbB2 sino que, por el contrario, sus niveles disminuyeron drásticamente (Figura 30B).

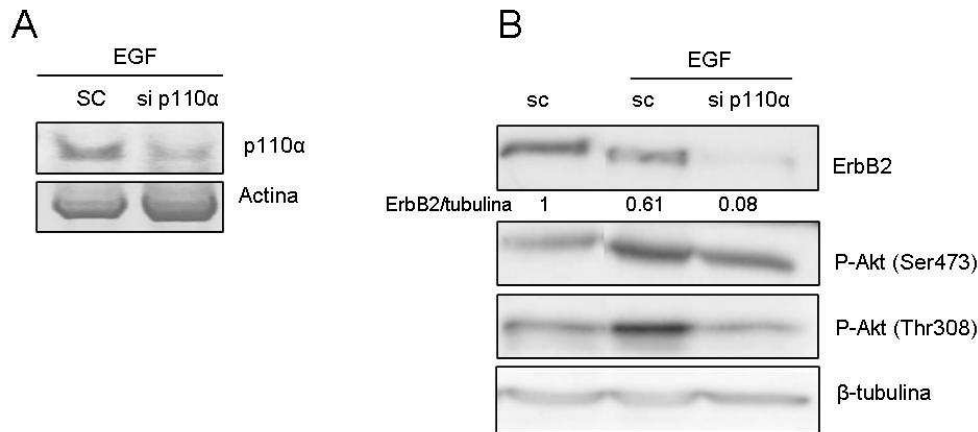


Figura 30: Efecto del EGF al silenciar la subunidad de p110 α (PI3K) sobre los niveles de ErbB2. Se transfectaron células LNCaP con un siARN control (SC) o un siARN contra p110 α (PI3K). A las 48 horas, se trataron con EGF (10⁻⁸M). A las 24hs, **A)** Se extrajo el ARN y se analizó por RT-PCR cualitativa el ARN mensajero de p110 α . **B)** Se aislaron los extractos celulares y se analizaron, por *western blot*, los niveles de ErbB2, P-Akt (Ser473) y P-Akt (Thr308) y β -tubulina. Se representa un experimento de cuatro independientes.

Todo parecía indicar que el aumento de ErbB2 en el tratamiento con EGF más LY29 era independiente de PI3K. Lo sorprendente de este resultado nos hizo pensar que el LY29, al afectar a todas las isoformas de PI3K, fuera más eficaz que la anulación únicamente de la isoforma p110 α (PI3K), por lo que utilizamos otro inhibidor de PI3K como es la wortmanina (W) y se comparó su efecto con el LY29. Observamos en la Figura 31, que los

niveles de ErbB2 aumentaron al tratar las células con EGF más LY29 pero disminuyeron significativamente (** $p < 0,01$) en presencia de EGF más W, de forma similar a lo obtenido cuando silenciamos la isoforma p110 α (PI3K) y las isoformas de Akt. El descenso observado fue de aproximadamente un 70 % frente al tratamiento con EGF. Además, en el tratamiento conjunto de EGF+ LY29 + W vuelven a aumentar los niveles de ErbB2 comparable con el tratamiento de EGF más LY29. Lo que confirma que el aumento de ErbB2 requiere de la presencia conjunta de EGF y LY29.

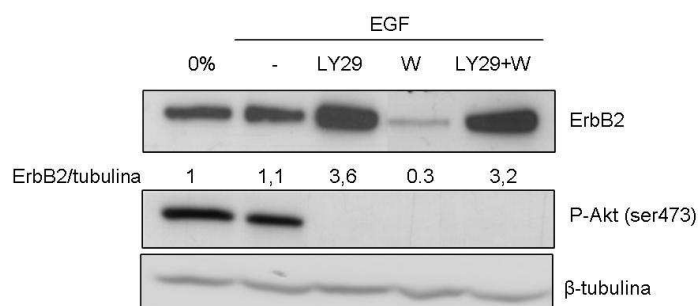


Figura 31: Efecto del EGF en presencia de wortmanina sobre los niveles de ErbB2. Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs. Se trataron con o sin EGF ($10^{-8}M$), EGF+LY29 ($20 \mu M$), EGF+ wortmanina ($100 nM$) y EGF+LY29+W. La dosis de wortmanina se recordó cada 8hs para mantener la inhibición. A las 24hs, se aislaron los extractos celulares se analizaron, por *western blot*, los niveles de ErbB2, P-Akt (Ser473) y β -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

El efecto contrario de la wortmanina o del silenciamiento de p110 α (PI3K) sugería que el LY29 actúa de manera independiente de PI3K y que podía ser una acción directa de este compuesto. Para confirmar esta posibilidad utilizamos el LY303511 (LY30), que es una molécula con la estructura química del LY29, a la que se le sustituyó un átomo de O_2 y no inhibe a la PI3K (a concentraciones de $100 \mu M$)⁽¹³²⁾. Como se observa en la Figura 32,

el LY30 no aumentó (ns $p > 0,5$) los niveles de ErbB2 con respecto al EGF, en comparación con el LY29.

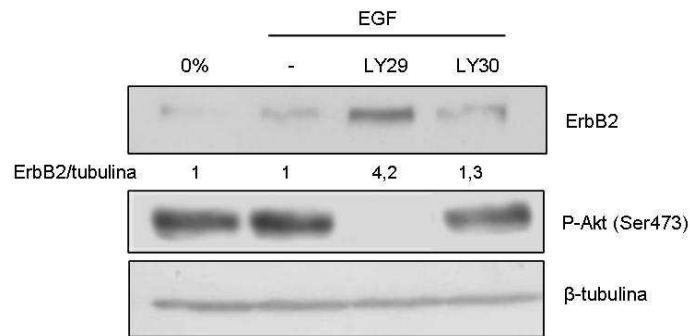


Figura 32: Efecto del EGF al inhibir con LY30, sobre los niveles de ErbB2. Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero (0%) durante 24hs. Se trataron en ausencia y presencia de EGF (10^{-8} M), EGF+LY29 (20 μ M) y EGF+LY30 (20 μ M). A las 24hs, se aislaron los extractos celulares y se analizaron, por *western blot*, los niveles de ErbB2, P-Akt (Ser473) y β -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

En conjunto este grupo de resultados indican que, si bien el LY29, la wortmanina y el silenciamiento tanto de Akt como de PI3K, inhiben la vía de la PI3K/Akt, únicamente el LY29 en presencia de EGF aumenta los niveles de ErbB2. Por lo tanto es evidente, que el tratamiento de las células LNCaP con EGF más LY29 regula específicamente otras vías de señalización que controlan los niveles de ErbB2.

4.3 Implicación de otras dianas del LY29

Está demostrado que el LY29 además de inhibir PI3K también inhibe a la caseína quinasa 2 (CK2) y a mTOR⁽¹³³⁻¹³⁴⁾. Por lo tanto quisimos estudiar si el aumento de ErbB2, producido por el tratamiento de EGF más LY29, estaba mediado por alguna de estas quinasas. Para ello utilizamos el TBB inhibidor de CK2 y la rapamicina inhibidor de mTOR. Como puede verse en

la Figura 33 A y B, que el tratamiento con cada uno de estos inhibidores, en presencia de EGF, no incrementó los niveles de ErbB2. En concreto el tratamiento con TBB los disminuyó y el tratamiento con rapamicina no los modificó a ninguna de las dosis utilizadas.

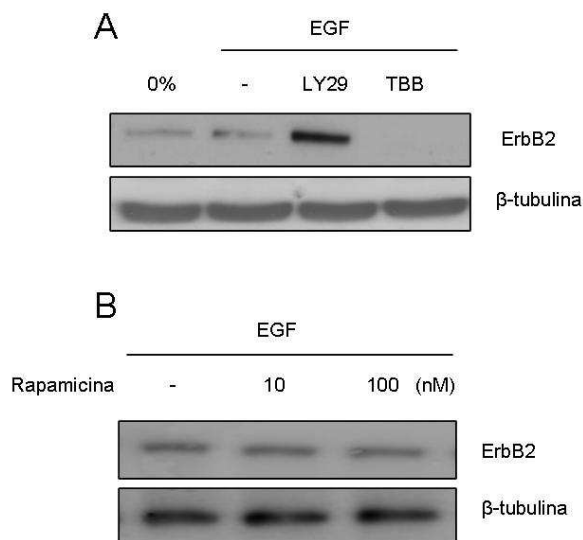


Figura 33: Efecto del EGF al inhibir con TBB y rapamicina sobre los niveles de ErbB2. Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs. **A)** se trataron con EGF (10^{-8} M), EGF+ LY29 (20 μ M) y EGF+ TBB (2,5 μ M). **B)** Se trataron con EGF (10^{-8} M)+ rapamicina (0, 10 y 10nM). A las 24hs, se aislaron los extractos celulares y se analizaron, por *western blot*, los niveles de ErbB2 y β -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

En conjunto todos estos resultados indican que el aumento de ErbB2 en el tratamiento combinado de EGF y LY29 es independiente de la vía de PI3K/Akt, CK2 y mTOR. Son necesarios más estudios para averiguar que vía o vías de señalización moduladas por LY29, son las responsables del aumento de ErbB2.

5. MECANISMOS IMPLICADOS EN EL AUMENTO DE ERBB2 EN EL TRATAMIENTO DE EGF EN PRESENCIA DE LY29

Los mecanismos responsables del aumento de los niveles de una proteína pueden ser: la disminución de su degradación y/o el aumento de su síntesis. La suma de ambos procesos o la exacerbación de uno de ellos, estaría produciendo el aumento de ErbB2. Por lo que seguidamente, nos planteamos analizar, cual de estos procesos celulares estaba alterado en el tratamiento con EGF más LY29 y era responsable del incremento de ErbB2.

5.1 Endocitosis y degradación de ErbB2

En primer lugar analizamos si el tratamiento de las células LNCaP con EGF más LY29 modificaba la degradación de ErbB2. Para ello, tratamos las células con EGF solo o en combinación con LY29 y a las 18 horas tiempo en el cual se visualiza el aumento de ErbB2 (ver Figura 21), bloqueamos el proceso de traducción con cicloheximida (CHX) a distintos tiempos (Gráfico 1). Esto nos permitió evaluar la estabilidad de la proteína ErbB2 formada, ya que en estas condiciones solo está activa la degradación y no la síntesis del receptor. Analizamos niveles de ErbB2 por *western blot* y calculamos el tiempo de vida media de esta proteína.

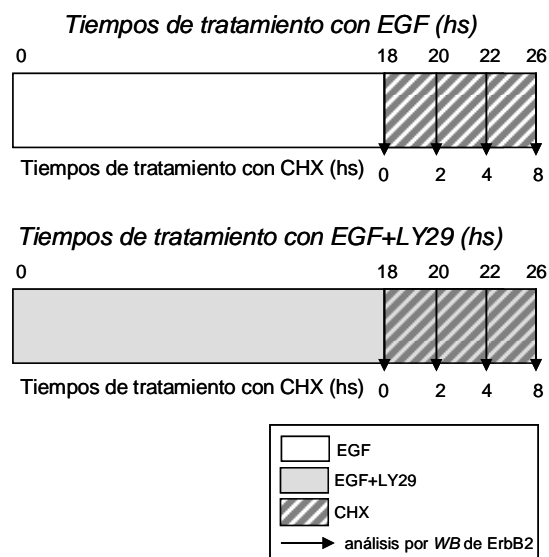


Gráfico 1: Esquema del tratamiento con CHX. Transcurridas 24hs de privación con medio RPMI sin FBS, se trataron las células con EGF (10^{-8} M) en presencia o ausencia de LY29 ($20 \mu\text{M}$). Transcurridas 18hs, se comenzó el tratamiento con Cicloheximida (CHX) ($100 \mu\text{g/ml}$) a distintos tiempos (0, 2, 4 y 8 horas). Los extractos celulares se procesaron para analizarlos por *western blot*.

Como se observa en la Figura 34A, los niveles de ErbB2 disminuyeron a medida que aumentamos el tiempo de incubación con CHX, tanto en el tratamiento con EGF como en el tratamiento combinado de EGF más LY29. Si comparamos los perfiles de degradación en ambos casos (Figura 34B), se puede apreciar que la caída de los niveles de ErbB2 en el tratamiento con EGF más LY29 fue similar al tratamiento con EGF. En otras palabras, podemos decir que la velocidad de degradación de ErbB2 no se ve afectada ya que el tiempo de vida media fue similar en ambos tratamientos, situándose alrededor de 6hs.

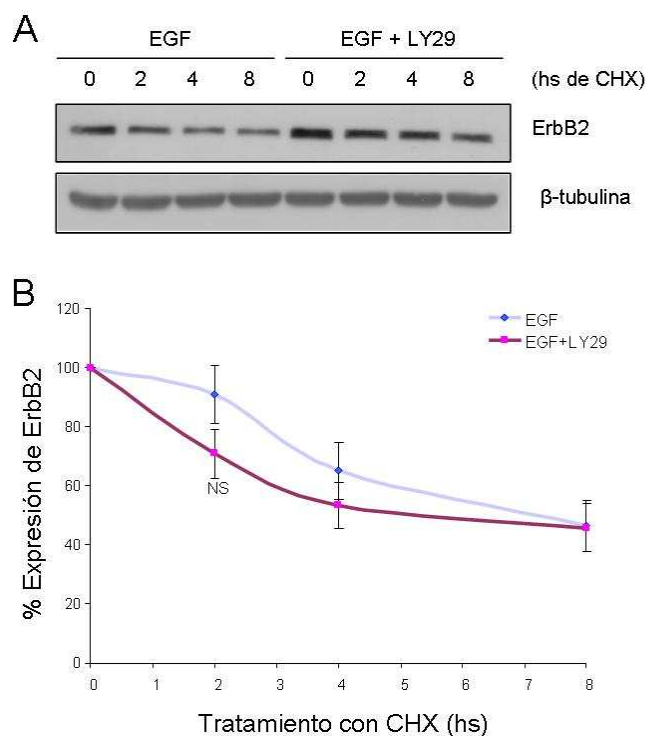


Figura 34: Cinética de degradación de ErbB2 en el tratamiento de EGF más LY29.

Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs y se trataron según el Gráfico 1. **A)** Se analizaron por *western blot* los niveles de ErbB2 y β -tubulina. Se muestra un experimento representativo de seis independientes. **B)** se muestran la media \pm ESM del análisis densitométrico de seis experimentos independientes, consideramos el tiempo 0 (CHX) como el 100% para cada tratamiento (cantidad de ErbB2 a las 18 horas de tratamiento). NS $p > 0,5$

En el apartado 2.2 hemos indicado que el tratamiento de las células LNCaP con EGF más LY29 aumenta la localización de ErbB2 en la membrana celular. La chaperona encargada de la estabilización y localización en la membrana de ErbB2 es Hsp90. Por ello nos planteamos estudiar si, bajo el estímulo del EGF en presencia de LY29, aumentaba la unión de ErbB2 con Hsp90. Para ello se inmunoprecipitó Hsp90, utilizando un anticuerpo específico y se analizó por *western blot*, la presencia de

ErbB2. Observamos en la Figura 35 A, que el tratamiento combinado de EGF y LY29 aumentó significativamente (** $p < 0,01$) 1,9 veces, la unión de ErbB2 a Hsp90 respecto a las condiciones basales (0%) o al tratamiento con EGF. Los niveles de Hsp90 no se modificaron con ninguno de los tratamientos utilizados (Figura 35 B).

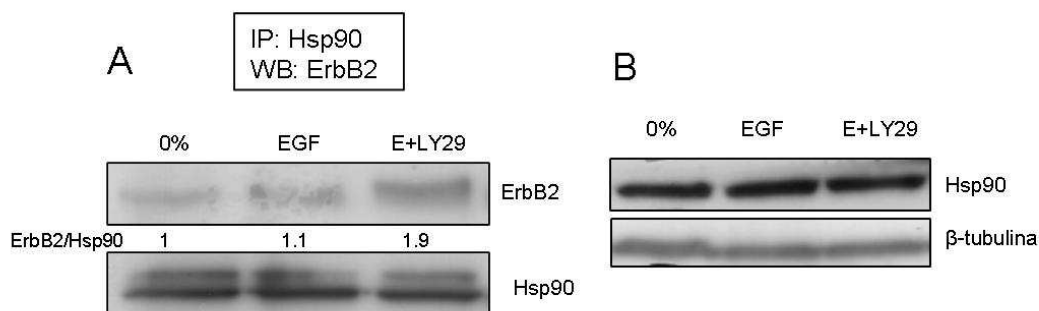


Figura 35: Interacción de ErbB2 con Hsp90. Se cultivaron células LNCaP (1.500.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero (0%) durante 24hs. Se trataron con o sin EGF (10^{-8} M) en presencia o ausencia de LY29 (20 μ M). A las 24hs, se obtuvieron los extractos celulares de los cuales: **A**) Se inmunoprecipitó Hsp90 con un anticuerpo específico. Se analizó por *western blot* la presencia de ErbB2 y Hsp90. **B**) Se analizaron los niveles de Hsp90 por *western blot* con anticuerpos contra Hsp90 y β -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Seguidamente quisimos estudiar si la actividad de Hsp90 estaba implicada en el aumento de ErbB2, inducido por el tratamiento con EGF más LY29. Para ello se utilizó geldanamicina (GD), un inhibidor específico de la actividad de esta chaperona y estudiamos tanto los niveles de ErbB2, como su localización subcelular. Como se muestra en la Figura 36 A, la GD disminuyó un 85% los niveles de ErbB2 observados en el tratamiento de EGF más LY29. Sin embargo, en el tratamiento con EGF la disminución de ErbB2 por GD fue solo de un 30%.

Posteriormente analizamos, mediante microscopía confocal, si la GD alteraba también la localización subcelular de ErbB2. Observamos en la

Figura 36 B, que en el tratamiento con EGF+LY29+GD la fluorescencia se localiza en el citosol, en contraste con lo que ocurre en el tratamiento con EGF+LY29 donde la fluorescencia se localiza en la membrana celular. En cambio, el tratamiento con EGF+GD, no modificó la fluorescencia con respecto al tratamiento con EGF que siguió siendo preferentemente citoplasmática.

La presencia de GD revierte el efecto de EGF más LY29 sobre la localización celular de ErbB2, impidiendo que se localice en la membrana celular. Estos resultados parecían indicar que el tratamiento con EGF más LY29 favorecía la unión de ErbB2 con Hsp90, lo que explica la localización de ErbB2 en la membrana celular y el aumento de la sensibilidad de ErbB2 a geldanamicina. Para confirmar la implicación de Hsp90 en los efectos del EGF más LY29 analizamos la sensibilidad a GD de otras proteínas clientes de esta chaperona como C-RAF y Akt. Para ello tratamos las células con EGF y EGF más LY29 en ausencia y en presencia de GD, analizando los niveles de C-RAF y Akt así como la fosforilación de Erk1/2.

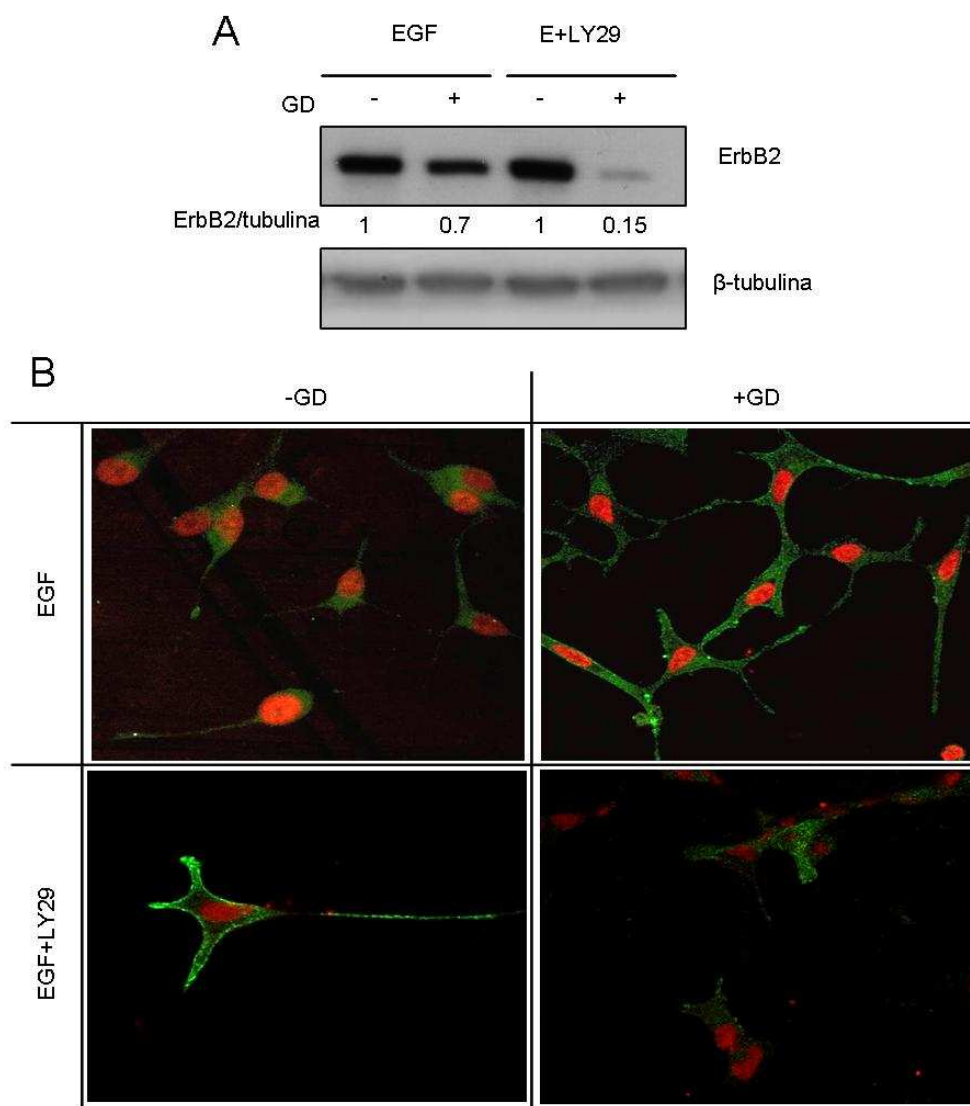


Figura 36: Efecto de la geldanamicina sobre los niveles y la localización de ErbB2.

Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs. Se trataron con EGF (10^{-8} M) y EGF+LY29 (20 μ M) en ausencia y en presencia de GD (250 nM). A las 24hs: **A)** Se aislaron los extractos celulares y se analizaron, por *Western blot*, los niveles de ErbB2 y β -tubulina. **B)** Se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron las células con el Trastuzumab y un anticuerpo secundario anti-humano. El núcleo celular, se tiñó con Ioduro de Propidio. Se muestran un experimento representativo de tres independientes.

Observamos en la Figura 37, que la disminución de los niveles de C-RAF y Akt, provocada por la GD fue mayor en presencia de EGF más LY29 que la detectada en presencia de EGF. La disminución de C-RAF afecta a la actividad de P-44/42, sin modificar los niveles de Erk total. Por lo tanto, aunque el tratamiento con EGF más LY29 no modifica los niveles de C-RAF y Akt sí aumenta su sensibilidad a la GD. Sugiriendo nuevamente que Hsp90 está implicado en los efectos del EGF más LY29.

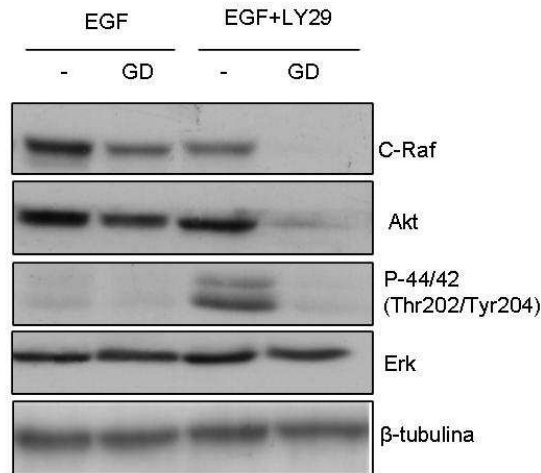


Figura 37: Efecto de GD sobre los niveles de C-RAF, AKT y la activación ERK. Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero durante 24hs. Se trataron con EGF (10^{-8} M) y EGF (10^{-8} M) + LY29 (20 μ M) en ausencia y en presencia de GD (250 nM). A las 24hs, se aislaron los extractos celulares se analizaron, por *western blot*, con anticuerpos contra C-RAF, Akt, P-44/42 (Thr202/Tyr204), Erk y β -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

Seguidamente comprobamos si Hsp90 estaba implicada en la estabilización de ErbB2. Para ello, se trataron las células con EGF+LY29 durante 18 horas y se trataron con CHX en ausencia y presencia de GD, durante distintos tiempos (ver Gráfico 2). Observamos en la Figura 38 B, que la GD provoca una disminución significativa en el tiempo de vida media de ErbB2 (~2 horas) comparado con su control (~6 horas).

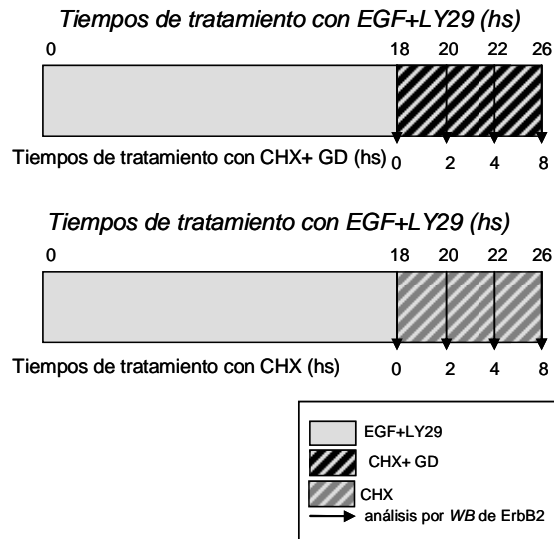


Gráfico 2: Esquema del tratamiento con CHX y GD. Transcurridas 24hs de privación con medio RPMI sin FBS, se trataron las células con EGF (10^{-8} M) en presencia de LY29 (20μ M). A las 18horas se comenzó el tratamiento con cicloheximida (CHX) (100μ g/ml) en ausencia y en presencia de geldanamicina (GD) (250 nM) a distintos tiempos (0, 1, 2, 4 y 8 horas). Los extractos celulares se analizaron por *western blot*.

El conjunto de estos resultados implican directamente a Hsp90 en el aumento de los niveles de ErbB2 que observamos en nuestras condiciones experimentales. Hasta aquí podemos decir que en el tratamiento con EGF más LY29 aumenta la unión de ErbB2 con Hsp90. La unión a esta chaperona incrementaría la localización de este receptor en la superficie celular, aumentando su estabilidad y evitando su internalización. Aunque el tratamiento de EGF más LY29 no modifica la velocidad de degradación ErbB2, nosotros pensamos que se altera su disponibilidad para ser degradado a través de su interacción con Hsp90.

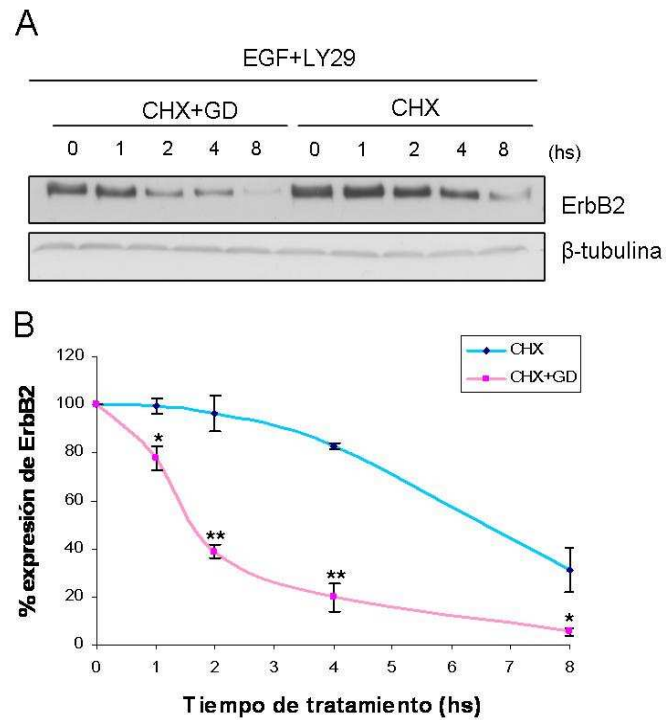


Figura 38: Efecto de GD sobre la estabilidad de ErbB2 en el tratamiento de EGF más LY29. Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero. A las 24hs se realizaron los tratamientos como se indica en el Gráfico 2. **A)** Se analizaron por *western blot* los niveles de ErbB2 y β -tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes. **B)** Se muestra la media \pm ESM del análisis densitométrico de tres experimentos independientes, consideramos el tiempo 0 (CHX) como el 100% para cada tratamiento (cantidad de ErbB2 a las 18horas de tratamiento). * $p < 0,1$ y ** $p < 0,01$.

5.2. Síntesis de ErbB2

Otro de los procesos celulares responsables del aumento de los niveles de ErbB2, en nuestras condiciones experimentales podía ser una mayor transcripción del gen para este receptor. Así nos planteamos, analizar los niveles de ARN mensajero de ErbB2 al tratar las células con EGF más

LY29. Para ello llevamos a cabo ensayos de RT-PCR cualitativa, observando que el tratamiento de EGF+LY29, aumentó el ARN mensajero de ErbB2 (Figura 39 A). Estos datos se confirmaron mediante PCR en tiempo real donde también se observó un incremento significativo de este ARN mensajero de aproximadamente 4,8 veces respecto al tratamiento con EGF (** $p < 0,01$ según el test de Wilcoxon) (Figura 39 B).

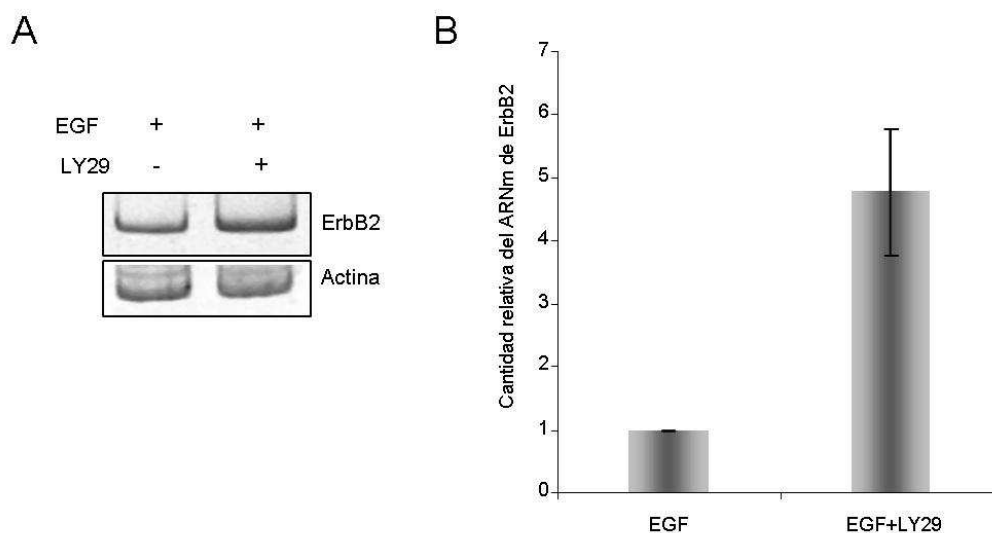


Figura 39: Efecto del EGF más LY29, sobre el ARN mensajero de ErbB2. Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero (0%). A las 24hs se trataron con EGF (10^{-8} M) en presencia o ausencia de LY29 (20 μ M). A las 24hs, se aisló el ARN para su posterior análisis por: **A)** RT-PCR cualitativa. Se muestra un experimento de tres independientes. **B)** PCR en tiempo real, el gráfico se corresponde al cociente de ErbB2 con su control 18S ($Ct \pm DS$) de 3 experimentos independientes.

Por lo tanto, el aumento de los niveles de la proteína ErbB2 inducido por el tratamiento de EGF en presencia de LY29 puede deberse, al menos en parte, al incremento de los niveles del ARN mensajero para este receptor.

El paso siguiente fue estudiar que mecanismos moleculares podían estar aumentando los niveles del ARN mensajero de ErbB2 en nuestras condiciones experimentales.

5.2.1 Implicación de Hsp90 en el aumento del ARN mensajero de ErbB2

La chaperona Hsp90, no solo estabiliza ErbB2 sino que también estabiliza múltiples proteínas entre las que se encuentran diversos factores de transcripción ⁽¹³⁵⁾. Dado que hemos observado que se produce una disminución de los niveles totales de ErbB2 al bloquear Hsp90 con geldanamicina (Figura 36 A), analizamos si esta chaperona podía estar regulando también la expresión del ARN mensajero de ErbB2. Para ello, tratamos a las células con EGF más LY29 en ausencia y en presencia de GD y analizamos por PCR en tiempo real el ARN mensajero de ErbB2. Como se observa en la Figura 40, la presencia de la GD disminuyó aproximadamente un 40% los niveles del ARN mensajero de ErbB2 inducidos por el EGF+LY29 (** $p < 0,01$ según el test de Wilcoxon).

Por lo tanto, el aumento de los niveles del ARN mensajero de ErbB2 inducido por el EGF más LY29 en las células LNCaP estaría mediado al menos en parte por Hsp90.

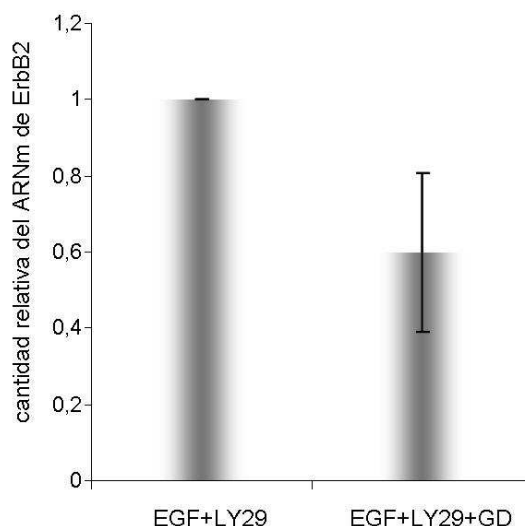


Figura 40: Efecto de GD sobre los niveles del ARN mensajero de ErbB2. Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero. A las 24hs se trataron con EGF (10^{-8} M) + LY29 (20 μ M) en ausencia y en presencia de GD (250 nM). A las 24hs, se aisló el ARN para su posterior análisis por PCR en tiempo real. El gráfico se corresponde al cociente de ErbB2 con su control 18S (Ct \pm DS) de 3 experimentos independientes.

5.2.2 Contribución de la vía MAPK/Erk al aumento del ARN mensajero de ErbB2

Previamente hemos mostrado que el tratamiento con EGF más LY29 induce, junto al aumento de ErbB2, una activación sostenida de la vía MAPK/Erk. Erk1/2 puede controlar la actividad de distintos factores de transcripción directamente o a través de MSK-1 ⁽¹³⁶⁾. Entonces nos planteamos, que la vía MAPK/Erk podía estar regulando los niveles de ErbB2 a nivel transcripcional. Para estudiar esta posibilidad, en primer lugar estudiamos los niveles de ErbB2 utilizando un inhibidor de MEK1/2 el

PD184161 (PD) y un inhibidor de MSK-1 el H89. Tratamos a las células con EGF y LY29 en presencia de distintas dosis de PD y en presencia de H89 y analizamos los niveles de ErbB2. Como se observa en la Figura 41 A, a medida que aumentó la dosis del PD, disminuyeron los niveles de ErbB2. Se puede observar que el PD fue efectivo e inhibió drásticamente la fosforilación de Erk1/2 el sustrato directo de MEK1/2. En la Figura 41B observamos que, en presencia del inhibidor H89 disminuyeron los niveles de ErbB2 en el tratamiento con EGF más LY29 sin cambios significativos en el tratamiento con EGF. Esto nos indica que la vía de las MAPK/Erk estaría modulando los niveles de ErbB2 a través de MSK-1.

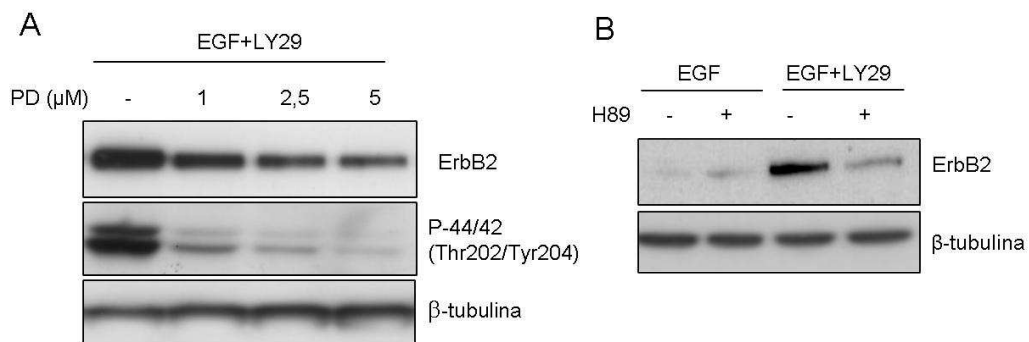


Figura 41: Efecto del PD y H89 sobre los niveles de ErbB2 en el tratamiento de EGF más LY29: Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero (0%). A las 24hs, se trataron con EGF (10⁻⁸M) + LY29 (20μM) **A**) en presencia de PD (1- 2,5 y 5 μM) y **B**) en presencia de H89 (10 μM). A las 24hs, se aislaron los extractos celulares y se analizaron, por *western blot*, con anticuerpos contra ErbB2, P-44/42 (Thr202/Tyr204) y β-tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres independientes.

En segundo lugar, estudiamos si la vía MAPK/ErK está modificando ErbB2 a nivel transcripcional. Para ello, estudiamos los niveles del ARN mensajero de ErbB2 en presencia de 5 μM de PD. En la Figura 42 podemos observar, que la presencia del PD, disminuyó aproximadamente

un 50% los niveles del ARN mensajero de ErbB2 en el tratamiento de EGF+LY29 (** $p < 0,01$ según el test de Wilcoxon).

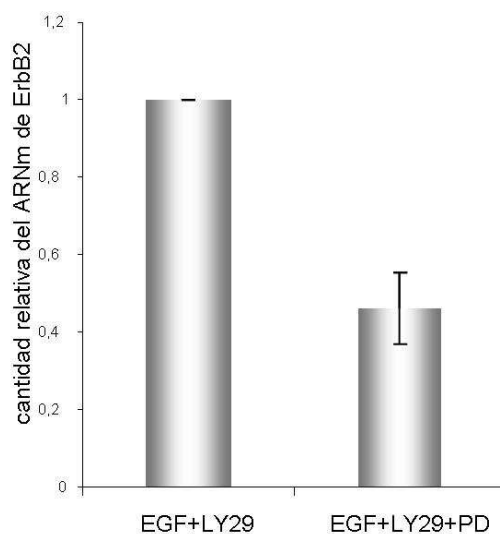


Figura 42: Efecto del PD sobre los niveles del ARN mensajero de ErbB2 en el tratamiento de EGF+LY29: Se cultivaron células LNCaP (300.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero (0%). A las 24hs se trataron con EGF (10^{-8} M) + LY29 (20 μ M) en ausencia y en presencia del PD (5 μ M). A las 24hs, se aisló el ARN para su posterior análisis por PCR en tiempo real. El gráfico se corresponde al cociente de ErbB2 con su control 18S (Ct \pm DS) de 3 experimentos independientes.

Estos resultados demuestran que la activación de la vía MAPK/Erk1/2 aumenta los niveles de ErbB2, por incremento del ARN mensajero y probablemente vía MSK-1.

Uno de los factores de transcripción regulados por Hsp90 y por Erk1/2 a través de las MSK-1 es NF κ B. El cual se ha descrito que controla la transcripción de ErbB2 ⁽⁶⁸⁾. Por lo tanto nos propusimos analizar la actividad transcripcional de NF κ B y si esta actividad está regulada por Hsp90 y Erk/MSK-1 en nuestras condiciones experimentales, midiendo la actividad de un promotor con elementos de respuesta a NF κ B. Para ello se transfectaron células LNCaP con el plásmido reportero de luciferasa con

elementos de respuesta a NFκB y un vector que contiene el gen de luciferasa del género *Renilla* (descritos en Materiales y Métodos). A las 48hs se trataron con EGF más LY29 o con TNF-α como control positivo de la activación de NFκB. Observamos en la Figura 43, que el tratamiento conjunto de EGF y LY29 aumentó aproximadamente 10 veces la actividad transcripcional de NFκB respecto a las condiciones basales, en los tratamientos por separado de EGF y LY29 no se observan cambios significativos. Como podemos observar la estimulación del EGF+LY29, fue similar a la provocada por el tratamiento con TNF-α.

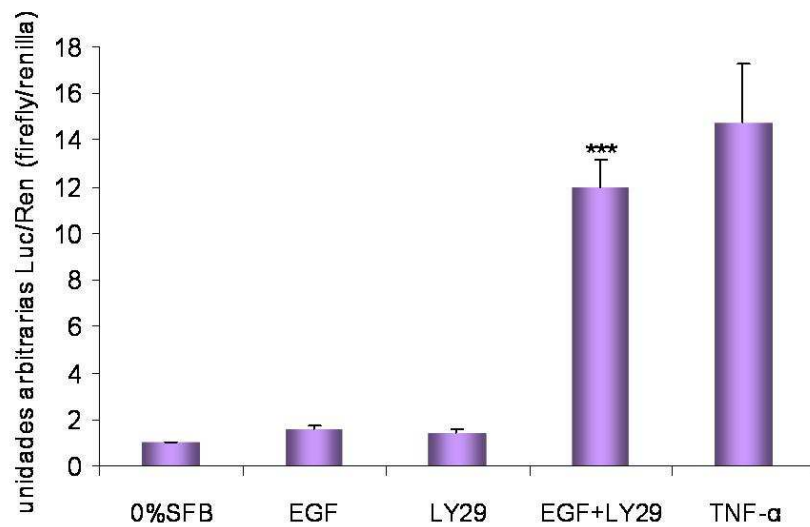


Figura 43: Actividad transcripcional de NFκB en el tratamiento combinado de EGF y LY29. Se cultivaron células LNCaP (200.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se transfectaron con el plásmido pGL3-3xNFκB-Tk-Luc y con el vector pRL-TK-*Renilla*. A las 24hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero (0%). A las 24hs se trataron con EGF (10⁻⁸M), EGF (10⁻⁸M) + LY29 (20 μM) y TNF-α (1 nM). A las 24hs, se analizó con el kit comercial Dual-Luciferase Reporter Assay System. Se representa el cociente Luc/Ren corregido con la concentración de proteínas. Se muestra la media ± ESM de tres experimentos independientes. *** p < 0,001 *versus* 0%SFB.

Una vez demostrado, el aumento de la actividad transcripcional de NFκB en nuestras condiciones experimentales, analizamos si Hsp90 y Erk/MSK1 controlaban la actividad transcripcional de NFκB. Para ello, analizamos la actividad del promotor con elementos de respuesta a NFκB, bajo el tratamiento de EGF más LY29 en combinación con los correspondientes inhibidores GD, PD y H89 (ver Gráfico 3).

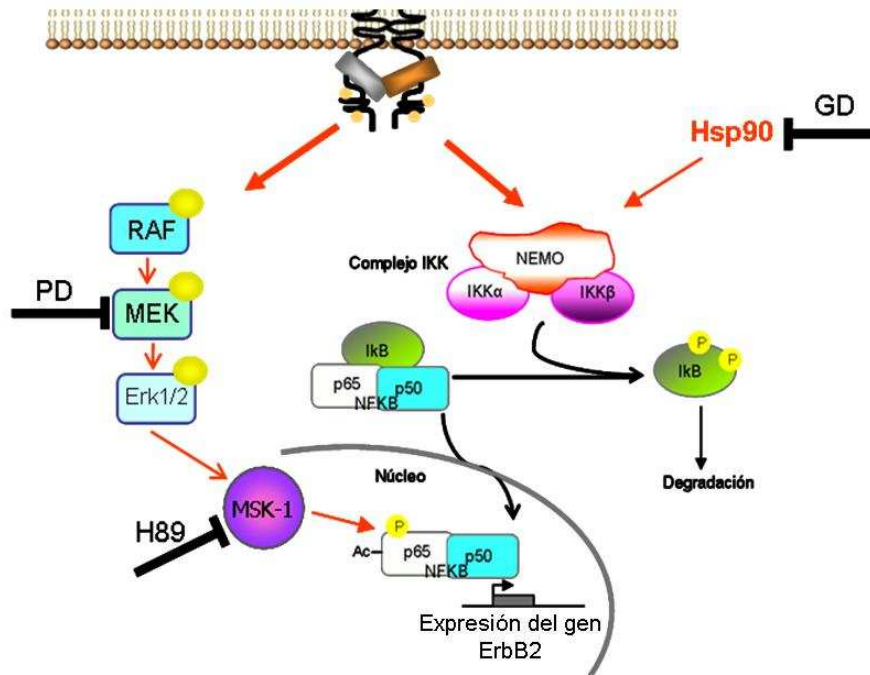


Gráfico 3: Esquema de las vías de señalización MAPK/Erk/MSK1 y NFκB junto con la localización de los inhibidores PD, H89 y GD.

Observamos en la Figura 44, que bajo el tratamiento de EGF más LY29, la presencia de PD o H89 disminuyó un 50% la actividad transcripcional de NFκB, siendo considerablemente superior la disminución con GD. Estos datos indican que la actividad transcripcional de NFκB en nuestras condiciones está controlada fundamentalmente por Hsp90 y en parte también por Erk/MSK-1. Dado que, Hsp90 y Erk1/2 están controlando tanto

el ARN mensajero como los niveles de ErbB2, es lógico pensar que estas proteínas podrían estar regulando la transcripción de ErbB2 a través de NFκB.

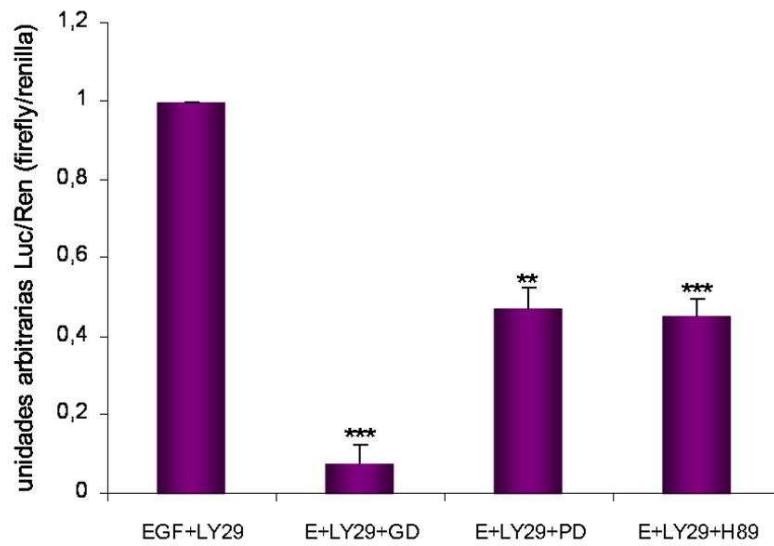


Figura 44: Efecto de GD, PD y H89 sobre la actividad transcripcional de NFκB en el tratamiento de EGF más LY29: Se cultivaron células LNCaP (200.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se transfectaron con el plásmido pGL3-3xNFκB-Tk-Luc y con el vector pRL-TK-Renilla. A las 24hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero. A las 24hs se trataron con EGF (10^{-8} M) + LY29 (20 μ M) en ausencia y presencia de GD (250 nM), PD (5 μ M) y H89 (10 μ M). A las 24hs, se analizó con el kit comercial Dual-Luciferase Reporter Assay System. Se representa el cociente Luc/Ren corregido con la concentración de proteínas. Se muestra la media \pm ESM de tres experimentos independientes. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ *versus* EGF+LY29.

6. IMPLICACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS LNCAP INDUCIDA POR EGF EN PRESENCIA DE LY29

Como se dijo al principio de este trabajo, el tratamiento con LY29 provoca muerte en las células LNCaP y la presencia de EGF rescata a las células de la muerte celular, induciendo supervivencia. En estas condiciones se produce un aumento considerable de los niveles de ErbB2, que no se observa cuando utilizamos otros inhibidores de la vía PI3K/Akt o al silenciar PI3K, lo que parece indicar que es un efecto específico del LY29 por mecanismos independientes de PI3K/Akt. Quisimos estudiar si la supervivencia en nuestras células realmente depende de la vía PI3K/Akt. Para ello nos planteamos verificar si la muerte celular que provoca el LY29 era debido a la inhibición de la PI3K/Akt utilizando otro inhibidor de esta ruta, la wortmanina y si el EGF revertía la muerte celular. Se trataron las células con LY29 y wortmanina, tanto en ausencia como en presencia de EGF y estudiamos la población subG0/G1 y las células TMRM negativas. Observamos en la Figura 45, que el tratamiento con wortmanina provocó un aumento significativo tanto de la población subG0/G1 como de las células TMRM negativas.

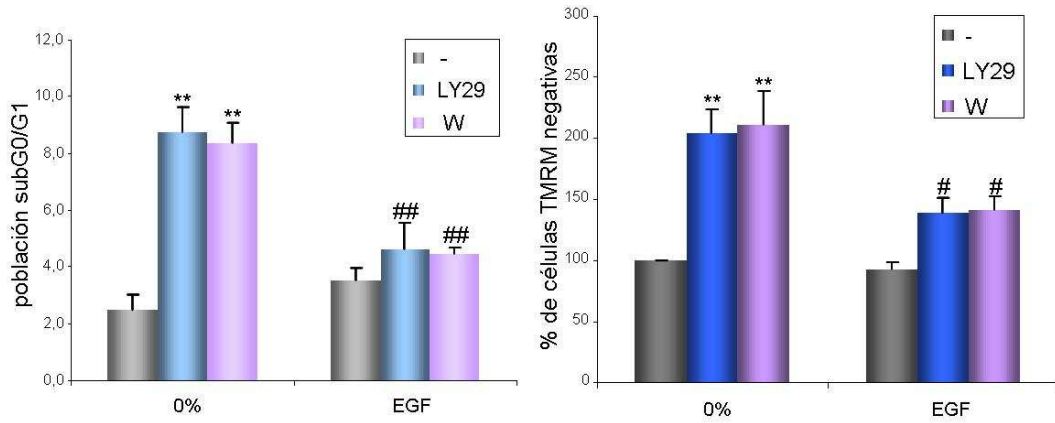


Figura 45: Efecto del tratamiento con W y LY29 sobre la supervivencia celular. Se cultivaron células LNCaP (150.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero (0%). A las 24hs se trataron con LY29 (20 μ M) y W (100 nM recordando la dosis cada 8hs) en ausencia como en presencia de EGF (10^{-8} M). A las 24hs, se analizó por citometría de flujo el ciclo celular (representando la población subG0/G1) y la sonda TMRM. Se muestra la media \pm ESM de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$ versus 0%; ## $p < 0,01$ y # $p < 0,1$ versus LY29 o W según corresponda.

Este efecto fue idéntico al LY29. Observamos además que la presencia de EGF disminuyó significativamente tanto la población subG0/G1 como las células TMRM negativas, en el tratamiento con wortmanina, de la misma forma que el LY29.

Seguidamente se comparó el efecto del LY30 con el del LY29, sobre la supervivencia celular. Para ello se trataron las células LNCaP con LY30 y LY29 tanto en ausencia como en presencia de EGF. Observamos en la Figura 46, que el tratamiento con LY30 no modificó la población subG0/G1 ni las células TMRM negativas tanto en ausencia como en presencia de EGF.

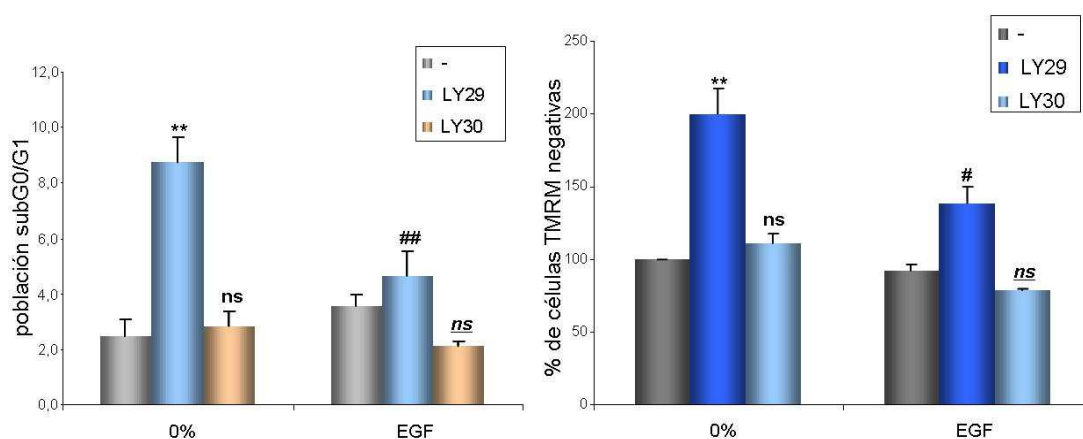


Figura 46: Efecto del tratamiento con LY30 y LY29 sobre la supervivencia celular.

Se cultivaron células LNCaP (150.000 células por placa) en RPMI con 7% de SFB. A las 48hs se reemplazó el medio completo por medio sin suero (0%). A las 24hs se trataron con LY29 (20 μ M) y LY30 (20 μ M) en ausencia como en presencia de EGF (10^{-8} M). A las 24hs, se analizó por citometría de flujo el ciclo celular (representando la población subG0/G1) y la sonda TMRM. Se muestra la media \pm ESM de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$ y $ns > 0,5$ *versus* 0%; ## $p < 0,01$ y # $p < 0,1$ *versus* LY29; $ns > 0,05$ *versus* LY30.

Para confirmar los resultados anteriores silenciamos la subunidad catalítica p110 α (PI3K). Para ello, transfectamos células LNCaP con un siARN contra p110 α (PI3K), tanto en ausencia como en presencia de EGF. Observamos en la Figura 47, que el silenciamiento de p110 α (PI3K) aumentó significativamente la población subG0/G1 y las células TMRM negativas. La presencia de EGF disminuyó la población subG0/G1 y las células TMRM negativas.

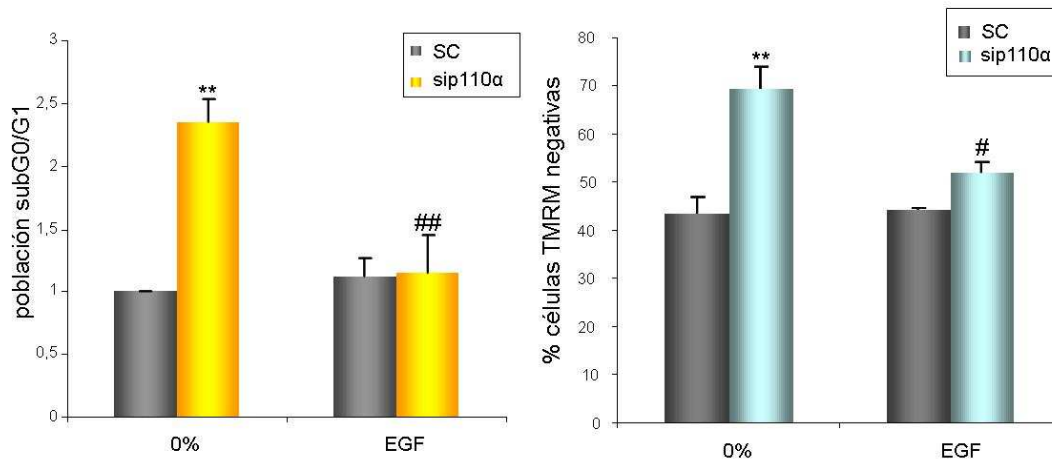


Figura 47: Efecto del silenciamiento de p110 α (PI3K) sobre la supervivencia celular. Se transfectaron células LNCaP con un siARN control (SC) o un siARN p110 α (PI3K). A las 48 horas, se trataron con EGF (10⁻⁸M). A las 24hs, se analizó por citometría de flujo el ciclo celular (representando la población subG0/G1) y la sonda TMRM. Se muestra la media \pm ESM de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$ versus 0%(SC); ### $p < 0,01$ y # $p < 0,1$ versus 0%(sip110 α).

Estos resultados indican que la vía PI3K/Akt es la responsable de la supervivencia en las células LNCaP y que la presencia de EGF activa otras vías de señalización que suplen la falta de PI3K e impide la muerte celular.

Discusión

María Alicia Cortés

El cáncer de próstata, en las primeras etapas, se caracteriza por su dependencia de los andrógenos. En esta fase, la terapia de elección es la ablación androgénica, con muy buenos resultados. Sin embargo, algunos pacientes unos años después, desarrollan cáncer de próstata metastático y en esta fase, el tumor no responde a andrógenos. Se desconocen los mecanismos responsables de la independencia androgénica y hasta el momento no existe una buena terapia que permita la cura del cáncer de próstata en esta etapa. Se postula que la ablación androgénica induciría la aparición de células con fenotipo neuroendocrino (NE), que pueden estimular el crecimiento de las células del tumor en ausencia de andrógenos. Estas células secretan una gran diversidad de neuropéptidos, hormonas y factores de crecimiento que pueden suplantar a los andrógenos y/o activar el receptor de andrógenos, en ausencia de ligando, e inducir proliferación celular. Nuestro trabajo fue enfocado a intentar dilucidar alguno de los mecanismos moleculares que producen la diferenciación neuroendocrina, uno de los grandes retos de la oncología prostática en nuestros tiempos.

Nuestro grupo previamente había demostrado que el EGF impide la diferenciación NE de las células LNCaP provocada por la eliminación de andrógenos ⁽³⁷⁾. Este efecto del EGF estaría modulado por la actividad de la vía PI3K/Akt. La activación constitutiva de esta vía de señalización por falta de PTEN, permite que el EGF estimule la proliferación de las células LNCaP, bloqueando el proceso de diferenciación NE. Por el contrario, en presencia de inhibidores de ésta vía como LY294002, el EGF induce supervivencia celular, permitiendo la diferenciación NE. Por lo tanto, era necesario comprender los mecanismos moleculares responsables de este cambio en los efectos del EGF, al inhibir la vía de la PI3K/Akt, ya que en estas condiciones, las células tumorales sobreviven y adquieren el fenotipo

NE, dos procesos de enorme trascendencia para la progresión tumoral prostática.

Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que el tratamiento conjunto de las células LNCaP con EGF y LY29, provoca un aumento de los niveles de ErbB2. Este receptor es responsable de la adquisición del fenotipo NE pero no de la supervivencia celular en estas condiciones. Este aumento de ErbB2 sería el resultado no solo de un aumento en su síntesis sino también de su permanencia en la membrana celular. Sorprendentemente, este aumento de ErbB2 es independiente de la vía PI3K/Akt y es el resultado de los efectos del LY29 en presencia de EGF sobre: Hsp90, Erk1/2 y/o probablemente NFκB.

El aumento de ErbB2 detectado requiere de la presencia conjunta de EGF y LY29, ya que ambos tratamientos por separado no modifican sus niveles. Además, este aumento depende de la activación de EGFR, debido a que el Iressa, un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de este receptor, no induce incremento de ErbB2.

En estas condiciones ErbB2 es funcional como demuestra su mayor grado de fosforilación, su localización en la membrana, la formación de heterodímeros y la activación de la vía MAPK/Erk con una cinética similar al aumento de ErbB2. Previamente, nuestro grupo de investigación había demostrado, que en las células LNCaP, el EGF activa la formación de heterodímeros e induce la fosforilación de EGFR y de ErbB2 así como la posterior activación de Erk1/2 ⁽³⁷⁾. Por lo tanto, un aumento continuado de ErbB2, unido a su mayor presencia en la membrana favorecería aun más la formación de estos heterodímeros, que al ser activados por el EGF, puede explicar, la permanencia de EGFR, la mayor fosforilación de ambos receptores y la activación sostenida de MAPK/Erk. La vía de las MAPK/Erk va a ser a su vez responsable de mantener elevados los niveles de ErbB2,

aumentando el ARN mensajero y provocando de esta manera un circuito de retroalimentación positiva en la activación de las MAPK/Erk.

Sin embargo, existe una aparente contradicción en nuestros resultados. Nuestro grupo de investigación publicó recientemente, que el EGF impedía el proceso de diferenciación neuroendocrina por activación de la vía MAPK/Erk de forma transitoria sin requerir la presencia de ErbB2 ⁽³⁷⁾ y en esta tesis demostramos que el proceso de diferenciación NE se produce por aumento de los heterodímeros ErbB2-EGFR provocando la activación sostenida de la MAPK/Erk. La explicación de estos datos puede ser que, como se ha demostrado en otros modelos, la magnitud y duración de la activación de las MAPK/Erk esta correlacionada con procesos celulares opuestos. Uno de los modelos mejor estudiados al respecto son las células PC12, una línea de feocromocitoma de rata. En estas células, la activación transitoria de las MAPK/Erk por EGF provoca proliferación celular, sin embargo, la activación sostenida de esta vía, por el factor de crecimiento neuronal (NGF), provoca diferenciación neuronal ⁽¹³⁷⁾.

El aumento de ErbB2 inducido por el EGF en presencia del LY29 está directamente relacionado con la adquisición de un fenotipo NE. Esta conclusión se apoya en varias evidencias: el aumento de ErbB2 se asocia con un aumento de los marcadores de diferenciación NE: NSE, CrgA y CrgB; el silenciamiento de ErbB2 mediante ARN de interferencia disminuye los niveles de estos marcadores y por último, distintos agentes inductores de diferenciación NE como Forskolina e Interleuquina-6 (IL-6), aumentan también los niveles de ErbB2.

En el cáncer de mama la sobreexpresión de ErbB2 se relaciona con un aumento del riesgo de recaída, resistencia al tratamiento y mal pronóstico. La similitud del cáncer de próstata con el cáncer de mama, respecto a su dependencia hormonal y otras características fisiológicas, impulsó inmediatamente el estudio de la implicación de ErbB2 en el cáncer de

próstata. Aunque no existen datos concluyentes sobre los mecanismos que conducen al aumento en los niveles de este receptor, si está aceptado que existe una alta correlación entre el aumento de ErbB2 y la progresión a la fase independiente de andrógenos del cáncer de próstata ⁽¹³⁸⁻¹³⁹⁾. Dado que ErbB2 induce la actividad transcripcional del receptor de andrógenos en ausencia del ligando ^(125, 140), la sobreexpresión de ErbB2 proporcionaría una vía alternativa para la progresión del cáncer de próstata en estas condiciones. La relación entre el aumento de ErbB2 y la diferenciación NE, que nosotros demostramos, puede constituir un nuevo mecanismo por el que la sobreexpresión de ErbB2 permita la progresión tumoral en ausencia de andrógenos.

Datos previos en la literatura han demostrado que la IL-6 necesita para inducir diferenciación NE que ErbB2 interaccione con su receptor, de hecho, la inhibición de ErbB2, impide el efecto diferenciador de esta citoquina ⁽¹²⁷⁾. Sin embargo, un estudio realizado en muestras humanas procedentes de tumores de cáncer de próstata primarios, no ha conseguido demostrar una relación directa entre niveles de CrgA y ErbB2 ⁽¹²³⁾. La falta de resultados concluyentes en clínica puede deberse a la dificultad de detectar en el tumor, las células con fenotipo NE, ya que éstas son morfológicamente indistinguibles del resto de células tumorales y no son una población homogénea sino que existen distintas subpoblaciones con marcadores y secreciones específicas ⁽¹⁴¹⁾. Por otro lado, es posible que la adquisición del fenotipo NE, por parte de las células tumorales, sea un proceso dinámico resultado del balance entre factores mitogénicos y diferenciadores. La diferenciación NE de esta manera podría ser, un proceso de la etapa posterior a la terapia hormonal y que en la etapa independiente de andrógenos metastásica ya no se observe. El aumento de ErbB2, no se observa en las líneas celulares independientes de andrógenos PC3 y DU145, solamente se produce en

las células LNCaP dependientes de andrógenos. Nosotros vimos, que el aumento de ErbB2, está relacionado con la adquisición del fenotipo neuroendocrino en las células LNCaP y este proceso está implicado en la independencia andrógena. Por lo que, no es esperable que se produzca en las células PC3 y DU145 que constituyen el modelo *in vitro* de independencia androgénica.

Nuestros resultados indican que el aumento del receptor ErbB2, sorprendentemente no está involucrado en la supervivencia de las células LNCaP inducida por el EGF en presencia del LY29. En líneas celulares de cáncer de mama existen evidencias de que el aumento de ErbB2 es el responsable de la activación de vías de supervivencia celular ⁽¹⁴²⁻¹⁴³⁾. Otros estudios indican que únicamente la actividad de EGFR es necesaria para proteger a las células LNCaP de los efectos apoptóticos del LY29 ⁽¹⁴⁴⁾. Es posible que el EGF, este activando vías de supervivencia celular que compensen la falta de PI3K/Akt, mediante la heterodimerización de EGFR con otros miembros de la familia de los ErbBs como ErbB3, presente en estas células; o mediante la formación de homodímeros EGFR-EGFR. Se han descrito efectos compensatorios de ErbB3 cuando se bloquean con inhibidores otros miembros de la familia de los ErbBs ⁽¹⁴⁵⁾.

El paso siguiente fue diseccionar la vía de señalización PI3K/Akt para averiguar que elementos de la misma eran responsables del aumento de ErbB2. La importancia de este estudio radica en la existencia de distintas isoformas de AKT con funciones específicas ^(85, 87) y en que PI3K tiene efectos independientes de Akt ⁽¹⁴⁶⁾. Nuestros datos demuestran que el aumento de ErbB2 no depende de la inhibición de la vía PI3K/Akt. La wortmanina y el silenciamiento de p110 α (PI3K) así como de las isoformas de Akt, inhiben la actividad de PI3K/Akt pero a diferencia del LY29 disminuyen los niveles de ErbB2 en presencia de EGF (Figura 48).

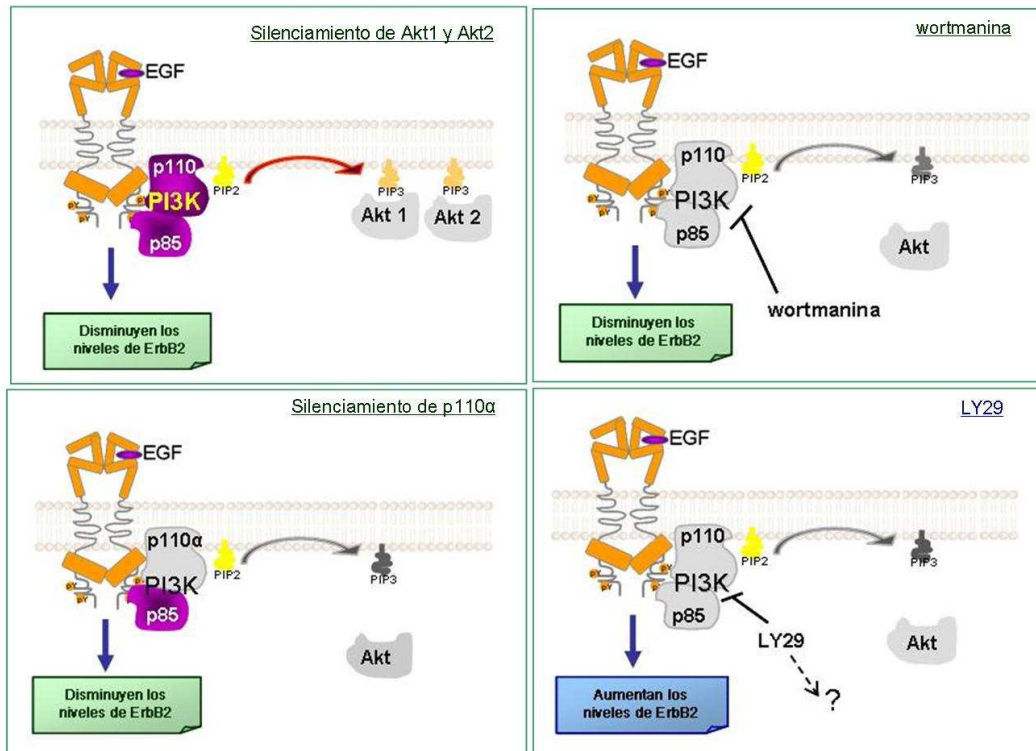


Figura 48: El LY29 en presencia de EGF, induce aumento de los niveles de ErbB2, independientemente de la vía PI3K/Akt. El *silenciamiento de Akt1 y Akt2* en presencia de EGF, disminuye los niveles de ErbB2. En este caso la PI3K está activa y hay formación de PIP3. El *silenciamiento de la p110 α (PI3K)* en presencia de EGF disminuye los niveles de ErbB2. La *wortmanina* que inhibe todas las isoformas de p110 específicamente, en presencia de EGF disminuye los niveles de ErbB2. El *LY29* inhibe a todas las isoformas de p110 y también otras proteínas dianas que están aumentando los niveles de ErbB2.

Estos datos son sorprendentes e indican un nuevo mecanismo de la molécula de LY29 en presencia del EGF sobre el oncogén ErbB2. En concordancia con estos resultados, se ha demostrado que el LY29 tiene efectos biológicos que son independientes de la vía PI3K/Akt. Concretamente en las células LNCaP, el LY29 provoca apoptosis, incrementando la producción intracelular de peróxido de hidrógeno ⁽¹³²⁾. En líneas de cáncer colorrectal, el LY29, induce activación de dos factores de

transcripción ATF3 y EGR-1 por mecanismos aún desconocidos ⁽¹⁴⁷⁾; también el EGR-1 es activado por el LY29 en células de leucemia ⁽¹⁴⁸⁾. A su vez, se ha descrito que el LY29 tiene efectos opuestos sobre NFκB: en células monocíticas potencia su activación inducida por citoquinas ⁽¹⁴⁹⁾, mientras que en macrófagos inhibe su activación ⁽¹⁵⁰⁾. En otros casos el LY29, ejerce sus efectos a través de otras dos dianas celulares conocidas como CK2 y mTOR que son inhibidas a las concentraciones que se utilizan para inhibir PI3K/Akt ^(134, 151). Sin embargo, en nuestro caso ni CK2 ni mTOR parecen estar implicados en el aumento de ErbB2 inducido por el EGF más LY29. Nosotros demostramos que, en presencia del EGF, la inhibición de CK2 con el TBB y de mTOR con Rapamicina disminuye o no modifica, respectivamente, los niveles de ErbB2.

Por lo tanto nos propusimos profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares responsables del aumento de ErbB2, tanto a nivel de la regulación de la expresión génica como a nivel de la degradación y/o estabilidad de la proteína, al tratar las células LNCaP con EGF en presencia de LY29. Como ya hemos mencionado la sobreexpresión de ErbB2 está relacionada con la progresión a la fase independiente de andrógenos del cáncer de próstata ⁽¹³⁸⁾. Sin embargo, pese a los numerosos estudios realizados en distintos modelos *in vitro* y muestras clínicas los mecanismos que conducen a la sobreexpresión de ErbB2 no están claros. El conocimiento de estos mecanismos, crearía nuevas posibilidades de control, en las fases previas a la independencia androgénica. Algunos autores han sugerido que la amplificación del gen para ErbB2 es un hecho común en el cáncer de próstata ⁽¹⁵²⁻¹⁵³⁾. Sin embargo otros estudios no han podido confirmarlo ⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁵⁾. Es posible que en el cáncer de próstata, a diferencia del cáncer de mama, no haya amplificación génica sino que un aumento en la síntesis de la proteína y/o una disminución de su degradación sean responsables del aumento de la

expresión de este receptor. De hecho, nuestros resultados apuntan en esta dirección ya que el aumento de ErbB2, inducido por el EGF en presencia del LY29, se debe al aumento de la síntesis de la proteína y a su mayor estabilidad. Además encontramos un elemento común implicado en ambos procesos: Hsp90. Esta chaperona es un elemento clave en la estabilidad de ErbB2, ya que mientras esté unida al extremo C-terminal del receptor no se produce la ruptura de este extremo y no hay degradación de ErbB2⁽⁵³⁾. De hecho, la geldanamicina que inhibe la actividad de Hsp90, provoca una rápida internalización y degradación de ErbB2⁽¹⁵⁶⁾. Hsp90 no solo regula la estabilidad de ErbB2, sino también su actividad. Hsp90 se une al dominio quinasa del receptor impidiendo el acceso de Src a la Tyr877, cuya fosforilación es necesaria para la activación total de ErbB2⁽⁶¹⁾ y restringiendo su capacidad de heterodimerizar con otros receptores (EGFR o ErbB3) en ausencia de ligando⁽⁶⁰⁾.

Nosotros hemos demostrado que el EGF en presencia de LY29 aumenta la unión de ErbB2 a Hsp90, induce su localización preferentemente en la membrana celular y no modifica su velocidad de degradación; por el contrario, la presencia de geldanamicina hace que ErbB2 se internalice, aumente su velocidad de degradación y por lo tanto disminuyan sus niveles. El tratamiento con EGF más LY29, también aumenta la sensibilidad a geldanamicina de otros clientes de Hsp90 como C-RAF y Akt. Estos resultados sugieren que se requiere Hsp90 para la localización y estabilización de ErbB2 en la membrana celular. Pero coincidiendo con la mayor formación de complejos ErbB2-Hsp90 nosotros observamos que aumenta la formación de heterodímeros EGFR-ErbB2 activos y la fosforilación de ErbB2 en el residuo Tyr877. El conjunto de estos resultados junto con los datos publicados, nos llevo a plantear el siguiente modelo (Figura 49): la unión de Hsp90 a ErbB2 es necesaria para la maduración y la estabilidad del receptor en la membrana celular pero se

separa de esta chaperona para activarse, heterodimerizar y degradarse o reciclarse. Así, Hsp90 se uniría a ErbB2 conforme se sintetiza, facilitando que adquiera y mantenga una conformación activa y estabilizándolo en la superficie celular. En esta situación, el dominio quinasa, que recordemos en ErbB2 tiene una configuración abierta, estaría unido a la chaperona restringiendo su capacidad de heterodimerizar. La presencia del ligando, en este caso EGF, activaría EGFR predisponiéndolo a dimerizar con ErbB2 y desplazando a la chaperona. Hsp90 desempeña una función similar con otras proteínas clientes como la serina treonina quinasa PKR, C-RAF y los receptores de hormonas nucleares ⁽¹⁵⁷⁾.

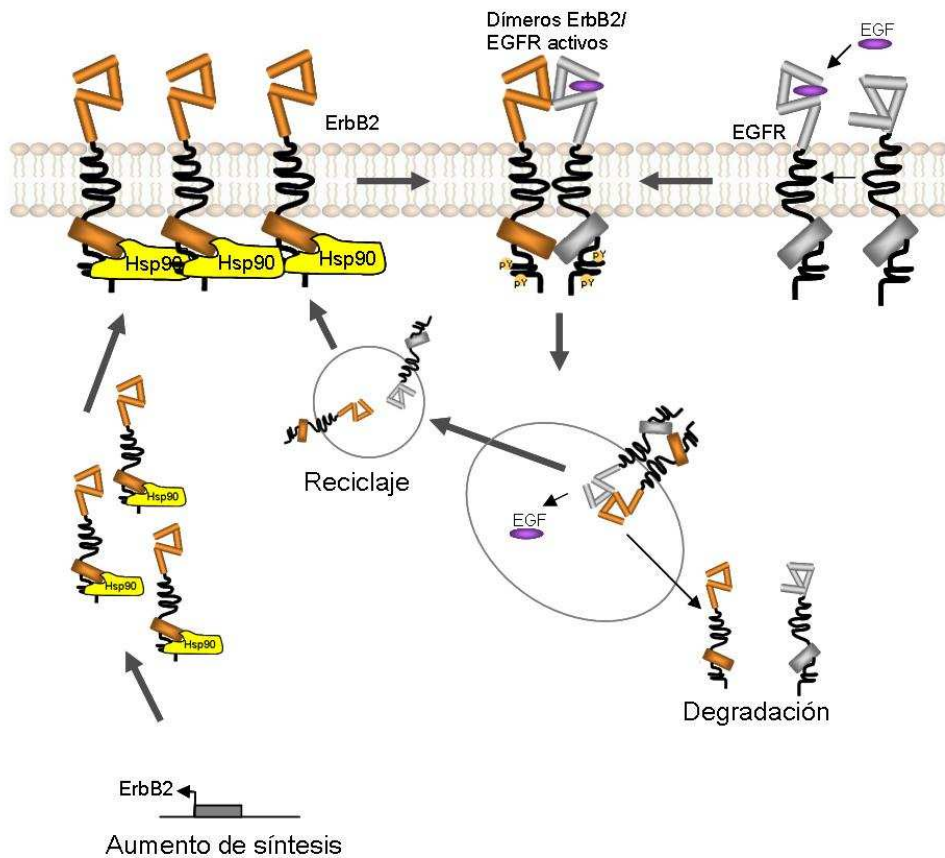


Figura 49: La estabilidad y localización en la membrana del ErbB2 sintetizado, requiere del control de hsp90. El aumento del ARNm de ErbB2 induce el aumento de la proteína. ErbB2 se une a Hsp90 que le permite su permanencia en la membrana celular. Por otro lado, ErbB2 se separa de Hsp90 y formando heterdímeros con EGFR induciendo la activación, endocitosis y reciclado a la membrana celular del receptor. De esta manera aumentarían los niveles de ErbB2 acumulándose en la membrana celular.

Nuestros resultados indican que Hsp90, en nuestras condiciones experimentales, está también implicada directamente en la síntesis de ErbB2. Nosotros demostramos que los niveles del ARN mensajero de

ErbB2 se reducen al bloquear Hsp90 con geldanamicina. Por lo tanto, el EGF en presencia del LY29, incrementaría los niveles de ErbB2 aumentando la síntesis de la proteína por un mecanismo dependiente de Hsp90 y favoreciendo la unión del receptor sintetizado a esta chaperona para su estabilización y localización en la membrana celular. Este doble papel de Hsp90 explica la disminución drástica de los niveles proteicos de ErbB2 que observamos cuando tratamos con geldanamicina en presencia de EGF y LY29. Esta disminución es muy superior a la observada en presencia solo de EGF. A su vez, la inhibición de Erk1/2 con PD y de MSK-1 con H89 también inhibió el aumento del ARNm de ErbB2 inducido por el tratamiento con EGF en presencia de LY29, lo que viene a confirmar un bucle de retroalimentación positiva ErbB2-Erk1/2, es decir, el aumento de ErbB2 induciría la activación sostenida de Erk1/2 que a su vez contribuiría al mantenimiento de los niveles de ErbB2 aumentando su síntesis a través de MSK-1.

La chaperona Hsp90 estabiliza múltiples proteínas entre las que se encuentran factores de transcripción ⁽¹³⁵⁾. Uno de estos factores de transcripción es NFκB, que además activa el promotor de ErbB2 ^(68, 158). La chaperona estabiliza el complejo IKK uniéndose a IKKα e induciendo la activación de NFκB ⁽¹⁵⁹⁾. Pero la activación completa de NFκB requiere modificaciones postraduccionales como la fosforilación de su subunidad p65. Las MAPK/Erk fosforilan y activan a NFκB, a través de MSK-1 ^(78, 160).

Este tipo de regulación se está produciendo en nuestro modelo (Figura 50). El EGF en presencia del LY29, aumenta la actividad transcripcional de NFκB a un nivel comparable al inducido por el TNF-α, un estimulador clásico de esta vía y este efecto es revertido por la geldanamicina, por el PD y por el H89. La geldanamicina produce una inhibición mayor, a la de los otros dos inhibidores, probablemente debido a que no solo desestabiliza las IKK impidiendo la translocación nuclear de NFκB, sino

que también disminuye los niveles de C-RAF, lo que inhibiría la activación de Erk1/2, MSK1 y la fosforilación de NFκB. Es evidente que existe un paralelismo entre el efecto de los inhibidores sobre los niveles de ErbB2 y la actividad transcripcional de NFκB. Por lo tanto, nosotros pensamos que NFκB, activado por el tratamiento combinado de EGF y LY29, a través de la chaperona Hsp90 y/o de Erk1/2-MSK1, podría estar regulando la transcripción de ErbB2.

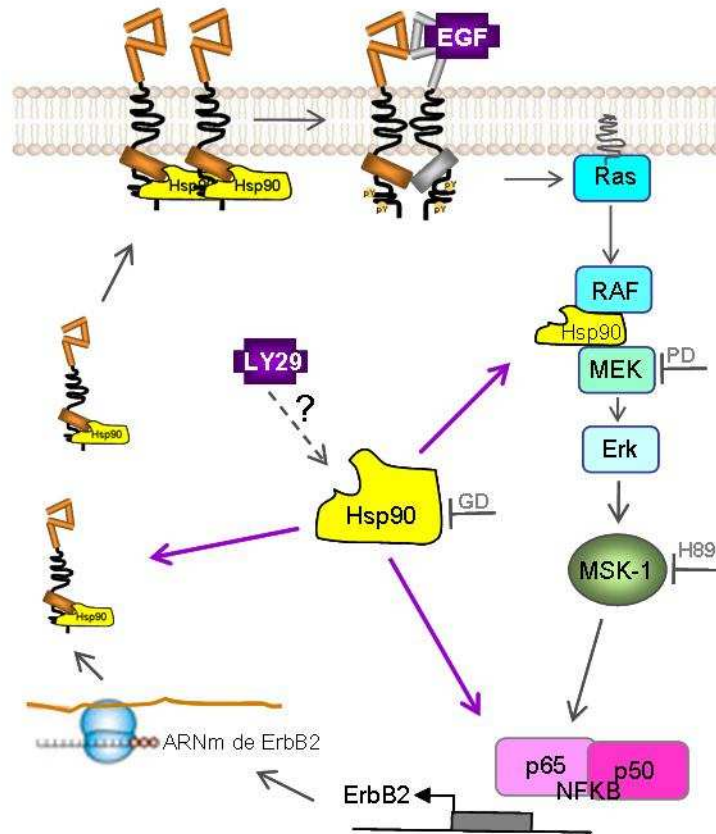


Figura 50: Resumen esquemático del mecanismo que induce el aumento de los niveles de ErbB2.

Para confirmar esta hipótesis sería necesario analizar si, en células LNCaP tratadas con EGF en presencia de LY29, la depleción de NFκB a través de ARN de interferencia modifica tanto el ARNm de ErbB2 como sus niveles proteicos y si la unión de NFκB al promotor de ErbB2 está aumentada.

El trabajo realizado en esta tesis ha intentado mejorar el conocimiento de los procesos que controlan los niveles del oncogén ErbB2, demostrando que existe una relación directa entre la sobreexpresión de este receptor y la adquisición de un fenotipo NE y describiendo nuevos mecanismos responsables del aumento de expresión de este receptor en las células LNCaP. A falta de demostrar esta relación en muestras humanas procedentes de tumores prostáticos en distintos estadios, nuestros resultados postulan un nuevo mecanismo por el que la sobreexpresión de ErbB2 podría controlar la independencia androgénica uno de los principales retos de la oncología prostática.

Dada la importancia del aumento de ErbB2 en la progresión del cáncer de próstata sería interesante analizar en profundidad las modificaciones que se están produciendo. Hsp90 es una proteína que sufre modificaciones postraduccionales que regulan su actividad como fosforilaciones en distintos residuos, es posible que el LY29 esté inhibiendo quinasas, distintas de las aquí analizadas, que sean responsables directa o indirectamente, de estas modificaciones. El EGF sería el estímulo necesario para que estas modificaciones pudieran evidenciarse y manifestarse. Aunque también se ha sugerido que el LY29 puede interaccionar con Hsp90, sin embargo, el efecto que tiene esta interacción con la actividad de esta chaperona no está claro aún ⁽¹³⁴⁾.

Los resultados obtenidos con este trabajo plantean una serie de cuestiones respecto al uso futuro de inhibidores de dianas terapéuticas en

el cáncer de próstata. El LY29, como inhibidor de la vía PI3K/Akt es un potente inductor de muerte celular en cáncer de próstata y como tal su aplicabilidad en el tratamiento de esta patología es clara. Dado sus múltiples efectos secundarios se están sintetizando y analizando derivados de esta molécula como el SF1126 que se encuentra en fase clínica I y con buenas expectativas ⁽⁹⁵⁾. Sin embargo, los intentos de bloquear esta ruta de supervivencia para inducir apoptosis pueden tener como efecto secundario, en presencia del EGF, el aumento del oncogén ErbB2 y la aparición de células con fenotipo neuroendocrino. Ambos procesos directamente relacionados con la independencia androgénica.

Por ello, estos datos pueden constituir una nueva razón para intentar ensayar la eficacia de alguna de las herramientas ya utilizadas en cáncer de mama contra ErbB2 en particular, contra los ErbBs y su señalización en general, en el tratamiento del cáncer de próstata. Bien entendido que estas terapias no se pueden utilizar de forma aislada sino en combinación con otros tratamientos ya que como hemos observado la anulación de ErbB2 impide la diferenciación NE pero no la supervivencia celular.

Conclusión

María Alicia Cortés

Las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

- ✓ El EGF impide la muerte de las células cancerígenas prostáticas LNCaP provocada por el LY294002, inhibidor de la vía PI3K/Akt, induciendo la adquisición de un fenotipo neuroendocrino.
- ✓ El EGF en presencia del LY294002 aumenta los niveles del receptor ErbB2. Este aumento está directamente implicado en el proceso de diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP pero no en la supervivencia celular.
- ✓ En estas condiciones ErbB2 se localiza en la membrana celular lo que favorece la formación de heterodímeros EGFR-ErbB2 y una mayor activación de ambos receptores y de la vía de la MAPK/Erk.
- ✓ El aumento de ErbB2 detectado requiere la presencia conjunta de EGF y LY29 ya que ambos tratamientos por separado no modifican los niveles de ErbB2. Este aumento depende de la activación del receptor EGFR.
- ✓ El aumento de los niveles de ErbB2 es específico de las células LNCaP y es dependiente de la dosis de LY29 y se mantiene en el tiempo junto con la activación de la vía MAPK/Erk.
- ✓ El aumento de los niveles de ErbB2 inducido por el EGF en combinación con el LY29 es independiente de la PI3K, de las isoformas de Akt 1 y 2, de CK2 y de mTOR.

- ✓ El EGF más LY29 aumenta los niveles de ErbB2 mediante dos mecanismos:
 - favoreciendo su unión con Hsp90 lo que incrementa los niveles del receptor en la membrana celular, evitando su internalización y posterior degradación.
 - incrementando los niveles de su ARN mensajero por un mecanismo controlado por Hsp90 y la vía MAPK/MSK-1, que a su vez aumentan la actividad transcripcional de NFκB.
- ✓ Dado que Hsp90 y Erk1/2 están controlando tanto el ARN mensajero como los niveles de ErbB2, es lógico pensar que estas proteínas podrían estar regulando la transcripción de ErbB2 a través de NFκB.

Bibliografía

María Alicia Cortés

- (1). Cotran RS, Kuman V, Collins T. *Aparato Genital Masculino*. In: Interamericana MG-H, editor. *Patología Estructural y Funcional de Robbins*. 6^{ta} ed2000. p. 1055-78.
- (2). Dixon J.S., Gosling J.A. *Macroanatomy of the Prostate*. In: M.J. Kirby R FJ, Roehrborn C, Boyle P., editor. *Benign Prostatic Hyperplasia*1996. p. 3-10.
- (3). Zapata PD. *La tirosina fosfatasa SHP-1 en el cáncer de próstata: regulación por somatostatina*. Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá; 2002.
- (4). Sherwood ER, Theyer G, Steiner G, Berg LA, Kozlowski JM, Lee C. *Differential expression of specific cytokeratin polypeptides in the basal and luminal epithelia of the human prostate*. *The Prostate*. 1991;18(4):303-14.
- (5). Sinha AA, Wilson MJ, Gleason DF. *Immunoelectron microscopic localization of prostatic-specific antigen in human prostate by the protein A-gold complex*. *Cancer*. 1987 Sep 15;60(6):1288-93.
- (6). Yam LT, Janckila AJ, Lam WK, Li CY. *Immunohistochemistry of prostatic acid phosphatase*. *The Prostate*. 1981;2(1):97-107.
- (7). Schalken JA, van Leenders G. *Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology*. *Urology*. 2003 Nov;62(5 Suppl 1):11-20.
- (8). Vashchenko N, Abrahamsson PA. *Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities*. *European urology*. 2005 Feb;47(2):147-55.
- (9). Lindzey J, Kumar MV, Grossman M, Young C, Tindall DJ. *Molecular mechanisms of androgen action*. *Vitamins and hormones*. 1994;49:383-432.

- (10). Griffiths K. *Molecular control of prostate growth*. In: Kirby R. MCJD, Fitzpatrick J.M., Rochrborn C.G., Boyle P., editor. textbook of benign prostatic hyperplasia. 1^{ra} ed. Oxford (UK): Isis Medical Media; 1996. p. 23-55.
- (11). MacLean HE, Warne GL, Zajac JD. *Localization of functional domains in the androgen receptor*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 1997 Jul;62(4):233-42.
- (12). Yeh S, Chang HC, Miyamoto H, Takatera H, Rahman M, Kang HY, Thin TH, Lin HK, Chang C. *Differential induction of the androgen receptor transcriptional activity by selective androgen receptor coactivators*. The Keio journal of medicine. 1999 Jun;48(2):87-92.
- (13). Prins GS. *Molecular biology of the androgen receptor*. Mayo Clinic proceedings. 2000 Jan;75 Suppl:S32-5.
- (14). Byrne RL, Leung H, Neal DE. *Peptide growth factors in the prostate as mediators of stromal epithelial interaction*. British journal of urology. 1996 May;77(5):627-33.
- (15). Aprikian AG, Han K, Guy L, Landry F, Begin LR, Chevalier S. *Neuroendocrine differentiation and the bombesin/gastrin-releasing peptide family of neuropeptides in the progression of human prostate cancer*. Prostate Suppl. 1998;8:52-61.
- (16). Zapata PD, Colas B, Lopez-Ruiz P, Ropero RM, Martin RM, Rodriguez FJ, Gonzalez FJ, Lopez JI, Angulo JC. *[Phosphotyrosine phosphatase SHP-1, somatostatin and prostate cancer]*. Actas urologicas espanolas. 2004 Apr;28(4):269-85.

- (17). Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008*. European journal of cancer (Oxford, England : 1990). 2010;46(4):765-81.
- (18). Parkin DM. *International variation*. Oncogene. 2004 Aug 23;23(38):6329-40.
- (19). Garcia Sanchez A, Antona JF, Urrutia M. *Geochemical prospecting of cadmium in a high incidence area of prostate cancer, Sierra de Gata, Salamanca, Spain*. The Science of the total environment. 1992 May 15;116(3):243-51.
- (20). Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF. *Cadmium-induced cancers in animals and in humans*. International journal of occupational and environmental health. 2007 Apr-Jun;13(2):202-12.
- (21). Stamey TA, Ekman PE, Blankenstein MA, Cooper EH, Kontturi M, Lilja H, Oesterling JE, Stenman UH, Turkes A. *Tumor markers. Consensus Conference on Diagnosis and Prognostic Parameters in Localized Prostate Cancer. Stockholm, Sweden, May 12-13, 1993*. Scandinavian journal of urology and nephrology. 1994;162:73-87; discussion 115-27.
- (22). Van Cangh PJ, Gala JL, Tombal B. *Immediate vs. delayed androgen deprivation for prostate cancer*. Prostate Suppl. 2000;10:19-25.
- (23). Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ. *Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer*. Journal of the National Cancer Institute. 2001 Nov 21;93(22):1687-97.
- (24). Russell PJ, Bennett S, Stricker P. *Growth factor involvement in progression of prostate cancer*. Clinical chemistry. 1998 Apr;44(4):705-23.

- (25). Hobisch A, Culig Z, Radmayr C, Bartsch G, Klocker H, Hittmair A. *Androgen receptor status of lymph node metastases from prostate cancer*. The Prostate. 1996 Feb;28(2):129-35.
- (26). Tilley WD, Lim-Tio SS, Horsfall DJ, Aspinall JO, Marshall VR, Skinner JM. *Detection of discrete androgen receptor epitopes in prostate cancer by immunostaining: measurement by color video image analysis*. Cancer research. 1994 Aug 1;54(15):4096-102.
- (27). van der Kwast TH, Tetu B. *Androgen receptors in untreated and treated prostatic intraepithelial neoplasia*. European urology. 1996;30(2):265-8.
- (28). Hobisch A, Culig Z, Radmayr C, Bartsch G, Klocker H, Hittmair A. *Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein*. Cancer research. 1995 Jul 15;55(14):3068-72.
- (29). Pienta KJ, Smith DC. *Advances in prostate cancer chemotherapy: a new era begins*. CA: a cancer journal for clinicians. 2005 Sep-Oct;55(5):300-18; quiz 23-5.
- (30). Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G, Klocker H. *Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor*. Cancer research. 1994 Oct 15;54(20):5474-8.
- (31). Zhu ML, Kyprianou N. *Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells*. Endocrine-related cancer. 2008 Dec;15(4):841-9.
- (32). Yuan TC, Veeramani S, Lin MF. *Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells*. Endocrine-related cancer. 2007 Sep;14(3):531-47.

- (33). Bonkhoff H. *Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status*. Prostate Suppl. 1998;8:18-22.
- (34). Gutierrez-Canas I, Juarranz MG, Collado B, Rodriguez-Henche N, Chiloeches A, Prieto JC, Carmena MJ. *Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K*. The Prostate. 2005 Apr 1;63(1):44-55.
- (35). Lee SO, Chun JY, Nadiminty N, Lou W, Gao AC. *Interleukin-6 undergoes transition from growth inhibitor associated with neuroendocrine differentiation to stimulator accompanied by androgen receptor activation during LNCaP prostate cancer cell progression*. The Prostate. 2007 May 15;67(7):764-73.
- (36). Cox ME, Deeble PD, Lakhani S, Parsons SJ. *Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression*. Cancer research. 1999 Aug 1;59(15):3821-30.
- (37). Martin-Orozco RM, Almaraz-Pro C, Rodriguez-Ubreva FJ, Cortes MA, Ropero S, Colomer R, Lopez-Ruiz P, Colas B. *EGF prevents the neuroendocrine differentiation of LNCaP cells induced by serum deprivation: the modulator role of PI3K/Akt*. Neoplasia (New York, NY. 2007 Aug;9(8):614-24.
- (38). Humez S, Monet M, Legrand G, Lepage G, Delcourt P, Prevarskaya N. *Epidermal growth factor-induced neuroendocrine differentiation and apoptotic resistance of androgen-independent human prostate cancer cells*. Endocrine-related cancer. 2006 Mar;13(1):181-95.

(39). Sweeney C, Carraway KL, 3rd. *Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage*. *Oncogene*. 2000 Nov 20;19(49):5568-73.

(40). Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd. *Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Aug 16;91(17):8132-6.

(41). Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains*. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):775-87.

(42). Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. *EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization*. *Molecular cell*. 2003 Feb;11(2):507-17.

(43). Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors*. *Molecular cell*. 2003 Sep;12(3):541-52.

(44). Sorkin A, Goh LK. *Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs*. *Experimental cell research*. 2008 Oct 15;314(17):3093-106.

(45). Fry WH, Kotelawala L, Sweeney C, Carraway KL, 3rd. *Mechanisms of ErbB receptor negative regulation and relevance in cancer*. *Experimental cell research*. 2009 Feb 15;315(4):697-706.

(46). Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y. *Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine*

kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. The EMBO journal. 1998 Jun 15;17(12):3385-97.

(47). Wang Z, Zhang L, Yeung TK, Chen X. *Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor-ErbB2 heterodimers in response to EGF stimulation.* Molecular biology of the cell. 1999 May;10(5):1621-36.

(48). Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. *ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors.* The Journal of biological chemistry. 1999 Mar 26;274(13):8865-74.

(49). Haslekas C, Breen K, Pedersen KW, Johannessen LE, Stang E, Madshus IH. *The inhibitory effect of ErbB2 on epidermal growth factor-induced formation of clathrin-coated pits correlates with retention of epidermal growth factor receptor-ErbB2 oligomeric complexes at the plasma membrane.* Molecular biology of the cell. 2005 Dec;16(12):5832-42.

(50). Offterdinger M, Bastiaens PI. *Prolonged EGFR signaling by ERBB2-mediated sequestration at the plasma membrane.* Traffic (Copenhagen, Denmark). 2008 Jan;9(1):147-55.

(51). Sorkin A, Di Fiore PP, Carpenter G. *The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired.* Oncogene. 1993 Nov;8(11):3021-8.

(52). Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L. *Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer.* Nature reviews. [10.1038/nrc2887]. 2010;10(8):537-49.

(53). Citri A, Kochupurakkal BS, Yarden Y. *The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the Hsp90 chaperone machine and potential for*

pharmacological intervention. Cell cycle (Georgetown, Tex. 2004 Jan;3(1):51-60.

(54). Miyata Y. *Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: the kinase controlling the Hsp90 chaperone machinery*. Cell Mol Life Sci. 2009 Jun;66(11-12):1840-9.

(55). So A, Hadaschik B, Sowery R, Gleave M. *The role of stress proteins in prostate cancer*. Curr Genomics. 2007 Jun;8(4):252-61.

(56). Fujita N, Sato S, Ishida A, Tsuruo T. *Involvement of Hsp90 in signaling and stability of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1*. The Journal of biological chemistry. 2002 Mar 22;277(12):10346-53.

(57). Mohan S, Konopinski R, Yan B, Centonze VE, Natarajan M. *High glucose-induced IKK-Hsp-90 interaction contributes to endothelial dysfunction*. Am J Physiol Cell Physiol. 2009 Jan;296(1):C182-92.

(58). Lerdrup M, Bruun S, Grandal MV, Roepstorff K, Kristensen MM, Hommelgaard AM, van Deurs B. *Endocytic down-regulation of ErbB2 is stimulated by cleavage of its C-terminus*. Molecular biology of the cell. 2007 Sep;18(9):3656-66.

(59). Tikhomirov O, Carpenter G. *Geldanamycin induces ErbB-2 degradation by proteolytic fragmentation*. The Journal of biological chemistry. 2000 Aug 25;275(34):26625-31.

(60). Citri A, Gan J, Mosesson Y, Vereb G, Szollosi J, Yarden Y. *Hsp90 restrains ErbB-2/HER2 signalling by limiting heterodimer formation*. EMBO reports. 2004 Dec;5(12):1165-70.

- (61). Xu W, Yuan X, Beebe K, Xiang Z, Neckers L. *Loss of Hsp90 association up-regulates Src-dependent ErbB2 activity*. Molecular and cellular biology. 2007 Jan;27(1):220-8.
- (62). Coene ED, Schelfhout V, Winkler RA, Schelfhout AM, Van Roy N, Grootelaes M, Speleman F, De Potter CR. *Amplification units and translocation at chromosome 17q and c-erbB-2 overexpression in the pathogenesis of breast cancer*. Virchows Arch. 1997 May;430(5):365-72.
- (63). Boshier JM, Williams T, Hurst HC. *The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995 Jan 31;92(3):744-7.
- (64). Dillon RL, Brown ST, Ling C, Shioda T, Muller WJ. *An EGR2/CITED1 transcription factor complex and the 14-3-3sigma tumor suppressor are involved in regulating ErbB2 expression in a transgenic-mouse model of human breast cancer*. Molecular and cellular biology. 2007 Dec;27(24):8648-57.
- (65). Benz CC, O'Hagan RC, Richter B, Scott GK, Chang CH, Xiong X, Chew K, Ljung BM, Edgerton S, Thor A, Hassell JA. *HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer*. Oncogene. 1997 Sep 25;15(13):1513-25.
- (66). Chang CH, Scott GK, Kuo WL, Xiong X, Suzdaltseva Y, Park JW, Sayre P, Erny K, Collins C, Gray JW, Benz CC. *ESX: a structurally unique Ets overexpressed early during human breast tumorigenesis*. Oncogene. 1997 Apr 3;14(13):1617-22.

- (67). Scott GK, Chang CH, Erny KM, Xu F, Fredericks WJ, Rauscher FJ, 3rd, Thor AD, Benz CC. *Ets regulation of the erbB2 promoter*. *Oncogene*. 2000 Dec 18;19(55):6490-502.
- (68). Kitamura T, Sekimata M, Kikuchi S, Homma Y. *Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 in ERBB2 expression in rheumatoid synovial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Jul;289(1):C82-8.
- (69). Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, Liu Y, Wang Y, Liu X, Chan MW, Liu JQ, Love R, Liu CG, Godfrey V, Shen R, Huang TH, Yang T, Park BK, Wang CY, Zheng P, Liu Y. *FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene*. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1275-86.
- (70). Qin HR, Iliopoulos D, Nakamura T, Costinean S, Volinia S, Druck T, Sun J, Okumura H, Huebner K. *Wwox suppresses prostate cancer cell growth through modulation of ErbB2-mediated androgen receptor signaling*. *Mol Cancer Res*. 2007 Sep;5(9):957-65.
- (71). Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE. *ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner*. *Molecular and cellular biology*. 1998 Sep;18(9):5042-51.
- (72). Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. *Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors*. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2004 Mar 1;58(3):903-13.
- (73). Light Y, Paterson H, Marais R. *14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity*. *Molecular and cellular biology*. 2002 Jul;22(14):4984-96.

- (74). Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF. *Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade*. Recent progress in hormone research. 2001;56:127-55.
- (75). Hallberg B, Rayter SI, Downward J. *Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation*. The Journal of biological chemistry. 1994 Feb 11;269(6):3913-6.
- (76). Adachi M, Fukuda M, Nishida E. *Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer*. The EMBO journal. 1999 Oct 1;18(19):5347-58.
- (77). Dickinson RJ, Keyse SM. *Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases*. Journal of cell science. 2006 Nov 15;119(Pt 22):4607-15.
- (78). Roux PP, Blenis J. *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol Mol Biol Rev. 2004 Jun;68(2):320-44.
- (79). Frodin M, Gammeltoft S. *Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction*. Molecular and cellular endocrinology. 1999 May 25;151(1-2):65-77.
- (80). Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR. *Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells*. Biochemical Society transactions. 2006 Nov;34(Pt 5):647-62.
- (81). Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. *The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 May;11(5):329-41.

- (82). Vanhaesebroeck B, Alessi DR. *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. The Biochemical journal. 2000 Mar 15;346 Pt 3:561-76.
- (83). Vivanco I, Sawyers CL. *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nature reviews. 2002 Jul;2(7):489-501.
- (84). Zinda MJ, Johnson MA, Paul JD, Horn C, Konicek BW, Lu ZH, Sandusky G, Thomas JE, Neubauer BL, Lai MT, Graff JR. *AKT-1, -2, and -3 are expressed in both normal and tumor tissues of the lung, breast, prostate, and colon*. Clin Cancer Res. 2001 Aug;7(8):2475-9.
- (85). Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Brugge JS. *Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition*. The Journal of cell biology. 2005 Dec 19;171(6):1023-34.
- (86). Sumitani S, Goya K, Testa JR, Kouhara H, Kasayama S. *Akt1 and Akt2 differently regulate muscle creatine kinase and myogenin gene transcription in insulin-induced differentiation of C2C12 myoblasts*. Endocrinology. 2002 Mar;143(3):820-8.
- (87). Wang S, Basson MD. *Identification of functional domains in AKT responsible for distinct roles of AKT isoforms in pressure-stimulated cancer cell adhesion*. Experimental cell research. 2008 Jan 15;314(2):286-96.
- (88). Knobbe CB, Merlo A, Reifemberger G. *Pten signaling in gliomas*. Neuro-oncology. 2002 Jul;4(3):196-211.
- (89). Lin J, Adam RM, Santiestevan E, Freeman MR. *The phosphatidylinositol 3'-kinase pathway is a dominant growth factor-activated cell survival pathway in LNCaP human prostate carcinoma cells*. Cancer research. 1999 Jun 15;59(12):2891-7.

- (90). Fry MJ. *Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play?* Breast Cancer Res. 2001;3(5):304-12.
- (91). Lin X, Bohle AS, Dohrmann P, Leuschner I, Schulz A, Kremer B, Fandrich F. *Overexpression of phosphatidylinositol 3-kinase in human lung cancer.* Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. 2001 Jul;386(4):293-301.
- (92). Krasilnikov M, Adler V, Fuchs SY, Dong Z, Haimovitz-Friedman A, Herlyn M, Ronai Z. *Contribution of phosphatidylinositol 3-kinase to radiation resistance in human melanoma cells.* Molecular carcinogenesis. 1999 Jan;24(1):64-9.
- (93). Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Monleon I, Sierra JJ, Pineiro A, Naval J, Alava MA. *Tyrosine phosphorylation of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase correlates with high proliferation rates in sublines derived from the Jurkat leukemia.* The international journal of biochemistry & cell biology. 2000 Apr;32(4):435-45.
- (94). Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. *A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002).* The Journal of biological chemistry. 1994 Feb 18;269(7):5241-8.
- (95). Garlich JR, De P, Dey N, Su JD, Peng X, Miller A, Murali R, Lu Y, Mills GB, Kundra V, Shu HK, Peng Q, Durden DL. *A vascular targeted pan phosphoinositide 3-kinase inhibitor prodrug, SF1126, with antitumor and antiangiogenic activity.* Cancer research. 2008 Jan 1;68(1):206-15.
- (96). Matthias P, Wymann GB-L, Marketa J, Zvelebil, Luciano Pirola, Bart Vanhaesebroeck, Michael D. Waterfield and George Parayotou. *Wortmannin Inactivates Phosphoinositide 3-Kinase by Covalent*

Modification of Lys-802, a Residue Involved in the Phosphate Transfer Reaction. Molecular and cellular biology. 1996:1722- 33.

(97). Kong D, Yamori T. *Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy.* Cancer science. 2008 Sep;99(9):1734-40.

(98). Basak S, Hoffmann A. *Crosstalk via the NF-kappaB signaling system.* Cytokine & growth factor reviews. 2008 Jun-Aug;19(3-4):187-97.

(99). Zerbini LF, Wang Y, Cho JY, Libermann TA. *Constitutive activation of nuclear factor kappaB p50/p65 and Fra-1 and JunD is essential for deregulated interleukin 6 expression in prostate cancer.* Cancer research. 2003 May 1;63(9):2206-15.

(100). Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV. *The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells.* Journal of cell science. 2002 Jan 1;115(Pt 1):141-51.

(101). Rusch V, Baselga J, Cordon-Cardo C, Orazem J, Zaman M, Hoda S, McIntosh J, Kurie J, Dmitrovsky E. *Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung.* Cancer research. 1993 May 15;53(10 Suppl):2379-85.

(102). Stumm G, Eberwein S, Rostock-Wolf S, Stein H, Pomer S, Schlegel J, Waldherr R. *Concomitant overexpression of the EGFR and erbB-2 genes in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with dedifferentiation and metastasis.* International journal of cancer. 1996 Feb 20;69(1):17-22.

- (103). Yao M, Shuin T, Misaki H, Kubota Y. *Enhanced expression of c-myc and epidermal growth factor receptor (C-erbB-1) genes in primary human renal cancer*. Cancer research. 1988 Dec 1;48(23):6753-7.
- (104). Yarden Y, Sliwkowski MX. *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol. [10.1038/35052073]. 2001;2(2):127-37.
- (105). Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H. *Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- α predicts worse prognosis in breast-cancer patients*. International journal of cancer. 2000 Nov 20;89(6):484-7.
- (106). Chu CT, Everiss KD, Wikstrand CJ, Batra SK, Kung HJ, Bigner DD. *Receptor dimerization is not a factor in the signalling activity of a transforming variant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII)*. The Biochemical journal. 1997 Jun 15;324 (Pt 3):855-61.
- (107). Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW. *Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer*. Br J Cancer. 1999 Mar;79(7-8):1220-6.
- (108). Ross JS, Fletcher JA. *The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy*. Stem Cells. 1998;16(6):413-28.
- (109). Kuhn EJ, Kurnot RA, Sesterhenn IA, Chang EH, Moul JW. *Expression of the c-erbB-2 (HER-2/neu) oncoprotein in human prostatic carcinoma*. J Urol. 1993 Nov;150(5 Pt 1):1427-33.
- (110). Barros-Silva JD, Leitao D, Afonso L, Vieira J, Dinis-Ribeiro M, Fragoso M, Bento MJ, Santos L, Ferreira P, Rego S, Brandao C, Carneiro F, Lopes C, Schmitt F, Teixeira MR. *Association of ERBB2 gene status with*

histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. Br J Cancer. 2009 Feb 10;100(3):487-93.

(111). Tapia C, Glatz K, Novotny H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, Tornillo L, Terracciano L, Spichtin H, Mirlacher M, Simon R, Sauter G. *Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin.* Mod Pathol. 2007 Feb;20(2):192-8.

(112). Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, Dietz-Band J, James W, Slamon DJ, Batsakis JG, et al. *Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis.* Cancer Res. 1994 Nov 1;54(21):5675-82.

(113). Al-Kuraya K, Novotny H, Bavi P, Siraj AK, Uddin S, Ezzat A, Sanea NA, Al-Dayel F, Al-Mana H, Sheikh SS, Mirlacher M, Tapia C, Simon R, Sauter G, Terracciano L, Tornillo L. *HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer.* J Clin Pathol. 2007 Jul;60(7):768-72.

(114). Dancer J, Takei H, Ro JY, Lowery-Nordberg M. *Coexpression of EGFR and HER-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative study using immunohistochemistry correlated with gene amplification by fluorescent in situ hybridization.* Oncol Rep. 2007 Jul;18(1):151-5.

(115). Haugen DR, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR. *Expression of c-erbB-3 and c-erbB-4 proteins in papillary thyroid carcinomas.* Cancer Res. 1996 Mar 15;56(6):1184-8.

(116). Colomer R, Shamon LA, Tsai MS, Lupu R. *Herceptin: from the bench to the clinic.* Cancer Invest. 2001;19(1):49-56.

(117). Baselga J, Swain SM. *Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3.* Nature reviews. 2009 Jul;9(7):463-75.

- (118). Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S. *c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases*. J Clin Oncol. 1996 Oct;14(10):2702-8.
- (119). Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science (New York, NY. 1989 May 12;244(4905):707-12.
- (120). Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA, Di Fiore PP. *The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand*. New Biol. 1990 Nov;2(11):992-1003.
- (121). Myers RB, Srivastava S, Oelschläger DK, Grizzle WE. *Expression of p160erbB-3 and p185erbB-2 in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma*. Journal of the National Cancer Institute. 1994 Aug 3;86(15):1140-5.
- (122). Prigent SA, Lemoine NR. *The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands*. Prog Growth Factor Res. 1992;4(1):1-24.
- (123). Yamada Y, Nakamura K, Aoki S, Taki T, Naruse K, Matsubara H, Tobiume M, Zennami K, Katsuda R, Honda N. *An immunohistochemical study of chromogranin A and human epidermal growth factor-2 expression using initial prostate biopsy specimens from patients with bone metastatic prostate cancer*. BJU international. 2007 Jan;99(1):189-95.

(124). Domingo-Domenech J, Fernandez PL, Filella X, Martinez-Fernandez A, Molina R, Fernandez E, Alcaraz A, Codony J, Gascon P, Mellado B. *Serum HER2 extracellular domain predicts an aggressive clinical outcome and biological PSA response in hormone-independent prostate cancer patients treated with docetaxel*. Ann Oncol. 2008 Feb;19(2):269-75.

(125). Liu Y, Majumder S, McCall W, Sartor CI, Mohler JL, Gregory CW, Earp HS, Whang YE. *Inhibition of HER-2/neu kinase impairs androgen receptor recruitment to the androgen responsive enhancer*. Cancer research. 2005 Apr 15;65(8):3404-9.

(126). Iwamura M, di Sant'agnese PA, Wu G, Benning CM, Cockett AT, Gershagen S. *Overexpression of human epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 by neuroendocrine cells in normal prostatic tissue*. Urology. 1994 Jun;43(6):838-43.

(127). Qiu Y, Ravi L, Kung HJ. *Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells*. Nature. 1998 May 7;393(6680):83-5.

(128). Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP. *LNCaP model of human prostatic carcinoma*. Cancer research. 1983 Apr;43(4):1809-18.

(129). Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry. 1976 May 7;72:248-54.

(130). Gobeil S, Boucher CC, Nadeau D, Poirier GG. *Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1):*

implication of lysosomal proteases. Cell Death Differ. 2001 Jun;8(6):588-94.

(131). Jiang X, Chen S, Asara JM, Balk SP. *Phosphoinositide-3-kinase pathway activation in PTEN deficient prostate cancer cells is independent of receptor tyrosine kinases and mediated by the p110{beta} and p110{delta} catalytic subunits.* The Journal of biological chemistry. 2010 Mar 15.

(132). Poh TW, Pervaiz S. *LY294002 and LY303511 sensitize tumor cells to drug-induced apoptosis via intracellular hydrogen peroxide production independent of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway.* Cancer research. 2005 Jul 15;65(14):6264-74.

(133). Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors.* The Biochemical journal. 2000 Oct 1;351(Pt 1):95-105.

(134). Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF, Waterfield MD. *Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002.* The Biochemical journal. 2007 May 15;404(1):15-21.

(135). Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, Michiels C. *Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction.* FEBS letters. 1999 Oct 29;460(2):251-6.

(136). Dyson MH, Thomson S, Inagaki M, Goto H, Arthur SJ, Nightingale K, Iborra FJ, Mahadevan LC. *MAP kinase-mediated phosphorylation of distinct pools of histone H3 at S10 or S28 via mitogen- and stress-activated kinase 1/2.* Journal of cell science. 2005 May 15;118(Pt 10):2247-59.

(137). Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE. *Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by*

epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. The Journal of biological chemistry. 2001 May 25;276(21):18169-77.

(138). Shi Y, Brands FH, Chatterjee S, Feng AC, Groshen S, Schewe J, Lieskovsky G, Cote RJ. *Her-2/neu expression in prostate cancer: high level of expression associated with exposure to hormone therapy and androgen independent disease.* The Journal of urology. 2001 Oct;166(4):1514-9.

(139). Shi Y, Chatterjee SJ, Brands FH, Shi SR, Pootrakul L, Taylor CR, Datar R, Cote RJ. *Role of coordinated molecular alterations in the development of androgen-independent prostate cancer: an in vitro model that corroborates clinical observations.* BJU international. 2006 Jan;97(1):170-8.

(140). Mellingshoff IK, Vivanco I, Kwon A, Tran C, Wongvipat J, Sawyers CL. *HER2/neu kinase-dependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability.* Cancer cell. 2004 Nov;6(5):517-27.

(141). Abrahamsson PA. *Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate.* Endocrine-related cancer. 1999 Dec;6(4):503-19.

(142). Makino K, Day CP, Wang SC, Li YM, Hung MC. *Upregulation of IKKalpha/IKKbeta by integrin-linked kinase is required for HER2/neu-induced NF-kappaB antiapoptotic pathway.* Oncogene. 2004 May 6;23(21):3883-7.

(143). Pianetti S, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE. *Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN.* Oncogene. 2001 Mar 15;20(11):1287-99.

- (144). Tørring N, Dagnæs-Hansen F, Sørensen BS, Nexø E, Hynes NE. *ErbB1 and prostate cancer: ErbB1 activity is essential for androgen-induced proliferation and protection from the apoptotic effects of LY294002*. *The Prostate*. 2003;56(2):142-9.
- (145). Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, Moasser MM. *Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3*. *Nature*. 2007 Jan 25;445(7126):437-41.
- (146). Welch HCE, Coadwell WJ, Stephens LR, Hawkins PT. *Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac*. *FEBS letters*. [doi: DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00454-X]. 2003;546(1):93-7.
- (147). Yamaguchi K, Lee SH, Kim JS, Wimalasena J, Kitajima S, Baek SJ. *Activating transcription factor 3 and early growth response 1 are the novel targets of LY294002 in a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway*. *Cancer research*. 2006 Feb 15;66(4):2376-84.
- (148). Liu P, Xu B, Li J, Lu H. *LY294002 inhibits leukemia cell invasion and migration through early growth response gene 1 induction independent of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;377(1):187-90.
- (149). Choi E-K, Jang H-C, Kim J-H, Kim H-J, Kang H-C, Paek Y-W, Lee H-C, Lee S-H, Oh W-M, Kang I-C. *Enhancement of cytokine-mediated NF-[kappa]B activation by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in monocytic cells*. *International Immunopharmacology*. 2006;6(6):908-15.
- (150). Kim YH, Choi KH, Park JW, Kwon TK. *LY294002 inhibits LPS-induced NO production through a inhibition of NF-kappaB activation: independent mechanism of phosphatidylinositol 3-kinase*. *Immunology letters*. 2005 Jun 15;99(1):45-50.

- (151). Shegogue D, Trojanowska M. *Mammalian Target of Rapamycin Positively Regulates Collagen Type I Production via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-independent Pathway*. Journal of Biological Chemistry. 2004 May 28, 2004;279(22):23166-75.
- (152). Kallakury BV, Sheehan CE, Ambros RA, Fisher HA, Kaufman RP, Jr., Muraca PJ, Ross JS. *Correlation of p34cdc2 cyclin-dependent kinase overexpression, CD44s downregulation, and HER-2/neu oncogene amplification with recurrence in prostatic adenocarcinomas*. J Clin Oncol. 1998 Apr;16(4):1302-9.
- (153). Ross JS, Sheehan CE, Hayner-Buchan AM, Ambros RA, Kallakury BV, Kaufman RP, Jr., Fisher HA, Rifkin MD, Muraca PJ. *Prognostic significance of HER-2/neu gene amplification status by fluorescence in situ hybridization of prostate carcinoma*. Cancer. 1997 Jun 1;79(11):2162-70.
- (154). Oxley JD, Winkler MH, Gillatt DA, Peat DS. *Her-2/neu oncogene amplification in clinically localised prostate cancer*. Journal of clinical pathology. 2002 Feb;55(2):118-20.
- (155). Savinainen KJ, Saramaki OR, Linja MJ, Bratt O, Tammela TL, Isola JJ, Visakorpi T. *Expression and gene copy number analysis of ERBB2 oncogene in prostate cancer*. The American journal of pathology. 2002 Jan;160(1):339-45.
- (156). Austin CD, De Maziere AM, Pisacane PI, van Dijk SM, Eigenbrot C, Sliwkowski MX, Klumperman J, Scheller RH. *Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin*. Molecular biology of the cell. 2004 Dec;15(12):5268-82.

- (157). Nollen EA, Morimoto RI. *Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins*. Journal of cell science. 2002 Jul 15;115(Pt 14):2809-16.
- (158). Cao N, Li S, Wang Z, Ahmed KM, Degnan ME, Fan M, Dynlacht JR, Li JJ. *NF-kappaB-mediated HER2 overexpression in radiation-adaptive resistance*. Radiation research. 2009 Jan;171(1):9-21.
- (159). Pittet JF, Lee H, Pespeni M, O'Mahony A, Roux J, Welch WJ. *Stress-induced inhibition of the NF-kappaB signaling pathway results from the insolubilization of the IkappaB kinase complex following its dissociation from heat shock protein 90*. J Immunol. 2005 Jan 1;174(1):384-94.
- (160). Hayden MS, Ghosh S. *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell. 2008 Feb 8;132(3):344-62.