



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

**Centro de Investigación
Príncipe Felipe**

Laboratorio de Biología Celular
y Molecular



ugr | **Universidad
de Granada**

Universidad de Granada

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular III e
Inmunología

Bases moleculares de la oncogénesis mediada por AIB1

Tesis Doctoral

Álvaro Avivar Valderas

2008



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

**Centro de Investigación
Príncipe Felipe**

Laboratorio de Biología Celular y
Molecular



ugr | Universidad
de Granada

Universidad de Granada

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular III e
Inmunología

D. JAIME FONT DE MORA SAÍNZ, INVESTIGADOR JEFE DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE (CIPF)

Y

DÑA. ESPERANZA ORTEGA SÁNCHEZ, CATEDRÁTICA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: **Bases moleculares de la oncogénesis mediada por AIB1**, ha sido realizada por D. Álvaro Avivar Valderas, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Granada, bajo nuestra dirección en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación, firmamos el presente certificado.

Valencia, a 15 de Mayo de 2008

Fdo. Jaime Font de Mora Saínez

Fdo. Esperanza Ortega Sánchez

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. El cáncer.....	3
1.1 Rutas de señalización importantes en cáncer.....	3
1.1.1 Ruta de Ras/Raf/MEK/Erk.....	4
1.1.2 Ruta de PI3K/AKT.....	5
1.1.3 Ruta de JAK/STAT.....	6
1.1.4 Ruta de JNK y p38.....	6
1.2 Modelos animales en cáncer.....	7
1.3 Cáncer de mama.....	9
1.3.1 Clasificación.....	10
1.3.2 Epidemiología y factores de riesgo.....	11
1.3.3 Marcadores en cáncer de mama.....	12
1.3.4 Terapias anti-estrogénicas y de anticuerpos monoclonales.....	12
2. Mecanismo de acción de la hormonas esteroideas.....	13
2.1 Los estrógenos.....	14
2.2 El receptor de estrógenos.....	14
2.2.1 Los receptores nucleares como factores de transcripción.....	15
2.2.2 Dominios conservados de ER.....	15
2.2.3 Interacción con ERE. Acetilación y metilación de la cromatina.....	16
2.2.4 Interacción con coactivadores y corepresores.....	16
3. AIB1 y la familia p160 de coactivadores nucleares.....	17
3.1 Función biológica de AIB1.....	19
3.1.1 Estructura y dominios funcionales.....	19
3.1.2 Formación secuencial del complejo de transcripción.....	21
3.2 AIB1 como diana de factores de crecimiento.....	22
3.2.1 Inducción de la migración.....	22
3.2.2 Inducción de la proliferación.....	23
3.3 Desregulación de AIB1 en cáncer de mama.....	24
3.4 AIB1 como agente antiapoptótico.....	25
4. Rutas de señalización que regulan a AIB1.....	26
4.1 Respuesta a factores de crecimiento.....	26
4.2 Respuesta a hormonas.....	27
4.3 Respuesta a citoquinas.....	28
5. Ciclo celular.....	29
5.1 Proteínas que regulan el ciclo celular.....	30
5.2 AIB1 como regulador importante del ciclo celular.....	31
5.3 Reguladores de ciclo celular implicados en cáncer de mama.....	32
6. Apoptosis y cáncer.....	33
6.1 Rutas que regulan la apoptosis.....	34
6.2 Apoptosis y cáncer de mama.....	35
MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. Animales.....	39
1.1 Modelos murinos.....	39
1.2 Genotipado de los ratones transgénicos.....	40
1.3 Extracción de mamas para análisis morfológico.....	40
1.4 Cultivos primarios de células epiteliales de ratones AIB1-tg.....	41
2. Cultivos celulares y reactivos empleados.....	41
3. Técnicas <i>in vivo</i>	43

3.1	Transfecciones transientes y estables de vectores.....	43
3.2	Transfecciones de siRNA.....	43
3.3	Infecciones adenovirales.....	44
3.4	Medida de apoptosis y ciclo celular.....	44
3.5	Marcaje con ³⁵ S y determinación de la vida media.....	44
3.6	Expresión de proteínas de fusión y experimentos de “pull-down”.....	45
4.	Técnicas <i>in vitro</i>	46
4.1	Inmunodetección de proteínas y anticuerpos utilizados.....	46
4.2	Inmunofluorescencia.....	48
4.3	Desfosforilación <i>in vitro</i>	49
4.4	Co-inmunoprecipitación de complejos.....	49
4.5	Obtención de lisados celulares Oocitos de <i>Xenopus Laevis</i>	50
5.	Extracciones moleculares.....	51
5.1	Extracción de DNA y RNA.....	51
5.2	Extracción de proteínas.....	51
5.3	Extracción en tampón desnaturizante de la línea HeLa ubiquitina-6xHis.....	52
6.	Clonaciones.....	52
6.1	Geles de agarosa.....	52
6.2	Clonaciones.....	52
6.3	RT-PCR y Real Time PCR.....	53
6.4	Mutagénesis dirigida.....	53
7.	Otras técnicas empleadas.....	54
7.1	Marcaje de BrdU e inmunohistoquímica.....	54
7.2	GeneChip de Affymetrix MG U74Av2.....	55
7.3	Doble Híbrido.....	55

OBJETIVOS..... 59

RESULTADOS..... 61

1.	Caracterización del modelo murino AIB1-tg.....	63
1.1	Hiperplasia en mama inducida por AIB1.....	63
1.2	Aumento en la proliferación y ocupación de animales AIB1-tg.....	64
1.3	La localización de AIB1 en el núcleo coincide con la entrada en la fase S del ciclo celular.....	65
1.4	La sobre-expresión de AIB1 promueve la expresión de ciclina D1 y cadherina E.....	66
1.5	Implicación de AIB1 en la transición epitelio-mesénquima.....	68
2.	Análisis fenotípico del cruce AIB1-tg con otros modelos transgénicos.....	69
2.1	AIB1 rescata el fenotipo en animales deficientes de p27.....	69
2.2	Her2/neu coopera en la hiperplasia inducida por AIB1.....	70
3.	Análisis comparativo de AIB1 en las líneas de cáncer MCF-7 y HeLa.....	73
3.1	Localización subcelular comparativa.....	73
3.1.1	La localización subcelular de AIB1 determina la vida media de la proteína.....	74
3.1.2	Ciclosporina A aumenta la estabilidad de AIB1 en células MCF-7.....	75
3.1.3	Modulación de la estabilidad por SERM.....	76
3.2	Modificaciones post-traduccionales.....	77
3.2.1	AIB1 se ubiquitinila y degradada por el proteasoma.....	78
3.2.2	Dos regiones en el dominio carboxi-terminal de AIB1 son necesarias para una eficiente activación transcripcional de AIB1 mediada por proteasoma.....	79
3.2.3	AIB1 se degrada por medio del proteasoma en el núcleo durante la fase M del ciclo celular.....	81
3.2.4	AIB1 interacciona con E6-AP.....	82
3.2.5	Las ubiquitina ligasas E6-AP y MDM2 modulan los niveles de AIB1.....	83

3.3 AIB1 modula el ciclo celular y previene la apoptosis.....	84
3.3.1 La sobre-expresión de AIB1 incrementa la proliferación en células COS1.....	84
3.3.2 El silenciamiento de AIB1 sensibiliza a la apoptosis.....	85
4. Identificación de genes reprimidos por AIB1: clonación y caracterización de DRO1.....	87
4.1 Análisis de “micro-arrays” revelan nuevos genes modulados por AIB1.....	87
4.2 AIB1 modula la expresión de DRO1.....	87
4.2.1 El E2 reprime la expresión de DRO1.....	89
4.2.2 La sobre-expresión de AIB1 coincide con una baja expresión de DRO1 en líneas humanas de cáncer.....	89
5. DRO1 como gen pro-apoptótico y represor de la proliferación.....	91
5.1 DRO1 y apoptosis.....	91
5.1.1 Localización subcelular de la proteína endógena.....	92
5.1.2 DRO1 induce apoptosis en HeLa y MCF-7.....	95
5.1.3 Implicación de la ruta de las caspasas y liberación del citocromo c.....	96
5.1.4 Señales de muerte inducen la translocación de DRO1 a la mitocondria.....	98
5.1.5 La estimulación con TNF α /CHX favorece la inducción apoptótica mediada por DRO1.....	99
5.1.6 DRO1 es una fosfo-proteína.....	100
5.1.7 Generación de mutantes de DRO1 en potenciales sitios de fosforilación de Erk.....	102
5.2 DRO1 y proliferación celular.....	104
5.2.1 La sobre-expresión de DRO1 reduce el porcentaje de células en G2-M.....	104
5.2.2 Localización parcial de DRO1 en el núcleo.....	105
5.2.3 DRO1 se internaliza en el núcleo durante la fase G1 y procesa en G2-M.....	107
5.2.4 Represión transcripcional de ciclina A2 y c-myc.....	108
6. Identificación y caracterización de la interacción de DRO1 y PLZF.....	110
6.1 El sistema del doble híbrido de levadura revela nuevas proteínas que interaccionan con DRO1.....	110
6.2 PLZF interacciona <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> DRO1.....	111
6.2.1 La interacción se produce por el extremo carboxi-terminal de PLZF.....	112
6.2.2 DRO1 interacciona con PLZF en el núcleo.....	114
6.2.3 DRO1 reprime la expresión de ciclina A2 por medio de PLZF.....	115
DISCUSIÓN	117
AIB1 favorece la proliferación induciendo hiperplasia en el tejido mamario de animales AIB1-tg.....	119
AIB1 contrarresta la deficiencia de p27 ^{Kip1} en animales p27 ^{Kip1} ^{-/-} y coopera con Her2/neu en la hiperplasia ductal.....	120
Diferencias en rutas de señales y en la distribución subcelular de AIB1 determinan su vida media en distintas líneas celulares de cáncer.....	123
DRO1 es una nueva proteína pro-apoptótica sensible a estrógenos, reprimida por AIB1 en múltiples líneas celulares humanas.....	125
La señalización apoptótica de TNF α /CHX transloca DRO1 a la mitocondria favoreciendo la apoptosis mediante liberación del citocromo c al citosol.....	126
DRO1 funciona como represor proliferativo a través de la represión transcripcional de c-myc y ciclina A2.....	128
La represión transcripcional de ciclina A2 por DRO1 está mediada por PLZF.....	130
CONCLUSIONES	133
REFERENCIAS	135
ABREVIATURAS	149

INTRODUCCIÓN

1. El cáncer.

El cáncer es una enfermedad de organismos pluricelulares, que se origina cuando una célula rompe las reglas básicas que controlan su crecimiento, proliferación y muerte. Las células cancerosas se caracterizan por proliferar incontroladamente, evitando las restricciones que regulan la progresión del ciclo celular. Su principal limitación será el suministro de nutrientes. Eventualmente podrán adquirir una nueva propiedad que les capacitará para colonizar otros tejidos a través de vasos linfáticos o sanguíneos.

Estas dos propiedades han sido adquiridas por la acumulación de una serie de fallos en los mecanismos que regulan la división, la muerte celular programada y la migración. La división y muerte celular programada son mecanismos claves en la homeostasis normal de los tejidos y están controlados por proteínas reguladoras que cumplen una función crucial (Hanahan y Weinberg 2000). Mutaciones secuenciales en los proto-oncogenes que codifican estas proteínas y que resultan en una ganancia de su función, los transforman en oncogenes (Clarke 2006).

Existen más de 200 tipos de cánceres, aunque los principales podríamos subdividirlos en cuatro grupos (Alberts 2002):

- Sarcoma, cáncer que se origina en hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos o demás tejido conectivo.
- Leucemia, neoplasia que afecta a las células hematopoyéticas en la médula ósea y conlleva el paso a sangre periférica de células atípicas.
- Linfoma y mieloma, cáncer que se origina en el sistema linfático, a veces asociado a las mucosas, y en las células plasmáticas de la médula ósea, respectivamente.
- Carcinoma, cáncer que se origina en las células epiteliales que cubren el cuerpo, los órganos internos o formando estructuras ductales asociadas a las glándulas.

Los mecanismos que se encuentran descontrolados en estos tipos de cánceres son los mismos mecanismos básicos que controlan las funciones esenciales de las células de los tejidos sanos. Con el estudio exhaustivo de los mecanismos moleculares que controlan las células cancerosas nos planteamos un objetivo primordial, la identificación de nuevas dianas moleculares para su intervención farmacológica.

1.1 Rutas de señalización importantes en cáncer.

Se conocen numerosos mecanismos de transducción de señales mediante los cuales las señales que regulan el crecimiento y la proliferación celular son recibidas y transmitidas desde la superficie celular hasta proteínas diana intracelulares. La señal se transduce hasta llegar al núcleo donde se procede a la transcripción de los genes diana que darán respuesta a la señal original.

Se conocen mutaciones activadoras en numerosos genes codificantes para proteínas implicadas en distintas rutas de señalización. Estas mutaciones confieren a la célula una capacidad de crecer y dividirse sin control. Los receptores encargados de transmitir las señales extracelulares se caracterizan por ser proteínas transmembrana con un dominio o bolsillo de unión a la hormona o factor de crecimiento en la cara extracelular y un dominio con actividad tirosina quinasa en su porción citoplásmica (Bell y Ryan 2005). La sobre-expresión de estos receptores tirosina quinasa (RTK) provoca en la célula una hipersensibilidad a los factores de crecimiento que está estrechamente relacionada con la progresión tumoral. En la célula tumoral, niveles idénticos de factores de crecimiento producen una sobre-amplificación de la señal e incluso señalización en ausencia del factor de crecimiento.

Asimismo, cambios en la regulación de los RTK causan a menudo la activación de rutas que resultan en la sobre-expresión de genes inductores del crecimiento. Cuatro rutas iniciadas por la activación de RTK han sido estudiadas en profundidad por su implicación en cáncer: las rutas de Ras/Raf/MEK/Erk, PI3K/Akt, Jak/Stat y JNK.

1.1.1 Ruta de Ras/Raf/MEK/Erk.

La ruta de señalización Ras/Raf/MEK/Erk es una de las rutas principales que controlan la proliferación y supervivencia celulares. Ras es el primer oncogén humano que se identificó y clonó y es uno de los genes más comúnmente mutados en cáncer. Más del 30% de los cánceres poseen mutaciones activantes de Ras. Ras pertenece a la familia de pequeñas proteínas con capacidad de hidrolizar GTP (GTPasas). En su forma inactiva une GDP y en su forma activa une GTP, siendo entonces capaz de interactuar con diversos efectores y transmitiendo de esta forma la señal hacia el interior celular (Blume-Jensen y Hunter 2001). El paso de Ras inactivo a Ras activo está catalizado por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina, GEF. Sin embargo, no se conocen mutaciones oncogénicas en proteínas GEF. Por otro lado, el paso de Ras activo a Ras inactivo está catalizado por proteínas que activan la actividad intrínseca de Ras de hidrolizar GTP bajando su energía de activación. La ruta de Ras/Erk controla múltiples funciones biológicas de la célula incluyendo la proliferación, el metabolismo y la supervivencia.

Inicialmente las proteínas Erk se identificaron como proteínas quinasa activadas por mitógenos. Las mutaciones oncogénicas de Ras producen una señalización permanente a través de diversas rutas, incluida la activación de Erk. Lo que conlleva la proliferación celular descontrolada. Un efecto similar es el observado por la mutación de un gen supresor de tumores relacionado con Ras, el NF1. NF1 es un enzima que cataliza la hidrólisis de Ras-GTP a Ras-GDP. Se conocen mutaciones puntuales en NF1 que inhiben su actividad y están implicadas en la enfermedad de neurofibromatosis (Kolch 2000).

El funcionamiento anormal en la ruta de Ras/Raf/MEK/Erk modula también a la familia de GTPasas Rho, Rac y Cdc42. La función biológica de ésta familia consiste en la promoción del crecimiento y la proliferación, y están además relacionadas con la organización del citoesqueleto y la migración (McCubrey et al. 2007). Resulta curioso que aunque no se han encontrado mutaciones activantes en estas GTPasas que estén asociadas a tumores, sí que se conocen mutaciones oncogénicas en sus GEF específicos Ost, Dbl y Vav, aunque se desconoce el porqué de este paradigma.

1.1.2 Ruta de PI3K/Akt.

La vía PI3K/Akt tiene una señalización compleja, ya que puede ser activada directamente por RTK o por la ruta de Ras. Esta cascada de señalización está constituida por dos quinasas fundamentales (Fresno Vara et al. 2004). La proteína fosfatidil-inositol-3-quinasa, PI3K, es una quinasa de membrana que cataliza la fosforilación del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ubicado en la cara interna de la membrana plasmática, a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato PIP3 (Fruman et al. 1998). PIP3 es capaz de unir fuertemente a Akt a través de su dominio PH. De esta forma Akt pasa de una ubicación deslocalizada en el citoplasma a concentrarse en los sitios de síntesis de PIP3, precisamente donde se encuentran las quinasas que lo fosforilan y activan.

La ruta de PI3K/Akt se encuentra regulada negativamente por la fosfatasa PTEN y por el hetero-dímero TSC1/TSC2. La supresión de PTEN es un fenómeno frecuente en tumores que conduce a la sobre-activación de Akt, provocando una respuesta celular dirigida a la supervivencia y proliferación.

Akt activa multitud de vías de señalización que regulan la activación del metabolismo gluco-proteico y la transcripción de genes implicados en supervivencia, proliferación y angiogénesis. La activación del ciclo celular por Akt tiene una importancia esencial en cáncer y está promovida fundamentalmente por dos acciones. La primera fosforilando e inhibiendo a GSK3, que en consecuencia activa a myc y ciclina D (Sears et al. 2000), y la segunda fosforilando y secuestrando en el citoplasma a represores de ciclo celular como p21^{Cip1} y p27^{Kip1} (Zhou et al. 2001; Liang et al. 2002). Asimismo, Akt promueve la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis mediante fosforilación a BAD y caspasa 9 (Cardone et al. 1998). Adicionalmente, Akt promueve el crecimiento celular fosforilando e inhibiendo a TSC2, lo que conlleva la desestabilización del complejo TSC1/TSC2 implicado en el proceso de activación de mTOR. El resultado es una hiper-activación de mTOR que en consecuencia favorece la progresión y el crecimiento celular descontrolado (Inoki et al. 2002).

1.1.3 Ruta de JAK/STAT.

La familia de quinasas JAK y STAT son las encargadas de mediar la respuesta a multitud de citoquinas, como interferón, interleuquinas y hormonas de crecimiento como EPO, TBO y prolactina. Las proteínas JAK están asociadas a diversos RTK y su activación es consecutiva a los RTK. Las proteínas quinasas JAK, además de fosforilar a STAT, se comunican también con otras rutas de señales como la de Erk (Winston y Hunter 1995). Las quinasas traductoras de la señal y activadoras de la transcripción, STAT, son una familia de proteínas que tras su fosforilación por JAK se dimerizan y se internalizan en el núcleo en donde activan la transcripción de genes diana.

El primer indicador por el que se atribuyó a la ruta JAK/STAT un papel importante en la señalización anormal en cáncer fue la alta expresión de STAT3 en muchos tipos de cáncer. Hoy en día se sabe que STAT3 está implicada en supervivencia celular. En un principio se pensó que la mayor activación de STAT en tumores era debida a la sobre-expresión o activación constitutiva de RTK. Sin embargo, actualmente se conocen mutaciones puntuales activadoras de la ruta en quinasas intermediarias por debajo de RTK como Abl, Fes y JAK (Danial y Rothman 2000).

1.1.4 Ruta de JNK y p38.

Las proteínas JNK constituyen un subgrupo de quinasas dentro de la familia de las quinasas activadas por mitógenos o MAPK, junto con p38 y Erk. Se trata de una superfamilia de serin, treonin-quinasas conservadas evolutivamente y ubicuamente distribuidas que regulan múltiples procesos celulares como crecimiento, apoptosis, diferenciación y respuestas a estímulos medioambientales (Gupta et al. 1996). La función primordial de éste subgrupo es la respuesta a citoquinas y estímulos relacionados con el estrés. Asimismo, responden a factores de crecimiento señalizados a través de la ruta de Ras (Minden et al. 1994). Como resultado, la activación de JNK modula múltiples respuestas fisiológicas como la respuesta inflamatoria, además de participar en procesos patológicos como el cáncer y la diabetes (Weston y Davis 2007).

Numerosos estudios han revelado altos niveles de JNK en diversas líneas celulares de cáncer, lo que implica directamente a la ruta JNK con la progresión tumoral (Antonyak et al. 2002). Sin embargo, su implicación en la transformación oncogénica resulta en ocasiones contradictoria. La modulación de la estabilidad de p53, proteína supresora de tumores, es uno de estos paradigmas. JNK puede actuar como un regulador negativo de p53, siendo éste enviado para degradación (Das et al. 2007), mientras que en otras ocasiones JNK contribuye a la estabilización de p53 (Fuchs et al. 1998).

JNK se une al dominio de activación amino-terminal de c-Jun, fosforilándolo y activándolo (Adler et al. 1992). De igual modo ocurre la fosforilación de otros sustratos o

efectores de JNK como JunB, JunD o ATF2 (Gupta et al. 1996; Kallunki et al. 1996), incrementando así su actividad transcripcional. c-Jun es un proto-oncogén que se encuentra sobre-expresado en diversas anomalías neoplásicas y actúa como factor de transcripción formando hetero-dímeros con c-Fos. Juntos conforman el complejo AP-1, pieza clave en la progresión del ciclo celular ya que es responsable de transcripción de genes como ciclina D1 (McGuire y Iacobelli 1997) y represor de genes como p53, p21^{Cip1} y p27^{Kip1} (Stepniak et al. 2006).

La actividad de la quinasa p38 se relacionó desde un principio con la respuesta a estrés fisiológico por su capacidad de fosforilarse en residuos de tirosina y activarse bajo la acción de diversos estímulos, como el cambio de osmolaridad y la respuesta al lipopolisacárido endotóxico (Han et al. 1994). Más recientemente, se ha demostrado su implicación en la respuesta a citoquinas como TNF α , IL-17 (Shapiro et al. 1998) o factores de crecimiento como FGF, IGF, VEGF o NGF (Cheng y Feldman 1998, Morooka et al.1998).

Existe un amplio grupo de factores de transcripción regulados por p38. Se trata de efectores transcripcionales que modularan la respuesta final tanto a nivel de división y diferenciación celulares, como ATF2, Chop-1 y MEF2 (Zhao et al. 1999), como a nivel de parada del ciclo celular y apoptosis como HBP1 y JunB (Yee et al. 2004).

1.2 Modelos animales en cáncer.

El estudio de modelos murinos modificados genéticamente ha sido una de las herramientas más empleadas durante los últimos 15 años para analizar los mecanismos moleculares que desencadenan y promueven la progresión tumoral. Adicionalmente, se han empleado en el estudio preclínico de drogas y han constituido la base para aplicar nuevas terapias más eficaces.

Existen dos aproximaciones para el estudio del cáncer en ratones modificados genéticamente. Una primera aproximación consiste en generar ratones transgénicos que sobre-expresan oncogenes mimetizando a las amplificaciones génicas y sobre-expresiones que ocurren en los tumores humanos. Los primeros modelos murinos susceptibles a padecer cáncer se obtuvieron mediante esta técnica. Inicialmente se construye mediante ingeniería genética un transgén cuyo cDNA se pone bajo la regulación de un determinado promotor. Posteriormente el transgén se micro-inyecta en el pronúcleo de oocitos recién fertilizados y se estudia la integración del transgén en el genoma de la progenie (Macleod y Jacks 1999). El número de copias que se integran y el lugar cromosómico de integración son aleatorios, por lo que dos líneas distintas de ratones de un mismo transgén pueden comportarse de manera distinta. En el caso de la mama se han utilizado dos promotores distintos, MMTV y el promotor de la proteína ácida Whey. Mientras el promotor MMTV empieza a expresarse a partir de las primeras semanas del nacimiento, el promotor de la proteína Whey limita su

expresión fundamentalmente al periodo de lactancia. En ocasiones, también se ha utilizado la expresión ubicua de tejidos mediante el empleo de promotores constitutivos como el CMV.

Transgenes	Función celular	Fenotipo	Referencia
CMV · c-myc	Factor de transcripción	Linfoma a los pocos meses del nacimiento	(Adams et al. 1985)
MMTV · Ras	GTPasa de membrana	Tumores a los 6 meses y elevada metástasis	(Sinn et al. 1987)
FlickGW · Bcl-2	Intermediario anti-apoptótico en muerte celular	Resistencia a apoptosis y linfomas a los 18 meses	(Sentman et al. 1991)
MMTV · Her2/neu	Receptor Tirosina-quinasa	Tumores en mama a los 4 meses	(Guy et al. 1992)
MMTV · Src	Tirosina-quinasa citoplasma	Hiperplasias epiteliales en mama	(Webster et al. 1995)
PB · TRAMP	Regulador apoptótico mediada por TNF	Cáncer de próstata	(Greenberg et al. 1995)
BLG · Ciclina E	Ciclina reguladora del ciclo fase tardía G1-S	Carcinoma en mama entre los 8 y 13 meses	(Bortner y Rosenberg 1997)
FABP · Ciclina D1	Ciclina reguladora del ciclo fase G1-S	Displasias y adenomas a los 9 meses, en el hígado	(Deane et al. 2001)
MMTV · AIB1	Coactivador de la transcripción	Hiperplasia y desarrollo de tumores en mama	(Torres-Arzayus et al. 2004)
“Knockouts”	Función celular	Fenotipo	Referencia
APC	Factor de transcripción	Adenomas por todo el tracto intestinal	(Moser et al. 1990)
p53	Factor de transcripción	Neoplasias varias a los seis meses	(Donehower et al. 1992)
Rb	Regulador del ciclo celular	Letal -/- y adenocarcinomas pituitarios +/-	(Jacks et al. 1992)
Wnt-1	Factor de transcripción	Letal. Embriones con defectos en riñón y gónadas	(Kreidberg et al. 1993)
PTEN	Fosfatasa lipídica	Cáncer de próstata	(Gingrich y Greenberg 1996)
Ink4a	Inhibidor del ciclo celular	Linfomas y sarcomas. Sensibilidad a carcinógenos	(Serrano et al. 1996)
BRCA-2	Reparación del DNA	Letalidad menos agresiva de BRCA-2	(Ludwig et al. 1997)
BRCA-1	Reparación del DNA	Fenotipos anormales variables, alta letalidad	(Ludwig et al. 1997)
p19Arf	Modula Mdm2 activando a p53	Linfomas y sarcomas tempranos	(Kamijo et al. 1997)
Smad4/Dpc4	Traductor de la señal TGF-β	Letal, defectos en gastrulación y embriogénesis	(Sirard et al. 1998)

Tabla 1. Algunos modelos murinos representativos de animales modificados genéticamente en el estudio del cáncer. Los promotores de los transgenes que dirigen la expresión del transgén a un tejido específico son MMTV, promotor de virus tumoral de mama de ratón, FlickGW, promotor de tirosina quinasa específica de leucocitos, PB, promotor de la probasina, BLG, promotor de la β-lactoglobulina o FABP, promotor de proteína de unión a ácidos grasos.

Una segunda aproximación consiste en generar deleciones parciales, completas o mutaciones inactivantes en genes supresores de tumores. Para ello se emplean técnicas de “gene targeting” mediante las que se reemplaza el alelo endógeno por un alelo mutado en las células del ratón. El reemplazamiento del gen silvestre por el mutado ocurre mediante recombinación homóloga en células troncales embrionarias de ratón. Por tanto y a diferencia de los animales transgénicos, la integración es una sustitución y está claramente dirigida a un lugar cromosómico. Posteriormente las células se implantan en un blastocisto para generar un animal quimera, conteniendo células mutantes y células silvestres. Finalmente, mediante dos cruces sucesivos se puede llegar a obtener animales homocigotos que contienen reemplazados los dos alelos silvestres por el mutante. Mediante el sistema Cre/lox se han llegado a generar ratones “knockout” deficientes en un gen específicamente en un solo tejido (Sauer 1998). En este caso el alelo reemplazado debe estar flanqueado por secuencias loxP. Estas secuencias loxP son reconocidas por la recombinasa Cre, topoisomerasa I que cataliza la recombinación específica del DNA entre secuencias loxP. Los ratones con el gen deseado flanqueado por las secuencias loxP han de ser finalmente cruzados con ratones transgénicos que expresan Cre específicamente en el tejido deseado. Finalmente tras un segundo cruce la descendencia presentará deleción del gen deseado precisamente en el tejido que está expresando Cre.

1.3 Cáncer de mama.

La mama es una glándula sudorípara modificada que se encuentra en la parte media del tórax, cuya función primordial es la de secretar leche. La aparición evolutiva de la glándula mamaria para dar lugar a todo el conjunto de mamíferos ocurrió hace 200 millones de años mediante la acción orquestada de un grupo de genes que ya estaban presentes en el reino animal (Hennighausen y Robinson 1998). La organización de la glándula mamaria consiste en un sistema arborescente de ductos que delimitan un espacio interno o lumen y que partiendo de los acinos glandulares, donde se produce la leche, van confluyendo progresivamente formando canalículos cada vez más gruesos, hasta terminar en uno de los 12 a 18 galactóforos situados inmediatamente por debajo del pezón.

A lo largo de toda su longitud, los ductos mamarios están tapizados por dos capas de células, una capa interna continua de células epiteliales y una capa externa discontinua de células mioepiteliales. La glándula mamaria es un órgano en constante evolución post-natal, desde la adolescencia al embarazo, la lactancia y la posterior involución. Incluso se pueden observar pequeñas diferencias según las distintas fases del ciclo menstrual. Por tanto, las células epiteliales que conforman la mama deben estar finamente reguladas en proliferación, supervivencia y diferenciación. Cabe esperar que alteraciones y cambios en este proceso tan dinámico den lugar a importantes cambios en la organización y regulación de las células

epiteliales mamarias, resultando en procesos patológicos como el cáncer. Las células epiteliales transformadas, pierden la capacidad de formar parte de alvéolos y ductos organizados, pierden su funcionalidad y crecen descontroladamente ocupando el lumen de lóbulos y lobulillos (carcinoma *in situ*).

En ocasiones, las células transformadas pierden los contactos y adhesiones específicas con otras células, comienzan entonces procesos de migración e invasión del estroma (carcinoma invasivo) pudiendo alcanzar los vasos sanguíneos y colonizar otros tejidos (metástasis). El cáncer de mama tiene el potencial de metastatizar a otros tejidos, principalmente a ganglios linfáticos, pulmón y hueso.

1.3.1 Clasificación.

Dependiendo de la célula que origina el cáncer de mama, podemos clasificarlos en cáncer lobular o cáncer ductal. En base a la localización y movilidad de las células, se dividen en carcinomas *in situ*, cuando se localizan en el ducto o el lóbulo y carcinomas invasivos cuando pasan a migrar hacia el tejido fibro-adiposo. En base a éstos parámetros podemos clasificar:

- Carcinoma ductal *in situ*, se origina en las células de las paredes de los conductos galactóforos. Es un cáncer localizado, que no ha producido metástasis.
- Carcinoma ductal invasivo, es el que se inicia en el conducto galactóforo pero logra atravesarlo y pasa al tejido adiposo de la mama y luego puede extenderse a otras partes del cuerpo. Es el tipo de tumor canceroso en mama con mayor incidencia.
- Carcinoma lobulillar *in situ*, se produce por un acúmulo de células anormales en los lóbulos mamarios. Poseer más que un tipo de cáncer no invasivo, es una condición previa que incrementa de forma considerable el riesgo a desarrollar cáncer en el futuro.
- Carcinoma lobulillar invasivo, tiene su origen en las glándulas mamarias pudiendo llegar a metastatizar, extendiéndose y destruyendo otros tejidos del cuerpo. Es el segundo tumor canceroso de mama con mayor incidencia, después del carcinoma ductal invasivo.
- Carcinoma inflamatorio, es el tipo de cáncer de mama menos conocido y menos frecuente, en torno al 1% de los casos, en el que la piel del pecho se vuelve inflamada y roja. Este cáncer de mama se desarrolla y esparce muy distintamente al lobulillar y ductal, en el que las células crecen en grumos o bultos. Las células del cáncer de mama inflamatorio crecen en los estrechos vasos linfáticos de la mama, bloqueándolos y causando el aspecto inflamado del pecho. El cáncer de mama inflamatorio es también más agresivo que el ductal y lobulillar ya que al crecer en los propios vasos linfáticos le permite migrar mucho más rápidamente a los ganglios linfáticos del pecho y de otras partes del cuerpo. Estas características le confieren peor pronóstico.

1.3.2 Epidemiología y factores de riesgo.

El cáncer de mama es la forma de cáncer más frecuente en mujeres, afectando a 1 de cada 9 mujeres del total de la población mundial (Thomas et al. 2008). Con 1 millón de nuevos casos cada año, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres (18%), seguido por el cáncer de cérvix y el cáncer de colon. La cuenca del Mediterráneo ha estado protegida frente a los elevados índices mostrados por países occidentales como Reino Unido, EE.UU., Suecia, Islandia, Alemania, etc. Sin embargo, la incidencia en España está aumentando año tras año, debido entre otras cosas a los cambios en el estilo de vida y alimentación, por lo que se ha convertido en un problema de salud pública que tenemos que contrarrestar.

Aunque se desconocen en gran medida las causas que originan el cáncer de mama, se sabe de diversos factores de riesgo que de una manera u otra aumentan las probabilidades de su aparición. En la Tabla 2 se enumeran algunos de los factores de riesgo de mayor importancia.

Tabla 2. Factores de riesgo que favorecen la aparición del cáncer.

Genéticos	Descripción
Historia familiar	Mutaciones en genes supresores como BRCA1 y BRCA2 son adquiridas por herencia genética y confieren alto riesgo a desarrollar cáncer. Hasta el 10% de los casos en occidente se deben a una predisposición genética.
No genéticos	Descripción
Factores medioambientales	Inmigrantes de zonas de baja incidencia, como Japón o Hawai, a EE.UU., con alta incidencia, adquieren los porcentajes del país hospedador demostrando la relevancia de factores ambientales y estilo de vida en el desarrollo del cáncer.
Edad	La incidencia se dobla cada 10 años hasta la menopausia.
Menarquía y menopausia	Son factores de riesgo la edad temprana en la menarquía y la menopausia tardía.
Edad del primer embarazo	El riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres que tienen su primer hijo a los 30 años es el doble de aquellas que lo tienen a los 20 años.
Radiaciones ionizantes	Adolescentes expuestas a radiaciones ionizantes en situaciones especiales (bombas atómicas o regiones próximas tras el accidente de Chernobyl) padecen mayor riesgo de padecer cáncer de mama.
Estilo de vida	El ejercicio, la dieta, anticonceptivos, el consumo de tabaco o alcohol, etc. La obesidad desempeña un papel dual ya que es factor preventivo durante la juventud, ya que la grasa inhibe el ciclo menstrual y se convierte en un factor de riesgo después de la menopausia, fuente de síntesis de estrógenos.

1.3.3 Marcadores en cáncer de mama.

Los marcadores tumorales son proteínas y productos metabólicos que se encuentran en niveles anormales cuando se desarrolla el cáncer. Pueden ser productos de las mismas células cancerosas, o del organismo en respuesta a las alteraciones fisiológicas que provoca el tumor. La gran importancia de los marcadores tumorales radica en su capacidad de pronosticar el desarrollo del tumor así como su respuesta a las distintas terapias disponibles.

En el cáncer de mama, existen varios marcadores que nos indican tanto la presencia como el grado de desarrollo de un tumor (Ross y Fletcher 1999). Algunos de los marcadores más indicativos son:

Contenido de receptores nucleares como PR o ER.

Contenido de receptores tirosina quinasa, RTKs, como Her2/neu.

Nivel de expresión de genes supresores de tumores como p53, BRCA1-2 o PTEN.

Nivel de expresión de oncogenes como c-myc y src.

Reguladores de ciclo celular como ciclinas e inhibidores de Cdk como p27^{kip1}.

Aneuploidías en el DNA.

Proteasas como catepsina D.

Índice de proliferación celular elevado como MIB-1 (Ki-67).

La mayoría de los cánceres en mama se dividen en ER positivos, cuando se sobre-expresa el receptor de estrógenos, o Her2/neu positivos, cuando se sobre-expresa el receptor de membrana Her2/neu. Esta clasificación tiene una importancia vital en clínica ya que permite decidir la terapia a seguir para tratar el tumor.

1.3.4 Terapias antiestrogénicas y de anticuerpos monoclonales.

La sobre-expresión del gen Her2/neu está asociada a un crecimiento rápido del tumor, junto con una alta probabilidad de recurrencia, una baja respuesta al tratamiento convencional de quimioterapia y una menor esperanza de supervivencia (Ross y Fletcher 1998). El proto-oncogén Her2/neu forma parte de una familia de receptores tirosina quinasa EGFR cuya actividad biológica incide en la activación de rutas celulares implicadas en la supervivencia y proliferación. Her2/neu se encuentra amplificado en un 10-35% de los tumores mamarios (Slamon et al. 1987; Slamon 1990) y su sobre-expresión ocurre en la etapas más tempranas del desarrollo del cáncer, de ahí que se piense que esté relacionado con la iniciación del tumor.

La terapia a seguir en cánceres Her2/neu positivos versa en el suministro de anticuerpos monoclonales (Trastuzumab) que bloquean la actividad de Her2/neu. (Fendly et al. 1990). El compuesto denominado Herceptin es la versión humanizada del anticuerpo muMAb 4D5 generado en modelos murinos (Shepard et al. 1991). A pesar de su eficacia, posee efectos cardiotóxicos adversos así como un elevado coste del tratamiento.

ER pertenece a la familia de receptores nucleares de hormonas esteroideas. El 40% de los casos de cáncer de mama se consideran ER positivos. La estrategia que se sigue para tratar el cáncer de mama ER positivo consiste en el uso de agentes antiestrogénicos que bloquean la señalización transcripcional de ER (tamoxifeno, raloxifeno), o inhibidores de la aromatasa, enzima implicada en la síntesis de estrógenos (anastrozole, letrozole y exemestane).

El compuesto antiestrogénico 4-hidroxitamoxifeno, ha sido usado como agente coadyuvante pionero para la cirugía desde los años 70 (Jordan 2003). Se une al ER provocando un cambio conformacional en el mismo e impidiendo la interacción con coactivadores que promueven la transcripción de genes diana (Shiau et al. 1998). Sin embargo, se ha observado que después de 1 a 3 años de tratamiento existe una recurrencia de los tumores de mama tratados con tamoxifeno. Paradójicamente, cuando se termina el tratamiento de tamoxifeno se produce una disminución en el volumen del tumor (Howell et al. 1992). Este fenómeno ha sido extensamente estudiado en modelos animales donde se ha probado que los tumores ER positivos desarrollan resistencia a tamoxifeno y terminan creciendo de manera dependiente al tamoxifeno (Gottardis y Jordan 1988). Se cree que el tamoxifeno es capaz de activar la señalización a través del receptor Her2/neu, lo que promueve la fosforilación de ER y sus coactivadores y como consecuencia activa el crecimiento de las células tumorales (Jordan 2004).

Para subsanar las limitaciones del tamoxifeno se emplea una terapia combinada de distintas drogas o terapia coadyuvante. El objetivo es bloquear completamente a ER con un antagonista puro como fulvestrant (Faslodex; ICI182780) y además bloquear a Her2/neu mediante el tratamiento simultáneo con Herceptin.

2. Mecanismo de acción de la hormonas esteroideas.

En el organismo existen células especializadas en recibir y transmitir señales extracelulares que controlan la correcta homeostasis del organismo. Este fenómeno está activado por varios tipos de señales entre los que se encuentra la endocrina, mediada por hormonas. Los procesos fisiológicos implicados en cáncer están frecuentemente regulados por las señales endocrinas entre las que destaca las hormonas esteroideas. Todas las hormonas esteroideas se sintetizan a partir del colesterol y se sintetizan en la corteza adrenal, los testículos, los ovarios y la placenta. Las hormonas se transportan en el torrente sanguíneo por todo el organismo hasta las células diana.

2.1 Los estrógenos.

La testosterona y los estrógenos pertenecen a las hormonas esteroideas sexuales, éste último cumple un papel esencial en la progresión del cáncer de mama. Ejercen una amplia variedad de efectos en la célula relacionados con el crecimiento, desarrollo y diferenciación. Adicionalmente, los estrógenos cumplen una función clave en la regulación de los sistemas reproductores de ambos sexos, en el desarrollo y diferenciación de la mama, en el sistema nervioso y en la regulación del eje gonadal-hipotalámico.

2.2 El receptor de estrógenos.

En mamíferos, los estrógenos ejercen su acción a través de dos isoenzimas, ER α y ER β . Esta pareja de proteínas pertenece a la superfamilia receptores nucleares, factores de transcripción que se activan tras la unión a la hormona respectiva y modulan de esta forma la expresión de genes diana. ER se activa por unión a estrógenos, produciéndose un cambio conformacional que lo libera de la interacción con corepresores tipo proteínas hsp90 y hsp70. Seguidamente el ER activado se dimeriza y se une a secuencias consenso de DNA llamadas elementos de respuesta a estrógenos (Lahusen et al. 2007) y localizadas en las regiones promotoras de los genes diana. Adicionalmente, en esta conformación interacciona con coactivadores de la transcripción que facilitan la transcripción de los genes.

El estudio de ER α y ER β en modelos murinos “knockout” ha permitido demostrar la gran importancia de ER α en el eje reproductor (Korach et al. 1996). Los ratones deficientes en ER α son viables, pero los machos son infértiles con atrofia de testículos y anomalías en los conductos seminíferos. Las hembras son también estériles, con ovarios hiperémicos sin prácticamente corpora lutea. El útero es hipoplástico y presentan un gran retraso en el desarrollo de la glándula mamaria. Por el contrario, los ratones “knockout” de ER β no muestran fenotipo aparente (Ogawa et al. 1999), lo que relega a esta isoenzima a un segundo plano en su función biológica durante el desarrollo. Sin embargo, ER β puede activarse mediante la fosforilación por Erk, reclutando los complejos transcripcionales en ausencia de estrógenos (Tremblay et al. 1999), por lo que su sobre-expresión podría estar implicada en fenómenos de resistencia a terapias antiestrogénicas. Adicionalmente ER α y ER β pueden formar heterodímeros lo que sugiere una regulación cruzada entre ambos (Ogawa et al. 1998). También se han descrito mutaciones en ER α que le confieren actividad transcripcional en presencia de antagonistas (Ince et al. 1994), proporcionando una explicación alternativa para la resistencia a terapias antiestrogénicas.

2.2.1 Los receptores nucleares como factores de transcripción.

Los receptores nucleares han sido divididos históricamente en tres grupos:

- Receptores Nucleares Tipo I. Esencialmente los clásicos receptores esteroideos e incluyen al receptor de glucocorticoides, el de estrógenos, el de progesterona, el de andrógenos y el receptor mineralocorticoide.
- Receptores Nucleares Tipo II. Normalmente se encuentran en el núcleo sin necesidad de ser activados por ligando, son el receptor de ácido retinoico, el receptor de la hormona tiroidea, el receptor del activador de proliferación del peroxisoma y el receptor de la vitamina D3. Actúan como heterodímeros y se unen a secuencias de repetición RxR.
- Receptores Nucleares Tipo III. Son los llamados receptores nucleares huérfanos y deben su nombre al desconocimiento de sus respectivos ligandos activadores. Incluyen al los receptores relacionados con ER, el receptor esteroideogénico del factor-1, el receptor del inductor del factor crecimiento neural y los receptores de testículos TR2 y R4 son otros ejemplos (Giguere 1999).

Las tres clases, constituyen uno de los grupos más grandes de factores de transcripción. Todos los miembros de esta superfamilia, comparten una serie de dominios estructurales. Estas regiones consisten en un dominio de activación amino-terminal o AF-1, un dominio de unión al DNA (DBD), una región bisagra y un segundo dominio de activación AF-2 que junto con el dominio de unión al DNA delimitan el bolsillo de unión a los ligandos (LBD).

2.2.2 Dominios conservados de ER.

Los receptores ER α y ER β , tienen seis dominios conservados codificados por 8-9 exones. ER α es una proteína constituida por 595 aminoácidos, que le confieren un peso molecular de 66 KDa.

El dominio AF-1 comprende los aminoácidos desde el 41 al 150, se encuentra finamente regulado y cumple un papel fundamental en la actividad de ER. La región situada entre los aminoácidos del 91 al 121 es imprescindible para producir la máxima actividad transcripcional (AF-2) y forma parte del bolsillo de unión a estrógenos (LBD). Esta región ha sido cristalizada en presencia o ausencia de ligando, comprobándose que forma una estructura compacta de 12 alfa-hélices delimitando una oquedad en la que queda envuelto el ligando (Shiau et al. 1998). La unión del ligando altera la conformación del LBD de tal modo que las alfa-hélices 3, 4 y 5 junto con la 12 cierran la entrada al bolsillo de unión de estrógenos a la vez que conforman una hendidura hidrofóbica con la que interaccionan los coactivadores p160 a través de sus motivos LXXLL.

La serina 118 de ER es una diana para la fosforilación en respuesta a señales de crecimiento transmitidas por Erk (Kato et al. 1995). La serinas 104 y 106 son dianas del complejo ciclina A2-Cdk2. Paradójicamente, la transactivación mediada por ciclina A2 ocurre indistintamente tanto con su ligando estradiol como con el tamoxifeno, ya que la acción del tamoxifeno está mediada por AF-1 (McInerney y Katzenellenbogen 1996; Glaros et al. 2006).

2.2.3 Interacción con ERE. Acetilación y metilación de la cromatina.

ER se une a secuencias consenso de DNA, llamadas elementos de respuesta a estrógenos o ERE. La secuencia mínima consenso, consiste en una repetición palindrómica invertida GGTCAnnnTGACC donde n puede ser cualquier nucleótido (Klein-Hitpass et al. 1988). Esta secuencia palindrómica no es siempre constante, de hecho, en la mayoría de los casos presenta variabilidad, siendo éstas modificaciones muy importantes para determinar la afinidad de ER a las secuencias EREs.

Además de la forma clásica o canónica de activación de la transcripción, ER puede aumentar la expresión de genes sin unirse directamente al DNA. En esta otra forma no clásica, ER interacciona con otros factores de transcripción como SP-1 o AP-1 y actúa como coactivador de la transcripción (Porter et al. 1997). La interacción física con el DNA se produce con el surco mayor del dominio DBD de ER, provocando a su vez una curvatura en el DNA. La creación de esta torsión en el DNA facilita la interacción de ER con otros complejos y con coactivadores de la transcripción.

Varios factores modulan la unión de ER a las secuencias EREs. Uno de ellos es la topología del DNA, se ha demostrado que la forma del DNA tiene una importancia vital en el reconocimiento de los NR con sus respectivos HREs. Así, la proteína HMG-1, que reconoce zonas de cromatina irregulares, incrementa la unión de los NR tipo I *in vitro*, mientras que no tiene ningún efecto en la unión de los NR tipo II. La fosforilación de ER es otro factor fundamental de la unión a secuencias EREs. ER se fosforila por diversas quinasas después de interactuar con los estrógenos y esta fosforilación le permite entre otras cosas dimerizarse, interactuar con el DNA y reclutar los complejos para iniciar la transcripción.

2.2.3 Interacción con coactivadores y corepresores.

La maquinaria de transcripción basal está constituida por la RNA polimerasa II, presente en el inicio de la transcripción de todos los genes. Para que la RNA polimerasa II inicie la transcripción, los factores de transcripción basales TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH, se tienen que acoplar al núcleo del promotor del gen que se va a transcribir (Thomas y Chiang 2006). En los genes de respuesta a estrógenos, ER interacciona directamente con los factores TFIIB y TBP (por medio de sus dominios AF-1 y AF-2), y además, con varios factores TAFs. Esta interacción tiene que ser facilitada por otras proteínas, coactivadores y

corepresores, que junto a ER forman complejos reconocidos por esta maquinaria de transcripción basal y que regulan la transcripción.

Se han descrito más de 20 proteínas capaces de interactuar *in vitro* con ER. Se denominan RIPs y los podemos dividir en coactivadores y corepresores según sea el efecto de su interacción sobre cada gen específico.

Algunos ejemplos de coactivadores son CBP/p300/p270, Calmodulina, NCoA-42, RIP149, la familia p160, SWI/SNF, TIF1 α , TRIP1/SUG1. La mayoría de ellos interactúan con ER por el LBD. En el caso de la familia de coactivadores p160, la interacción se produce por el AF-2 del dominio LBD y una región conservada llamada NID o dominio de interacción con receptor nuclear (Featherstone 2002).

Los corepresores tipo NCoR y SMRT fueron identificados por primera vez como proteínas de interacción de receptores nucleares de clase II, RAR, RXR o TR, ya que estabilizaban la unión del NR al DNA de forma constitutiva, reprimiendo la transcripción (Chen y Evans 1995; Kurokawa et al. 1995). A diferencia de los coactivadores, que poseen o reclutan una actividad acetiltransferasas de histonas, una de las funciones de los corepresores es reclutar complejos proteicos con actividad deacetilasa de histonas. Las deacetilasas mantienen compactada la cromatina y dificultan el acceso de los factores de transcripción, reprimiendo así la transcripción.

3. AIB1 y la familia p160 de coactivadores nucleares.

El empaquetamiento del DNA en forma de nucleosomas es un sistema muy efectivo de mantener organizada la cromatina dentro de los núcleos. No obstante, este empaquetamiento supone también serios problemas para procesos como la transcripción de genes y la replicación del genoma. Para que estos procesos puedan tener lugar, se produce un proceso de reestructuración de la cromatina, realizado por un grupo de enzimas llamadas remodeladoras de cromatina. Existen dos grupos:

- Complejos dependientes de ATP. Están relacionados con la localización y asociación de los nucleosomas con el DNA.
- Enzimas que catalizan modificaciones post-traduccionales en histonas. Estas modificaciones constituyen un mecanismo importante de la regulación de la transcripción de genes y de la replicación del genoma. Incluso se postula actualmente sobre su función en la diferenciación celular.

Una de las familias de enzimas remodeladoras de cromatina más estudiadas es la familia p160. Aunque existe una cierta controversia sobre si poseen actividad intrínseca acetiltransferasa, lo que sí está bien demostrado es que son capaces de reclutar a otras

proteínas histona acetiltransferasas como CBP y p300, así como metiltransferasas como CARM1 y PRMT1. Se conocen hasta la fecha 3 miembros en este grupo:

- SRC-1 (coactivador del receptor de esteroides 1) se clonó por primera vez gracias su capacidad de interactuar con los receptores ER, PR, TR (Onate et al. 1995). Se encuentra en el cromosoma 2 de humanos (región p23) y se expresa en multitud de tejidos. Su actividad se ha relacionado fundamentalmente con la sensibilidad a hormonas esteroideas y tiroideas (Weiss et al. 1999). También se ha relacionado con el desarrollo y función del cerebelo (Iannacone et al. 2002), asimismo está implicado en el balance metabólico entre tejido adiposo blanco y pardo (Picard et al. 2002).
- TIF2 (también llamado SRC-2 y GRIP1) se clonó por su capacidad de interactuar con ER y GR. Se encuentra en el cromosoma 8 de humanos (región q21) y al igual que el primer miembro de esta familia su expresión es ubicua. También se ha relacionado con el metabolismo en tejido adiposo blanco y pardo, aunque también se ha demostrado necesario para la espermatogénesis y la fertilidad de ambos sexos.
- AIB1 (también conocido como SRC-3, ACTR, RAC3, p/CIP y TRAM1) se identificó inicialmente como un gen que estaba siendo sobre-expresado en el amplicón 20q, comúnmente activado en cánceres de mama y ovario. Es el único de los tres miembros que está claramente demostrada su implicación en cáncer y en la actualidad se ha visto su sobre-expresión en otros cánceres no ginecológicos como gástrico (Sakakura et al. 2000), páncreas (Ghadimi et al. 1999, Henke et al. 2004), hígado (Wang et al. 2002b) y colon (Xie et al. 2005).

Además de interactuar con receptores nucleares, los coactivadores de la familia p160 pueden interactuar con otros factores de transcripción. SRC-1 y AIB1 coactivan la transcripción mediada por c-myc (Zhang et al. 2004), mientras que todos los miembros de la familia pueden coactivar a NF- κ B (Werbajh et al. 2000; Nojek et al. 2004; Sahar et al. 2007). Las observaciones anteriores confirman que la coactivación de la familia p160 no está restringida exclusivamente a los NRs, resultando imprescindibles para otros muchos procesos fisiológicos.

Las proteínas codificadas por los genes de la familia SRC tienen entre un 50% (SRC-1 y AIB1) y un 55% (TIF2 y AIB1) de similitud en la secuencia y una identidad desde el 43% (SRC-1 y AIB1) al 48% (TIF2 y AIB1) (Xu y Li 2003). Los tres miembros de esta familia comparten los mismos dominios, un dominio bHLH/PAS en la zona amino-terminal, siete dominios LXXLL distribuidos por toda su secuencia y en el extremo carboxi-terminal dos dominios de activación de la transcripción AD1 y AD2 (véase 3.1.1).

3.1 Función biológica de AIB1.

El gen de AIB1 se encuentra en humanos en el cromosoma 20 (región q12). Su transcripción se realiza en el sentido centrómero a telómero, a lo largo de más de 155 kilobases, que conforman 23 exones. La proteína AIB1 está codificada por 1424 aminoácidos, con un peso molecular de 155 kDa y una movilidad electroforética de unos 180 kDa. Mediante técnica de “Northern blot” se ha detectado su expresión en multitud de tejidos: útero, pituitaria, placenta, riñón, páncreas, pulmón, cerebro, hígado, corazón, glándulas mamarias y testículos. Sin embargo, mediante tinciones de inmunohistoquímica con LacZ como gen repotero en un modelo “knock-in” se ha demostrado que AIB1 se expresa principalmente en células epiteliales de mama, oocitos, la capa epitelial vaginal, hepatocitos, células de la musculatura lisa, vasos sanguíneos, oviductos y hipocampo (Xu et al. 2000).

Las funciones biológicas de los distintos miembros de la familia p160 han sido estudiadas mediante el análisis de modelos murinos “knockout”. Los animales “knockout” para AIB1 revelaron fenotipos con retraso en el desarrollo y el crecimiento, además de un funcionamiento anormal del tejido adiposo blanco (Louet et al. 2006). Interesantemente, los distintos fenotipos observados en modelos “knockout” entre los miembros de la familia p160, sugieren que, aunque en ocasiones sus funciones se puedan compensar, los miembros de ésta familia poseen funciones distintas y específicas *in vivo*. En concreto, AIB1 resulta esencial en el desarrollo y el crecimiento normal, pubertad, sistema reproductor femenino y morfogénesis de la glándula mamaria (Xu et al. 2000).

3.1.1 Estructura y dominios funcionales

AIB1 posee dominios estructurales conservados bien definidos. Hasta hoy en día se han descrito cinco dominios conservados en AIB1 que también se encuentran en los otros 2 miembros de la familia p160.

- Dominio bHLH/PAS, hélice vuelta hélice/PAS, fue originalmente identificado en las proteínas Per, Arnt y Sim de *Drosophila*, donde está implicado en la unión al DNA y la heterodimerización de proteínas que contienen dicho motivo (Huang et al. 1993). La presencia de éste dominio posibilita la interacción funcional no sólo entre los miembros de la familia p160, sino además entre otros factores de transcripción que contengan dominios PAS. AIB1 interacciona con factores de transcripción por medio de este dominio, como por ejemplo con TEF-4, un miembro de la familia de factores de transcripción TEF (Belandia y Parker 2000).
- Dominio rico en serinas y treoninas. En este dominio se encuentran multitud de aminoácidos susceptibles de ser fosforilados. Las modificaciones post-traduccionales juegan un papel fundamental en la modulación de la actividad de AIB1 (Wu et al. 2004).

- Dominio central RID, con múltiples secuencias LXXLL (donde L, leucina y X, cualquier otro aminoácido) responsables de la interacción con el receptor unido a ligando (Torchia et al. 1997). El análisis de la estructura secundaria de las secuencias LXXLL muestra que éstas forman hélices anfipáticas donde las leucinas crean una superficie hidrofóbica. Diferentes motivos LXXLL muestran diferentes afinidades por los distintos factores de transcripción. Mutaciones puntuales en residuos conservados de este motivo LXXLL son suficientes para inhibir la interacción de AIB1 con ER por su dominio AF-2 (Heery et al. 1997).

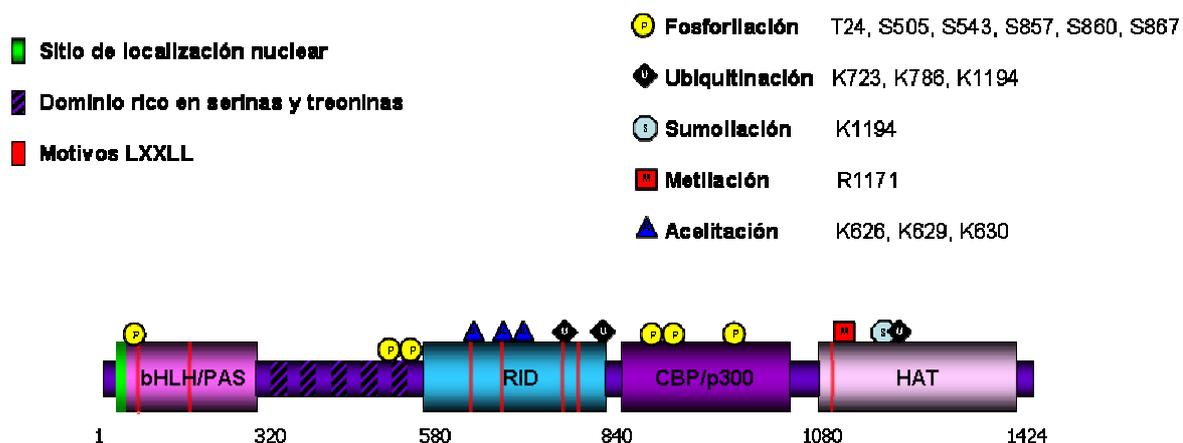


Figura 1. Estructura de la proteína AIB1. Se muestran los distintos dominios funcionales así como las modificaciones post-traduccionales descritas en la actualidad.

- Dominios de activación 1 y 2. Los dominios de activación son responsables de la interacción con coactivadores generales de la transcripción como CBP/p300 (Li et al. 2000). Mutaciones puntuales en estos sitios disminuyen significativamente la unión a estos complejos y la activación de la transcripción. El AD1 interacciona con los coactivadores CBP/p300, mientras que el AD2 se caracteriza por reclutar a las metiltransferasas CARM1/PRMT1. AIB1 estabiliza estos complejos incipientes en los promotores activos, jugando un papel crucial en el remodelado de la cromatina y ensamblaje final de toda la maquinaria de transcripción que acompaña a la RNA polimerasa II (Liao et al. 2002).
- Dominio HAT. Se ha propuesto que el dominio carboxi-terminal de AIB1 posee actividad acetiltransferasa de histonas. AIB1 no sólo es capaz de reclutar enzimas con capacidad HAT, como CBP/p300 o p/CAF, sino que por sí solo es capaz de acetilar histonas, con una particular afinidad por la H3 e H4 (Chen et al. 1997). Sin embargo, ésta capacidad HAT es sustancialmente más débil que la producida por los complejos CBP/p300 (Spencer et al. 1997).

3.1.2 Formación secuencial del complejo de transcripción.

Distintas rutas activadas por factores de crecimiento o citoquinas, convergen en fosforilaciones activantes que inducen la translocación de AIB1 al núcleo. En el núcleo AIB1 se asocia a proteínas con actividad histona acetiltransferasa (CBP/p300 y p/CAF), y con actividad histona metiltransferasas (CARM1 y PRMT1) (Kamei et al. 1996; Koh et al. 2001). La asociación y acercamiento a la cromatina de estos complejos está promovida por interacciones con el factor de transcripción activado por unión a la hormona y localizado en las regiones promotoras. Un tercer complejo remodelador de cromatina reclutado es el SWI/SNF, que produce acetilaciones de histonas de manera dependiente de ATP, provocando cambios en la morfología del DNA (Huang et al. 2003). A continuación es reclutado el complejo mediador TRAP, cuya misión es comunicar directamente al complejo formado por AIB1/CBP/p300 con la maquinaria de transcripción basal (Shang et al. 2000).

Todos estos eventos resultan en una modificación local de la estructura de la cromatina, lo que facilita la adhesión de toda la maquinaria transcripcional. Por último, para un inicio transcripcional satisfactorio, se requiere la formación del complejo de preiniciación o PIC, constituido por la RNA polimerasa II junto con los factores iniciadores de la transcripción como TBP y la familia TAFII formada por un total de seis miembros (TFIIA-F) (Chen y Hahn 2004). AIB1 cumple por tanto un papel crucial en el remodelado y reestructuración de la cromatina, procesos previos y fundamentales en el inicio de la actividad transcripcional.

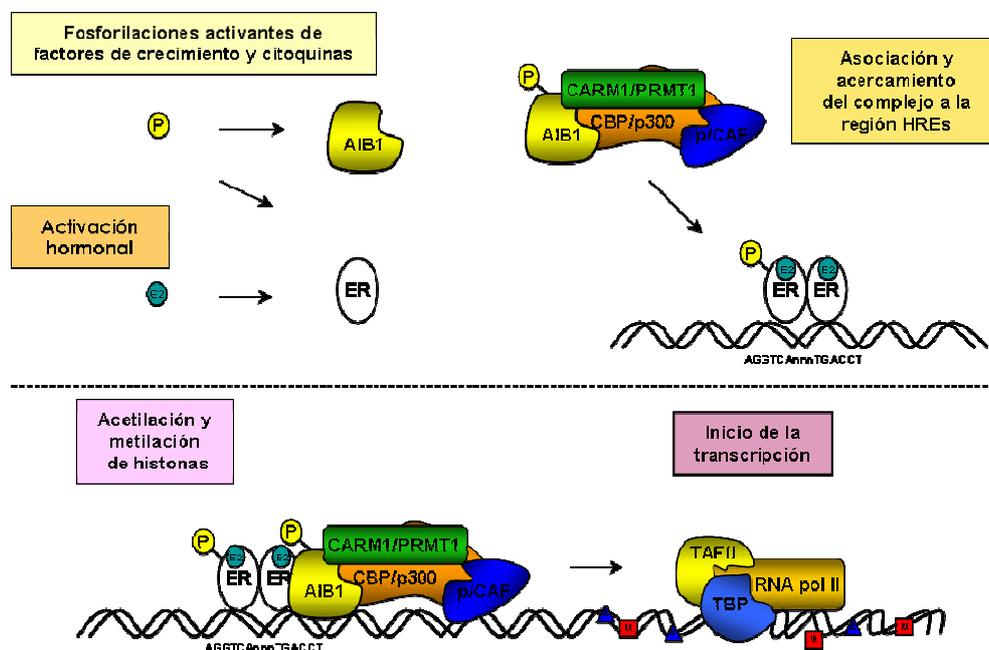


Figura 2. Formación secuencial del complejo de transcripción. Modelo clásico funcional de AIB1. Factores de crecimiento, citoquinas y hormonas inducen la transcripción mediada por AIB1 y el receptor de estrógenos, ER, de genes con secuencias de elementos de respuesta a estrógenos, ERE.

3.2 AIB1 como diana de factores de crecimiento.

La promiscuidad de AIB1 como coactivador de múltiples factores de transcripción y su capacidad de ser modificado post-traduccionamente por distintas rutas activadas por factores de crecimiento y citoquinas lo convierten en una proteína clave sobre la que giran muchas funciones celulares.

En condiciones de crecimiento normal, AIB1 se encuentra en el núcleo. Sin embargo, cuando cultivos celulares son privados de factores de crecimiento mediante la eliminación del suero, AIB1 se localiza en el citoplasma (Wang et al. 2000). La estimulación con IGF-I de células privadas de suero restituye la localización nuclear de AIB1. Esta redistribución está modulada por receptores tirosina quinasa como IGF-IR, ya que el tratamiento con ácido ocadaico, inhibidor de fosfatasa como PP2A o PP1, bloquea la actividad de IGF-IR e impide este proceso (Wang et al. 2000). Estudios previos demostraron que AIB1 es fosforilado directamente por MAPK, aumentando su actividad transcripcional dependiente de ER (Font de Mora y Brown 2000). Por tanto, AIB1 funciona como conexión entre la señalización de factores de crecimiento mediada por quinasas y la transcripción mediada por receptores nucleares.

AIB1 se ha relacionado con la respuesta inmune e inflamatoria, ya que es capaz de interactuar con IKK, la quinasa responsable de la fosforilación de I κ B (Wu et al. 2002). La importancia de la función biológica de I κ B está relacionada con la capacidad de secuestrar en el citosol al factor de transcripción NF- κ B. En respuesta a citoquinas como TNF α o interleuquina-1, I κ B se fosforila y degrada, dejando a NF- κ B libre, lo que provoca la translocación de éste factor al núcleo en donde transcribe genes diana (véase 4.3). Además, AIB1 es fosforilado por IKK en respuesta a citoquinas como TNF α o interleuquina-1, lo que amplifica la expresión de los genes diana de NF- κ B por su capacidad de coactivarlo, como por ejemplo el factor regulador de interferón 1 (Wu et al. 2002).

3.2.1 Inducción de la migración.

Además de la clásica función de AIB1 como coactivador de ER, los resultados más recientes sugieren una función celular mucho más compleja. AIB1 tiene capacidad de coactivar otros factores de transcripción como NF- κ B (Werbajh et al. 2000), E2F1 (Louie et al. 2004), CREB (Torchia et al. 1997) o AP-1 (Li et al. 2007b). AIB1 también se encuentra asociado al promotor de genes importantes en migración, proliferación y supervivencia celular como son los genes de ciclina D1, c-myc y cadherina E (Planas-Silva et al. 2001; Shang et al. 2002).

Los primeros indicios que evidencian una clara implicación de AIB1 en migración se observaron en *Drosophila* con Taiman, el gen hortólogo de AIB1. Se observó que mutaciones

en el gen de Taiman afectaban a la movilidad de células foliculares específicas en el desarrollo del ovario de *Drosophila* (Bai et al. 2000). Además, estas células mutadas tenían unos niveles anormalmente elevados en proteínas implicadas en migración como cadherina E y β -catenina (España et al. 2004, Fernandez et al 2000).

Estas evidencias fueron extrapoladas a humanos, donde se ha demostrado que AIB1 tiene la capacidad de promover la migración en células de cáncer de ovario, independientemente de su papel como coactivador de ER (Yoshida et al. 2005). Se ha demostrado además que AIB1 tiene la capacidad de inducir la expresión de proteínas implicadas en migración, como cadherina E (Avivar et al. 2006). Cadherina E está implicada en la adhesión célula-célula y su desregulación está relacionada con la transición epitelio-mesénquima que acompaña a la transformación de las células epiteliales en la progresión tumoral. Además, sirve de reservorio de β -catenina, factor de transcripción que estimula el crecimiento y la diferenciación.

Otras evidencias apuntan al importante papel de AIB1 en migración, como es la capacidad de inducir la sobre-expresión de metaloproteasas como MMP-7 y MMP-1, que reducen la adhesión celular a proteínas específicas de la matriz extracelular (Li et al. 2007b). La regulación de AIB1 sobre éstas metaloproteasas es consecuencia de la coactivación de AP-1, un factor de transcripción ampliamente estudiado en proliferación, supervivencia y muerte celular (Angel y Karin 1991). AP-1 es un complejo transcripcional constituido por homodímeros de Jun o heterodímeros de Jun con Fos o ATF. Su función es crucial en la regulación del ciclo celular, regulando la expresión de genes clave como ciclina D1, p53, p21^{cip1}, p19^{ARF} o p16 (Shaulian y Karin 2001).

3.2.2 Inducción de la proliferación.

E2F1 es un factor de transcripción que se une al DNA a través de secuencias consenso 5'TTTC(GC)GCGC3' (Sidle et al. 1996). Esta secuencia consenso se encuentra en las regiones promotoras de numerosos genes implicados en la progresión del ciclo celular de G1 a S y en la transcripción de genes implicados en la replicación del DNA. AIB1 interacciona físicamente con el extremo amino-terminal de E2F1, coactivando la expresión de genes de respuesta a E2F e induciendo, por tanto, la proliferación y el crecimiento (Louie et al. 2004).

CREB es un factor de transcripción perteneciente a una gran familia de factores nucleares activadores o represores. Los miembros de ésta familia se caracterizan por poseer un dominio CRE, elemento de respuesta a cAMP. CREB regula la transcripción de genes en respuesta a numerosas señales extracelulares como neurotransmisores y hormonas (Della Fazio et al. 1997). AIB1 interacciona con CBP, proteína de unión a CREB, resultando crítico

en la transcripción de genes dependientes de receptores nucleares, activando y promoviendo la proliferación celular (Wang et al. 2000, Turnell et al. 2005).

Asimismo, AIB1 puede ser reclutado en el promotor de ciclina D1, promoviendo la expresión de dicha ciclina (Planas-Silva et al. 2001, Avivar et al. 2006). La ciclina D1 es un regulador clave en el ciclo celular que está implicado en la transición de la fase G1 a S y que se encuentra sobre-expresado en varios tipos de cánceres (Tashiro et al. 2007). Además de su actividad como regulador del ciclo celular, la ciclina D1 actúa como un coactivador de otros factores de transcripción y proteínas remodeladoras de cromatina como p/CAF o SRC-1 (Coqueret 2002). Curiosamente, la sobre-expresión de ciclina D1 se produce en etapas tempranas del desarrollo del cáncer de mama sugiriendo que su sobre-expresión está ligada a la activación de ER mediada por ligando (Alle et al. 1998). AIB1 puede ser considerado como un nuevo intermediario responsable de favorecer la progresión tumoral de los cánceres que sobre-expresan ciclina D1 (Planas-Silva et al. 2001).

Por otro lado, AIB1 activa la transcripción de la proteína c-myc, un potente estimulador de la proliferación y crecimiento celular (Alle et al. 1998). C-myc es un marcador tumoral en cáncer de mama. Su expresión responde a la estimulación por estrógenos y su sobre-expresión resulta en un incremento de la proliferación celular en cáncer de mama (Alle et al. 1998). La amplificación de AIB1 y c-myc poseen un alto valor pronóstico, no sólo en cáncer de mama sino en otros tipos de como el cáncer de hígado (Wang et al. 2002b).

AIB1 interacciona también con el factor de transcripción NF- κ B. La coactivación de este factor de transcripción es muy importante no sólo para la respuesta inflamatoria e inmune, sino también para el crecimiento y la supervivencia celulares. AIB1 responde a citoquinas como TNF α a través de NF- κ B, siendo activado y fosforilado por intermediarios de esta ruta y translocándose seguidamente al núcleo. La coactivación de NF- κ B por AIB1 favorece la transcripción de genes importantes en crecimiento y proliferación celular como ciclinas D y E, c-myc (Duyao et al. 1990; Guttridge et al. 1999), genes implicados en la adhesión celular como fibronectina (Lee et al. 2002) o factores de crecimiento como p53, Twist o Snail (Wu y Lozano 1994; Horikawa et al. 2007). Por tanto, la expresión de genes diana de NF- κ B mediada por AIB1 abarca un amplio conjunto de procesos celulares relacionados con la supervivencia y la proliferación celulares.

3.3 Desregulación de AIB1 en cáncer de mama.

Inicialmente se asignó a AIB1 un papel esencial como coactivador de receptores de hormonas esteroideas y su sobre-expresión en cánceres parecía coincidir con la positividad de ER y PR. En uno de los primeros trabajos en los que se relacionó directamente a AIB1 con el cáncer de mama, se observó que de 11 líneas de cáncer de mama estudiadas 4 contenían

amplificación y sobre-expresión de AIB1, curiosamente las cuatro líneas encontradas eran también positivas para el marcador tumoral ER (Anzick et al. 1997). En otro estudio se analizaron 1157 cánceres de mama y 122 de ovario observándose la amplificación de AIB1 en tan solo el 5% y 7% de ellos respectivamente (Bautista et al. 1998). En la gran mayoría de los casos, la amplificación de AIB1 coincidía con la sobre-expresión de ER y PR, lo que parecía indicar una clara correlación entre amplificación de AIB1 y positividad para receptores esteroideos. Posteriormente, se ha demostrado la sobre-expresión del coactivador en cánceres de mama ER negativos (Bouras et al. 2001). Es decir, existen otros mecanismos de sobre-expresar AIB1 distintos de la amplificación cromosómica. La sobre-expresión de AIB1 se ha observado también en otros cánceres ginecológicos como el cáncer de próstata, endometrio y ovario (Li et al. 2005; Zhou et al. 2005).

Resulta particularmente interesante la coincidencia de la sobre-expresión de AIB1 con la del receptor Her2/neu en cáncer de mama invasivo. Cuando se sobre-expresa tanto AIB1 como Her2/neu se obtiene un peor pronóstico y además, esta co-expresión va acompañada de fenómenos de resistencia a terapias antiestrogénicas como el tamoxifeno (Osborne et al. 2003). Her2/neu señala, entre otras, por la ruta de Erk, por lo que la sobre-expresión de Her2/neu conduce a una hiper-activación de AIB1 incrementando así su capacidad oncogénica (Font de Mora y Brown 2000).

3.4 AIB1 como agente antiapoptótico.

Numerosas evidencias demuestran el importante papel de AIB1 en la regulación de la apoptosis. Estudios en MCF-7 y células epiteliales primarias de mama han revelado que la eliminación de la expresión de AIB1 produce una reducción de la proliferación celular acompañada de un aumento significativo de la apoptosis (Torres-Arzayus et al. 2004). Otras observaciones en muestras de tumores de próstata que sobre-expresan AIB1 apoyan el papel de AIB1 como agente represor de la apoptosis (Zhou et al. 2005).

En células de leucemia mieloide crónica K562, donde AIB1 se encuentra sobre-expresado, el silenciamiento del coactivador sensibiliza a la apoptosis mediada por TRAIL (Colo et al. 2007). FasL, TNF α y TRAIL, son los ligandos de una familia de receptores citoplasmáticos que contienen los llamados dominios de muerte. La unión de estas moléculas a sus receptores específicos causan la oligomerización del receptor, desencadenando la activación de caspasas, proteínas efectoras de la apoptosis. En este caso, AIB1 funciona como una proteína antiapoptótica, siendo necesaria para la resistencia a TRAIL en la línea K562 de leucemia mieloide crónica.

Como hemos visto anteriormente, AIB1 está implicado en numerosas vías de señalización. Una de ellas es la ruta celular JNK/c-Jun. Se ha demostrado que el silenciamiento de la expresión de AIB1 produce un aumento en la fosforilación de JNK y c-

Jun, resultando en la inhibición de la replicación del DNA y en un aumento de la apoptosis (Horiguchi et al. 2006). Por tanto, podríamos concluir que AIB1 cumple un papel importante no sólo en crecimiento y proliferación, sino también en apoptosis y muerte celular. Estas funciones biológicas se encuentran muy finamente reguladas y en un delicado equilibrio. Así, cabe prever que cambios sutiles en la regulación de AIB1 pueden provocar efectos drásticos en la célula.

4. Rutas de señalización que regulan a AIB1.

Numerosos estudios revelan que AIB1 es una molécula regulada por distintas rutas de transducción de señales activadas por citoquinas, factores de crecimiento y hormonas, convirtiéndose en un punto de encrucijada clave que regula la respuesta a estas señales. Por ello, no es de extrañar que AIB1 esté implicado en los procesos celulares más básicos como proliferación, apoptosis, metabolismo, migración y diferenciación. La sobre-expresión y/o la hiper-activación de AIB1 son fenómenos que acompañan a la tumorigénesis y la progresión tumoral. En estos casos se produce una exacerbación de las señales mitogénicas y antiapoptóticas mediadas por AIB1.

4.1 AIB1 y factores de crecimiento.

El análisis de ratones “knockout” ha revelado el papel esencial que desempeña AIB1 en el eje reproductor (Xu et al. 2000) y en el crecimiento (Wang et al. 2000). De todo el conjunto de hormonas y factores de crecimiento analizados, se observó que los ratones deficientes en AIB1 poseen bajos niveles circulantes de IGF-I así como un menor tamaño corporal. Los ratones “knockout” de IGF-I no son viables. IGF-I es un factor de crecimiento esencial, estrechamente relacionado con otros factores de crecimiento y hormonas relacionadas con crecimiento y metabolismo: insulina e IGF-II. El sistema de IGF-I está implicado en numerosos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de mama, próstata, colon, páncreas e hígado (Hankinson et al. 1998). Por otro lado, la sobre-expresión de AIB1 en la mama del ratón produce un aumento de los niveles paracrinos de IGF-I (Torres-Arzayus et al. 2004), mientras que la ausencia de AIB1 resulta en una disminución de la señalización de IGF-I y una resistencia a la formación de tumores (Kuang et al. 2004). Estos resultados sugieren que IGF-I puede ser un mediador muy importante de la oncogenicidad inducida por AIB1. Adicionalmente, se ha descrito un mecanismo de retroalimentación por el que la síntesis de IGF-I mediada por AIB1 repercute nuevamente en AIB1 activándolo a través de moléculas clave en la señalización de IGF-I como Erk y Akt (Font de Mora y Brown 2000; Torres-Arzayus et al. 2004; Ferrero et al. 2008, en prensa).

Los efectos de IGF-I están mediados por el IGF-IR, un receptor de membrana con actividad tirosina quinasa. El receptor IGF-IR estimula el crecimiento de muchos tejidos, entre ellos el tejido epitelial de glándula mamaria, inhibiendo la degradación proteica y activando la oxidación de grasas (Webster et al. 1996). Pero IGF-IR también estimula la proliferación, supervivencia y metástasis de las células cancerosas. Además, está implicado en apoptosis y diferenciación mediada por p53 ya que este gen supresor de tumores puede reprimir la expresión de IGF-IR.

EGF es un factor de crecimiento clave para promover supervivencia celular. EGF se une a la familia de receptores ErbB transduciendo la señal a través de rutas cuya respuesta va a depender de: la cantidad de EGF extracelular, el nivel de expresión del receptor ErbB y la modulación positiva o negativa de múltiples intermediarios que translucen por dichas rutas. AIB1 se encuentra entre ellos (Font de Mora y Brown 2000). Uno de los miembros de ésta familia de receptores es la tirosina quinasa ErbB2 también llamado Her2/neu, frecuentemente sobre-expresado en cánceres de mama (Ross y Fletcher 1998). AIB1 es fosforilado por señales provenientes de Her2/neu y la sobre-expresión de ambos está relacionada con los peores pronósticos en cáncer de mama. De forma análoga a lo observado en la ruta de IGF-I, la eliminación de AIB1 reduce la fosforilación de Her2/neu en tirosinas específicas lo que conlleva una reducción de la fosforilación y activación de STAT5 y de JNK pero no de Akt (Lahusen et al. 2007). Estos resultados sugieren una activación recíproca entre ambos oncogenes.

Un último grupo de factores de crecimiento implicados en la actividad de AIB1 es el formado por la superfamilia de TGF- β , compuesta por tres grupos: TGFs, activinas y BMPs (Derynck y Zhang 2003). Este grupo de factores de crecimiento fosforilan y activan a las proteínas Smads, translocándose al núcleo e iniciando la transcripción de genes diana implicados en la regulación del ciclo celular y apoptosis (van Grunsvan et al. 2005). La actividad de TGF- β induce la expresión de AIB1, mientras que 17- β -estradiol la disminuye (Lauritsen et al. 2002). Estos resultados han llevado a proponer que los compuestos antiestrogénicos pueden desplazar el comportamiento proliferativo de las células dependientes de estrógenos para proliferar mediante el aumento de los niveles celulares de AIB1, pudiendo jugar un papel importante en la resistencia a la terapia y en la progresión tumoral.

4.2 Respuesta a hormonas.

La implicación de la hormona 17- β -estradiol (E2) en la proliferación y supervivencia del epitelio normal y transformado de mama, ha sido extensamente estudiada (Russo y Russo 2006). Notablemente, estudios recientes atribuyen al E2 la capacidad de provocar

cambios genómicos y fenotípicos en el epitelio normal de mama, confirmando la importancia de esta hormona esteroidea en el inicio de la tumorigénesis (Huang et al. 2007). Los efectos biológicos del E2 están mediados por los receptores nucleares ER α y ER β que, una vez activados, se unen a secuencias ERE de genes diana constituyendo el modelo clásico de transcripción de genes mediada por ligando. Sin embargo, un tercio de los genes regulados por estrógenos no contienen ERE, constituyendo un sistema paralelo de regulación de la expresión génica.

Los estrógenos modulan la actividad de AIB1 mediante dos rutas de señalización. La ruta clásica de señalización, también llamada genómica, está mediada por el receptor nuclear ER α , en la que la activación de AIB1 conduce al reclutamiento de la maquinaria transcripcional y la expresión de genes de respuesta a estrógenos. Recientemente se ha descrito la llamada señalización no genómica del E2, en la que el dominio LBD de ER α activado y unido a la membrana plasmática activa la señalización de Ras y PI3K a través de la activación de la quinasa Src (Edwards 2005). Trabajos recientes demuestran la capacidad de E2 de promover la asociación del complejo AR/ER/Src, promoviendo la transducción de la señal dependiente de Src. El bloqueo de las secuencias implicadas en la formación de dicho complejo previenen la estimulación de las rutas Src/Erk, la expresión de ciclina D1 y la progresión del ciclo celular (Auricchio et al. 2008). Activaciones análogas ER/MAPK han sido igualmente constatadas (Atanaskova et al. 2002). Estamos por tanto, ante mecanismos moleculares hasta ahora no descritos, en los que la señalización no genómica de ER cumple un papel esencial.

Hormonas como la progesterona o la insulina, modulan la actividad de AIB1 a distintos niveles. La progesterona, a través del receptor nuclear PR, puede modular la actividad transcripcional de AIB1 de forma análoga al E2 (Han et al. 2006). La insulina en cambio, induce la autofosforilación del receptor de insulina, activando los sustratos IRS que activan cascadas de señalización de Ras-MAPK y PI3K/Akt (Saltiel y Kahn 2001). La insulina conduce a la fosforilación de Akt, quinasa clave en la progresión del ciclo celular y en la prevención de apoptosis. En cáncer, la desregulación de ésta vía provoca una hiperactivación de Akt (Altomare y Testa 2005), sobre-activando entre otros intermediarios a AIB1 y facilitando el crecimiento y la progresión tumoral.

4.3 Respuesta a citoquinas.

TNF α es una citoquina clásicamente implicada en inflamación, inmunidad y organización celular. La capacidad de disminuir la vascularización del tumor y aumentar la apoptosis en células patológicas ha permitido relacionar a TNF α con cáncer. La familia de receptores TNF, forman un amplio grupo de proteínas receptoras de señales extracelulares

necesarias para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune. Estas señales celulares están implicadas en la activación de múltiples moléculas señalizadoras como NF- κ B, JNK, p38 o PI3K (Balkwill 2006).

NF- κ B es un factor de transcripción activado en respuesta a citoquinas como TNF α o IL-1. Además de su papel en la respuesta inmune e inflamación, NF- κ B regula la expresión de genes que controlan la progresión en el ciclo celular y la supervivencia. La forma inactiva de NF- κ B se encuentra en el citoplasma, asociada a proteínas inhibitoras de la familia de I κ B. Señales extracelulares confluyen en la fosforilación de I κ B, marcándolo al inhibidor para su degradación proteasomal y dejando libre a NF- κ B. Éste se transloca al núcleo donde promueve la transcripción de un amplio y heterogéneo grupo de genes diana como Bax, XIAP, Bcl-X_L, p53, c-myc, Twist o Snail. La expresión de NF- κ B se ha encontrado aumentada en varios tipos de cáncer, jugando un papel importante en la progresión del cáncer, promoviendo proliferación y migración así como inhibiendo la apoptosis (Hayden y Ghosh 2008).

AIB1 interacciona físicamente con NF- κ B (Werbajh et al. 2000), favoreciendo la transcripción de genes inducida por TNF α . Se ha demostrado que la actividad transcripcional de AIB1 está regulada por fosforilaciones específicas, algunas de las cuales están inducidas por quinasas activadas por TNF α . Por este motivo, tratamientos con TNF α promueven la fosforilación de AIB1 modulando su actividad (Wu et al. 2004). El patrón de fosforilación que experimenta AIB1 es distinto según sea la señal que lo provoca, respondiendo de forma distinta y específica a cada ruta de señalización. La fosfo-conformación producida por las rutas activadas por TNF α marca a AIB1 para la coactivación de NF- κ B.

5. Ciclo celular.

El ciclo celular comprende una serie de eventos, finamente controlados, que conducen a la replicación del DNA y a la división celular. Es un proceso que en células de mamíferos puede tardar de 12 a 24 horas. Se divide en cuatro fases, una primera fase G1 de crecimiento celular que suele ser la fase más larga; una fase S de síntesis en la que se duplica el DNA; una fase G2 en la que se determina si la célula puede entrar en mitosis y por último una fase M, en la que tiene lugar la mitosis celular (Lundberg y Weinberg 1999).

El mecanismo que regula la progresión entre estas fases está constituido por dos componentes básicos, las quinasas dependientes de ciclinas o Cdks, cuyos niveles se mantienen relativamente constantes durante todo el ciclo celular y las ciclinas, que por el contrario se sintetizan y degradan según las distintas fases del ciclo celular. Las Cdks son serina-treonina quinasas que se regulan por tres mecanismos distintos: fosforilaciones activantes e inactivantes, unión a inhibidores (Ckis) y unión a sus respectivas ciclinas

específicas necesarias para la formación de los complejos activos (Morgan 1997). Así, durante la fase G1 los complejos predominantes en la célula son ciclina D-Cdk4/6 y ciclina E-Cdk2. Durante la fase S prevalece el complejo ciclina A-Cdk2 y por último en fase G2 y M se encuentran activos los complejos ciclina A-Cdk2 y finalmente ciclina B-Cdk1.

Las células cancerosas proliferan descontroladamente, en parte por su capacidad de evadir los “checkpoints” o puntos de control que sirven para decidir si la célula puede continuar con la siguiente fase del ciclo o no. En situaciones de daño al DNA y otras anomalías importantes que conducen al estrés celular, existen mecanismos que paran el ciclo en los “checkpoints” para que la célula intente reparar la situación crítica en la que se encuentra. En caso de que la célula no pueda solventar el problema, tomará la decisión de auto-suicidarse o apoptosis. La actividad anormal de las Cdks puede ir acompañada de la amplificación y sobre-expresión de ciclinas (Buckley et al. 1993) y la inactivación de inhibidores de ciclo que controlan los “checkpoints” (Lilischkis et al. 1996). La ventaja selectiva de supervivencia de las células cancerosas puede ser también consecuencia de la amplificación o sobre-expresión de receptores de factores de crecimiento (Ross y Fletcher 1999), mutaciones en genes implicados en los “checkpoints” (Fiscella et al. 1993) o desregulación de genes relacionados con la apoptosis. Por tanto, el estudio exhaustivo de los mecanismos que controlan el ciclo celular así como las proteínas que controlan dichos procesos resultan de un alto interés clínico como posibles dianas de tratamiento terapéutico en cáncer.

5.1 Proteínas que regulan el ciclo celular.

Los reguladores clave del ciclo celular se agrupan en tres subfamilias de proteínas: Cdks, ciclinas y Ckis. Las interacciones y el equilibrio funcional entre dichas subfamilias resultan esenciales para la correcta progresión del ciclo celular.

Existe una fase de reposo celular, externa al ciclo celular llamada G0 o fase de quiescencia. En esta fase la célula no se divide, y permanece en este estado a la espera de señales que activen su entrada en ciclo. Cuando la célula es estimulada por factores mitogénicos entra en la fase G1 del ciclo celular, donde la ciclina D1 juega un papel crucial. Basta un estímulo mitogénico durante los primeros 2/3 de la fase G1 del ciclo celular para que continúe progresando en el ciclo (Pardee 1974). Esta observación sugiere la existencia de un punto de control o “checkpoint” R, pasado el cual la célula decide irrevocable e irreversiblemente continuar con el ciclo celular. En esta progresión juega un papel muy importante la ciclina D1, que a través de su Cdk fosforila a Rb, importante gen supresor que bloquea el ciclo al inhibir al factor de transcripción E2F. A medida que Rb se va fosforilando, va perdiendo su afinidad por E2F, el cual al quedar libre de su inhibidor va activando la

transcripción de los genes necesarios para la entrada en la fase S, entre ellos la ciclina E (Weinberg 1995).

Las ciclinas E1 y E2, actúan en la fase G1 tardía, activando al complejo Cdk2 y fosforilando en última instancia a Rb y a una serie de proteínas implicadas en la replicación del DNA. La inducción transcripcional de esta serie de proteínas se ve favorecida por la acción del complejo ciclina A-Cdk2. La ciclina A se va acumulando en la fase S del ciclo celular. Numerosas aproximaciones experimentales sugieren que Cdk2 conmuta su asociación con la ciclina E por la ciclina A, que se encuentra ahora en exceso. El complejo ciclina A-Cdk2 se transloca al núcleo a comienzos de la fase S, promoviendo la expresión de proteínas necesarias para la finalización y salida completa de la fase S.

El inicio de la fase G2 coincide con la asociación de ciclina A a Cdk1. La fase G2 prosigue con la degradación de ciclina A mediada por ubiquitina mientras que ciclina B es sintetizada activamente. Cdk1 presenta mayor afinidad por ciclina B, a la que se une formando el complejo ciclina B-Cdk1 que posee la capacidad de fosforilar a más de 70 proteínas diana durante la transición G2 a M. Por último, los complejos ciclina B/Cdk1 citoplasmáticos se asocian a los centrosomas durante la profase, promoviendo la separación de los mismos mediante la fosforilación de Eg5, proteína motora necesaria para la ejecución correcta de la mitosis. El complejo APC actúa a este nivel, completando la mitosis al degradar a ciclina B (Malumbres y Barbacid 2005).

Los inhibidores de Cdks constituyen una forma muy particular de regular el ciclo y su expresión está frecuentemente alterada en tumores. Se conocen dos grupos de Ckis. El primer grupo está constituido por la familia INK4, a la que pertenecen p16^{Ink4a} y p19^{Ink4d}, cuya función consiste básicamente en competir con las ciclinas D y A por las sub-unidades Cdk4 y Cdk6. El segundo grupo es el de la familia Cip/Kip, a la que pertenecen p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p51^{Kip2} y su función celular principal consiste en la unión e inhibición de la actividad quinasa de Cdk4 y Cdk2.

5.2 AIB1 como un regulador del ciclo celular.

Estudios recientes han revelado distintas funciones de AIB1 en la progresión del ciclo celular durante G1. Además de coactivar a ER en el promotor transcripcionalmente activo de ciclina D1 (Planas-Silva et al. 2001), AIB1 coactiva al factor de transcripción E2F1 favoreciendo la progresión del ciclo celular e implicado en la síntesis de ciclina A (Louie et al. 2006). Nuestros resultados han demostrado que AIB1 se nucleariza en células no cancerosas del epitelio mamario cuando éstas pasan por la fase S del ciclo celular (Avivar et al. 2006), sugiriendo que AIB1 cumple también una función durante o después de la fase S. En este sentido, otros autores también han encontrado que AIB1 facilita la replicación del DNA a través de JNK y Akt (Horiguchi et al. 2006).

Una vía clave en la regulación del ciclo celular es la ruta de Raf/MEK/Erk activada por RTKs a través del oncogén Ras. Parte de la actividad oncogénica de AIB1 se atribuye a la hiperactivación de esta ruta de señalización (Font de Mora y Brown 2000). Adicionalmente, la ruta Raf/MEK/Erk induce la expresión transcripcional de la ciclina D1 y la degradación de p27^{Kip1}. La sobre-expresión de AIB1 también produce un incremento de los niveles de ciclina D1 (Avivar et al. 2006), por lo que existe un efecto sinérgico entre ambas rutas que converge en un incremento importante de los niveles de ciclina D1.

La ruta de PI3K/Akt está activada también por RTKs, resultando en la fosforilación de sustratos implicados en la transición de G1 a S. AIB1 participa de esta señalización a distintos niveles. Por un lado se ha demostrado que AIB1 está implicado en promover el ciclo celular a través de Akt (Horiguchi et al. 2006). Por otro lado Akt fosforila e inhibe a GSK3 β , que promueve la degradación de ciclinas D1 y E. , GSK3 β fosforila a AIB1 y lo marca para degradar por la ruta de ubiquitina proteasoma (Wu et al. 2007). Sin embargo, Akt interviene independientemente de GSK3 β inhibiendo la ubiquitinización de AIB1 y estabilizándolo. Akt fosforila también a p27^{Kip1} y p21^{Cip1} en residuos situados en secuencias de localización nuclear. Esta fosforilación retiene a estas Ckis en el citosol, facilitando así la proliferación (Shin et al. 2002).

5.3 Reguladores de ciclo celular implicados en cáncer de mama.

Desregulaciones en el patrón de expresión de p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, concretamente aquellas que conducen a una represión transcripcional, están relacionadas con fenómenos de progresión tumoral (Jackson et al. 2002; Musgrove et al. 2004). Es por esto que p27^{Kip1} y p21^{Cip1} se consideran proteínas supresoras de tumores y su utilidad como marcadores pronóstico ha sido intensamente estudiada. La localización subcelular de p21^{Cip1} y p27^{Kip1} es también un factor estudiado en laboratorios anatomopatológicos, considerándose la situación citosólica como un marcador de mal pronóstico (Alkarain et al. 2004).

La sobre-expresión del oncogén Her2/neu está relacionada con bajos niveles de p27^{Kip1}. Numerosos estudios han demostrado la implicación directa del inhibidor en la tumorigénesis inducida por Her2/neu en glándula mamaria (Muraoka et al. 2002). En ratones “knockout” de p27^{Kip1} se ha observado que la pérdida de un alelo induce una mayor proliferación celular independiente de Her2/neu. Curiosamente, la pérdida de los dos alelos de p27^{Kip1} se asocia con una disminución de la expresión de ciclina D1 y una resistencia a la oncogenicidad promovida por Her2/neu. Paradójicamente, la expresión de p27^{Kip1} resulta imprescindible para la correcta morfogénesis de la mama, mientras que la supresión completa de su expresión produce una fuerte inhibición del desarrollo de la glándula mamaria (Muraoka et al. 2001).

La ciclina D1 se sobre-expresa en el 50% de los cánceres de mama, siendo uno de los oncogenes más comúnmente expresados en cáncer de mama (Gillett et al. 1994). Ciclina D1 colabora sinérgicamente con el oncogén c-myc en procesos tumorigénicos (Wang et al. 2007) pero también es capaz de actuar independientemente de Cdk5 interaccionando con otros factores de transcripción y reguladores del empaquetamiento de la cromatina (Coqueret 2002). Al igual que ocurre con AIB1, la amplificación del gen de la ciclina D1 se produce en un pequeño porcentaje de los tumores que sobre-expresan ciclina D1, por lo que dicha sobre-expresión es en la mayoría de los casos debida a la desregulación de las rutas de señalización que regulan su expresión. Algunas de éstas rutas han sido identificadas y están promovidas por otros oncogenes como Ras y Her2/neu (Sutherland y Musgrove 2004).

Análogamente, la ciclina E1 también se sobre-expresa en cáncer de mama aunque también se han descrito formas truncadas de ciclina E1 con mayor afinidad por Cdk2, lo que se traduce en la formación de complejos resistentes a la inhibición por p27^{Kip1} o p21^{Cip1} (Wingate et al. 2005). Es por éste motivo que la ciclina E1 tiene un elevado valor pronóstico en cáncer de mama.

6. Apoptosis y cáncer.

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada por el que los organismos pluricelulares eliminan de una forma controlada, limpia y específica a aquellas células que han dejado de ser funcionales, han sufrido mutaciones o han sido dañadas. Como todos los procesos biológicos celulares, es susceptible de ser regulado positiva o negativamente. En humanos la desregulación de la apoptosis conduce a múltiples patologías, entre las que se encuentra el cáncer (Hanahan y Weinberg 2000).

Los mecanismos que conducen a la apoptosis celular son altamente complejos y sofisticados y se conocen distintas rutas implicadas, todas ellas dependientes de energía. Cuando una célula entra en el proceso de muerte programada, adopta una morfología contraída y frecuentemente termina fragmentándose para facilitar ser fagocitada por macrófagos y reabsorbida por las células adyacentes (Hengartner 2000). La apoptosis además, juega un papel esencial en la correcta morfogénesis y arquitectura de numerosos tejidos. Por ejemplo, en el tejido epitelial mamario, la muerte programada por una adhesión inapropiada, o anoikis, es crucial para la correcta formación del espacio luminal. De hecho, la ocupación del espacio luminal es un fenómeno de procesos tumorigénicos que se ha observado en carcinomas *in situ* de mama (Debnath et al. 2002).

Asimismo, existe un proceso de muerte celular no programada o necrosis, como consecuencia de lesiones y procesos patológicos. Los mecanismos que conducen a la

necrosis son distintos a los apoptóticos. En la necrosis las células se hinchan y lisan vertiendo al entorno su contenido y provocando procesos inflamatorios (Hail et al. 2006).

Las caspasas constituyen uno de los componentes esenciales en la respuesta apoptótica. Son proteasas, bioquímicamente definidas como cisteínproteasas, que se encuentran muy conservadas evolutivamente. Se expresan en forma de zimógenos que necesitan ser procesados a su vez por otras caspasas para activarse, desencadenando así la cascada de caspasas. En humanos han sido identificadas más de una docena y 2/3 de ellas están implicadas directamente en apoptosis (Earnshaw et al. 1999). Todas las caspasas conocidas poseen un dominio funcional cisteínproteasa que reconoce e hidroliza sustratos con el dominio D-XXX, donde los tres aminoácidos variables determinan la especificidad de la caspasa por dicho sustrato (Thornberry et al. 1997).

6.1 Rutas que regulan la apoptosis.

Hasta la fecha se han descrito dos rutas que desencadenan la apoptosis. La primera es la llamada ruta extrínseca o de receptores de muerte y la segunda es la ruta intrínseca o mitocondrial. Sin embargo, existen evidencias que indican una recíproca señalización entre intermediarios implicados en ambas rutas (Igney y Krammer 2002).

La ruta extrínseca está iniciada por la unión de un ligando a los receptores transmembranales de la superfamilia TNF. Los principales ligandos y receptores estudiados son FasL/FasR, TNF α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5. Todos los receptores se encuentran en la membrana plasmática formando homotrímeros. La estimulación apoptótica promueve el reclutamiento de proteínas adaptadoras que se encuentran en el citosol como FADD o caspasa-8. El nuevo oligómero formado es un complejo activo de señalización de muerte o DISC (Peter y Krammer 2003), que tras activar procaspasa-8 desencadena la muerte celular. Caspasa-8 activa la cascada de las caspasas, siendo la última efectora caspasa-3.

En algunos sistemas celulares se ha demostrado que la activación de caspasa-8 es el requisito suficiente y necesario para producir apoptosis (Hengartner 2000), aunque otras observaciones atribuyen dicha capacidad a la activación de intermediarios de la ruta intrínseca de apoptosis (Yin et al. 1999).

La ruta intrínseca de señalización apoptótica está iniciada por un amplio grupo de estímulos que se procesan de forma receptor-independiente. Los estímulos impactan sobre dianas celulares que procesan la señal, con la particularidad de que la respuesta puede ser desencadenada por un estímulo positivo (como radiaciones, toxinas, hipoxia, infecciones virales, radicales libres) o por respuesta a un estímulo negativo (como la ausencia de factores de crecimiento, hormonas o citoquinas).

Ambas respuestas conducen inevitablemente a una permeabilización de la membrana mitocondrial, liberando de la intermembrana al citosol dos tipos de proteínas pro-apoptóticas (Wang 2001). Dentro del primer grupo se encuentra Smac/DIABLO, la serinproteasa HtrA2/Omi y el citocromo c. El citocromo c liberado al citosol se une a Apaf-1 se oligomeriza y se une a la procaspasa-9 activándola y constituyendo el apoptosoma. Este complejo catalítico es el responsable de la activación de las caspasas efectoras 7 y 3. La liberación del segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas, AIF, endonucleasa G y CAD, es un evento posterior y ocurre sólo en estadios apoptóticos avanzados e irreversibles. AIF y las demás endonucleasas se translocan al núcleo fragmentando el DNA en fragmentos de tamaños entre 50 y 300 pares de bases (Joza et al. 2001).

El control y regulación de todos éstos eventos apoptóticos mitocondriales está finamente regulado por los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Adams y Cory 2001). Sus miembros pueden modular la permeabilidad de la membrana mitocondrial aumentándola (subfamilia pro-apoptótica como Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk) o disminuyéndola (subfamilia antiapoptótica Bcl-2, Bcl-x, Bcl-x_L, Bcl-x_S, Bcl-w y BAG). Todos los miembros de la familia de Bcl-2 se caracterizan por poseer dominios de homología Bcl-2 o BH (desde BH1 a BH4), aunque los miembros pro-apoptóticos se caracterizan por tener solamente el dominio BH3 (Zha et al. 1996). La regulación de esta familia de proteínas es muy compleja y controlada ya que tienen la especial capacidad de determinar si la célula debe continuar definitivamente el proceso apoptótico o por el contrario si éste proceso se puede abortar.

6.2 Apoptosis y cáncer de mama.

Uno de los primeros genes identificados como reguladores de la muerte celular fue el gen Bcl-2, que además se encuentra regulado por estrógenos en células epiteliales humanas y está sobre-expresado en cánceres de mama ER positivos (Gee et al. 1994). En los tumores de mama, la positividad para el marcador Bcl-2 es considerada un buen pronóstico (Joensuu et al. 1994). Existen dos corrientes que justifican dicha observación. La primera está relacionada con la capacidad de los antagonistas de estrógenos usados en terapias de cáncer de mama ER positivos, como el tamoxifeno, de reprimir la expresión de Bcl-2 favoreciendo así la apoptosis de las células cancerosas (Huang et al. 1997). Sin embargo, otros trabajos apuntan a la actividad directa de Bcl-2 en el ciclo celular (represor de la proliferación) como la principal causa asociada al buen pronóstico (Murphy et al. 1999).

Bax es un miembro de la familia de Bcl-2 y su función biológica, al contrario de Bcl-2, es pro-apoptótica. Existen numerosos estudios sobre el valor pronóstico de Bax como marcador de cáncer de mama, siendo los resultados contradictorios. Actualmente, se considera más significativa la relación de expresión Bcl-2:Bax, que la expresión independiente de ambas proteínas (Wu et al. 2000). Además, la localización subcelular de

Bax es crítica en la apoptosis ya que su localización citosólica se relaciona con inactividad y su translocación a la mitocondria es un fenómeno intrínseco de la apoptosis (Sarkar et al. 2003).

Bcl-X_L se ha relacionado, en cambio, con procesos de inhibición de la apoptosis. Ejerce su función antiapoptótica evitando la salida de citocromo c al citosol y manteniendo la integridad de la membrana mitocondrial externa (Kim et al. 1997). Bcl-X_L tiene además la capacidad de interactuar con Apaf-1 en el citosol, inhibiendo la activación de caspasas (Hu et al. 1998). Se ha descrito que la sobre-expresión de Bcl-X_L es uno de los factores clave en la resistencia a apoptosis inducida por multitud de estímulos (Fontana et al. 1998). Existen evidencias que relacionan los altos niveles de expresión de Bcl-X_L en carcinomas primarios de mama humanos con procesos de metástasis (Fernyez et al. 2000; Espana et al. 2004). Por otro lado, numerosos autores relacionan la sobre-expresión de Bcl-X_L con la resistencia a la apoptosis mediada por p53 (Schott et al. 1995). Por tanto, Bcl-X_L cumple un papel crucial en la resistencia a la muerte celular mediada tanto por estímulos apoptóticos como por genes supresores de tumores como p53.

Caspasa-3 es un miembro clave en la ejecución de la apoptosis. La baja expresión de caspasa-3 está relacionada con procesos tumorigénicos y con la progresión tumoral. La línea celular MCF-7 de carcinoma de mama no expresa caspasa-3, resultando la restitución de la misma en una sensibilización a la apoptosis (Friedrich et al. 2001; Yang et al. 2005). Estudios análogos en los que restituyen caspasa-3 a MCF-7, han revelado una inhibición del crecimiento asociada a la sobre-expresión de p27^{Kip1} (Faraglia et al. 2005). Las observaciones anteriores demuestran que la baja expresión de caspasa-3 representa un importante mecanismo de supervivencia celular en pacientes con cáncer de mama. Caspasa-3, así como todos los intermediarios apoptóticos anteriormente nombrados, representan dianas potenciales para el tratamiento de cáncer de mama.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales.

1.1 Modelos murinos.

El transgén de AIB1 se generó a partir del cDNA humano de AIB1, originalmente cedido por Paul Meltzer (Anzick et al. 1997). El plásmido original pcDNA 3.1(+)/AIB1 se digirió con Apal, localizado justo después (3') de la secuencia de AIB1 y se le añadió un sitio extra NotI de modo que AIB1 quedó flanqueado por dos sitios NotI. La digestión con NotI liberó un fragmento de 4,84 kpb correspondiente al cDNA de AIB1 y se subclonó en el plásmido pTLMTV B bajo el control del promotor MMTV para dirigir la expresión del transgén a la mama del ratón. Asimismo, el vector pTLMTV B contiene una secuencia de splicing alternativo y de poliadenilación procedente del virus SV40 para conferir estabilidad al transgén transcrito.

La sonda del transgen se obtuvo por digestión del plásmido pTLMTVB-*hAIB1* con NheI/SalI, eliminando así las 2,75 kpb de secuencia bacteriana, posteriormente se microinyectó en oocitos fertilizados de ratones con el fondo genético de C57Bl/6 en el servicio de ratones transgénicos de Beth Israel Deaconess, Boston (EE.UU.). Dichos animales se mantuvieron en un fondo genético puro de C57Bl/6.

Los animales transgénicos FVB/N-Tg(MMTVneu) fueron adquiridos de Jackson Laboratories con el fondo gético FVB y corresponden a los originalmente obtenidos por Müller (Guy et al. 1992). El genotipo de la descendencia resultante del cruce con animales AIB1-tg fue confirmado por análisis de PCR con los oligonucleótidos recomendados por Jackson Laboratories.

El modelo de animales "knockout" para el inhibidor de ciclo celular p27^{Kip1} fue cedido por Jim Roberts (Fero et al. 1996). La colonia de animales "knockout" se mantuvo mediante cruces heterocigotos p27^{Kip1} +/- . Los seis genotipos necesarios para el estudio se obtuvieron a partir de dos cruces. El primero consistió en el cruce de machos WT/p27^{Kip1} +/- con hembras WT/ p27^{Kip1} +/-, seleccionando de la descendencia mediante genotipado hembras WT/p27^{Kip1} +/+, WT/p27^{Kip1} +/- y WT/p27^{Kip1} -/-. El segundo se obtuvo mediante el cruce de machos AIB1-tg/p27^{Kip1} +/- con hembras AIB1-tg/p27^{Kip1} +/-, seleccionando de la descendencia mediante genotipado hembras AIB1-tg/p27^{Kip1} +/+, AIB1-tg/p27^{Kip1} +/- y AIB1-tg/p27^{Kip1} -/-.

1.1 Genotipado de los ratones transgénicos.

Para el genotipado de ratones, se digirió una porción de cola de ratón, de aproximadamente 0,5 cm en 500 µl de tampón de lisis (Tris 100 mM, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, SDS 0.2%) complementados con proteinasa K al 1.25 % (0.4 U/ml, Roche) durante toda la noche a 55°C. Al lisado del tejido se le añadió 500 µl de Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:25:1; Invitrogen), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 13600 rpm durante 6 minutos. Se extrajo la fase acuosa superior y el DNA genómico se precipitó con 1 ml de etanol absoluto mediante centrifugación a 13200 rpm durante 5 minutos. El DNA precipitado se lavó con 700 µl de etanol al 70% y se resuspendió en 100 µl de tampón TE (Tris-EDTA pH 8).

El genotipo de los ratones transgénicos y “knockout” se determinó mediante PCR con oligonucleótidos específicos. Para los ratones AIB1-tg el transgén humano se amplificó con los oligonucleótidos 5'GGCCCCGGCCCCCAAGCTTG3' y 5'CGTGAATCACTGGCCAGTGGA TCC3'. Los animales positivos para el transgén humano amplificaron una banda de 250 pb.

Para detectar el transgén humano Her2/neu se usaron los oligonucleótidos 5'TTTCCTGCAGCAGCCTACGC3' y 5'CGGAACCCACATCAGGCC3'. Los animales positivos para el transgén Her2/neu, amplificaron una banda de 550 pb.

En los ratones “knockout” para p27^{Kip1}, cada alelo se detectó en reacciones separadas, siendo los oligonucleótidos para el alelo salvaje 5'GATGGACGCCAGACAAGC3' y 5'CTCCTGCCATTCGTATCTGC3', amplificando una banda de 190 pb. El alelo “knockout” se amplificó con los oligonucleótidos 5'TGGAACCCTGTGCCATCTCTAT3' y 5'CCTTCTATC GCCTTCTTGACG3', obteniéndose una banda de aproximadamente 600 pb.

1.3 Extracción y análisis morfológico de mamas.

Se extirparon las glándulas mamarias cuartas inguinales de hembras vírgenes de 8 semanas y se extendieron sobre portaobjetos (Superfrost/Plus, Fisher Scientific). Se trató en todo momento, mediante una manipulación delicada, de mantener siempre la integridad y forma original de la mama.

La mamas se introdujeron en solución de fijación ácido acético glacial:metanol 1:3 durante una hora. Tras un lavado en etanol al 70% y otro en agua, se tiñeron por un tiempo mínimo de 16 horas en la solución de tinción, con el volumen necesario para cubrir completamente la muestra. La solución de tinción se preparó solubilizando por ebullición 1 g de carmine (Sigma) y 2.5 g de sulfato de potasio y aluminio (Sigma) en 500 ml de agua destilada durante 20 minutos. Se volvió a ajustar el volumen hasta 500 ml y se filtró con papel de filtro hasta obtener una dilución translúcida, conservándose a 4° C hasta su uso.

El proceso de tinción de mama concluye con tres lavados en concentraciones crecientes de etanol, 70, 95 y 100% de 15 minutos cada uno y un último lavado en tolueno

(Merck) de 15 minutos. Las mamas fijadas y teñidas en los portas, se conservaron a temperatura ambiente en recipientes de vidrio con metil-salicilato (Merck).

1.4 Cultivos primarios de células epiteliales de ratones AIB1-tg.

Se extirpó la cuarta glándula mamaria de la región inguinal de hembras vírgenes de 8 semanas de edad. El tejido se depositó en una placa petri recubriéndolo con medio de cultivo DMEM/F12 (Invitrogen) sin suero. Posteriormente, se troceó en pequeños fragmentos de aproximadamente 1-2 mm³ con un bisturí dentro de una campana de flujo laminar para preservar la esterilidad. Se añadió colagenasa A (Roche) a 2 mg/ml y se incubó la mezcla a 37 °C durante 20 minutos con agitación de 100 rpm en un agitador orbital. Pasado ese tiempo, se disgregó el tejido haciéndolo pasar tres veces a través de una pipeta Pasteur de cuello estrecho con objeto de disgregar el tejido. Este proceso se repitió dos o tres veces más, hasta conseguir homogenizar la mayoría de los trozos. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 1000 xg durante 10 minutos para eliminar la colagenasa.

El centrifugado celular se resuspendió en 2 ml de medio DMEM/F12 suplementado con antibióticos penicilina/estreptomicina al 1% (v/v), 10% (v/v) de FBS, 5 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de EGF murino y 5 µg/ml de ácido linoleico. La resuspensión celular se sembró en placas de 6 cm y se dejó crecer durante 2 a 3 días hasta que empezaron a formarse y crecer los primeros clones de células epiteliales primarias de mama.

2. Cultivos celulares y reactivos empleados.

Varios tipos celulares fueron utilizados para desarrollar toda la experimentación. Dependiendo de la línea celular, se emplearon básicamente dos medios de cultivo. Las líneas celulares, MCF-7, HeLa, COS-1, U-2 OS, MDA-MB-468, MDA-MB-231 y A549 se crecieron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM (Invitrogen). Mientras que las líneas celulares ZR-75, BT47 y H1299 se crecieron en medio RPMI-1640 (Invitrogen).

Los medios DMEM y RPMI-1640 se complementaron con 2 mM L-Glutamina, 1% (v/v) de los antibióticos penicilina/estreptomicina (100x, Invitrogen) y 10% (v/v) de suero bovino fetal (Invitrogen) previamente inactivado durante media hora a 55° C. Los cultivos celulares se crecieron de manera exponencial en monocapas, evitándo la confluencia total continuada. Al llegar a confluencia los cultivos se dividían mediante el tratamiento con tripsina, Trypsin-EDTA (Invitrogen).

La línea de células epiteliales humanas, HMEC (Clonetics), se creció en el medio de cultivo especial MEMG recomendado por la compañía suministradora. Las células se levantaron y dividieron siguiendo las especificaciones de Clonetics.

Todas las líneas celulares se crecieron en un incubador con una atmósfera al 5% de CO₂ a una temperatura de 37° C y un 98% de humedad relativa.

Los reactivos enumerados en la Tabla 3, relativos a inhibidores, activadores y hormonas, se emplearon en experimentos específicos a las concentraciones indicadas.

Tabla 3. Principales reactivos empleados en los experimentos.

Reactivo	Concentración final	Disolvente	Descripción de su uso	
G418	500 µg/ml	Agua	Antibiótico para la selección de clones resistentes	
Dexametasona	20 µM	Agua	Inducción de la expresión del promotor pCMV	
TNFalpha	50 ng/ml	Agua	Inducción de apoptosis	
Cicloheximida	25 µg/ml	DMSO	Inducción de la síntesis de proteínas	
LY294002	65 µM	DMSO	Inhibidor específico de PI3K	
MG132	20 µM	DMSO	Inhibición de la degradación por proteasoma	
Epoxomicina	100 nM	DMSO	Inhibición de la degradación por proteasoma	
PD98059	20 µM	DMSO	Inhibición de la ruta MEK1	
SB20219	5µM	DMSO	Inhibición de la ruta p38	
17-β-Estradiol	10 nM	Etanol	Inducción de la transcripción mediada por ER	
4-hidroxi-tamoxifeno	1 µM	Etanol	Represión de la transcripción mediada por ER	
ICI182780	1 µM	DMSO	Represión de la transcripción mediada por ER	
Insulina	50 nM	Agua/ Ácido acético	Inducción de rutas de señalización IGFR	
PGA-1	50 µM	PBS	Inhibe el complejo Apaf-1/caspasa 9/citocromo c	
Inhibidores de ciclo celular	Concentración final	Tiempo de empleo	Disolvente	Fase del ciclo que bloquea
Ciclosporina A	5 µM	16 h	DMSO	Transición G0-G1
Wortmanina	100 nM	24 h	DMSO	G1 tardía
L-mimosina	400 µM	24 h	Na OH	Transición G1-S
Hidroxiurea	5 mM	48 h	Agua	Fase S
Etopósido	10 µM	24 h	DMSO	Transición G2-M
Nocodazol	100 ng/ml	24 h	DMSO	Fase M

3. Técnicas *in vivo*.

3.1 Transfecciones transientes y estables de vectores.

Se usaron distintos métodos de transfección dependiendo del tipo celular. En todos los casos, las transfecciones se realizaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante, siendo los agentes lipídicos más usados Lipofectamine 2000 y LTX (Invitrogen), FuGene 6 (Roche) y jetPEI (Q-BIOgene).

Las células se sembraron el día anterior a la transfección en una confluencia de 8000-10000 células/cm² con el objetivo de conseguir una confluencia del 80% al día siguiente.

Para la transfección se prepararon dos mezclas. La primera conteniendo medio OptiMEM (Invitrogen) sobre el que se añadió el agente lipídico. La otra mezcla contenía OptiMEM más el vector de DNA deseado. Las dos mezclas se dejaron reposar según el tiempo especificado por el fabricante. Posteriormente, se mezclaron los dos tubos y tras un nuevo reposo se añadió gota a gota sobre el medio de cultivo celular. La expresión del vector se comprobó pasadas 32-48 horas.

Para la transfección estable en COS-1 se transfectaron 10 µg del plásmido pcDNA3.1(-) AIB1 y 1 µg de pBABE-EGFP con FuGene 6 en placas de 10 cm de diámetro. A las 24 horas se reemplazó el medio y 48 horas después las células fueron seleccionadas con el antibiótico G418.

3.2 Transfecciones de siRNA.

Para la transfección del RNA de interferencia se usó HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los oligonucleótidos para el silenciamiento se diseñaron con el programa "RNAi design software" de la compañía Oligoengine disponible en <http://www.oligoengine.com>. La secuencia de los oligonucleótidos de silenciamiento para AIB1 son 5'AGACUCCUUAGGACCGCUU3' y 5'AAGCGGUCCUAAGGAGUCU3'; para PLZF son 5'GACGACAAUGACACGGAGGTT3' y 5'CCUCCGUGUCAUUGUCGUCTT3'; para MDM2 5'UUCACUCAGCCAACCGAGAU3' y 5'AUCUGGUUGGCUGAGUGAA3' y para E6-AP 5'AUGGCCAGACACAGAAAG3' y 5'CUUUCUGUGUCUGGGCCAU3'. Los silenciamientos se realizaron en placas de cultivo de 6 cm de diámetro, transfectando 150 ng de los oligonucleótidos de RNA previamente anillados y 12 µl de HiPerFect Transfection Reagent, resultando siempre la concentración final de 5 nM. Se usó siempre material libre de RNAsas.

3.3 Infecciones adenovirales.

En los experimentos indicados, las células HMEC se infectaron con adenovirus de tipo Ad5 para expresar AIB1 humano. Como control se emplearon adenovirus de expresión de la proteína verde GFP. Las infecciones se realizaron a 40 moi (40 partículas víricas por célula). Las células se recogieron 48 horas después de la infección para cuantificar la expresión de proteínas y mRNA según los protocolos estándar ya referidos. Los adenovirus se generaron en el servicio del Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.4 Medida de apoptosis y ciclo celular.

La medición de las distintas fases del ciclo y de la apoptosis se realizó mediante citometría de flujo con un citómetro Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Después de tratar las células según las condiciones indicadas en cada experimento, se lavaron dos veces con PBS y se recogieron de la placa de cultivo tratando con Versene (Invitrogen), menos agresivo que la tripsina y daña menos la matriz extracelular. En éste caso y a diferencia de la tripsina, el tratamiento es más largo, entre 10-20 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células se recogieron y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. El "pellet" de células se lavó con PBS, se centrifugó de nuevo a 1200 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en etanol al 70% durante 12 horas a 4 °C para permeabilizar la membrana plasmática y permitir así el marcaje del DNA genómico. Finalmente se eliminó el etanol mediante dos lavados con PBS. El marcaje del DNA genómico se realizó con 5 µg/ml de ioduro de propidio (Sigma) y RNAasa A (Roche) a una concentración final de 200 µg/ml. Se incubaron con agitación suave durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Pasado éste tiempo las células se analizaron por citometría de flujo.

3.5 Marcaje con ³⁵S y determinación de la vida media.

Se sembraron $1.5-2 \times 10^5$ células de las líneas celulares MCF-7 o HeLa en placas de 6 cm de diámetro, una placa por cada punto de la recta patrón. Al día siguiente se reemplazó el medio de cultivo estándar por medio DMEM sin L-cisteína (Invitrogen), suplementado con 10% de suero previamente dializado para eliminar los aminoácidos. Se añadió al medio 50 µCi de ³⁵S-L-cisteína (GE Healthcare) y se incubó durante 2 horas a 37 °C.

Tras el pulso inicial, se recogió la primera placa correspondiente al tiempo 0, se lavó dos veces con PBS y se conservó a -80 °C para su posterior lisis e inmunoprecipitación. Para el resto de placas, tras un lavado se sustituyó el medio de marcaje por medio común de cultivo y se fueron recogiendo según los tiempos predeterminados. En los ensayos de vida media en presencia de los diferentes compuestos SERMs (tamoxifeno, ICI182780 y E2),

éstos se añadieron a tiempo 0 y los intervalos de seguimiento fueron de 30 minutos. Las placas se lisaron e inmunoprecipitaron siguiendo los procedimientos estándar. A continuación, los inmuno-complejos se resolvieron por SDS-PAGE al 7,5%, se secaron sobre papel Whatman 3mm y se expusieron sobre placas de captura de las emisiones radiactivas para su posterior análisis con un PhosphorImager (Molecular Dynamics). El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) se determinó a partir de la pendiente (λ) de la recta de regresión al representar el tiempo *versus* logaritmo de la cantidad de radiactividad retenida en AIB1 $t_{1/2} = \ln 2/\lambda$.

3.6 Expresión de proteínas de fusión y experimentos de “pull-down”.

La expresión de proteínas en *E. coli* se hizo con la cepa BI21 (DE3). Se crecieron durante la noche preinóculos de 100 ml en medio selectivo (LB suplementado con ampicilina a 50 $\mu\text{g/ml}$). Los preinóculos se sembraron sobre 900 ml del mismo medio y se dejaron crecer hasta alcanzar una densidad óptica $\text{DO}_{600} \approx 0.8$. La expresión de la proteína se indujo al añadir al cultivo IPTG (isopropil-beta-D-tio-galactopiranosido) (Sigma) a una concentración final de 200 nM durante 4 horas. Se recogieron las células centrifugando a 6000 xg durante 15 minutos y el “pellet” celular se resuspendió en 25 ml de PBS conteniendo 10mM de DTT (di-tio-treitol) y 1mM de AEBSF (4-(2-aminoetil) benzeno-sulfonil fluoruro), se sonicó en hielo medio minuto cinco veces. A continuación se añadió Tritón X-100 hasta llegar al 1% final y se agitó vigorosamente. Tras centrifugar a 10000xg 15 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo Falcon de 50 ml y se le añadió 500 μl de una suspensión de Glutathione Sepharose 4B al 50% (Amersham Pharmacia Biotechnology). Para determinar la eficacia de la inducción y la eficacia de la purificación, se analizaron por SDS-PAGE 30 μg de lisado total antes y después de la inducción, así como del material retenido en las bolas de Sepharose. El gel se tiñó con azul de coomassie (0.5% azul de coomassie, 50% metanol y 10% ácido acético). Se incubó durante 30 minutos en agitación moderada y se destiñó por último en solución decolorante (50% metanol y 10% ácido acético).

Para los experimentos de “pull-down”, el lisado celular fue sometido a una primera fase de prelavado, incubo 1,2 mg de lisado de MCF-7 con 40 μl de Glutathione Sepharose al 50%, en agitación rotatoria a 4 °C durante 45 minutos. Posteriormente, el lisado celular se incubó con 50-70 μg de la proteína de fusión durante 2 horas a 4 °C en una noria para mantener rotación constante. Los lavados se realizaron de forma análoga a un inmunoprecipitado de proteínas de cultivo celular.

4. Técnicas *in vitro*.

4.1 Inmunodetección de proteínas y anticuerpos utilizados.

Los lisados celulares resuspendidos en la solución desnaturalizadora de Laemmli tampón (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2.3% SDS, 10 mM DTT y 0.1% de azul de bromofenol), se cargaron en geles de poliacrilamida a distintas concentraciones, dependiendo del tamaño molecular de las proteínas a detectar. La electroforesis vertical se realizó en SDS-PAGE tampón (25 mM Tris, 192 mM glicina y 1.7 mM SDS) a un amperaje constante de 18 mA.

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVFD (Inmobilon, Millipore) activadas previamente con metanol. La transferencia se realizó en tampón de transferencia húmeda (25 mM Tris-HCl, 19 mM glicina y 10% metanol) a 200 mA durante 16 horas para la detección de proteínas con tamaños moleculares de más de 100 KDa y a 300 mA durante 2 h para proteínas con pesos moleculares de menos de 100 KDa.

Después de la transferencia las membranas se bloquearon con tampón T-TBS (25 mM Tris, 50 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.05% Tween 20 (Calbiochem)) complementado con un 5% de albúmina del suero bovino (BSA, Invitrogen) durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en tampón T-TBS con 3% de BSA a las concentraciones que se indican en la Tabla 4. Las membranas se lavaron tres veces durante 20 minutos en tampón T-TBS y posteriormente se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a peroxida (GE Healthcare).

Los anticuerpos anti-DRO1 se encargaron a la compañía Eurogentech (Cultek). La predicción de los péptidos de mayor potencial inmunoreactivo fue realizada por la compañía a partir de la secuencia de DRO1 humano. Los dos péptidos que se seleccionaron fueron “EDPRRAQVPPTRESRV” correspondiente a los aminoácidos 313 al 328 y “QDDYRHHESYHHGYPY” correspondiente a los aminoácidos 935 al 950 del extremo carboxi-terminal. Se inmunizaron dos conejos y los sueros se titularon para determinar las diluciones óptimas de su uso en el laboratorio. Los que mejor funcionaron fueron los desarrollados contra el extremo carboxi-terminal y fueron los que se emplearon en todos los experimentos sucesivos.

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados en “western blot”.

WB	Anticuerpo primario	Dilución	Marca	Referencia	Especie
	AIB1	1:1000	Becton Dickinson	611105	Ratón
	DRO1	1:2500	Producción propia	aa 935-950	Conejo
	Caspasa 3 activa	1:1000	Cell Signalling	9661	Conejo
	Procaspasa 3	1:1000	Cell Signalling	9665	Conejo
	β -tubulina	1:2000	Santa Cruz	5274	Ratón
	α -actina	1:10000	Sigma	A1978	Cabra
	E6-AP	1:750	Santa Cruz	25509	Ratón
	MDM2	1:500	Santa Cruz	965	Ratón
	HA	1:1000	Covance	MMS-101R	Ratón
	AU5	1:500	Covance	MMS-135R	Ratón
	Bcl-2	1:750	Santa Cruz	783	Conejo
	Fosfo treonina	1:1000	Zymed	71-8200	Conejo
	Fosfo serina	1:1000	Zymed	61-8100	Conejo
	ER α	1:500	Affinity Bioreagent	PA1-309	Ratón
	Gal4-DBD	1:1000	Santa Cruz	577	Conejo
	Gal4-DBD	1:500	Santa Cruz	510	Ratón
	Cadherina E	1:1000	Becton Dickinson	610181	Ratón
	Twist	1:500	Santa Cruz	15393	Conejo
	Citoqueratina 14	1:1000	Santa Cruz	17104	Cabra
	PLZF	1:500	Santa Cruz	283119	Ratón
	Citocromo c	1:200	Santa Cruz	13561	Ratón
	Fosfo tirosina	1:1000	Santa Cruz	7020	Ratón
	Ciclina D1	1:750	Santa Cruz	450	Ratón

Los anticuerpos secundarios utilizados (véase Tabla 5) se diluyeron 1:5000 en T-TBS con 3% de BSA y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Tras cinco lavados con T-TBS, las membranas se incubaron con reactivos de ECL (Cultek y GE Healthcare), generando la luminiscencia que fue detectada con películas de rayos X Hyper Films (GE Healthcare).

Tabla 5. Anticuerpos secundarios empleados en “western blot”.

WB	Anticuerpo secundario	Dilución	Referencia	Marca
	Anti-ratón	1:5000	NA931V	GE Healthcare
	Anti-conejo	1:5000	NA943V	GE Healthcare
	Anti-cabra	1:5000	6741-1	Abcam

4.2 Inmunofluorescencia.

Las células se sembraron en cubre-objetos previamente esterilizados en etanol. Después del tratamiento específico de cada experimento, los cubre-objetos se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron durante 10 minutos con formalina al 10% en PBS (SIGMA). Se retiró la formalina y tras dos lavados se permeabilizaron con Triton TX-100 (Merk) al 0.1% en PBS durante 10 minutos. Las muestras se lavaron una vez más con PBS para retirar el detergente restante y se bloquearon una hora a 37 °C en tampón de bloqueo compuesto por PBS suplementado con suero de caballo al 1% y BSA al 1%.

Tabla 6. Principales anticuerpos empleados en inmunofluorescencia.

IF	Anticuerpo primario	Dilución	Referencia	Marca	Especie
	AIB1	1:150	611105	Becton Dickinson	Ratón
	DRO1	1:150	aa 935-950	Producción propia	Conejo
	Caspasa 3 activa	1:100	9661	Cell Signalling	Conejo
	HA	1:150	MMS-101R	Covance	Ratón
	Calregulina	1:100	6467	Santa Cruz	Ratón
	Anticuerpo secundario	Dilución	Referencia	Marca	
	Ratón conjugado a FITC	1:150	715-096-150	Jackson ImmunoResearch	
	Ratón conjugado a CY3	1:150	715-166-150	Jackson ImmunoResearch	
	Conejo conjugado a CY3	1:150	711-166-152	Jackson ImmunoResearch	

La incubación de los anticuerpos primarios se realizó diluyendo los anticuerpos a las concentraciones indicadas en la Tabla 6 en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4° C. Las muestras se lavaron tres veces con PBS durante 30 minutos. La incubación de los anticuerpos secundarios se realizó a 37°C durante una hora, las diluciones están indicadas en la Tabla 6. Se realizaron otros tres lavados en PBS, pasados los cuales se marcaron los

núcleos de las células fijadas con DAPI 1mg/ml diluido en PBS 1:10000, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se realizó un breve lavado en H₂O destilada para eliminar sales y se procedió a montar las muestras con medio de montaje (DakoCytomation).

Para el marcaje específico de mitocondrias, las células se incubaron con MitoTracker a una concentración final de 500 nM en el medio de cultivo específico de cada línea celular. La incubación se realizó durante 40 minutos, pasados los cuales las células se lavaron y se fijaron y permeabilizaron durante 10 minutos con metanol previamente enfriado a -20 °C. Seguidamente, las muestras se sometieron al protocolo estándar de inmunofluorescencia anteriormente detallado.

En los ensayos de colocalización, las imágenes fueron analizadas con el programa MetaMorph Imaging (Molecular Devices). El análisis de colocalización en la figura 27B, se efectuó en células individuales, siendo el resultado final la media del análisis de cinco células de un mismo experimento representativo. Primero se cuantificó el área de colocalización (en unidades relativas), en color amarillo resultante de la superposición de la señal de Mitotracker y DRO1. Posteriormente se cuantificó el área roja relativa a la señal exclusivamente de DRO1. La relación entre ambas refleja el porcentaje de DRO1 total que se encuentra asociado a la mitocondria.

4.3 Defosforilación *in vitro*.

40 µg de lisado de células MCF-7 se diluyeron hasta 50 µl con el tampón específico de la proteína fosfatasa lambda, λ-PP (New Engly Biolabs) conteniendo 2 mM MnCl₂ y 100 unidades de λ-PP. La reacción se incubó a 30 °C durante 1 hora. En paralelo se trató un control sin fosfatasa. 30 µl de cada muestra se hirvió con solución solubilizadora de Laemmli en 40 µl volumen final y se analizó por “western blot”.

4.4 Co-inmunoprecipitación de complejos.

Lisados celulares de 0.5-1 mg de proteína total medidos mediante Bradford (Bio-Rad) se llevaron hasta un volumen mínimo de 500 µl y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con agitación rotatoria con los anticuerpos descritos en la Tabla 7 y a la dilución indicada. Al día siguiente, se añadió proteína A-sefarosa (GE Healthcare) para anticuerpos policlonales o proteína G-sefarosa (GE Healthcare) para los monoclonales. La cantidad de proteína A ó G que se añadió fue de 30 µl de la suspensión al 50% por cada 1 mg de proteína de lisado. La incubación se extendió por media hora más antes de centrifugar las muestras. Los inmunocomplejos retenidos en las bolas de sefarosa se lavaron dos veces con 1 ml del tampón de lisis, un tercer lavado con 1 ml Tris-HCl pH=7,5; LiCl 500 mM y por último, se

realizaron dos lavados en Tris-HCl 7,5 para eliminar la sal residual. Finalmente se hirvieron en solución solubilizadora de Laemmli para su posterior análisis por “western blot”.

Tabla 7. Anticuerpos empleados en ensayos de inmunoprecipitación.

IP	Anticuerpo	Dilución	Referencia	Marca	Especie
	AIB1	1:50	aa 695-934	Producción propia	Conejo
	DRO1	1:100	aa 935-950	Producción propia	Conejo
	HA	1:100	MMS-101R	Covance	Ratón
	AU5	1:100	MMS-135R	Covance	Ratón
	Gal4 DBD	1:100	577	Santa Cruz	Conejo

4.5 Obtención de lisados celulares Oocitos de *Xenopus Laevis* en G2 o M.

Los oocitos de *Xenopus laevis* se aislaron de porciones de ovario que se extirparon de ranas anestesiadas mediante hipotermia. Los oocitos separados mediante disección manual, se escogieron con grado de desarrollo VI (aproximadamente de 1 mm de diámetro y con los dos hemisferios claramente diferenciados) bajo inspección ocular con una lupa de disección. Los oocitos se separaron en dos grupos, un grupo control sin tratamiento, correspondiente a la fase del ciclo celular G2. El segundo grupo se incubó con 15 μ M progesterona (Sigma) para inducir la maduración meiótica. La aparición de un anillo en el polo animal después de 4-6 horas fue indicativa del paso de G2 a meiosis. Se seleccionaron y lisaron tres oocitos control parados en G2 y tres oocitos parados en M. Se incubaron los lisados con los inmunocomplejos de AIB1 obtenidos de la inmunoprecipitación de 1,5 mg de lisado de células MCF7. La incubación se realizó durante 20 minutos a 25 °C. Posteriormente, los inmunoprecipitados se lavaron y se hirvieron en solución solubilizadora de Laemmli para ser analizados por “western blot”.

5. Extracciones moleculares.

5.1 Extracción de DNA y RNA.

Para la extracción y purificación del DNA plasmídico se utilizó el sistema de purificación de Maxi y mini-prep (QIAGEN) siguiendo las indicaciones de fabricante.

Para la extracción de RNA de cultivos celulares se utilizó el agente TRIzol (Invitrogen). Las placas con los cultivos celulares se lavaron 2 veces con PBS, siendo posteriormente resuspendidos en 1 ml de TRIzol y purificados de la fase acuosa tras añadir y agitar vigorosamente 0.2 ml de cloroformo. El RNA total se precipitó de la fase acuosa añadiendo 0.5 ml de isopropanol y centrifugando durante 10 minutos a 13200 rpm. El RNA se resuspendió en 100 μ l de tampón de DNasa, libre de RNasa y se trató con 15 unidades de DNasa (Takara) 30 minutos a 37 °C para eliminar posibles restos de DNA que contaminan la muestra. Finalmente se purificó el RNA mediante el sistema RNeasy (QIAGEN) y se conservó a -80°C.

5.2 Extracción de proteínas.

Los cultivos celulares en placas Petri se lavaron dos veces con PBS frío y se mantuvieron sobre hielo. Seguidamente, se les añadió 0.3 ml del tampón de lisis frío, a las placas de 10 cm de diametro y 0.15 ml a las de 6 cm de diametro. El tampón de lisis se preparó a partir del tampón comercial 10x Cell Lysis (Cell Signalling) suplementado con 1 mM NaF, hasta 300 mM NaCl, 1 mM AEBSF (Roche) y cóctel de inhibidor de proteasas (Roche). Los lisados celulares se mantuvieron en hielo y se agitaron en vortex 2 veces por 30 segundos con un intervalo de 5 minutos entre ambas. Seguidamente, se centrifugaron a 13200 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes de los lisados celulares se cuantificaron con el sistema de Bradford de Bio-Rad y se hirvieron con solución solubilizadora de Laemmli (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2.3% SDS, 10 mM DTT y 0.1% de azul de bromofenol).

Las extracciones subcelulares fraccionadas se realizaron siguiendo dos procedimientos. El primero se realizó con el sistema "Subcellular Proteome Extraction Kit" (Merck), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las fracciones aisladas obtenidas de citoplasma, membranas más orgánulos, núcleo y citoesqueleto, se cuantificaron siguiendo los métodos anteriormente descritos. El segundo método separó la fracción citosólica de la fracción de membranas, incluyendo las mitocondrias y se empleó para la localización de DRO1 y citocromo c. Las células se lisaron con 80 mM KCl, 250 mM de sacarosa y 500 μ g/ml de digitonina (Ruiz-Ruiz y Lopez-Rivas 2002). En este caso los lisados celulares se centrifugaron a 10000xg durante 5 minutos. Con éste método se obtuvieron dos fracciones,

una de citoplasma y otra de membranas celulares. Los lisados fraccionados se cuantificaron y se desnaturalizaron mediante la ebullición con solución solubilizadora de Laemmli.

5.3 Extracción en tampón desnaturalizante de la línea HeLa ubiquitina-6xHis.

Células HeLa expresando de forma estable ubiquitina marcada con la etiqueta 6xHis (6 histidinas) fueron recogidas y lisadas en tampón de lisis desnaturalizante (6 M hidrocloreuro de guanidinio, 0.1 M NaH₂PO₄ y 10 mM de imidazol). Después de la sonicación y centrifugación a 15000 xg por 10 minutos los lisados se incubaron con microesferas de Ni²⁺-NTA (Qiagen) en noria durante 4 horas a 4 °C. Tras el lavado de la resina, las proteínas asociadas a ubiquitina-6xHis se disolvieron en solución solubilizadora de Laemmli y se resolvieron mediante SDS-PAGE siguiendo los procedimientos estándar.

6. Clonaciones.

6.1 Geles de agarosa.

Los distintos pasos en las clonaciones, digestiones con enzimas de restricción, subclonaciones y genotipados de animales, se analizaron en geles de agarosa (Invitrogen) en tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido bórico y 2 mM EDTA) con bromuro de etidio (Invitrogen) al 0.005%. Los pocillos del gel se cargaron con las muestras de DNA resuspendidas en tampón de carga (40% sacarosa, 0.01% azul de bromofenol). La electroforesis se realizó en tampón TAE a un voltaje constante de 80 V. Para la estimación del peso molecular del DNA se emplearon los marcadores Lambda/HindIII Marker (Invitrogen) para rangos entre 125-23130 pb y PhiX 174/Hae para rangos entre 72-1353 pb.

6.2 Clonaciones.

La clonación de la proteína humana DRO1 se amplificó a partir de RNA total de células HeLa con los oligonucleótidos 5'ACACAATGACATGGAGAATGG3' y 5'GCAGCTGCAGAGGAACTG3'. El fragmento amplificado de 2,7 kpb se purificó por gel (QIAGEN, Gel purification kit) y se amplificó de nuevo con los oligonucleótidos 5'GGCCGAATTCTCAGTAAGGGTATC3' y 5'GGCGAGATCTATGACATGGAGAATG3', con objeto de añadir los sitios EcoRI y BglII para poderlo subclonar en el plásmido pcEFL·AU5.

Las reacciones de ligación se realizaron con la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) y 50 µg de vector convenientemente digerido y purificado, añadiendo inserto en proporción molar 1:3.

El gen completo PLZF se clonó mediante transcripción inversa o RT-PCR (SuperScript First-Stry Synthesis System, Invitrogen) a partir del RNA de células HMEC con los

oligonucleótidos 5'CACCATGGATCTGACAAAAATGG3' y 5'CCCTTCACACATAGCACAGGTAG3'. Al fragmento amplificado de unas 2 kpb se le añadió sitios EcoRI y XhoI con los oligonucleótidos 5'GCGCGAATTCATGGATCTGACAAAAATGG3' y 5'GCGCCTCGAGTACACATAGCACAGG3' para subclonarlo en el vector pGEX4T-1-GST.

Para el mapeo del sitio de interacción entre las proteínas DRO1 y PLZF se amplificaron fragmentos de los dominios funcionales de PLZF con los oligonucleótidos 5'GCGCGAATTCATGGATCTGACAAAAATGG3' y 5'GCGCCTCGAGCAGCCGCAAATATCC3' para el fragmento Δ ZF y con 5'GCGCGAATTCAGAATGCACTTACTGG3' y 5'GCGCCTCGAGTCACACATAGCACAGG3' para el fragmento Δ BTB-RD2.

6.3 RT-PCR y Real Time PCR.

Las reacciones de transcripción inversa (RT) se realizaron partiendo de 1,5 μ g de RNA total, 1 μ l de 10 mM de dNTPs, 1 μ l oligo-dT (suministrado en el "kit") y agua hasta completar un volumen de 20 μ l. La amplificación de los transcritos se realizó a 42 °C durante 50 minutos siguiendo las instrucciones del fabricante (SuperScript First-Stry Synthesis System, Invitrogen). Los cDNAs obtenidos se conservaron a -80 °C para su posterior análisis.

Para los experimentos de PCR en tiempo real se usó el cDNA procedente de 20 ng de RNA por cada reacción y SYBR green supermix a la concentración indicada por el fabricante (Biorad). Cada muestra se amplificó por triplicado con oligonucleótidos específicos para cada gen: DRO1 5'TATGTGCAACAACGTGATGA3' y 5'AAGTGGTCGATTTTCATGGT3'; AIB1 5'GGCCAGTGATTCACGAAAACG3' y 5'ACTTTCCTGCTCCCGTCTCC3'; y GAPDH como control interno 5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3' y 5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA3'. Para cuantificar los niveles de mensajero de ciclina A2 se usaron los oligonucleótidos 5'GTGGGCACTGCTGCTATGCT3' y 5'GCAGTTTGCAGGCTGCTGAT3' y para c-myc 5'AGATGGTGACCGAGCTGCTG3' y 5'GAGGTGGAGCAGACGCTGTG3'. La expresión relativa de cada gen se analizó con el programa MJ Opticon Monitor (Biorad).

6.4 Mutagénesis dirigida

Las mutaciones puntuales en las distintas construcciones se realizaron con el sistema QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se partió del vector pcEFL-AU5-DRO1, que contenía el inserto de DRO1 a mutar. Se sustituyeron las treoninas 347 y 398 de DRO1 (potenciales sitios de fosforilación por Erk) por alaninas con los oligonucleótidos 5'CCCCAACCTCCCTCAGCCCCCAGAGCCACCACC3' y 5'GGTGGTGGCTCTGGGGGCTGAGGGAGGTTGGGG3' para T347A y 5'GCAGAGGCCTGGGCCCCCTCACCTCCC3' y 5'GGGAGGGTGAGGGGGCCAGGGCCTCTGC3'

para T398A. La reacción se realizó con polimerasa Pfu turbo (Roche) y posterior digestión con la encima de restricción Dpn I, que reconoce secuencias metiladas y hemi-metiladas, digiriendo las copias parentales del DNA no mutadas. Después de la digestión, el producto final se transformó en la cepa bacteriana competente DH5 α y se sembró en placas LB ampicilina. La placas fueron preparadas resuspendiendo 35 gramos de medio deshidratado LB agar Lennox (Conda) en 1 l de agua destilada. Posteriormente el medio se autoclavó y una vez su temperatura fue inferior de 50 °C, se añadió ampicilina a una concentración final de 50 μ g/ml.

7. Otras técnicas empleadas.

7.1 Marcaje de BrdU e inmunohistoquímica.

Ratones silvestres y AIB1-tg de 10 semanas de edad se inyectaron intraperitonealmente con 100 μ g/g de peso corporal con una solución de BrdU (Sigma) en PBS a concentración de 10 mg/ml. Se extirparon las mamas y se fijaron con formalina al 10% durante 6 horas. Tras un lavado en agua destilada durante 20 minutos, las mamas fueron deshidratadas mediante concentraciones crecientes de etanol al 70, 80, 96 y 100%. Posteriormente se lavaron en una disolución etanol:Xilol (Merck) durante 5 minutos y se pasaron finalmente a Xilol por un periodo de 45 minutos. El proceso de parafinado se realizó a una temperatura de 60 °C en tres pasos, primero en parafina I (46 °C-48 °C) (Merck) durante 1 hora, segundo en parafina II (51 °-53 °C) (Merck) durante dos horas y por último en parafina III (57 °C-60 °C) (Merck) durante 3 horas. Los bloques de parafina se realizaron en parafina III.

Los bloques de parafina se cortaron con microtomo en secciones de 5 μ m de grosor y se montaron sobre portaobjetos (Superfrost/Plus, Fisher Scientific). Para realizar la tinción inmunohistoquímica se procedió al desparafinado e hidratación de las secciones. Las muestras se trataron con 3% H₂O₂ en PB 0.1M 10 minutos en oscuridad y tras tres lavados con PB se trataron con HCl 2N 30 minutos a 37 °C, neutralizándose posteriormente con tampón borato 0.1M pH 8.5 15 minutos. A continuación se bloquearon en PGB Superblock (PB 0.1 M, 10% suero de caballo y 0.1% BSA) durante 1-2 horas a temperatura ambiente y se permeabilizaron con PBS y Triton TX-100 (Merk) al 0.2% durante 10 minutos. Posteriormente se incubaron con anticuerpos anti-BrdU de rata (Accurate Chemical) diluidos 1:100 en PBS y Triton TX-100 (Merk) al 0.2 % a 4 °C durante toda la noche. Tras realizar tres lavados en PBS las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios para rata acoplados a peroxidasa. Finalmente las muestras se revelaron con DAB (3-3 diamino benadina) y se realizó una tinción de contraste nuclear con hematoxilina.

7.2 GeneChip de Affymetrix MG U74Av2.

Se aisló mRNA de cultivos primarios epiteliales de mamas de hembras WT y tgAIB1. A partir del mRNA extraído, se sintetizó cRNA y se hizo hibridar con los oligonucleótidos de los “chips”.

La señal de todos los “chips” se normalizó utilizando el método RMA (Robust Multi-Array analysis) basado en la normalización por cuantiles. Seguidamente el cálculo de la expresión de cada gen se hizo según el método de Irizarry incluido también en el paquete RMA. Finalmente la comparación entre los distintos chips se hizo partiendo de la consideración de dos grupos, WT y AIB1-tg, y el cálculo de la expresión diferencial significativa de los genes se hizo por el método SAM (Significance Analysis of Microarrays) basado en permutaciones aleatorias y con cálculo de significación estadística basado en FDR (False Discovery Rate). El análisis fue realizado por el Dr. Javier de las Rivas, Grupo de Bioinformática y Genómica Funcional del Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca).

7.3 Doble Híbrido.

Generación de la construcción-cebo.

Para construir la proteína híbrida LexA-Dro1 se amplificó la región codificante de DRO1 a partir del plásmido pCEFL-AU5-DRO1 con los oligonucleótidos 5'GCG CGAATTCATGACATGGAGAATGGGAC3' y 5'GCGCCTCGAGTCAGTAAGGGTATCCATG GTG3', añadiendo los sitios de restricción EcoRI y XhoI en 5' y 3' respectivamente para su posterior subclonación en el plásmido pEG202.

Transformación de la cepa de levadura EGY48.

El ensayo del doble híbrido se realizó con la cepa EGY48 (MAT α ura3 trp1 his3 3lexAop-leu2) que deriva de la cepa U457, donde mediante recombinación homóloga se reemplazaron las secuencias operadoras del gen LEU2 por secuencias operadoras LexA derivadas del gen colE1 (Ebina et al. 1983).

Se inoculó la cepa EGY48 en 10 ml de medio mínimo líquido -U:Glu (glucosa) y se creció a 30 °C durante toda la noche. Al día siguiente, el precultivo se diluyó de manera que transcurrieran dos ciclos celulares para alcanzar la densidad óptica óptima para la transformación, que comprende el rango de DO₆₀₀ = 0.4-0.6. Entonces, se recogieron las células y se resuspendieron en 100 μ l de tampón TE. Posteriormente fueron transformadas con el DNA de interés por el método de acetato de litio/PEG (polietilenglicol) mediante choque térmico a 42 °C durante 10 minutos. Las levaduras transformadas se sembraron en

placas con el medio mínimo correspondiente y se mantuvieron en incubador a 30 °C durante 2-3 días hasta la aparición de las primeras colonias.

Así, la cepa EGY48 se cotransformó con el vector pSH18-34, que codifica para el gen URA3 y contiene además un operón con 8 repeticiones del operador de LexA que dirigen la expresión del gen reportero LacZ y con el vector pEG202·DRO1 que, además de la proteína híbrida LexA·DRO1, contiene el gen de HIS3.

Transformación de EGY48 con la librería de cDNA de riñón humano.

Un precultivo de la cepa EGY48 (previamente cotransformada con los vectores pSH18-34 y pEG202·DRO1) fue crecido en 5 ml de medio mínimo –HU:Glu durante toda la noche. Al día siguiente el precultivo fue llevado a un volumen total de 150 ml y se siguió creciendo hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 0.5$. Las levaduras se recogieron por centrifugación a 1500 xg durante 5 minutos. El “pellet” se lavó en agua destilada y se resuspendió en 1 ml de TE/LiOAc (Tris-EDTA pH 8, 0.1 M LiOAc). Se efectuaron 10 reacciones independientes, cada una de ellas compuesta por 100 μ l con 4 μ g de librería de riñón humano adulto conteniendo 3.5×10^6 clones independientes (Clontech), 2 μ l LiOAc 1M, 10 μ g esperma de salmón y 600 μ l de PEG/LiOAc/TE (12:1.5:1.5). Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 minutos, añadiéndose entonces 80 μ l de DMSO (Sigma) para aumentar la eficiencia de la transformación. Posteriormente se realizó el choque térmico a 42 °C durante 10 minutos. Por último las 10 reacciones se centrifugaron a 1000 xg, se resuspendieron en 600 μ l de agua estéril y se sembraron en 10 placas de medio mínimo –HUT:Glu de 15 cm de diámetro. Se obtuvieron un total de $1.78 \cdot 10^6$ transformantes que fueron recogidos y resuspendidos 1:1 en tampón para su criopreservación (65% Glicerol, 100 mM sulfato de magnesio, 25 mM Tris pH 8) en criotubos (Corning) a -80 °C.

Se sembró una de las alícuotas conservada a -80 °C en 25 ml de medio mínimo –HUT:Gal-Raff (galactosa, rafinosa) donde la glucosa ha sido sustituida por galactosa y rafinosa para activar la expresión de la librería. Transcurridas 4 horas las levaduras se centrifugaron a 1500 xg y se sembraron en 16 placas –LHUT:Gal-Raff/Xgal. El resultado esperado es que aquellos productos génicos expresados por la librería que interaccionen con DRO1 activaran la síntesis de LEU2 y de β -galactosidasa, de modo que permitirán el crecimiento de la levadura en ausencia de leucina. Además, Xgal actuará como sustrato con la β -galactosidasa dando un producto de color azul característico. Así, transcurridos de 2 a 3 días, los transformantes positivos serán las colonias azuladas capaces de crecer en el medio mínimo –HUTL:Gal-Raff. Se obtuvieron un total de 104 clones potencialmente positivos.

La validez de los transformantes positivos se corroboró mediante la realización de réplicas, separando el análisis del crecimiento sin leucina del de la formación del color, tanto

en presencia de galactosa como en presencia de glucosa, constituyendo un control negativo muy relevante y necesario dada la frecuente presencia de falsos positivos. El primer reportero es el gen LEU2, que rescata la auxotrofia para leucina y es testado en placas -LHUT:Glu (resultado esperado negativo) y -LHUT:Gal-Raff (resultado esperado positivo). El segundo reportero es el plásmido LacZ, testado en placas -HUT:Glu/Xgal (resultado esperado negativo) y -HUT:Gal-Raff/Xgal (resultado esperado positivo). De los 104 clones analizados, sólo 16 resultaron positivos tras éste último análisis por réplicas.

Análisis del DNA plasmídico de los clones.

El DNA plasmídico de las levaduras se extrajo usando el “kit” de purificación (QIAGEN purification kit), de forma análoga que en bacterias. La mezcla de plásmidos purificados se analizó por PCR y se resolvió cuidadosamente en un gel de agarosa, comparándose el tamaño del producto de PCR de las distintas colonias obtenidas de modo que aquellos que presentaban el mismo tamaño molecular se consideraron iguales, escogiéndose sólo uno como representativo del resto. Cada uno de los clones que amplificaban fragmentos con pesos moleculares variables se enviaron a secuenciar. Los oligonucleótidos empleados para su secuenciación son los siguientes 5'GAAGCGGATGTTAACGA3' y 5'GAAGTCCAAAGCTTCTCGAG3'.

De un total de 16 clones analizados, fueron considerados distintos 5. Posteriormente se confirmó individualmente cada uno de los 5 clones, para lo que fue necesario aislar el plásmido de interés (pJG4-5-cDNA) de la mezcla de plásmidos purificados. Para ello 100 ng de la mini-prep se transformó en bacterias DH5 α y se sembró en placas LB:Xgal. Se obtuvieron colonias azules y blancas, siendo éstas últimas las que contenían el plásmido de interés con una probabilidad del 50%. Se seleccionaron los clones blancos y se digirieron con BamHI/Sal, la obtención de una banda de \approx 500 pb correspondía al plásmido de la librería. Una vez purificado el plásmido de interés, se reconfirmó la especificidad de la interacción transformándolo individualmente junto a pEG202-DRO1 y se sembrando la transformación en placas -LHUT:Gal-Raff. De las 5 transformaciones realizadas, la correspondiente al clon #A1 resultó la más relevante. El análisis por secuenciación del cDNA de la librería de dicho clon codificaba para la proteína PLZF.

OBJETIVOS

- Caracterización del modelo transgénico murino AIB1-tg, para determinar las consecuencias de la sobre-expresión de AIB1 en la morfogénesis de la mama.
- Determinar mediante el establecimiento de cruces de animales AIB1-tg con el modelo de animales "knockout" para p27^{Kip1}, las consecuencias de la pérdida de un alelo de p27^{Kip1} en la hiperplasia inducida de nuestro modelo AIB1-tg. Del mismo modo determinar la capacidad oncogénica de AIB1 mediante el establecimiento de cruces con el modelo MMTV/*neu*.
- Caracterización funcional del coactivador AIB1 y determinación de dominios importantes en su estabilidad y actividad transcripcional.
- Identificar y estudiar nuevos intermediarios apoptóticos implicados en la insensibilización apoptótica mediada por AIB1.

RESULTADOS

1. Caracterización del modelo murino AIB1-tg.

1.1 Hiperplasia en mama inducida por AIB1.

La sobre-expresión de AIB1 en tumores de mama, implica directamente su actividad con la progresión tumoral en la glándula mamaria. Para estudiar su implicación, hemos generado un modelo murino transgénico (Avivar et al. 2006), donde el transgén humano AIB1 se sobre-expresa 2.5 ± 0.3 veces en células epiteliales de ratón. El promotor MMTV, que controla la expresión del transgén AIB1 introducido, dirige su expresión específicamente a las células epiteliales de la mama. Quisimos estudiar las consecuencias fenotípicas de una sobre-expresión moderada de AIB1, a diferencia de otros modelos de transgénicos de AIB1 donde la expresión es de 7,6 veces más (Torres-Arzayus et al. 2004),

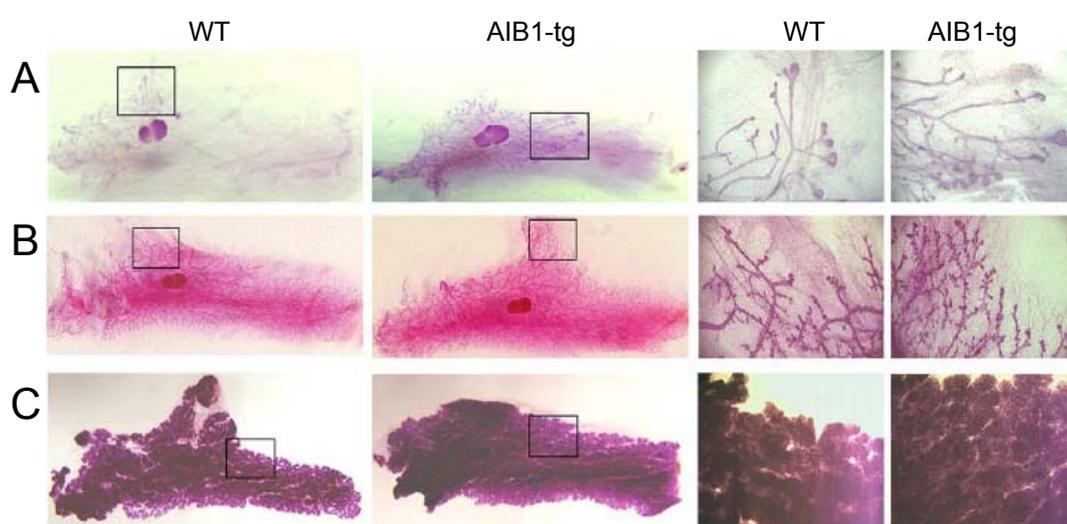


Figura 3. Los animales AIB1-tg presentan hiperplasia ductal. Montajes de mama total se efectuaron en hembras de **A)** 4 semanas, $n = 6$ WT y 6 AIB1-tg; **B)** 12 semanas, $n = 6$ WT y 6 AIB1-tg; **C)** hembras lactantes, $n = 3$ WT y 3 AIB1-tg. En los paneles de la derecha se observan detalles de las zonas marcadas.

Para estudiar la prevalencia de cáncer en nuestro modelo animal, se mantuvieron en observación un total de 28 hembras AIB1-tg y 21 hembras WT durante dos años. No se detectó desarrollo de tumor en los animales objeto de estudio. Estos resultados sugieren que niveles bajos de sobre-expresión de AIB1 no son suficientes para desencadenar tumores (inducir inestabilidad cromosómica), en contraste con otras líneas de transgénicos de mayor expresión (Torres-Arzayus et al. 2004). Sin embargo, sí que se detectó un mayor crecimiento ductal y ocupación en las mamas de animales AIB1-tg. Al comienzo de la pubertad (4 semanas de edad), se observó un mayor crecimiento ductal, así como un mayor engrosamiento de las terminaciones ductales en tinciones de mamas completas (Fig. 3A, detalles en paneles de la derecha). Las TEB o yemas terminales son características de la

mama en pubertad y representan las regiones más proliferativas del epitelio, por lo que estos resultados nos sugieren que la sobre-expresión de AIB1 está favoreciendo la proliferación epitelial ductal.

Como se puede observar (Fig. 3A), el crecimiento ductal en animales AIB1-tg se extiende más allá del ganglio linfático (abultamiento redondeado fuertemente teñido en la zona central de la mama) comparado con los animales WT, apoyando la mayor proliferación del epitelio transgénico. Características fenotípicas análogas se observaron en mamas de hembras adultas (12 semanas de edad) donde además, se observó un mayor porcentaje de ocupación de la bolsa de grasa mamaria y un mayor número de ramificaciones secundarias (Fig. 3B). En el máximo desarrollo de la mama, en la lactancia, también fue observada una mayor ocupación y arborización de los ductos mamarios de ratones AIB1-tg (Fig. 3C). Este fenotipo fue observado con una alta penetrancia. Todos estos resultados sugieren que aunque bajos niveles de AIB1 no son suficientes para producir tumores, sí que producen hiperplasia epitelial mamaria, aumentando la proliferación y ramificación lateral de los ductos durante el desarrollo y aumentando además, el contenido de epitelio y diferenciación terminal durante la lactancia.

1.2 Aumento en la proliferación y ocupación del estroma en animales AIB1-tg.

Con objeto de cuantificar el fenotipo observado en hembras AIB1-tg, se determinó el porcentaje de estroma ocupado por tejido epitelial en hembras adultas. Consistente con la morfología observada, las hembras AIB1-tg muestran un 25% más de ocupación (Fig. 4A). Éste incremento en la ocupación del estroma está relacionada con un incremento en la incorporación de BrdU (Fig. 4B), indicando que las células epiteliales AIB1-tg tienen un mayor índice de proliferación lo que podría explicar la mayor ocupación del estroma. Estas observaciones sugieren un papel importante de AIB1 en la iniciación del tumor y demuestran que niveles moderados de sobre-expresión de AIB1 son suficientes para producir hiperplasia. Probablemente, modificaciones adicionales tanto a nivel genético como epigenético son requeridas posteriormente para desencadenar la génesis del tumor.

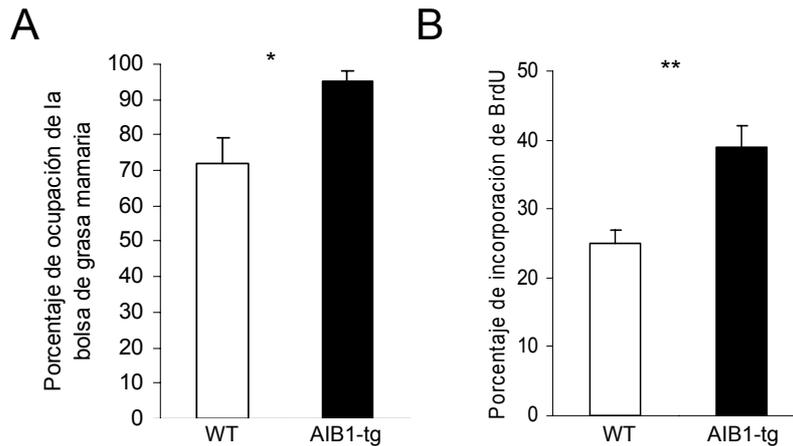


Figura 4. Incremento de la ocupación del estroma y proliferación celular en AIB1-tg. A) Porcentaje de ocupación del estroma medio de 3 hembras WT y 3 hembras AIB1-tg de 10 semanas de edad. El porcentaje medio de ocupación se estimó dividiendo la distancia total de crecimiento de los ductos entre el tamaño del tejido graso. *P = 0.02. **B)** Incorporación de BrdU, representada por el número de núcleos positivos en secciones de tejido de glándula mamaria en 10 campos distintos por muestra analizada. Los resultados finales representan la media de 3 experimentos, representando un total de 9 WT y 9 AIB1-tg. **P = 0.04.

1.3 La localización de AIB1 en el núcleo coincide con la entrada en la fase S del ciclo celular.

En ensayos de inmunofluorescencias de secciones de mama se observó que la incorporación de BrdU correspondía con la localización nuclear de AIB1 (Fig. 5A). Ésta observación es similar tanto en animales WT como AIB1-tg (los anticuerpos empleados en este caso detectan tanto el AIB1 humano del transgén como el homólogo del ratón p/CIP), si bien, el porcentaje de incorporación de BrdU fue mayor en animales transgénicos como cabía esperar (Figs. 2B y 3B). Ésta correlación entre proliferación y marcaje nuclear de AIB1 es independiente del estado de desarrollo de la mama como se puede observar comparando hembras en pubertad y lactantes (Fig. 3A). Dado que la incorporación de BrdU se produce en la fase S del ciclo celular, éstos resultados sugieren que el transporte de AIB1 al núcleo es un mecanismo que ocurre mayoritariamente durante o después de la fase S. Consistente con ésta observación, células no proliferativas contienen niveles bajos de AIB1 y localización citoplasmática. Esta observación fue cuantificada, confirmándose que las células que habían incorporado BrdU coincidían significativamente con tinción nuclear de AIB1 (barras abiertas) más que con tinción citosólica de AIB1 (barras cerradas) (Fig. 5B).

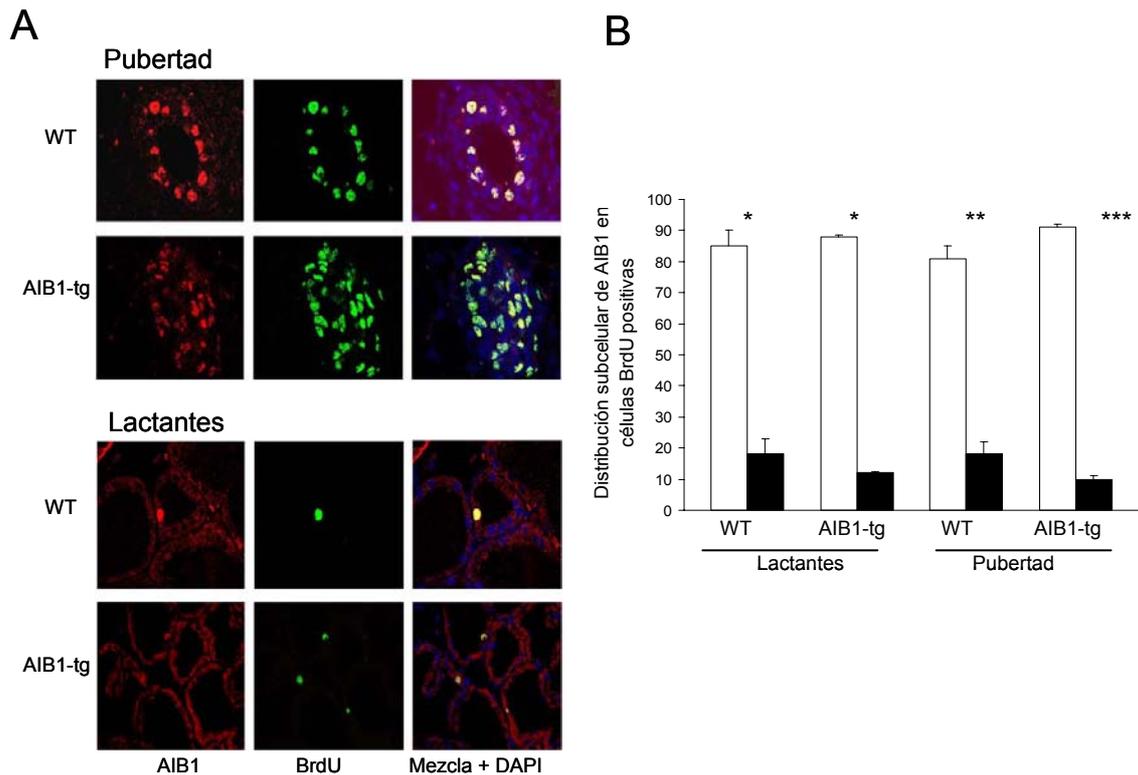


Figura 5. La localización nuclear de AIB1 coincide con la entrada en fase S del ciclo celular. A) El doble marcaje se realizó, con el anticuerpo policlonal anti-AIB1 a una dilución de 1:200, que reconoce tanto AIB1 como p/CIP y con el anticuerpo anti-BrdU. **B)** La coincidencia del marcaje para BrdU y AIB1 en el núcleo se representó en barras abiertas, mientras que la localización citoplasmática de AIB1 corresponde con barras cerradas. Lo representado corresponde a los marcajes de 3 hembras WT y 3 hembras AIB1-tg, en cada una de las edades. * $P = 10^{-6}$, ** $P = 10^{-3}$, *** $P = 10^{-8}$, **** $P = 10^{-3}$.

Resultados previos (Louie et al. 2004) mostraron que la expresión de AIB1 aumenta a medida que la célula va progresando de G1 a S, sugiriendo la existencia de un mecanismo de retro-alimentación. Nuestros resultados sugieren la existencia de una nueva función durante o después de la fase S, además de las ya descritas durante la fase G1 como coactivador de E2F1 (Louie et al. 2006) y promotor de la transcripción de ciclina D1 (Planas-Silva et al. 2001).

1.4 La sobre-expresión de AIB1 induce la expresión de ciclina D1 y cadherina E.

Para profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares regulados por AIB1, se aislaron células epiteliales primarias de mama y se cultivaron hasta un máximo de dos pases con objeto de mantenernos lo más próximos al modelo animal y evitar la ganancia de modificaciones que ocurren durante sucesivos pases en los cultivos *in vitro*. Como control, los cultivos de AIB1-tg se silenciaron en paralelo con pequeño RNA de interferencia específico de AIB1 (SiAIB1) y previamente validado (Shang y Brown 2002). Se estudiaron las características de crecimiento de estos cultivos en monocapa mediante la técnica de

citometría de escáner por láser o LSC. Como se esperaba, los cultivos primarios de AIB1-tg (barras rayadas) poseían un menor porcentaje de células en fase G0-G1 y mayor porcentaje de células en G2-M (Fig. 6A), corroborando los resultados precedentes observados en la mama hiperplásica de ratones AIB1-tg.

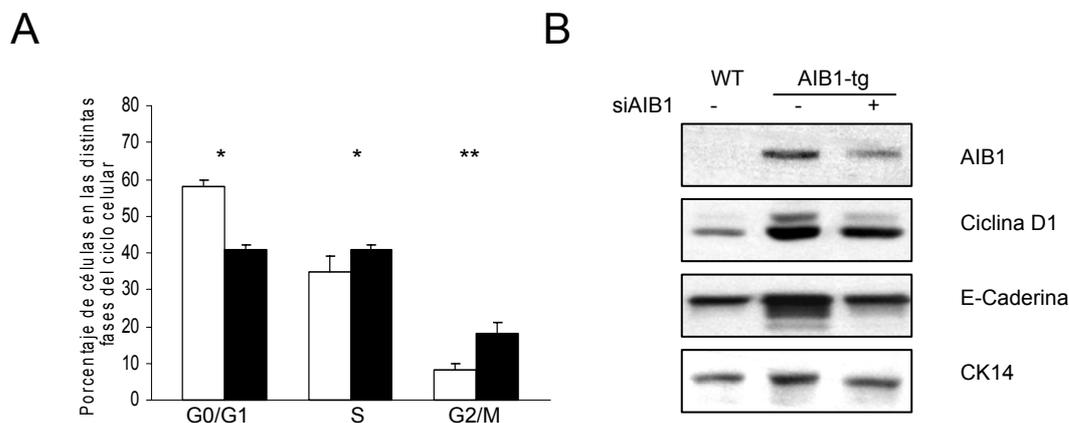


Figura 6. La sobre-expresión de AIB1 promueve la expresión de ciclina D1 y caderina E. **A)** Células epiteliales primarias de animales WT (barras abiertas) y animales AIB1-tg (barras cerradas) fueron sembradas a una densidad de 5000 células/cm² y crecidas durante dos días antes del análisis por citometría de escáner por láser, LSC. *P = 0.0004, **P = 0.14, **P = 0.04. **B)** Análisis por “western blot” mostrando niveles de AIB1, ciclina D1 y caderina E en células epiteliales primarias WT, AIB1-tg y AIB1-tg silenciadas con siAIB1. Citoqueratina 14 fue usada como control de carga.

Mediante análisis por “western blot” obtuvimos que la sobre-expresión de AIB1 induce un incremento en la expresión de ciclina D1, en concordancia con resultados previos (Fig. 6B, calles izquierda y central). El incremento en ciclina D1 quedó disminuido cuando se silenció AIB1 de los cultivos (Fig. 6B, calle derecha), confirmando que el aumento de ciclina D1 era debido a la sobre-expresión de AIB1. Curiosamente, en cultivos AIB1-tg se observó también un incremento de cadherina E, una proteína transmembrana específica de epitelio que participa en procesos de adhesión célula-célula. Además, cadherina E actúa como reservorio de β -catenina, importante regulador de factores de transcripción implicados en la proliferación celular. El silenciamiento de AIB1, de forma análoga a las observaciones anteriores, disminuye los niveles de cadherina E.

1.5 Implicación de AIB1 en la transición epitelio-mesénquima.

El complejo cadherina E/ β -catenina es fundamental para la formación y mantenimiento de las uniones adherentes célula-célula en el tejido epitelial. Además, están implicadas en el control de la diferenciación y proliferación celular. La pérdida de la actividad del complejo cadherina E/ β -catenina a nivel intercelular, provoca la degradación de la matriz extracelular adoptando las células un fenotipo más invasivo (Yoshida et al. 2001).

El factor de transcripción Twist juega un papel esencial en la metástasis. Se ha demostrado que la inhibición de la expresión de Twist detiene la capacidad metastásica de células de carcinoma mamario (Yang et al. 2004). Por otro lado, Twist promueve la transición epitelio-mesénquima, por lo que decidimos analizar si la sobre-expresión de AIB1 tenía algún efecto sobre Twist. Para ello, se analizaron lisados protéicos de glándula mamaria en hembras adultas WT y AIB1-tg de 8 semanas de edad. Mediante análisis por "western blot", se observó un incremento significativo de los niveles de Twist en los animales AIB1-tg (Fig. 7A), por lo que estaríamos ante un nuevo mecanismo que implica directamente a AIB1 en la pérdida de la adhesión celular y metástasis, a otros descritos recientemente (Li et al. 2007). El silenciamiento de AIB1 por medio de RNA de interferencia, produce una disminución de los niveles de Twist (Fig. 7B), confirmando que la sobre-expresión de Twist era debida a la sobre-expresión de AIB1.

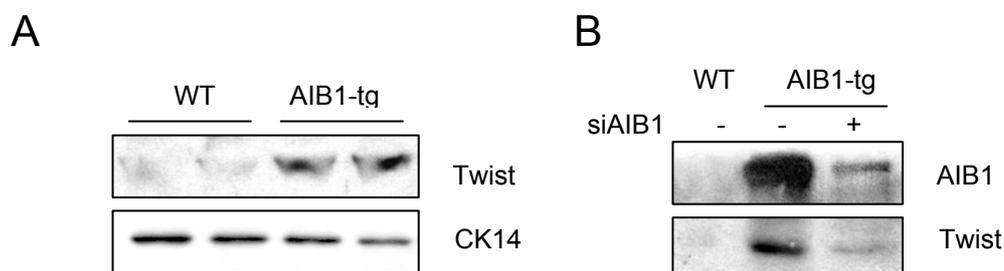


Figura 7. La sobre-expresión de AIB1 induce un incremento en los niveles de Twist. A) Análisis por "western blot" mostrando los niveles de Twist en lisados de mama total de 2 hembras WT y 2 AIB1-tg de 10 semanas de edad. **B)** "Western blot" de cultivos de células epiteliales primarias de hembras WT, AIB1-tg y AIB1-tg silenciadas con RNA de interferencia siAIB1. Citoqueratina 14 fue usada como control de carga, CK14.

2. Análisis fenotípico del cruce AIB1-tg con otros modelos transgénicos.

2.1 AIB1 rescata el fenotipo en animales deficientes de p27^{Kip1}.

p27^{Kip1} es un regulador del ciclo celular que inhibe los complejos ciclina-Cdk durante G0/G1 y G1/S, bloqueando la progresión celular. Modelos murinos en los que se estudia la función de p27^{Kip1} sugieren que la pérdida del inhibidor está implicada en el desarrollo de cánceres (Bloom y Pagano 2003).

Para determinar las consecuencias de la reducción o pérdida de la expresión de p27^{Kip1} en la morfogénesis de la glándula mamaria, preparaciones de mama total de hembras de 8 semanas de edad fueron examinadas. Se observó que mamas de hembras p27^{Kip1}+/- poseían un mayor crecimiento ductal y un incremento significativo en la ocupación del estroma. En imágenes magnificadas (Fig. 8A, paneles de la derecha) se pudo observar que acompañando a la mayor ocupación, las TEB de animales p27^{Kip1}+/- tenían mayor tamaño y existían en un mayor número si las comparamos las hembras p27^{Kip1}+/-.

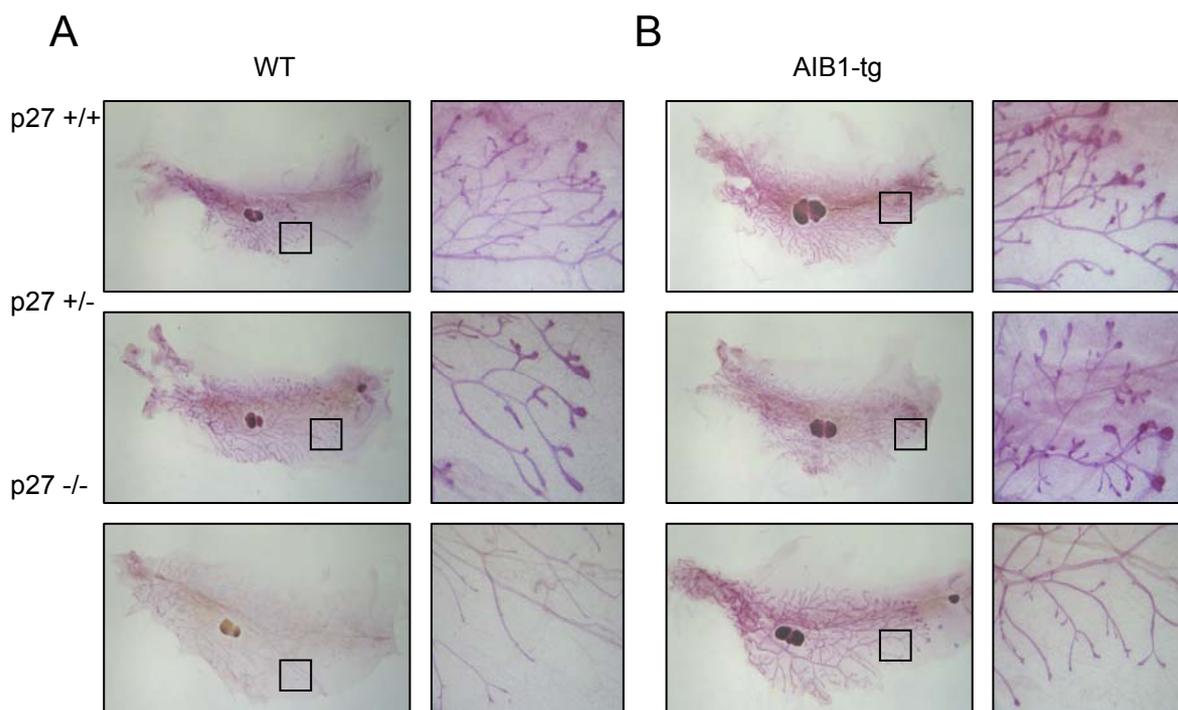


Figura 8. AIB1 rescata el fenotipo de animales deficientes de p27^{Kip1}. **A)** Montajes de mama total en hembras vírgenes. Imágenes representativas de un total de 20 hembras analizadas, de los tres genotipos obtenidos del cruce entre animales p27^{Kip1}+/- . **B)** Imágenes representativas de un total de 17, de los tres genotipos indicados resultantes del cruce de animales p27^{Kip1}+/- con AIB1-tg/p27^{Kip1}+/- . Las imágenes magnificadas de la derecha corresponden a los detalles de las zonas enmarcadas con un rectángulo.

Notablemente, en el epitelio de las hembras $p27^{Kip1-/-}$ se observó el efecto contrario, estando caracterizado por un menor número de TEB y una baja ocupación del estroma (Fig. 8A), en el detalle ampliado (8A panel de la derecha) se puede observar además, la menor consistencia de los ductos, menor número de ramificaciones laterales, así como la ausencia casi completa de TEB. Nuestras observaciones demuestran que la pérdida de un alelo provoca un incremento en el crecimiento epitelial de mama, mientras que la pérdida de ambos alelos produce un retraso en el crecimiento epitelial de mama, coincidiendo con análisis precedentes de éste modelo (Muraoka et al. 2001).

El objetivo que nos propusimos a continuación fue estudiar la implicación de $p27^{Kip1}$ en la hiperplasia mamaria de los ratones AIB1-tg. Mediante dos cruces sucesivos de animales AIB1-tg con ratones heterocigotos para $p27^{Kip1}$ obtuvimos los tres genotipos de interés. Las mamas de hembras AIB1-tg/ $p27^{Kip1+/-}$ presentaron la mayor ocupación del saco de grasa mamario y el mayor grado de ramificación. En las imágenes ampliadas (Fig. 8B paneles de la derecha) se puede observar el mayor tamaño de las TEB de las mamas AIB1-tg/ $p27^{Kip1+/-}$, lo que sugiere una mayor tasa de crecimiento ductal.

Sin embargo el fenotipo más interesante se observó en las mamas de hembras AIB1-tg/ $p27^{Kip1-/-}$ (Fig. 8B). La ocupación del estroma continúa hasta llegar prácticamente al segundo ganglio linfático (en el extremo derecho de la mama) y los ductos recuperan el fenotipo perdido en los $p27^{Kip1-/-}$ (Fig. 8A). En las imágenes ampliadas (Fig. 8B panel de la derecha) se observan engrosamientos terminales, que forman pequeños TEB y gran número de ramificaciones laterales, ausentes en las hembras $p27^{Kip1-/-}$ (Fig. 8A).

Las observaciones obtenidas demuestran que la sobre-expresión de AIB1 colabora con el fenotipo hiperplásico que produce la pérdida de un alelo de $p27^{Kip1}$. Se produce un incremento en el crecimiento del epitelio mamario, generando una hiperplasia en hembras AIB1-tg/ $p27^{Kip1+/-}$. Sin embargo, la cooperación entre AIB1 y $p27^{Kip1+/-}$ es por vías independientes ya que la sobre-expresión de AIB1 rescata parcialmente el fenotipo de animales $p27^{Kip1-/-}$. Así, se podría concluir que la hiperplasia inducida por la sobre-expresión de AIB1 no depende de $p27^{Kip1}$, sin embargo, puede contrarrestar la ausencia completa de $p27^{Kip1}$ en animales AIB1-tg/ $p27^{Kip1-/-}$ promoviendo la proliferación y la morfogénesis de la mama.

2.2 Her2/neu coopera en la hiperplasia inducida por AIB1.

Nuestro modelo AIB1-tg genera hiperplasia ductal. No se han observado neoplasias debido probablemente a que la baja dosis de sobre-expresión de AIB1 no es suficiente para desencadenar tumores en el tejido epitelial de mama. Ya que en los procesos tumorigénicos son necesarios varios efectos sinérgicos para desencadenar la neoplasia (Wang et al. 2007), quisimos estudiar la conexión entre AIB1 y el receptor tirosina quinasa Her2/neu en la mama.

La sobre-expresión de Her2/neu induce tumores en mama y favorece la metástasis (Guy et al. 1992; Landis et al. 2006). El modelo transgénico MMTV/*neu* (generado en la cepa de ratón FVB y con promotor específico de epitelio MMTV) nos proporciona una buena herramienta para estudiar la capacidad oncogénica de AIB1. Para ello, se cruzaron animales AIB1-tg con transgénicos heterocigotos MMTV/*neu*, obteniéndose los cuatro genotipos necesarios para el estudio WT, WT/MMTV/*neu* y AIB1-tg/WT y los dobles transgénicos AIB1-tg/MMTV/*neu*.

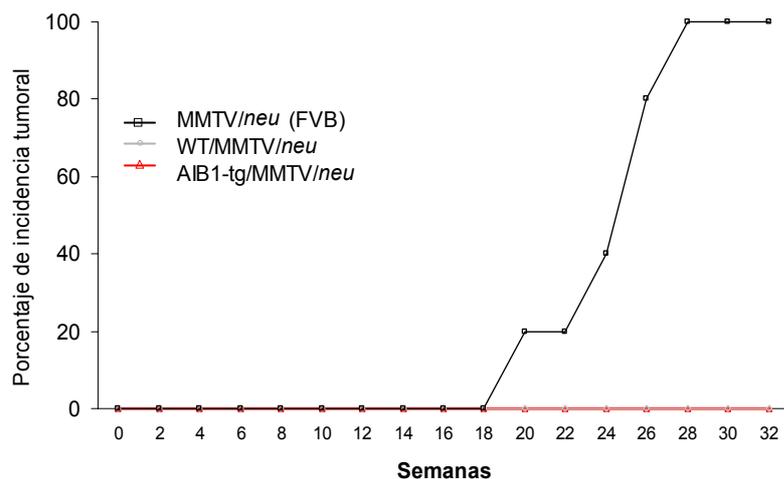


Figura 9. Porcentaje de incidencia tumoral. Una población de hembras de la cepa FVB pura MMTV/*neu* n = 15, y de cepas híbridas FVB con C57Bl/6 WT/MMTV/*neu* n = 23 y AIB1-tg/MMTV/*neu* n = 22 fue estudiada durante un periodo máximo de 10 meses. Los primeros tumores detectables se produjeron a los cuatro meses. Las hembras con tumores superiores a 1cm de diámetro fueron sacrificadas.

En un primer experimento se mantuvieron un total de 34 hembras WT/MMTV/*neu* y 31 hembras AIB1-tg/MMTV/*neu* durante 10 meses para un estudio de progresión tumoral. Se sabe que las hembras homocigotas MMTV/*neu* comienzan a padecer neoplasias a partir de los 4 meses de edad (Muller et al. 1996). En coherencia con lo esperado hembras homocigotas MMTV/*neu* comenzaron a desarrollar tumores a los 4.5 meses (Fig. 9). Sin embargo, en contra de lo esperado, no se observaron tumores en las hembras WT/MMTV/*neu* y más aún, no se produjo un incremento de la incidencia tumoral en hembras dobles transgénicas AIB1-tg/MMTV/*neu* incluso después de pasados 10 meses (Fig. 9).

Para analizar en profundidad el resultado obtenido y definir el papel de AIB1 en la morfogénesis de mama de animales transgénicos MMTV/*neu*, se realizaron preparaciones de mama total de hembras de 2 meses de edad WT, WT/MMTV/*neu* y AIB1-tg/MMTV/*neu*. En contra de lo esperado, las hembras WT/MMTV/*neu* no sólo no desarrollaban tumores sino que, sorprendentemente, reflejaban un importante retraso en la morfogénesis de la mama comparadas con hembras WT (Fig. 10). Además, no se observó un incremento significativo del crecimiento ductal, ni una mayor ocupación del estroma comparando las mamas de hembras WT/MMTV/*neu* y AIB1-tg/MMTV/*neu* (Fig. 10). Sin embargo, la sobre-expresión de AIB1 produce un fuerte incremento en el número de ramificaciones laterales. En las imágenes ampliadas, se observa acompañando al incremento en las ramificaciones laterales, un aumento significativo en el número de TEB (Fig. 10, detalle de mama AIB1-tg/MMTV/*neu*).

Los resultados obtenidos, reflejan un importante retraso en la morfogénesis de la mama en hembras WT/MMTV/*neu*. Este retraso quedó parcialmente restablecido en hembras AIB1-tg/MMTV/*neu*.

A excepción de las hembras control MMTV/*neu*, ninguna de las hembras descendientes de los cruces WT/MMTV/*neu* o AIB1-tg+MMTV/*neu* desarrollaron tumores palpables. A nivel morfológico, tampoco se observaron ni neoplasias ni pequeñas micro-lesiones.

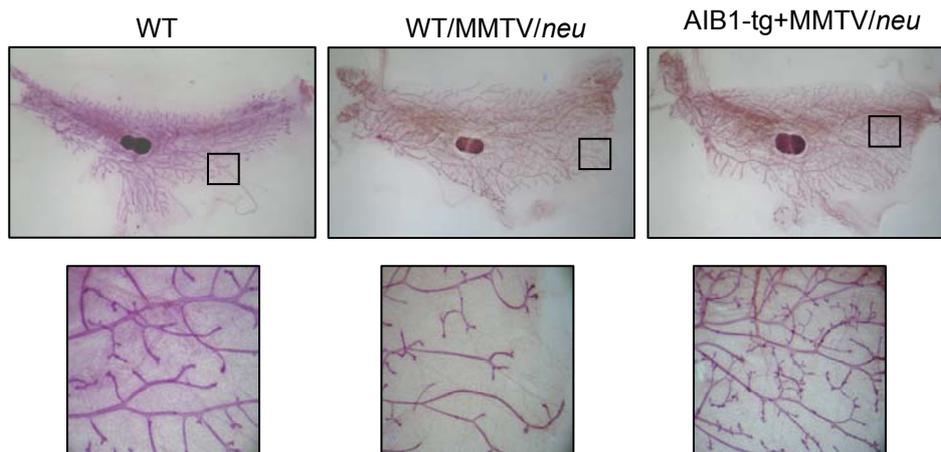


Figura 10. Her2/*neu* coopera con la hiperplasia inducida por AIB1. Montajes de mama total en hembras vírgenes control WT, transgénicas WT/MMTV/*neu* y dobles transgénicas AIB1-tg/MMTV/*neu* de 2 meses de edad. Las imágenes ampliadas de la derecha corresponden a los detalles de las zonas marcadas con un rectángulo.

3. Análisis comparativo de AIB1 en las líneas MCF-7 y HeLa.

3.1 Localización subcelular comparativa.

Quisimos analizar la expresión de AIB1 además de en líneas de cáncer de mama, en otras líneas de interés que serían utilizadas en posteriores experimentos. Se analizaron los niveles de mRNA de AIB1 por PCR en tiempo real en distintas líneas (Fig. 11), relativizando los niveles con la línea humana no transformada de epitelio de mama HMEC. Interesantemente, la sobre-expresión de AIB1 en líneas de cáncer de mama, no sólo está limitada a líneas dependientes de ER como MCF-7 (Bautista et al. 1998), sino que también se observó un incremento de su expresión en líneas como MDA-MB-321, cuyo crecimiento no depende del ER.

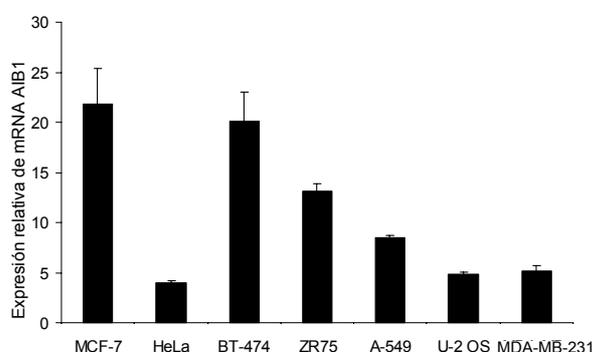


Figura 11. Análisis de la expresión de mRNA de AIB1 por PCR en tiempo real. Las líneas celulares indicadas fueron sembradas a una densidad de 5000 células/cm² y crecidas durante dos días antes de la extracción del RNA. Los porcentajes indicados corresponden a tres experimentos independientes. Los niveles de mRNA de cada línea celular se normalizaron usando la línea epitelial de mama humana HMEC.

Para profundizar en los mecanismos moleculares que regulan la actividad de AIB1, se usó como modelo el estudio comparativo de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y la línea de cáncer de cérvix HeLa. En un primer ensayo, quisimos estudiar la distribución subcelular de AIB1 comparando ambas líneas. Cultivos celulares en crecimiento exponencial, se fijaron y se procesaron en parafina para su análisis inmunohistoquímico. Se observó que mientras en células HeLa AIB1 mostraba una localización preferentemente citosólica, en la línea celular MCF-7 la localización de AIB1 era principalmente nuclear (Fig. 12A). Los resultados anteriores los confirmamos mediante fraccionamientos subcelulares analizados por "western blot" (Fig. 12B). Los resultados anteriores muestran una distinta localización subcelular de AIB1 entre éstas dos líneas, lo que sugiere que los mecanismos que regulan la movilidad de AIB1 entre ambas líneas se encuentran alterados.

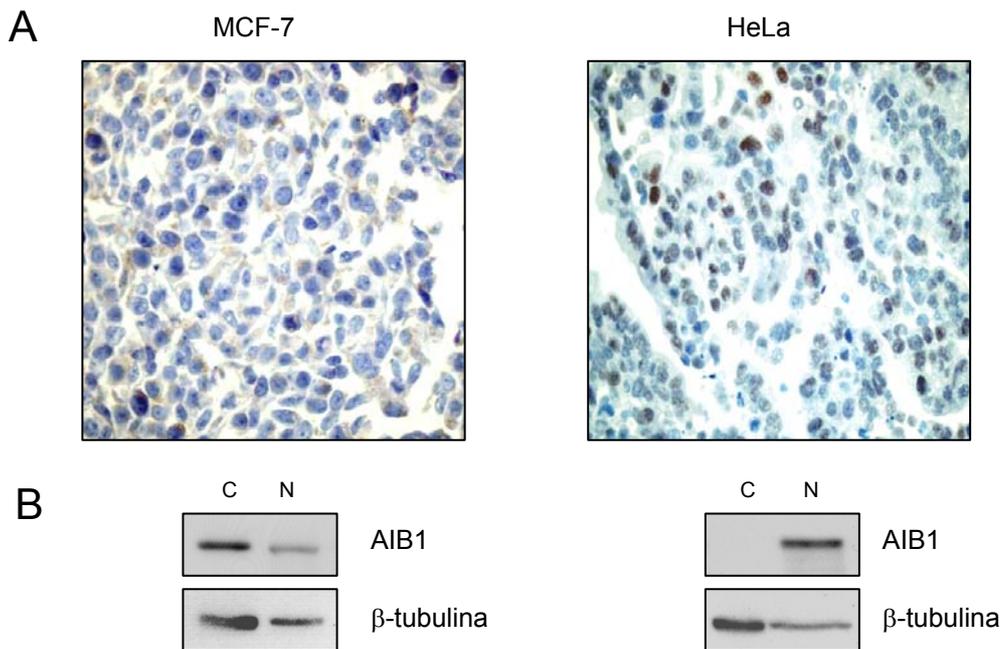


Figura 12. Diferente localización subcelular de AIB1 en líneas de cáncer humano. A) Células MCF-7 y HeLa con crecimiento exponencial fueron recogidas e introducidas en parafina antes del análisis inmunohistoquímico con anticuerpos anti-AIB1. **B)** En paralelo se realizó análisis por “western blot” de lisados celulares fraccionados en citosol (C) y núcleo (N) incubados con anticuerpos anti-AIB1 y β -tubulina como control de carga.

3.1.1 La localización subcelular de AIB1 determina la vida media de la proteína

La localización subcelular es un factor determinante en la actividad de las proteínas (Jung et al. 2007; Nachmias et al. 2007). En la mayoría de los casos, una distinta localización subcelular puede estar determinada por alteraciones en el transporte y/o balances descontrolados en la relación síntesis/degradación protéica. Mediante experimentos de pulso y caza determinamos la vida media de AIB1 y obtuvimos una diferencia significativa entre ambas líneas, siendo la vida media de AIB1 en MCF-7 de aproximadamente una hora, mientras que en HeLa resultó de más de 9 horas (Fig. 13).

AIB1 es un cofactor de transcripción por lo que su actividad proliferativa se relaciona con la localización nuclear (Louie et al. 2004), mientras que su localización citosólica está relacionada con niveles bajos de fosforilación y por tanto de inactividad transcripcional (Wu et al. 2004; Amazit et al. 2007; Li et al. 2007a). Los resultados anteriores indican una localización subcelular citosólica en la línea celular MCF-7, relacionada con una alta tasas de reemplazo protéico, mientras que en HeLa se obtuvo una localización preferentemente citosólica, relacionada con una baja tasa de reemplazo protéico.

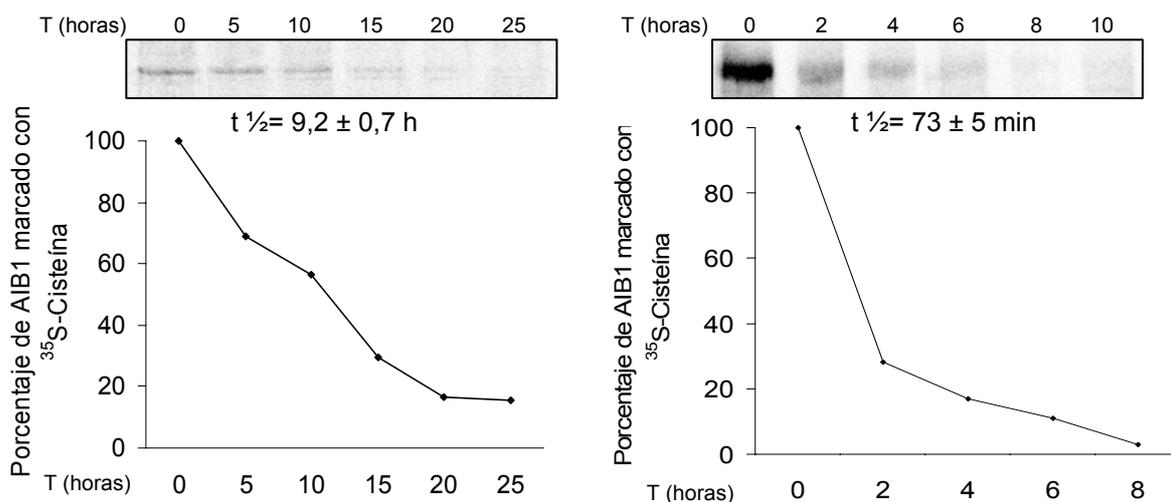


Figura 13 La localización subcelular de AIB1 determina la vida media de AIB1. A) Cultivos celulares subconfluentes de las líneas MCF-7 y HeLa fueron marcados con ^{35}S -cisteína antes de ser lisados en los tiempos indicados e IP con el anticuerpo anti-AIB1. La banda correspondiente a AIB1 fue cuantificada con PhosphorImager. Las imágenes mostradas corresponden a 1 de los 3 experimentos independientes que se realizaron en cada línea celular.

3.1.2 Ciclosporina A aumenta la estabilidad de AIB1 en células MCF-7

Para demostrar que existe una relación entre la localización subcelular y la tasa síntesis/degradación, se realizó un ensayo de pulso y caza modificando la localización de AIB1 en la línea celular MCF-7. Se usó ciclosporina A, droga que bloquea el ciclo celular en la fase G0-G1. Como resultado del bloqueo se obtuvo una localización citosólica de AIB1 en células MCF-7 (Fig. 14A).

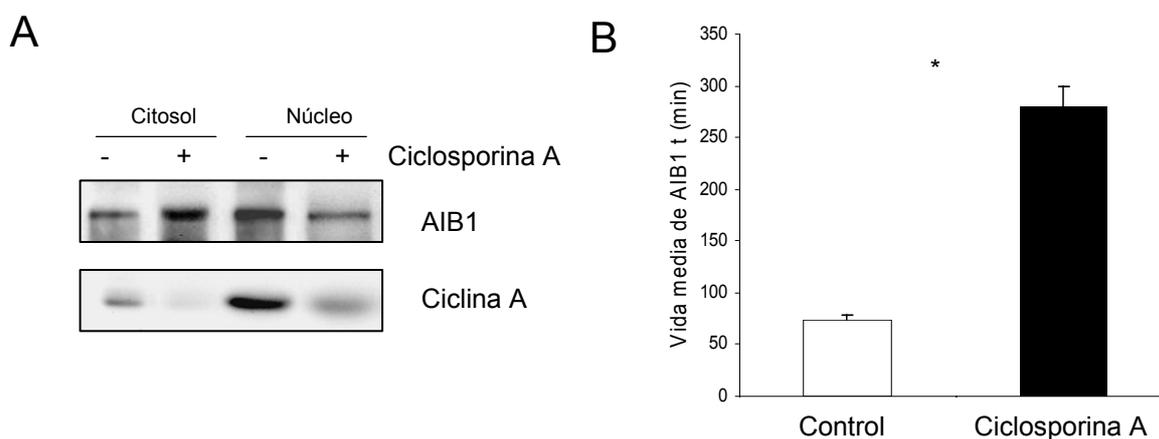


Figura 14. Ciclosporina A aumenta la vida media en células MCF-7. A) Células MCF-7 con crecimiento exponencial (80% confluencia) se trataron con $5\ \mu\text{M}$ ciclosporina A. Los lisados celulares fraccionados se analizaron por “western blot” con anticuerpos anti-AIB1. Como control del bloqueo celular en la fase G0-G1 se usaron anticuerpos anti-ciclina A. **B)** Paralelamente cultivos MCF-7 fueron marcados con ^{35}S -cisteína para el análisis de la estabilidad de AIB1. Se obtuvo una vida media de 73 ± 5 min en los cultivos control (barra abierta) y de 279 ± 10 min en los cultivos tratados con ciclosporina A (barra cerrada). *P = ≤ 0.05 .

Se realizó el ensayo de pulso y caza en células MCF-7 bloqueadas en G0-G1, obteniéndose una vida media de más de cuatro horas (Fig. 14B), un incremento de 3.8 veces con respecto al control. La localización subcelular es determinante en la vida media de la proteína, siendo ésta importante en la función fisiológica y la actividad de AIB1. Los resultados mostrados revelan la existencia de un distinto transporte entre las líneas celulares MCF-7 y HeLa, estableciendo además, una relación entre la localización nuclear y el incremento en la tasa de degradación o reciclaje de AIB1.

3.1.3 Modulación de la estabilidad por SERM

La función fisiológica de AIB1 en la célula es la de promover la transcripción de receptores nucleares activados por ligando (Liao et al. 2002). Se sabe que la actividad de AIB1 está modulada por SERM (moduladores selectivos del receptor de estrógenos) y que ésta actividad depende directamente de su función como coactivador de ER (Shao et al. 2004). Para profundizar en los mecanismos que regulan la estabilidad y por consiguiente en la actividad de AIB1, quisimos estudiar la estabilidad de AIB1 en presencia de distintos compuestos estrogénicos.

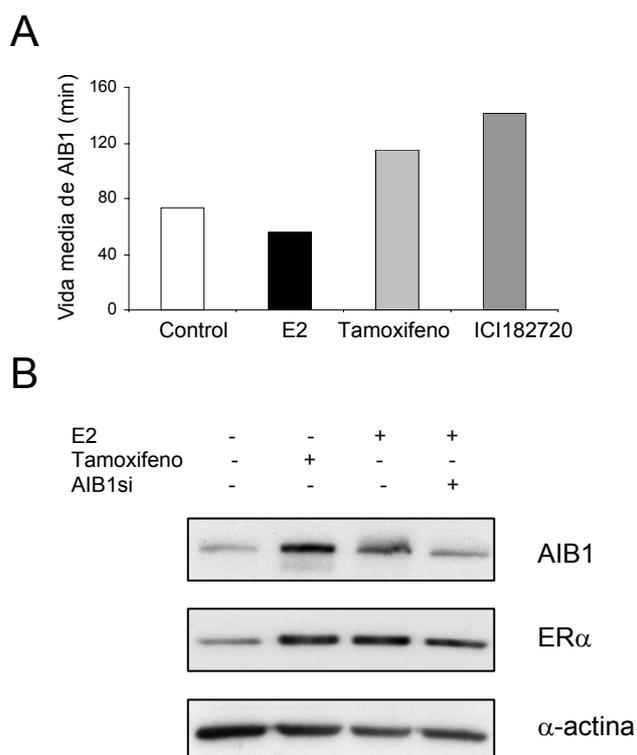


Figura 15. SERM están implicados en la modulación de la vida media de AIB1. **A)** Cultivos celulares subconfluentes fueron tratados con los SERM indicados antes del marcaje con ^{35}S -cisteína. La banda obtenida tras la inmunoprecipitación y SDS-PAGE fue cuantificada por PhosphorImager. Los tiempos de vida media ($t_{1/2}$), están indicados en minutos. **B)** Análisis por “western blot” de lisados celulares de la línea MCF-7 tratados con E2 10 nM y tamoxifeno 10 μM . En paralelo, cultivos celulares estimulados con E2 fueron transfectados con RNA de interferencia específico para AIB1 a una concentración final de 5 nM. Los lisados fueron incubados con anticuerpos específicos para AIB1 y ER α , usando α -actina como control de carga.

Cultivos celulares de la línea MCF-7 tratados con los distintos moduladores estrogénicos, fueron sometidos a un ensayo de pulso y caza (Fig.15). Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con E2, ligando natural de ER, disminuye la vida

media de AIB1, mientras que el tratamiento con los antagonistas ICI182780 y tamoxifeno, incrementan el tiempo de vida media de la proteína.

La señalización hormonal que activa complejos de transcripción de los que forma parte el ER, juega un papel crucial en la estabilidad y reciclado de ER (Reid et al. 2003) y en consecuencia sobre AIB1. Los estrógenos y sus antagonistas regulan transcripcionalmente a AIB1 mediante la interacción con ER α .

Para definir el efecto de los SERM en líneas celulares que no sobre-expresaban el ER α , las observaciones anteriores fueron contrastadas usando la línea celular de riñón de mono COS-1. Se sobre-expresaron AIB1 y ER α de forma transiente en células COS-1 tratadas con E2 y tamoxifeno (Fig. 15B). El tamoxifeno provoca un incremento importante en la estabilidad de la proteína AIB1 ectópica (Fig. 15B, calle 2), acompañado por un aumento en la estabilidad de ER α . Como cabía esperar el E2 aumenta la expresión de AIB1 y de ER α (Shao et al. 2004), mientras que el silenciamiento de AIB1 desestabiliza ER α unido a ligando (Fig. 15B, calle 4). Éste resultado sugiere un nuevo mecanismo de desestabilización del ER α mediada por el coactivador AIB1.

Nuestros resultados sugieren un mecanismo de control por el que el AIB1 de los complejos activos sería más rápidamente degradado, evitando así una transcripción continua que podría resultar oncogénica. Por el contrario, los agentes antagonistas de estrógenos, el tamoxifeno y el antagonista puro ICI182780, produjeron un incremento de la vida media de AIB1, sugiriendo una estabilización de la proteína y/o del complejo proteico del cual AIB1 forma parte. Resultados similares han sido obtenidos en experimentos análogos con células HeLa (Lonard et al. 2004). Éstas observaciones tienen una gran importancia en el tratamiento clínico, ya que la actividad de AIB1 ha estado relacionada con fenómenos de resistencia al tratamiento anti-estrogénico en cáncer de mama (Osborne et al. 2003). Nuestros resultados muestran una estabilización proteica de AIB1 inducida por antagonistas del E2 como el ICI182780 o tamoxifeno, comúnmente empleados en terapias de cánceres de mama hormono-dependientes. Teniendo en cuenta que AIB1 promueve ciclo celular independiente de estrógenos (Louie et al. 2006), el tratamiento con tamoxifeno en cánceres de mama ER positivos podría inducir una acción sinérgica a la actividad oncogénica de AIB1, constituyendo uno de los mecanismos responsables de la resistencia al tratamiento anti-estrogénico de los cánceres de mama ER positivos.

3.2 Modificaciones post-traduccionales.

La estabilización, transporte intracelular y activación de AIB1 son mecanismos regulados por modificaciones post-traduccionales. AIB1 se fosforila (Font de Mora y Brown 2000), acetina (Chen et al. 1999) y metila (Feng et al. 2006) y más recientemente se sumoila

(Wu et al. 2006) y ubiquitinilina (Yan et al. 2003; Mani et al. 2006), de manera que su actividad está controlada finamente para que su acción sea rápida, específica y transitoria.

Basándonos en las observaciones obtenidas en nuestro modelo comparativo entre las líneas MCF-7 y HeLa, quisimos estudiar qué modificaciones post-traduccionales estaban afectando al distinto comportamiento de AIB1. La sumoilación es un mecanismo de marcar y regular la actividad de las proteínas, muchas de las cuales son factores de transcripción como p53. AIB1 posee 4 sitios potenciales de sumoilación en las lisinas 148, 723, 786 y 1194. Por ello decidimos estudiar la potencial sumoilación de AIB1. Sin embargo, no obtuvimos resultados positivos para la sumoilación de AIB1 (Fig.16A), debido probablemente a una baja sub-población de conjugados sumoilados de AIB1. Más recientemente Sí que se ha descrito la sumoilación de AIB1 (Wu et al. 2006).

3.2.1 AIB1 se ubiquitina y degradada por el proteasoma

La poliubiquitinación es un mecanismo de marcaje protéico relacionado con la degradación. Está mediada por el proteasoma, un complejo multiprotéico que degrada proteínas conjugadas a cadenas de poliubiquitinas, aunque también existe una degradación proteasomal independiente de ubiquitinas. Por otro lado, el marcaje por monoubiquitinación está directamente implicado en procesos como la regulación del tráfico intracelular (García-Higuera et al. 2001), regulación de interacciones proteína-proteína (Deng et al. 2000) o alteración de la función específica de una proteína (Witowsky y Johnson 2003).

Usando el inhibidor específico del proteasoma MG132 observamos que AIB1 se acumulaba en las líneas MCF-7 y COS-1, mientras que en HeLa permanecía inalterado (Fig. 16B). Para determinar si la causa de la estabilización por el inhibidor MG132 era debida a una degradación proteasomal dependiente de ubiquitina realizamos una transfección transiente en células MCF-7 con ubiquitina marcada con el epitopo HA. Los inmunocomplejos precipitados revelaron la existencia de al menos dos bandas de mayor peso molecular a AIB1, sugiriendo que AIB1 está siendo ubiquitinado (Fig. 16C). En ocasiones, el observar una escalera o bandeo típico de poliubiquitinación resulta tedioso debido a la inestabilidad de la proteína y, sobre todo, a la potente actividad de deubiquitinasas que actúan durante el lisado y la inmunoprecipitación. Es quizás éste el motivo por el que no veíamos el bandeo de poliubiquitinas en AIB1. El tratamiento con MG132 causó la acumulación del material inmunoprecipitado, sugiriendo que la ubiquitinación es un mecanismo de marcaje sobre AIB1 para la degradación mediada por proteasoma. En concordancia con las observaciones anteriores realizadas en HeLa, no se obtuvieron inmunocomplejos de AIB1 asociados a ubiquitina (Fig. 16D), debido probablemente a la baja población de AIB1 conjugado a ubiquitina existente en dicha línea. Estos resultados sugieren la existencia de un distinto marcaje post-traduccional mediado por ubiquitinas entre las líneas MCF-7 y HeLa.

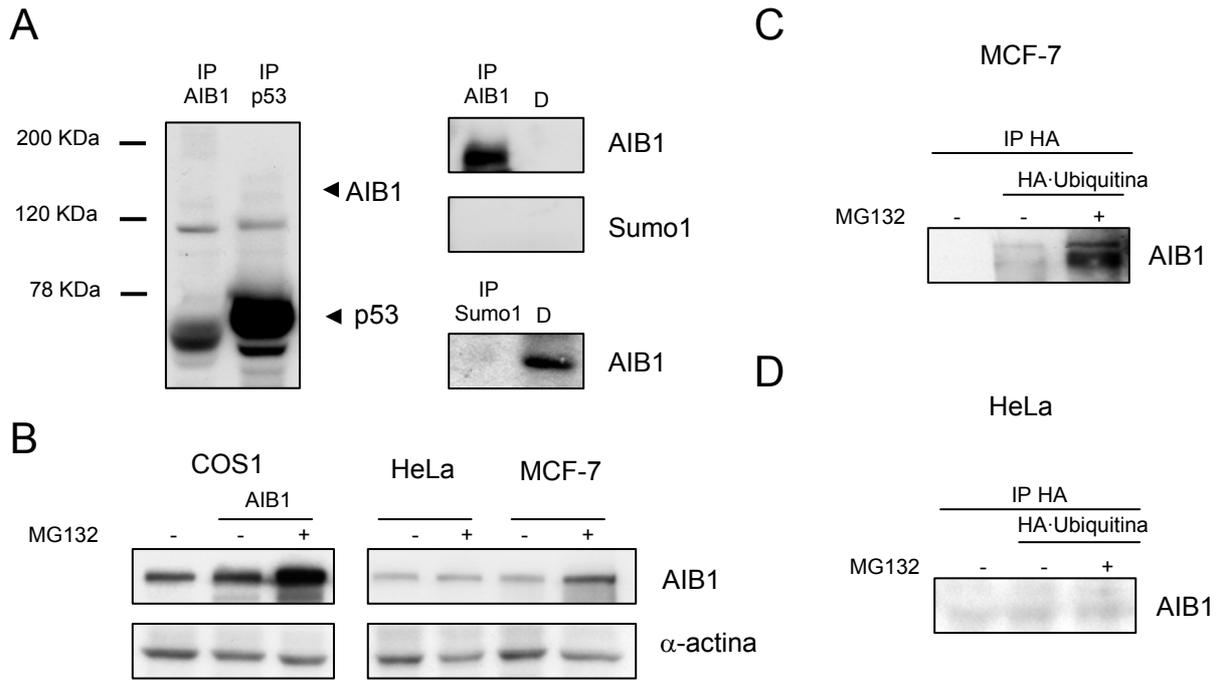


Figura 16. AIB1 se ubiquinila y estabiliza con MG132. A) Ensayo de sumoilación. En el ensayo de la izquierda se inmunoprecipitaron, IP, lisados celulares de MCF-7 con anticuerpos anti-p53 y anti-AIB1 y se revelaron con anticuerpos anti-sumo. En las transferencias de la derecha los inmunocomplejos con anti-AIB1 o anti-sumo se revelaron con el anticuerpo contrario según se indica. Como control de la IP se analizaron los lisados después de inmunoprecipitar, D. **B)** Células COS-1 transfectadas con pCDNA3.1+AIB1 (paneles de la izquierda) y células HeLa y MCF-7 (paneles de la derecha) se trataron 15 horas con 20 μ M MG132 antes de lisarlas. **C)** y **D)** “Western blot” de lisados de células MCF-7 y HeLa, respectivamente, transfectadas con pSSHK-HA-ubiquitina e inmunoprecipitados (IP) con anti-HA. Los inmunocomplejos asociados a HA-ubiquitina se revelaron con anti-AIB1.

3.2.2 Dos regiones en el dominio carboxi-terminal de AIB1 son necesarias para una eficiente activación transcripcional de AIB1 mediada por proteasoma.

Con el objetivo de definir los dominios implicados en la ubiquitinación y su importancia en la actividad transcripcional de AIB1, se generaron construcciones fusionadas a Gal4·DBD. Cada construcción fue cotransfectada en células COS-1 con el gen reportero de la luciferasa bajo el control del elemento de respuesta a Gal4. El tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132 o epoxomicina, inhibidor aún más específico del proteasoma, provocó un incremento sustancial en la actividad transcripcional de los fragmentos que contenían la mitad carboxi-terminal de AIB1 (Fig. 17A). Curiosamente, éstos fragmentos carecen de las serinas 505 y 509 que participan en la ubiquitinación mediada por la E3 ubiquitina ligasa SCF^{Fbw7 α} (Wu et al. 2007). Sin embargo, la actividad del fragmento que comprende los aa 673-979 y que contiene las dos lisinas implicadas en la ubiquitinación mediada por SCF^{Fbw7 α} no resultó modulada por los inhibidores proteasomales. Los resultados revelan que la región que

comprende los aa 1133-1424, es igualmente necesaria para la modulación mediada por proteasoma (Fig. 17A).

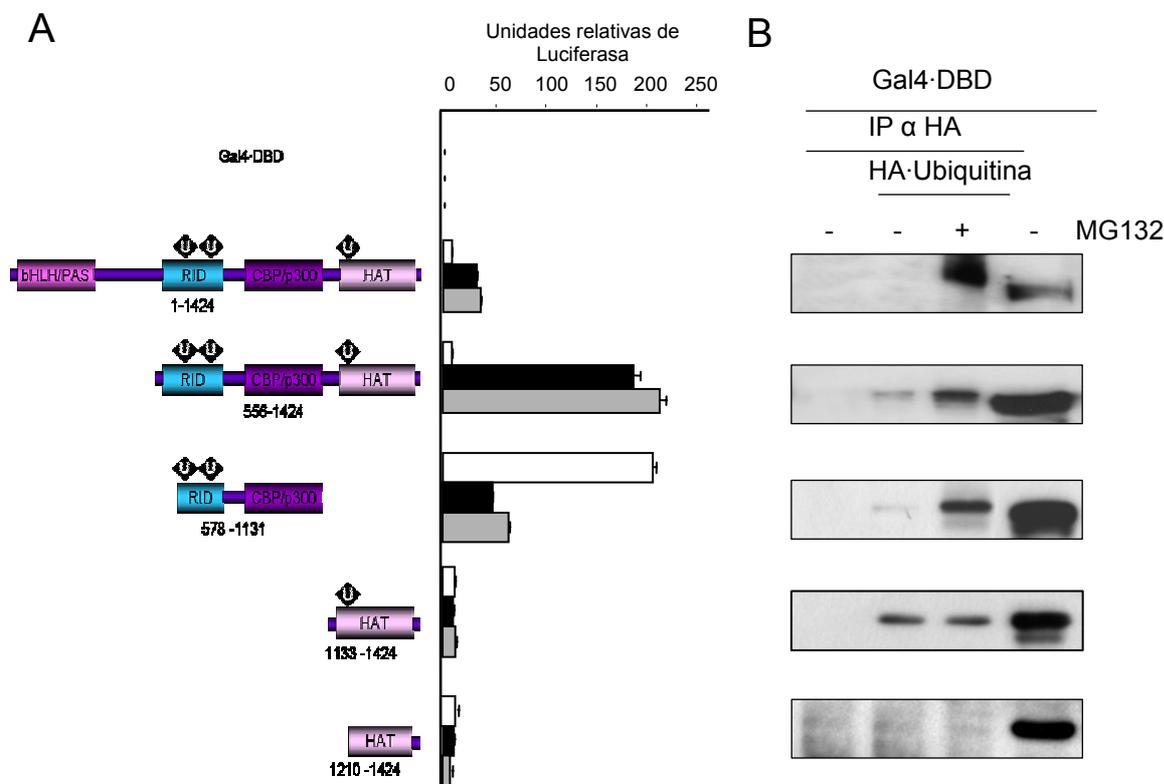


Figura 17. Dos dominios situados en el extremo carboxi-terminal de AIB1 son sensibles a la inhibición proteasomal y son ubiquitinados. **A)** Células COS-1 fueron cotransfectadas transientemente con los fragmentos indicados de AIB1 fusionados a Gal4-DBD junto al gen reportero de la Luciferasa. Los cultivos se mantuvieron sin tratamiento (barras abiertas) o paralelamente fueron tratados con MG132 (barras cerradas) o epoxomicina (barras grises) a una concentración final de 20 μ M en ambos casos. **B)** Células COS-1 fueron cotransfectadas con los fragmentos indicados de AIB1 fusionados a Gal4-DBD junto a pSSHK-HA-ubiquitina. 33 horas después de la transfección, las células se trataron con MG132, 20 μ M y transcurridas 15 horas los cultivos fueron lisados y cuantificados. En todos los casos, 1 mg de proteína total se inmunoprecipitó con anticuerpos anti-HA. Los inmunocomplejos precipitados se analizaron por “western blot” con anticuerpos anti-Gal4-DBD.

Apoyándonos en las observaciones anteriores, se quiso evaluar el potencial de ubiquitinación de los fragmentos estudiados. Células COS-1 fueron cotransfectadas con la finalidad de sobre-expresar los distintos fragmentos de AIB1 junto con ubiquitina, marcada con la etiqueta de HA. Se inmunoprecipitaron los complejos asociados a ubiquitina y se detectaron los distintos fragmentos de AIB1 (Fig. 17B). Confirmando observaciones anteriores: los fragmentos que contenían las lisinas implicadas en la ubiquitinación mediada por SCF^{Fbw7 α} resultaron ubiquitinados (Fig. 17B, tres primeros fragmentos). Adicionalmente observamos que el fragmento que comprende los aa del 1133-1424 se estaba igualmente ubiquitinando.

Identificamos así, dos nuevos dominios que son requeridos simultáneamente para una completa activación transcripcional mediada por proteasoma. Ésta tipo de activación se produce por mecanismos independientes a los hasta ahora descritos por otros autores. La identificación y caracterización de dichos mecanismos está siendo abordada actualmente en nuestro laboratorio. Adicionalmente, hemos identificado un nuevo dominio susceptible de ubiquitinación, que se une a los otros dos sitios ya descritos.

3.2.3 AIB1 se degrada por medio del proteasoma en el núcleo durante la fase M del ciclo celular

Con la finalidad de profundizar en los mecanismos de degradación de AIB1, quisimos ubicar la localización subcelular de la degradación. Existen trabajos con resultados contradictorios, que sitúan la degradación de AIB1 en el citosol (Mani et al. 2006), mientras otros la sitúan en el núcleo (Li et al. 2007a). En nuestros experimentos quisimos analizar células HeLa y MCF-7 por tener una distribución subcelular de AIB1 distinta (Fig. 12), lo que nos permitiría contrastar resultados y validarlos. Células MCF-7 y HeLa fueron tratadas con el inhibidor del proteasoma MG132 y los niveles de expresión de AIB1 fueron analizados en lisados celulares fraccionados (Fig. 19A). Los resultados revelaron un incremento significativo en la fracción nuclear de ambas líneas celulares, siendo más acusado el incremento observado en MCF-7. Pero el mayor cambio en la redistribución subcelular se produjo en células HeLa, en donde AIB1 pasó de ser mayoritariamente citosólico (Fig. 12B panel de la izquierda) a acumularse en el núcleo en presencia del inhibidor del proteasoma (Fig. 18A). Éstos resultados junto con la vida media de AIB1 en ambas líneas celulares (Fig. 13) sugieren que la degradación de AIB1 mediada por el proteasoma es nuclear.

Muchos reguladores del ciclo celular están también sometidos a una regulación cíclica. Nuestros resultados mostraron que AIB1 se sintetizaba fuertemente en células epiteliales de la mama que abandonaban G0 para entrar en ciclo y se nuclearizaba al pasar por la fase S (Avivar et al. 2006). Para determinar si AIB1 se degrada en una fase posterior a la fase S, usamos lisados de oocitos de *Xenopus laevis*. Los oocitos de *X. laevis* son células de 1 mm de diámetro que han quedado bloqueadas en la fase G2 del ciclo celular. La progesterona secretada por las células contiguas les hace entrar en meiosis, quedando bloqueados nuevamente en la metafase de la segunda mitosis a la espera de ser fecundados. A este proceso se le conoce como maduración o rotura de la vesícula germinal. Nosotros aislamos oocitos del ovario de *X. laevis* (fase G2) y los hicimos madurar *in vitro* con progesterona (fase M). Lisados celulares de MCF-7 se incubaron con extractos celulares de oocitos G2 o extractos de oocitos M madurados (Fig. 18B). Los resultados revelaron una bajada de los niveles de AIB1 de los lisados incubados con oocitos M, sugiriendo una degradación durante la fase M del ciclo celular. Esta degradación era prevenida si en la

incubación se añadía el inhibidor MG132, apoyando la hipótesis de una degradación mediada por el proteasoma.

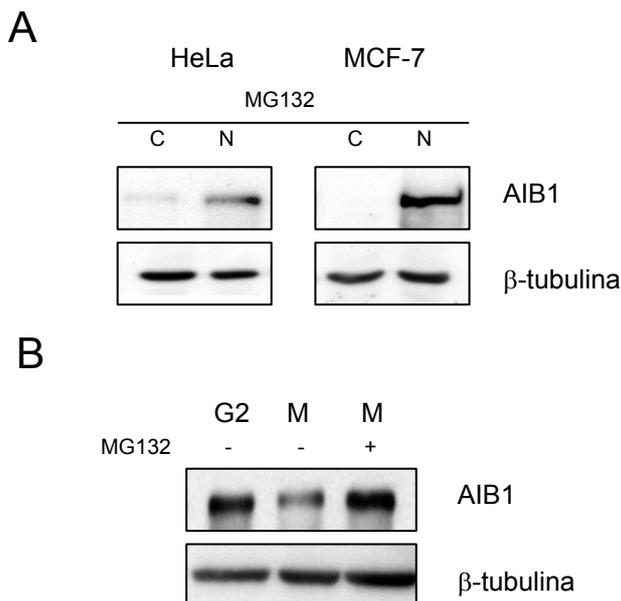


Figura 18. AIB1 se degrada en el núcleo durante la fase M del ciclo celular. **A)** Cultivos celulares tratados con MG132 15 horas antes del fraccionamiento celular, en citosol (C) y núcleo (N) se analizaron por “western blot” con anticuerpos específicos anti-AIB1. **B)** Lisados celulares de oocitos de *Xenopus laevis* (G2) y madurados (M) con progesterona 10 mg/ml, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con inmunocomplejos con anticuerpos anti-AIB1 procedentes de la inmunoprecipitación de 1 mg de lisados celulares de MCF-7. Posteriormente se analizó AIB1 por “western blot”, con anticuerpos anti-AIB1.

3.2.4 AIB1 interacciona con E6-AP

Nuestro siguiente objetivo fue la identificación de la ubiquitina ligasa que marca a AIB1 para la degradación. La ubiquitina ligasa E6-AP fue identificada inicialmente como la responsable de la degradación del gen represor de tumores p53 (Huibregtse et al. 1993), sin embargo trabajos recientes han atribuido a E6-AP la capacidad de interactuar y aumentar la actividad transcripcional de algunos receptores hormonales esteroideos, incluido ER α (Nawaz et al. 1999). Para probar si E6-AP tiene capacidad de interactuar con AIB1 se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación en células COS-1 transfectadas con E6-AP marcado con la etiqueta HA. Los inmunocomplejos precipitados revelaron una asociación de la proteína AIB1 con E6-AP (Fig. 19A). Curiosamente, la inhibición de la degradación por medio del inhibidor MG132 disminuyó la intensidad de la interacción.

Con el objetivo de determinar la actividad de E6-AP sobre la estabilidad de AIB1 en la célula, transfectamos células MCF-7 para sobre-expresar E6-AP. En contra de lo esperado, los resultados analizados por inmunofluorescencia revelaron que las células con mayor sobre-expresión de E6-AP también tenían mayor intensidad de AIB1 (Fig. 19B), lo que parecía indicar que E6-AP pudiera estabilizar y/o aumentar los niveles de AIB1 en esta línea celular.

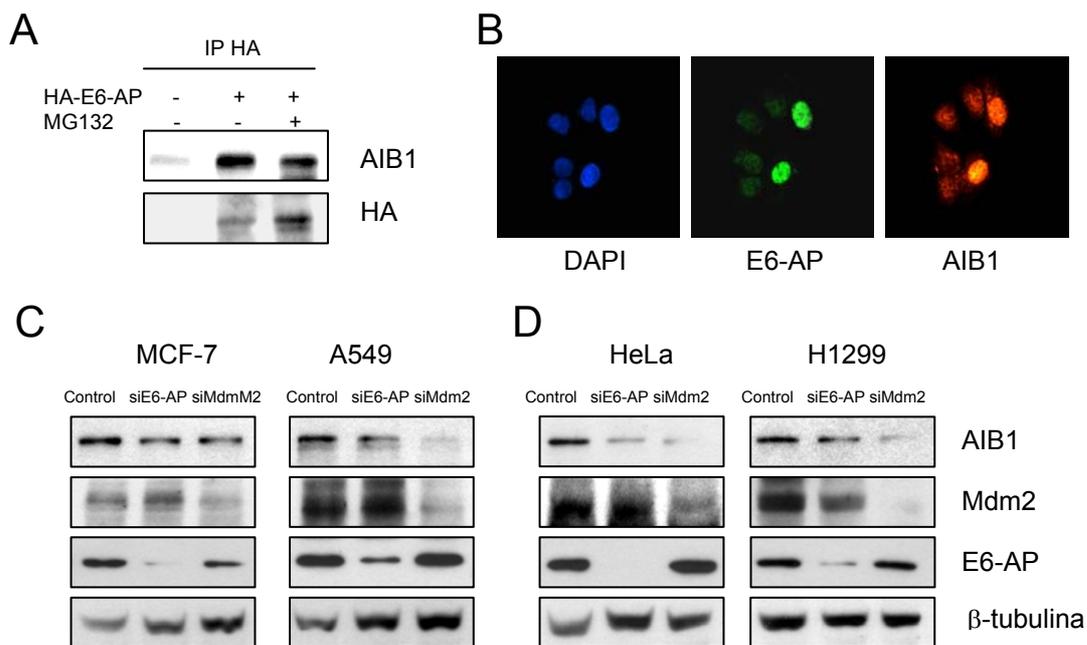


Figura 19. E6-AP interacciona y favorece la expresión de AIB1. **A)** Ensayo de inmunoprecipitación (IP) de células COS-1 transfectadas con pCDNA-HA-E6-AP y tratadas con MG132 (20 μ M) 15 horas antes de su lisis. **B)** Inmunofluorescencia de células MCF-7 en crecimiento exponencial (80% de confluencia). Las preparaciones fueron teñidas con anticuerpos específicos anti-HA (HA-E6-AP) y anti-AIB1 a las concentraciones indicadas en materiales y métodos en la Tabla 6. **C)** “Western blot” de las líneas celulares MCF-7 y A549 y **D)** HeLa y H1299, transfectadas con 20 ng de RNA de silenciamiento específico para E6-AP y Mdm2, 48 horas antes de la lisis celular.

3.2.5 Las ubiquitina ligasas E6-AP y Mdm2 modulan los niveles de AIB1

Con el objetivo de contrastar los resultados anteriores, estudiamos los efectos del silenciamiento de la ubiquitina-ligasa E6-AP sobre los niveles de AIB1. Se generó RNA de interferencia para silenciar los niveles de proteína E6-AP y se transfectó en distintas líneas celulares. Igualmente se quiso comprobar si el silenciamiento de Mdm2, otra ubiquitina ligasa también implicada en la degradación de p53 (Kubbutat et al. 1997), producía efectos análogos en la estabilidad de AIB1.

Ambas ubiquitina ligasas produjeron una disminución significativa de los niveles de AIB1 (Fig. 19C y 19D). La disminución de AIB1 es independiente de la localización subcelular de AIB1 ya que éste efecto fue observado tanto en las líneas MCF-7 y A549, de localización subcelular nuclear (Fig.19D), como en las líneas HeLa y H1299, de localización subcelular citosólica (Ferrero et al. 2008) (Fig.19D). Estos resultados sugieren que otros mecanismos complejos aún no descritos están implicados en la degradación de AIB1. E6-AP (y probablemente Mdm2) podrían regular a AIB1 bien a nivel de la estabilización de la proteína, bien a nivel transcripcional participando en la transcripción de AIB1. Aunque no hemos analizado los niveles de mensajero de AIB1, sí que se han descrito a estas dos moléculas como coactivadores de la transcripción (Reid et al. 2003).

3.3 AIB1 regula el ciclo celular y previene la apoptosis.

AIB1 ha sido clasificado como un oncogén (Torres-Arzayus et al. 2004), atribuyendo a su expresión la capacidad de modular y promover el ciclo celular (Louie et al. 2006). Con la finalidad de estudiar la potencialidad *per se* de AIB1 de promover el ciclo celular usamos la línea celular COS-1, cuyo crecimiento no depende de estrógenos y no sobre-expresa AIB1. Las células COS-1 se cotransfectaron con dos plásmidos de expresión para AIB1 y para la proteína fluorescente GFP como marcador de células transfectadas. Las células emisoras de fluorescencia verde fueron analizadas por citometría de flujo, dos y cuatro días después de la transfección (Fig. 20A). Los resultados obtenidos revelaron una disminución de la población de células en G0-G1 y un aumento significativo de las células en G2-M. Estos resultados coinciden con las observaciones obtenidas en nuestro modelo de ratones transgénicos (Fig. 6A), ratificando el papel promotor de AIB1 en el ciclo celular.

3.3.1 La sobre-expresión de AIB1 incrementa la proliferación en células COS1

Con objeto de confirmar los resultados obtenidos en transfecciones transientes decidimos obtener clones estables de COS-1 que sobre-expresan AIB1. Dos días después de la transfección añadimos antibiótico G418 al medio de cultivo para seleccionar la población resistente al antibiótico, es decir, aquellas células que integraron el plásmido de expresión de AIB1 y que además contenía la resistencia a G418. Se mantuvo la selección con antibiótico durante 20 días. Para comprobar el nivel de sobre-expresión de AIB1 del cultivo en masa realizamos un análisis por “western blot”, observando un incremento del 38% con respecto al control (Fig. 20B, paneles dentro de la gráfica). El análisis por citometría de flujo reveló igualmente un incremento importante en la fase celular de G2-M (Fig. 20B).

Los resultados mostrados añaden a la capacidad promotora del ciclo celular de AIB1 ya descritas un papel de activador de la progresión celular *per se* en líneas celulares independientes de estrógenos como COS-1 y no vinculadas con el tejido epitelial de mama.

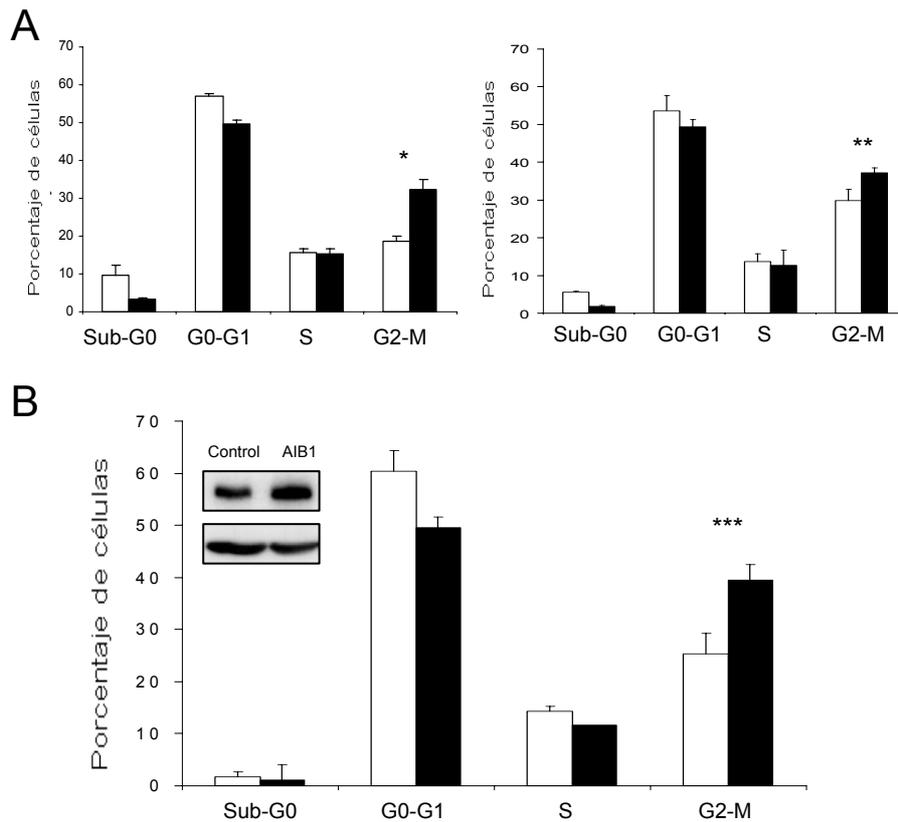


Figura 20. La sobre-expresión de AIB1 en células COS-1 favorece la proliferación celular. **A)** Gráfico representativo de las distintas fases del ciclo celular analizadas por citometría de flujo. Células COS-1 cotransfectadas con pCDNA3 y pEGFP (barras abiertas) o pCDNA3-AIB1 y pEGFP (barras cerradas) fueron recogidas dos días (panel izquierdo) o cuatro días (panel derecho) después de la transfección. Las células emisoras de fluorescencia verde fueron seleccionadas y analizadas por citometría de flujo. **B)** Ensayo análogo en el que un cultivo control (barras abiertas) y un cultivo que sobre-expresa AIB1 (barras cerradas) se creció durante 20 días en medio selectivo de G418 antes de su análisis por citometría de flujo. *P = 0.05, ** P = 0.1, *** P = 0.04.

3.3.2 El silenciamiento de AIB1 sensibiliza a la apoptosis

La apoptosis es un proceso clave en la progresión tumoral. Numerosas evidencias demuestran que el cáncer no sólo es resultado de una progresión incontrolada sino que va acompañado de una inhibición de procesos pro-apoptóticos (Fernandez et al. 2002). Siguiendo este razonamiento, nos dispusimos a estudiar la capacidad de AIB1 como represor de la apoptosis.

Cultivos primarios no cancerosos de epitelio mamario humano (HMEC) fueron infectados con adenovirus para sobre-expresar a AIB1 y silenciados con siRNA de AIB1. Los niveles de AIB1 fueron corroborados por “western blot” para comprobar la eficiencia de la infección y del silenciamiento (Fig. 21, paneles internos). Paralelamente, para analizar el porcentaje de células apoptóticas en los distintos tratamientos, las células en subG0-G1 fueron contabilizadas por citometría de flujo (Fig. 21). En concordancia con las observaciones

realizadas en células COS-1 (Fig. 20A y 20B), la sobre-expresión de AIB1 provocó una disminución del porcentaje de células en apoptosis mientras que el silenciamiento mostró un claro incremento en el número de células apoptóticas. Los resultados revelaron que cambios en los niveles de AIB1 provocan una sensibilización de las células HMEC a la apoptosis.

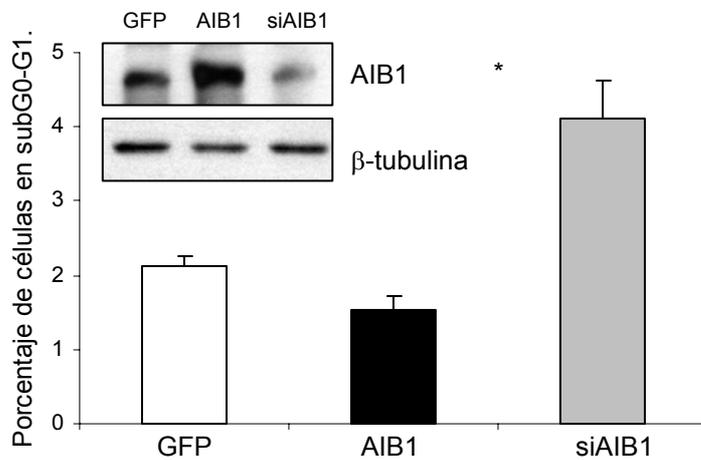


Figura 21. El silenciamiento de AIB1 sensibiliza a células HMEC a la apoptosis. A) Cultivos celulares de la línea HMEC fueron infectados con adenovirus control que sobre-expresan GFP y adenovirus para sobre-expresar AIB1. Paralelamente un tercer cultivo fue silenciado con RNA de interferencia, siAIB1. * $P \leq 0.05$.

Sin embargo, los resultados no revelan si la actividad antiapoptótica de AIB1 es consecuencia de una acción directa de la proteína o si por el contrario se trata de mecanismos secundarios relacionados con la actividad transcripcional de AIB1. Por tanto, restan por identificar intermediarios apoptóticos implicados en la represión apoptótica mediada por AIB1. La identificación y caracterización de uno de estos efectores constituirá el objetivo del siguiente apartado.

4. Identificación de genes reprimidos por AIB1: clonación y caracterización de DRO1.

4.1 Análisis de “micro-arrays” revelan nuevos genes modulados por AIB1.

Con el objetivo de estudiar cambios en la expresión de genes en ratones AIB1-tg que explicaran los mecanismos moleculares desencadenados por AIB1 causantes de la hiperplasia, efectuamos un análisis con “micro-arrays” de expresión. Empleamos “arrays” comerciales de Affymetrix que permiten el análisis de 12488 genes. En el estudio empleamos cultivos primarios de epitelio mamario de 4 ratones silvestres y 4 ratones AIB1-tg. El motivo de utilizar cultivos primarios fue para escoger muestras más homogéneas y controladas y de este modo contrarrestar el importante efecto que tiene la fase estral en el epitelio mamario.

El nivel de la expresión de cada gen fue calculado, estimado y contrastado según lo descrito en el punto 7.2 de materiales y métodos. Finalmente, obtuvimos una serie de genes significativamente alterados por AIB1, entre los que estaba DRO1, un gen relativamente desconocido al principio. Su represión, una de las más significativas, así como nuestros primeros análisis que lo implicaban en procesos apoptóticos, nos invitó a profundizar en su estudio y su relación con AIB1.

4.2 AIB1 modula la expresión de DRO1.

La proteína DRO1 fue descrita inicialmente como una proteína sensible a estrógenos y asociada a la progresión del cáncer de mama (Marcantonio et al. 2001b). Trabajos posteriores revelaron que DRO1 se encuentra reprimida por una serie de oncogenes, entre los que se encuentran β -catenina, Ras o c-myc (Bommer et al. 2005). A estos precedentes se añadió la capacidad de DRO1 de sensibilizar en líneas celulares de cáncer a ciertos estímulos apoptóticos (Bommer et al. 2005). Estos resultados junto con la represión de DRO1 en los ratones transgénicos AIB1-tg nos hizo pensar en el papel de DRO1 como potencial gen supresor de tumores.

Con la finalidad de validar los resultados obtenidos con el ensayo de “micro-arrays”, se analizaron los niveles de mRNA de DRO1 por PCR en tiempo real. La línea celular de

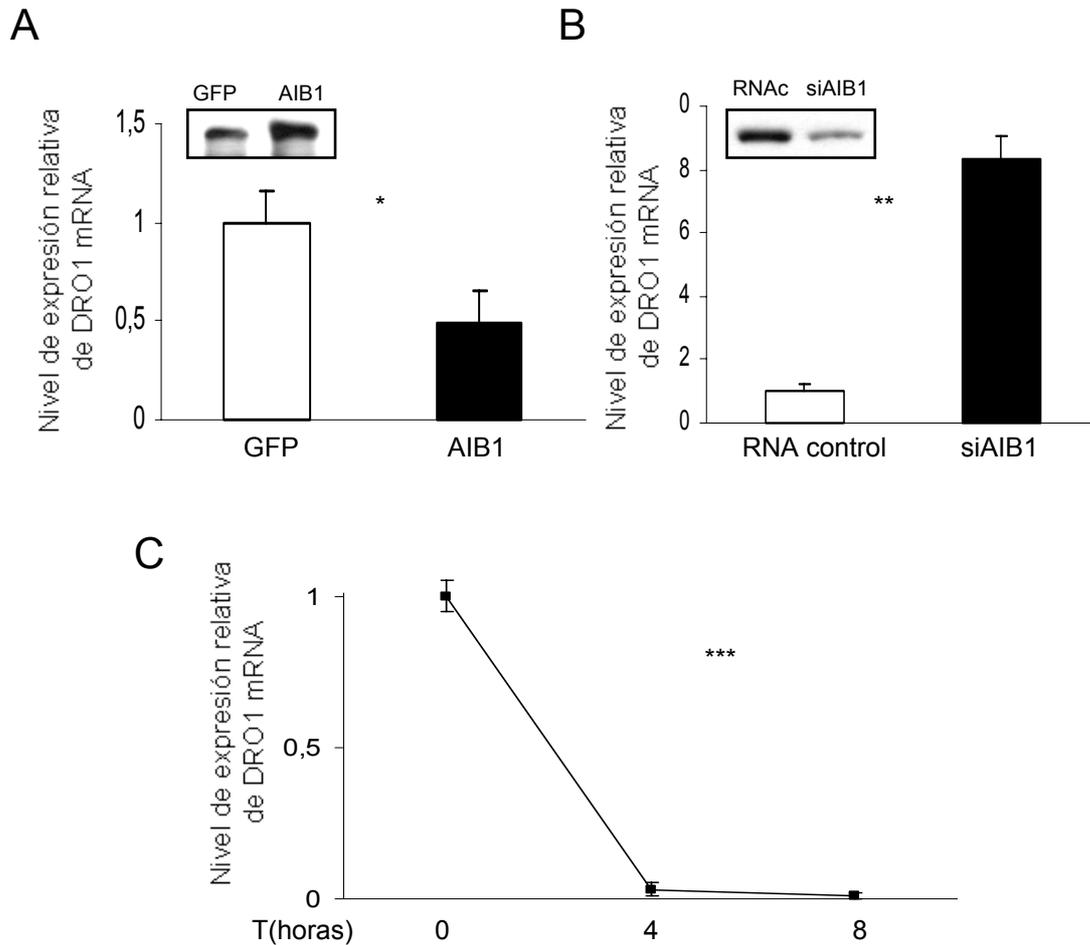


Figura 22. AIB1 regula la expresión de DRO1. **A)** Cultivos celulares de la línea HMEC fueron infectados con adenovirus control (barras abiertas) y adenovirus de expresión de AIB1 (barras cerradas). 48 horas después de la infección el RNA fue aislado y analizado por PCR en tiempo real con oligonucleótidos específicos de DRO1. La gráfica muestra la media de tres experimentos independientes. El análisis se normalizó con GAPDH. **B)** Células HMEC se silenciaron con RNA aleatorio y siAIB1 a una concentración final de 5 nM. La gráfica representa la media de expresión de mRNA de DRO1 de tres experimentos independientes. **C)** Células MCF-7 se mantuvieron en medio sin estrógenos durante 10 días, pasados los cuales se estimularon con E2 a los tiempos indicados. Los niveles de expresión de mRNA de DRO1 fueron analizados por PCR en tiempo real según los procedimientos estándar. En todos los casos $*P \leq 0.05$.

4.2.1 El E2 reprime la expresión de DRO1

Los estrógenos juegan un papel importante en la morfogénesis del tejido epitelial mamario así como en la progresión de algunos cánceres de mama (Howell et al. 1992). Los primeros estudios con SSG1, el homólogo de DRO1 en rata, reflejaron una modulación negativa del estradiol a nivel de proteína en la glándula mamaria (Marcantonio et al. 2001b), estudios en células musculares lisas revelaron una modulación de la expresión de SSG1 en respuesta a andrógenos (Marcantonio et al. 2001a). Estas observaciones nos impulsaron a estudiar el grado de implicación de DRO1 en la respuesta hormonal y más concretamente, su posible implicación en la progresión del cáncer de mama.

Con el objetivo de determinar la relevancia de los estrógenos en la regulación de la expresión de DRO1, células de carcinoma humano MCF-7 se incubaron con E2 durante 8 y 24 horas. Los niveles de mRNA de DRO1 fueron seguidamente analizados por PCR en tiempo real (Fig. 22C). Los resultados revelaron una regulación negativa de los niveles de mRNA de DRO1 por E2. El tratamiento con E2 durante 24 horas produjo una fuerte represión transcripcional de más de 130 veces con respecto al control.

4.2.2 La sobre-expresión de AIB1 coincide con una baja expresión de DRO1 en líneas humanas de cáncer

SSG1 se expresa en múltiples tejidos como, ovario, útero, glándula mamaria, hígado, corazón, cerebro, páncreas, riñón, adiposo o pulmón (Marcantonio et al. 2001b). Al mismo tiempo que estudiamos la expresión de DRO1 en distintos tejidos, quisimos estudiar si existía una relación entre la sobre-expresión de DRO1 con la represión de los niveles de DRO1. Para ello, analizamos los niveles de expresión de los mRNA de DRO1 y AIB1 en distintas líneas celulares humanas de cáncer (Fig. 23). Los resultados obtenidos revelaron la existencia de dos subgrupos o tendencias. En el primer caso las líneas que sobre-expresan AIB1 poseen unos niveles reducidos de DRO1. Por el contrario una baja expresión de AIB1 está relacionada con altos niveles de expresión de DRO1.

Los niveles más altos de expresión de DRO1 se observaron en la línea de ósteosarcoma humano U-2 OS, coincidiendo con los resultados obtenidos en otros estudios (Liu et al. 2004). La diferencia relativa de expresión más acusada, se obtuvo en la línea MCF-7, coincidiendo con los niveles más altos de expresión de AIB1, mientras que en la línea no tumoral de epitelio de mama humano HMEC la expresión de DRO1 resultó 5,25 veces mayor que la de AIB1. Los resultados sugieren la existencia de un mecanismo conservado de represión de DRO1 inducida por AIB1. Extrapolando al estudio del cáncer de mama, el análisis de los resultados obtenidos en la línea epitelial de mama HMEC con la cancerosa MCF-7, sugiere que la represión de DRO1 podría ser un mecanismo que acompaña a la transformación tumoral en epitelio de mama.

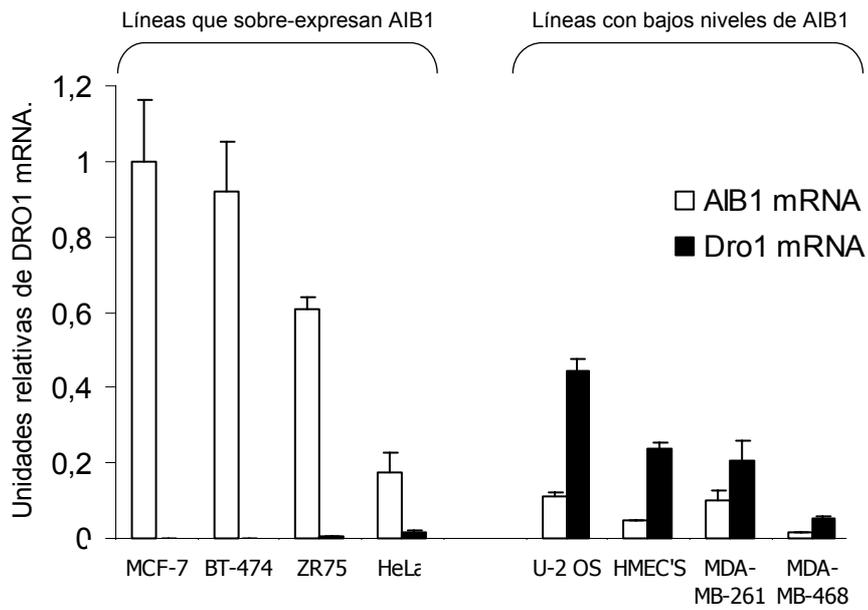


Figura 23. Niveles de expresión de DRO1 y AIB1 en líneas humanas de cáncer. Análisis por PCR en tiempo real de los niveles de AIB1, (barras abiertas) y DRO1, (barras cerradas). El RNA fue aislado, digerido con DNAsa y purificado antes de sintetizarse el cDNA. La reacción de PCR en tiempo real se efectuó con 20 ng de cDNA. Los valores obtenidos para AIB1 se normalizaron con GAPDH. En todas las líneas mostradas *P ≤ 0.05.

5. DRO1 como gen pro-apoptótico y represor de la proliferación.

5.1 DRO1 y apoptosis.

Con la finalidad de estudiar las funciones fisiológicas de DRO1 así como su capacidad de sensibilizar células a estímulos apoptóticos (Bommer et al. 2005), diseñamos oligonucleótidos para clonar DRO1. El cDNA codificante de DRO1 se amplificó a partir de mRNA de células HeLa, obteniéndose un fragmento de unas 2.8 Kb que posteriormente fue clonado adecuadamente en el vector de expresión pCEFL·AU5, en fase de lectura con el epitopo AU5 en su extremo amino terminal.

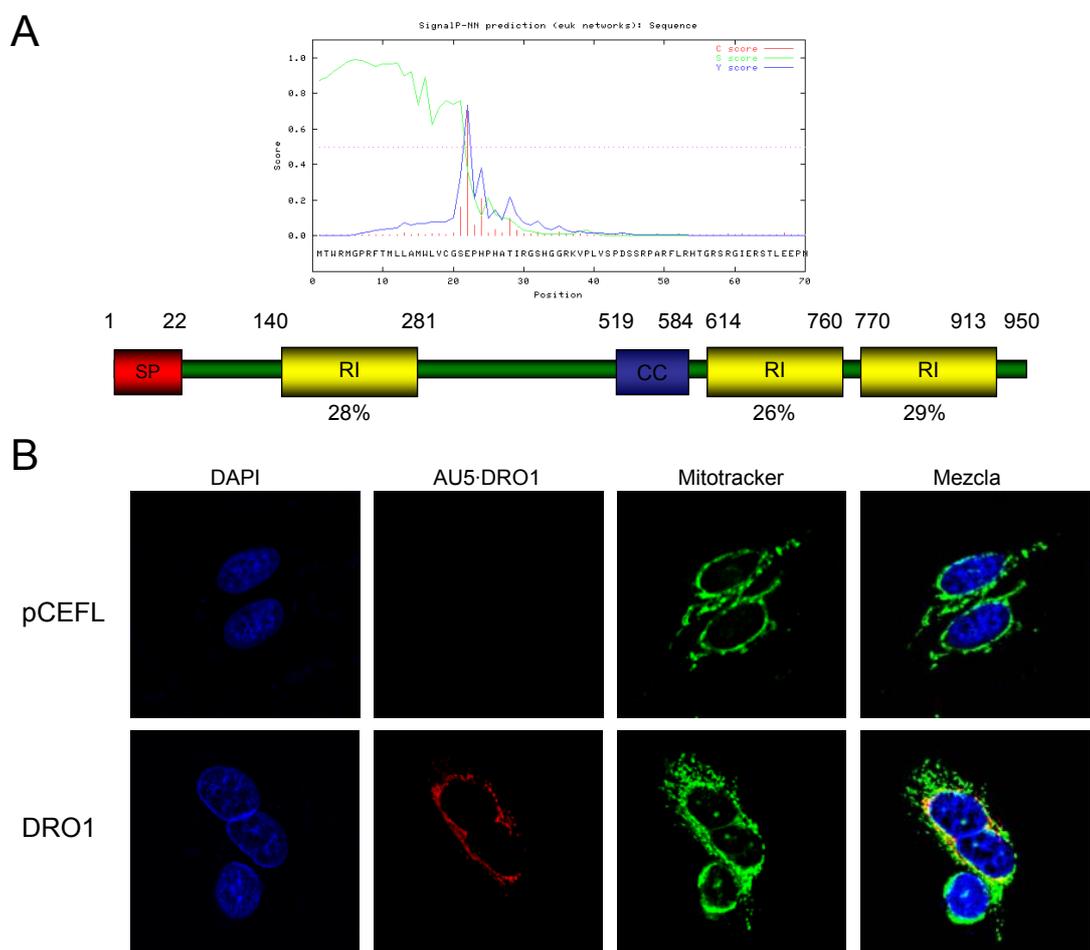


Figura 24. Clonación de DRO1 y análisis de péptidos señal. A) Análisis de la secuencia primaria de DRO1 con el programa Signal Peptide 3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) mostrando una alta probabilidad de transporte mitocondrial (0.8594). En la parte inferior, esquema representativo de los dominios conservados en DRO1: SP, péptido señal; RI, repetición interna; CC, del inglés "coiled-coil domain". Los porcentajes indican el grado de homología con el dominio represor transcripcional de Drs. **B)** Inmunofluorescencia de células MCF-7 transfectadas con pCEFL·AU5 o pCEFL·AU5·DRO1. Dos días después, se añadió al medio de cultivo Mitotracker verde a una concentración final de 500 mM 30 minutos antes de ser fijadas.

La escasa información bibliográfica sobre la distribución subcelular de DRO1 resulta contradictoria y ambigua. De la misma manera, resulta contradictoria la información existente sobre la posible capacidad de DRO1 de ser N-glicosilada. Algunos estudios afirman que DRO1 es N-glicosilada y posteriormente secretada al exterior celular (Aoki et al. 2002; Okada et al. 2008). Otros autores coinciden con la N-glicosilación, pero no confirman que sea una modificación post-traduccional para la secreción (Bommer et al. 2005). Diversos autores localizan a DRO1 en el citoplasma y de forma parcial en RE (Bommer et al. 2005), en el Golgi (Visconti et al. 2003) o en el exterior celular (Okada et al. 2008). Sin embargo, ninguno de estos estudios determina con precisión la localización subcelular de DRO1 y/o su relación con el RE o Golgi, suponiendo la existencia de la N-glicosilación que postulan algunos autores.

Sorprendentemente, ninguno de los estudios anteriores hace referencia a la posible localización mitocondrial de DRO1. Realizamos un análisis computacional con el “software” Signal IP 3.0 (Emanuelsson et al. 2007). Basándose en el extremo amino-terminal de las proteínas, éste programa estima la existencia de potenciales sitios de señalización para mitocondria, cloroplastos o rutas de secreción celulares. El “software” determinó que con una probabilidad del 85,94%, DRO1 poseería un péptido de señalización para transporte a la mitocondria (Fig. 24A). Nos dispusimos por tanto a definir la localización subcelular de DRO1, centrándonos particularmente en su posible ubicación mitocondrial.

Con el objetivo de definir de forma concreta la localización subcelular de DRO1, células MCF-7 se transfectaron con el plásmido pCEFL-AU5-DRO1. La expresión ectópica de DRO1 fue detectada por inmunofluorescencia con anticuerpos frente al epitopo AU5. Los resultados revelaron una localización perinuclear de DRO1 (Fig. 24C). Para estudiar la posible colocalización con las mitocondrias, éstas se marcaron *in vivo* con Mitotracker. Sin embargo, en la superposición de imágenes no se observó colocalización entre la posición de DRO1 y las mitocondrias. Los resultados muestran a AU5-DRO1 localizado principalmente en la zona perinuclear. Esta observación coincide con la obtenida por otros autores que relacionan la ubicación perinuclear con el Golgi (Visconti et al. 2003).

5.1.1 Localización subcelular de la proteína endógena

La localización de proteínas ectópica inducida mediante transfecciones transientes puede resultar artefactual ya que la sobre-expresión provoca en ocasiones localizaciones distintas a la ubicación natural de la proteína endógena. Además, la etiqueta AU5 podría causar un efecto de enmascaramiento al péptido de localización mitocondrial, situado a continuación de AU5 (Fig. 24B). Por estos motivos decidimos generar anticuerpos específicos contra la proteína endógena de DRO1.

Se inmunizaron conejos con dos péptidos pertenecientes a la secuencia de la proteína humana DRO1. Los epítomos con mayor potencial de respuesta inmunogénica

correspondieron a los aminoácidos situados entre el 313 y el 328, EDPARRAQVPPTRESRV y los situados entre los aminoácidos 935 al 950 correspondientes al péptido QDDYRHHESYHHGYPY (Fig. 25A). La titulación de los sueros por “western blot” (Fig. 25B) y ensayos de inmunofluorescencia (Fig. 25C), revelaron la mayor eficiencia del suero obtenido con la inmunización del péptido situado en el dominio carboxi-terminal. Los sucesivos experimentos se realizaron con este suero.

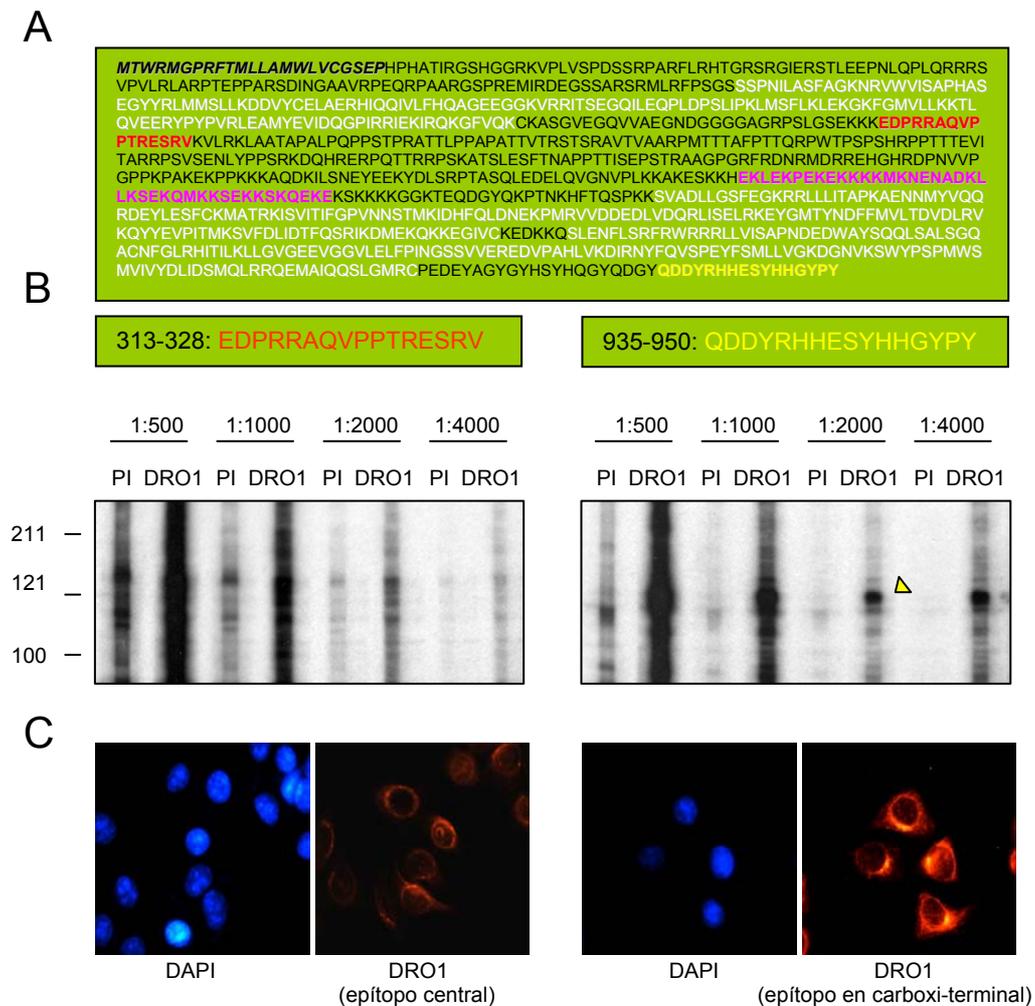


Figura 25. Análisis por “western blot” e inmunofluorescencia con anticuerpos generados contra DRO1 humano. A) Secuencia completa de aminoácidos de DRO1 con los epitopos usados para generar los anticuerpos marcados en rojo y en amarillo. Además en negrita figura el péptido señal, SP, en blanco las tres repeticiones internas, IR y en rosa el dominio “coiled-coil”, CC. **B)** Análisis por “western blot” de los dos sueros generados y de sus respectivos sueros pre-inmunes (PI). En la parte superior del panel se muestran las concentraciones usadas. La flecha amarilla indica la banda detectada, coherente con el peso molecular esperado de DRO1. **C)** Inmunofluorescencia de células MCF-7 incubadas con el suero contra el péptido central (izquierda) y contra el péptido carboxi-terminal (derecha).

Realizamos nuevos ensayos de inmunofluorescencia con la línea epitelial HeLa, marcando con suero pre-inmune, suero anti-DRO1 y el marcaje mitocondrial con Mitotracker (Fig. 26A). De manera diferente a lo observado con la proteína transfectada cuya localización era preferentemente perinuclear (Fig. 24C), el marcaje con el suero anti-DRO1 reveló una localización citosólica difusa en HeLa (Fig. 26A). En las imágenes mezcla, el color amarillo resultante de la superposición de la señal de DRO1 y la señal mitocondrial sugiere una relativa coincidencia subcelular.

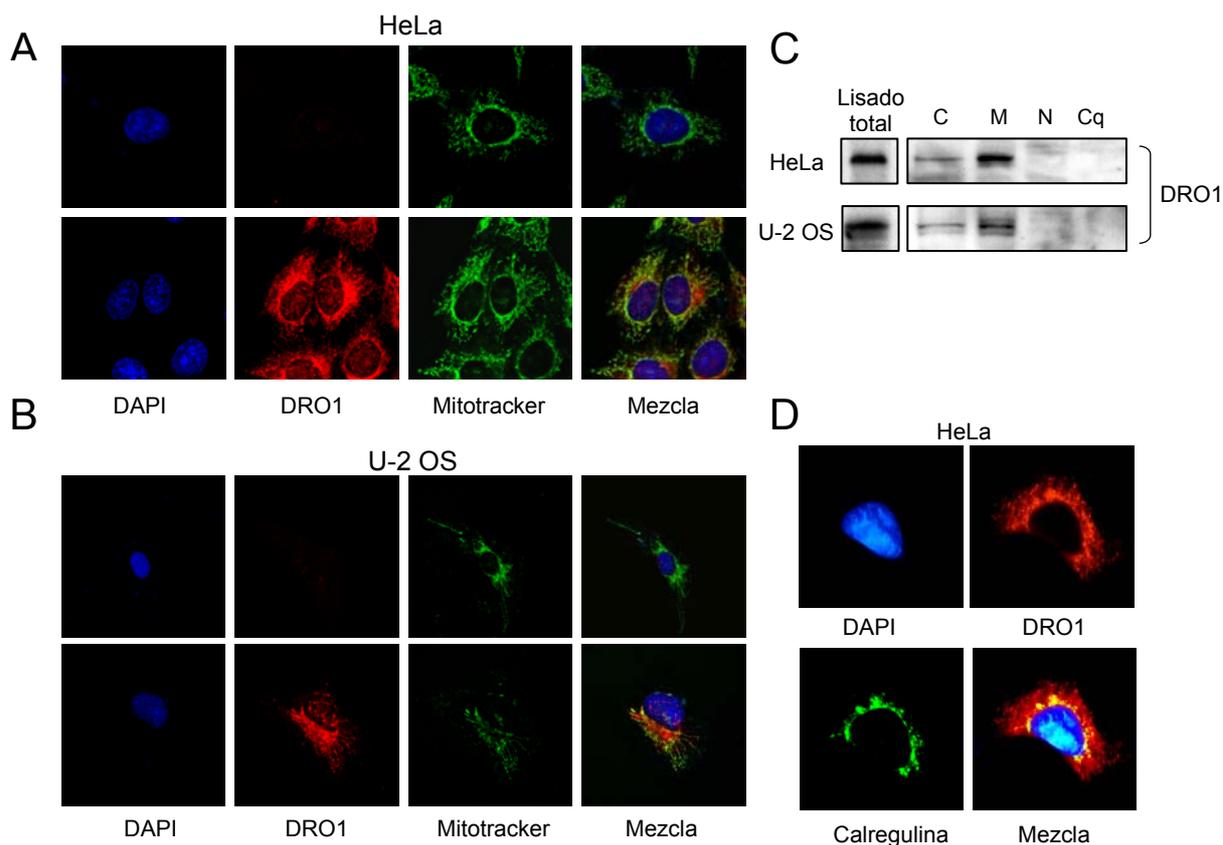


Figura 26. Análisis por “western blot” e inmunofluorescencia con microscopía confocal de la localización subcelular de DRO1. Ensayo de inmunofluorescencia en células HeLa **A**) o U2-OS **B**) con suero anti-DRO1 (rojo) y Mitotracker (verde). **C**) “Western blot” de lisados celulares fraccionados de células HeLa y U-2 OS. Las distintas fracciones citosol (C), membranas (M), núcleo (N) y citoesqueleto (Cq) fueron incubadas con anticuerpos anti-DRO1. **D**) Análisis de IF de células HeLa incubadas con los anticuerpos anti-DRO1 y el marcador específico de RE anti-calregulina.

Los resultados anteriores (Fig. 23) revelaron que la línea celular U-2 OS era la que tenía los niveles más altos de expresión de DRO1. Por ello, decidimos analizar la localización de DRO1 tanto en HeLa como en U-2 OS. En el ensayo de inmunofluorescencia en células U-2 OS, DRO1 se localiza en gránulos que se disponen sobre estructuras ramificadas, coincidiendo parcialmente con el marcaje de Mitotracker (Fig. 26B). Los resultados obtenidos sugieren que, al menos una parte de la población celular total de DRO1 se encuentra

asociada a mitocondrias. En concordancia con estos resultados de inmunofluorescencia, el análisis por “western blot” de lisados celulares fraccionados de células HeLa y U-2 OS, nos permitió detectar a DRO1 en las fracciones subcelulares correspondientes al citosol y a las membranas (Fig. 26C).

Por otro lado y dado que los trabajos publicados apuntan la existencia de una N-glicosilación y la posterior secreción celular de DRO1 (Liu et al. 2004; Visconti et al 2003), quisimos estudiar la relación física de DRO1 con el ER, orgánulo celular donde ocurren la mayoría de las glicosilaciones. Cultivos celulares de U-2 OS fueron marcados con DRO1 y calregulina en un ensayo de inmunofluorescencia (Fig. 26D). Los resultados revelaron que solamente parte de la señal de DRO1 coincide con la calregulina, marcador específico de RE.

5.1.2 DRO1 induce apoptosis en HeLa y MCF-7

Ya que estaba descrita la capacidad de DRO1 de sensibilizar a células a estímulos apoptóticos (Bommer et al. 2005) y los resultados que obtuvimos revelaron una parcial colocalización en las mitocondrias, quisimos comprobar si DRO1 poseía la capacidad de inducir apoptosis *per se*. Con tal objetivo, transfectamos DRO1 en células MCF-7, que expresan bajos niveles de DRO1. El porcentaje de células en subG0-G1 correspondiente a la población celular apoptótica fue analizado por citometría de flujo (Fig. 27A). Los resultados revelaron un incremento de la población celular en subG0-G1 de los cultivos transfectados con DRO1, sugiriendo una capacidad pro-apoptótica de DRO1.

La línea celular MCF-7 es deficiente de caspasa-3 (Janicke et al. 1998), así que quisimos estudiar si la inducción apoptótica de DRO1 estaba siendo limitada por la deficiencia de caspasa-3. La transfección conjunta de DRO1 y procaspasa-3 en células MCF-7 mostró un incremento del porcentaje de células en subG0-G1, sugiriendo que la capacidad inductora de apoptosis de DRO1 estaba favorecida por caspasa-3 (Fig. 27A). Un ensayo análogo se realizó en la línea celular HeLa, donde la sobre-expresión de DRO1 reportó resultados similares (Fig. 27B).

Los resultados obtenidos muestran la capacidad de DRO1 como inductor de la apoptosis *per se*. Esta inducción apoptótica podría estar relacionada con la ruta de las caspasas, en concreto con la activación de la caspasa-3.

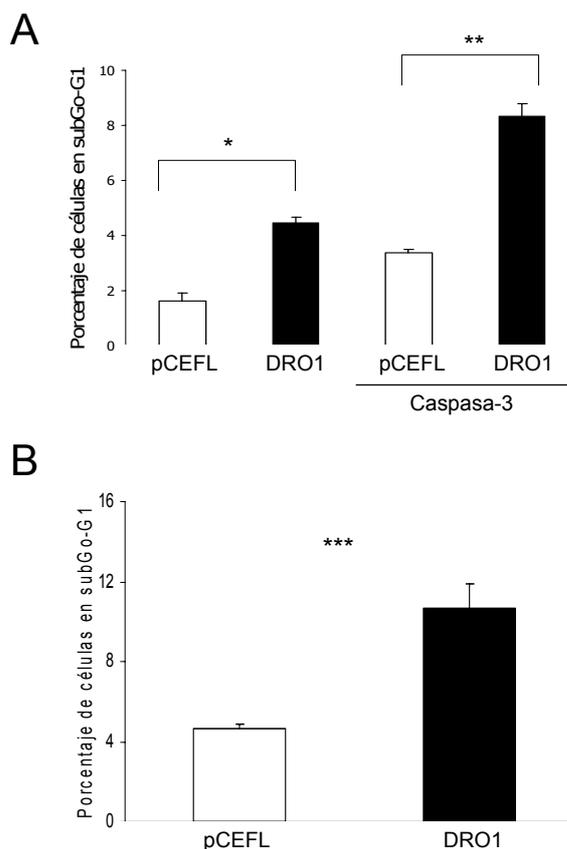


Figura 27. DRO1 induce apoptosis en células MCF-7 y HeLa. A) Gráfico representativo del porcentaje de células en fase subG0-G1 del ciclo celular. Células MCF-7 fueron transfectadas con el vector control pCEFL·AU5 (barras abiertas) o pCEFL·AU5·DRO1 (barras cerradas) en negro. En paralelo se realizaron cotransfecciones con pcDNA·caspasa 3 (barras de la derecha, según se indica). En todos los casos la cantidad de plásmido transfectada fue de 6 µg. El resultado corresponde a la media de tres experimentos independientes. **B)** Análisis de citometría de flujo en células HeLa transfectadas con 6 µgr de vector pCEFL·AU5 (barra abierta) o pCEFL·AU5·DRO1 (barra cerrada). Igualmente, el resultado corresponde a la media de tres experimentos independientes. *P = 0.011, ** P = 1.10⁻⁴, *** P = 0.043.

5.1.3 Implicación de la ruta de las caspasas y liberación del citocromo c

Siguiendo la línea de observaciones anteriores, quisimos determinar la relación de la actividad pro-apoptótica de DRO1 con la señalización en la ruta de las caspasas. Para ello, transfectamos con DRO1 cultivos subconfluentes de la línea celular HeLa y pasadas 24 horas analizamos los lisados celulares por “western blot”. Los resultados mostraron que la transfección de DRO1 produce un ligero descenso de los niveles de procaspasa-3 como consecuencia de su procesamiento y un importante aumento de los niveles de caspasa-3 activa (Fig. 28A). Un ensayo análogo se realizó en la línea celular MCF-7. En concordancia con la observaciones anteriores, la sobre-expresión de DRO1 junto con procaspasa-3 es suficiente para detectar caspasa-3 activa en los lisados celulares cotransfectados (Fig. 28A).

Las observaciones anteriores fueron confirmadas adicionalmente, por análisis de inmunofluorescencia (Fig. 28B), que nos revelaron que la sobre-expresión de DRO1 coincide con la detección de caspasa-3 activa, corroborando los resultados de “western blot” y sugiriendo la implicación de la caspasa-3 en la apoptosis inducida por DRO1.

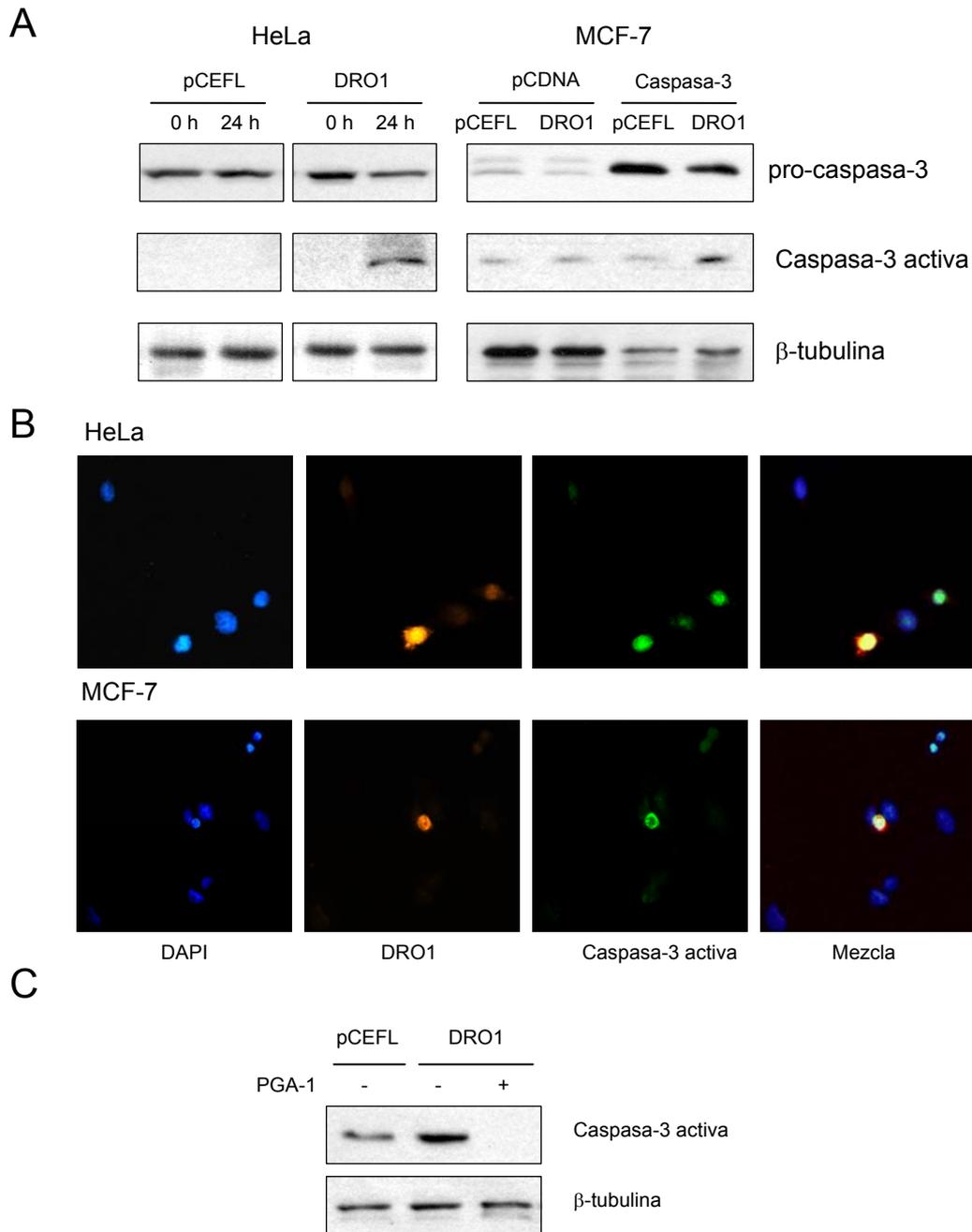


Figura 28. DRO1 induce la activación de caspasa 3. **A)** Células HeLa (panel de la izquierda) fueron transfectadas con pCEFL-AU5 o pCEFL-AU5-DRO1. 24 horas después fueron recogidas y lisadas para su posterior análisis por "western blot". Del mismo modo, células MCF-7 (panel de la derecha) fueron cotransfectadas con los vectores indicados. Las células fueron recogidas y lisadas 24 horas después de la transfección. **B)** Paralelamente se realizó un análisis por inmunofluorescencia incubando las muestras con anticuerpos específicos anti-caspasa 3 activa y anti-AU5 para la detección del DRO1 ectópico. **C)** "Western blot" de células MCF-7 estimuladas con PGA-1 (conjugado cíclico de péptido 1) a una concentración final de 50 μ M inhibidor específico que actúa a nivel del complejo formado por Apaf-1, caspasa 9 y citocromo C. Los lisados celulares fueron incubados con anticuerpos anti-caspasa 3 activa y anti- β -tubulina como control de carga.

Con el fin de definir el nivel al cual actúa DRO1 en la cascada de señalización, se usó el inhibidor específico de Apaf-1, PGA-1, que inhibe la formación del complejo pro-apoptótico del apoptosoma (Mondragon et al. 2008). El apoptosoma es un complejo multi-protéico constituido por Apaf-1, citocromo c y procaspasa-9 (Kim et al. 2005). La actividad principal de éste complejo consiste en el procesamiento y activación de caspasa-9. El apoptosoma activo transduce la señal apoptótica procesando y activando a la procaspasa-3. Se sobre-expresó DRO1 en células MCF-7 control y en paralelo, otras fueron tratadas con PGA-1 (Fig. 28C), que previno la activación de caspasa-3 en las células MCF-7, sugiriendo que la activación pro-apoptótica de DRO1 ocurre antes de la activación del apoptosoma y de caspasa-3.

5.1.4 Señales de muerte inducen la translocación de DRO1 a la mitocondria

Algunas proteínas citosólicas como Bax o asociadas a orgánulos como Bcl-2 son activadas por señales apoptóticas, siendo entonces translocadas a la mitocondria (Wolter et al. 1997). En la mayoría de los casos, se trata de proteínas pro-apoptóticas que tras ser internalizadas provocan pérdida del potencial de membrana, disfunción mitocondrial y liberación de citocromo c (Smaili et al. 2001). Dado el cierto paralelismo con DRO1, decidimos abordar el estudio de que estuviera siendo regulado por un mecanismo análogo.

Para estudiar ésta hipótesis, cultivos celulares de la línea U-2 OS fueron sometidos al tratamiento combinado $TNF\alpha/CHX$ durante 4 horas con el objetivo de activar la señalización apoptótica. Los resultados de inmunofluorescencia mostraron una fuerte colocalización en células tratadas con $TNF\alpha/CHX$ (Fig. 29A). Los resultados los cuantificamos empleando el programa MetaMorph Imaging (Fig. 29B). Los resultados evidencian el incremento significativo de la señal de colocalización correspondiente a DRO1 y Mitotracker, indicando que el estímulo apoptótico induce la translocación de DRO1 a la mitocondria.

Con un tratamiento análogo, lisados protéicos fraccionados de U-2 OS fueron analizados por "western blot". Las dos fracciones aisladas que obtuvimos contienen las membranas celulares o el contenido citosólico (Fig. 29C). Los resultados confirmaron un enriquecimiento de DRO1 en las fracciones membranales tratadas con $TNF\alpha/CHX$. Estos resultados apoyan la existencia de un mecanismo de señalización activado por estímulos apoptóticos que translocan a DRO1 a la mitocondria.

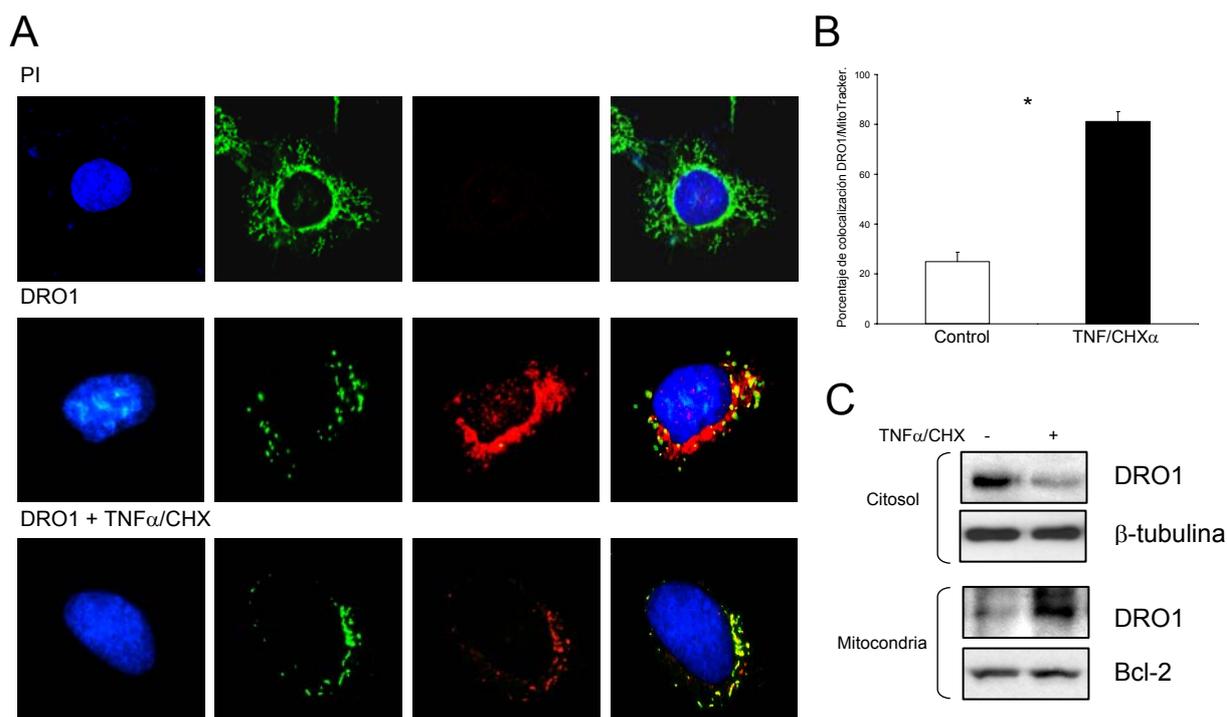


Figura 29. El estímulo apoptótico TNF α /CHX induce la translocación de DRO1 a la mitocondria. A) Inmunofluorescencias realizadas en cultivos celulares de la línea U-2 OS incubadas con suero pre-inmune, PI (paneles superiores) o suero anti-DRO1 (paneles intermedios e inferiores). En los paneles inferiores las células fueron estimuladas con TNF α /CHX durante 4 horas. **B)** Análisis con el programa “MetaMorph Imaging” del porcentaje de translocación de DRO1 a la mitocondria en cultivos control (barra abierta) y cultivos estimulados con TNF α /CHX (barra cerrada). La gráfica representa la media del análisis de seis células individuales en cada caso, donde se dividió el área de colocalización, color amarillo, entre el área de distribución de DRO1, color rojo. *P \leq 0.05. **C)** “Western blot” de fraccionamientos subcelulares de células U-2 OS sin estimular o estimuladas con TNF α /CHX durante 4h. Se detectó DRO1 con anticuerpos purificados de los sueros anti-DRO1 (péptido carboxi-terminal), los controles de carga se realizaron con anticuerpos anti-Bcl-2, marcador específico de mitocondria y anti- β -tubulina como control de carga citosólica.

5.1.5 La estimulación con TNF α /CHX favorece la inducción apoptótica mediada por DRO1

En coherencia con las observaciones anteriores, cabría esperar que la translocación de DRO1 a la mitocondria como resultado de la estimulación apoptótica coincidiera con un incremento en el porcentaje de células en subG0-G1. Con la finalidad de contrastar la autenticidad de ésta hipótesis, cultivos celulares de la línea HeLa fueron transfectados con DRO1 y tratados con TNF α /CHX para su posterior análisis por citometría de flujo (Fig. 30A). De acuerdo con lo esperado, el estímulo apoptótico produjo un incremento en el porcentaje de células apoptóticas con respecto a las células control transfectadas con el vector vacío pCEFL-AU5. El tratamiento con TNF α /CHX de las células transfectadas con DRO1 produjo los valores más altos de apoptosis. Estos resultados muestran una relación directa entre la localización subcelular mitocondrial de DRO1 con la inducción de la apoptosis.

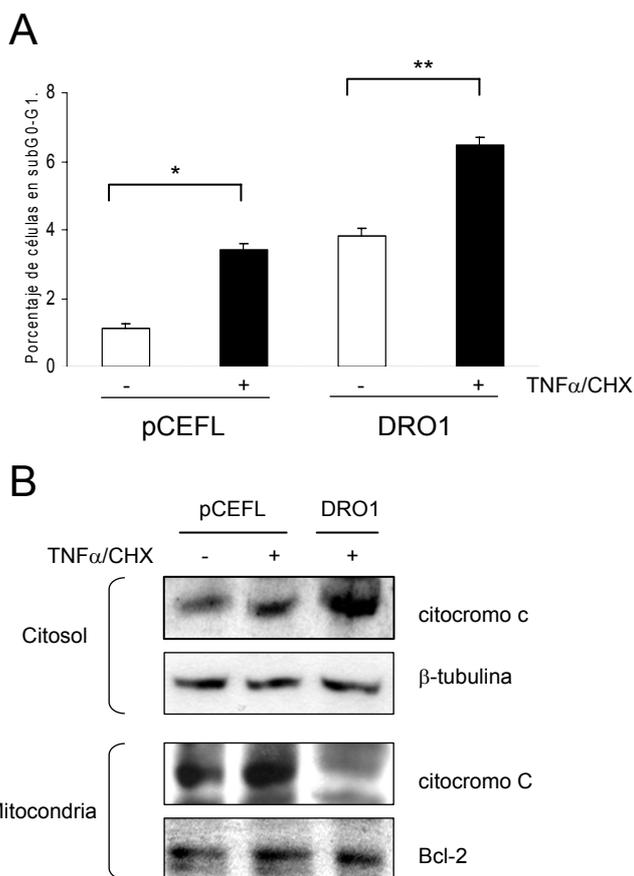


Figura 30. La sobre-expresión de DRO1 favorece la apoptosis inducida por TNF α /CHX y la liberación de citocromo c. **A)** Gráfico representativo del porcentaje de células en fase subG0-G1 del ciclo celular. Células HeLa fueron transfectadas con el vector pCEFL-AU5 o pCEFL-AU5-DRO1 según lo indicado en la representación. 44 horas después de la transfección, los cultivos fueron estimulados con TNF α /CHX durante 4 horas, siendo posteriormente fijados y analizados por citometría de flujo. La gráfica representa la media de tres experimentos independientes. **B)** “Western blot” de fraccionamientos subcelulares de cultivos MCF-7 transfectados con el vector pCEFL-AU5 o pCEFL-AU5-DRO1, según lo indicado. El estímulo apoptótico se aplicó 4 horas antes de la lisis celular. La liberación citosólica del citocromo c se detectó con anticuerpos específicos anti-citocromo c. Los anticuerpos anti- β -tubulina y anti-Bcl-2 fueron usados como control de carga citosólica y mitocondrial respectivamente. *P \leq 0.02 y **P \leq 0.05.

Los resultados obtenidos con el inhibidor específico de Apaf-1 sugieren que la inducción apoptótica de DRO1 ocurre antes de la formación/activación del complejo apoptosoma (Fig. 28C). Para la formación del apoptosoma es necesaria la liberación de la mitocondria del citocromo c (Kim et al. 2005). Esto nos hizo pensar que quizás DRO1 pudiera estar implicado en el proceso de la despolarización de la membrana mitocondrial previo a la liberación de citocromo c. Con el objetivo de definir la capacidad de DRO1 de estimular dicha liberación, cultivos de la línea celular HeLa se transfectaron con DRO1 y se estimularon con TNF α /CHX. Las mitocondrias fueron aisladas y lisadas independientemente. La liberación del citocromo c se cuantificó mediante “western blot” (Fig. 30B). Los resultados revelaron un enriquecimiento de citocromo c en la fase citosólica de las células que sobre-expresaban DRO1 y habían sido estimuladas con TNF α /CHX. Este incremento venía acompañado por la pérdida del contenido de citocromo c en la fase mitocondrial, lo que sugiere una importante participación de DRO1 en la liberación del citocromo c.

5.1.6 DRO1 es una fosfoproteína

La activación y translocación de proteínas al interior de orgánulos o al núcleo celular puede estar regulada por modificaciones post-traduccionales activadoras que facilitan el transporte de la proteína al compartimento destino (Kim et al. 2006; Xuan Nguyen et al.

2006). Las fosforilaciones reversibles en residuos de serina, treonina o tirosina, son las modificaciones post-traduccionales más comunes y mejor estudiadas (Shenolikar 1986; Piwnicka-Worms 1996). Para profundizar en los mecanismos moleculares que regulan la activación y translocación de DRO1 a la mitocondria, quisimos estudiar la posibilidad de que DRO1 fuera susceptible de ser fosforilado por alguna ruta de señalización.

Una primera observación que nos sugirió la existencia de una fosforilación se produjo al analizar lisados celulares de células estimuladas con la citoquina $TNF\alpha$. La fosforilación de proteínas pro-apoptóticas tras el estímulo con $TNF\alpha$ es un mecanismo que se ha definido en numerosos estudios (Grethe y Porn-Ares 2006; Ihnatko y Kubes 2007). Estimulamos células HeLa con $TNF\alpha$ durante 3 horas antes de ser lisadas y analizadas por “western blot” (Fig. 31A). Los resultados revelaron un ligero cambio en la movilidad electroforética de DRO1, la cual quedaba totalmente revertida si las células eran previamente tratadas con el inhibidor específico de MEK1 PD98059. Estos resultados sugieren que DRO1 podría ser sustrato de fosforilación por Erk.

Un ensayo de desfosforilación *in vitro* reforzó la hipótesis de que DRO1 estaba siendo fosforilado *in vivo*. Lisados de células HeLa se trataron con λ -PP y fueron analizados por “western blot”. El tratamiento con λ -PP produjo un cambio en la movilidad electroforética de DRO1 (Fig. 31B), sugiriendo que DRO1 estaba siendo desfosforilado.

Para seguir definiendo la naturaleza de la fosforilación de DRO1, inmunoprecipitamos DRO1 de lisados celulares de HeLa y los inmunocomplejos los analizamos con anticuerpos fosfoespecíficos. Una banda del tamaño esperado de DRO1 fue detectada con el anticuerpo que reconoce específicamente treoninas fosforiladas (Fig. 31C). No se detectó señal alguna en los inmunoprecipitados incubados con anticuerpos específicos para fosfo-tirosinas y fosfo-serinas. Los resultados demuestran que DRO1 está siendo fosforilado *in vivo* en al menos un residuo de treonina.

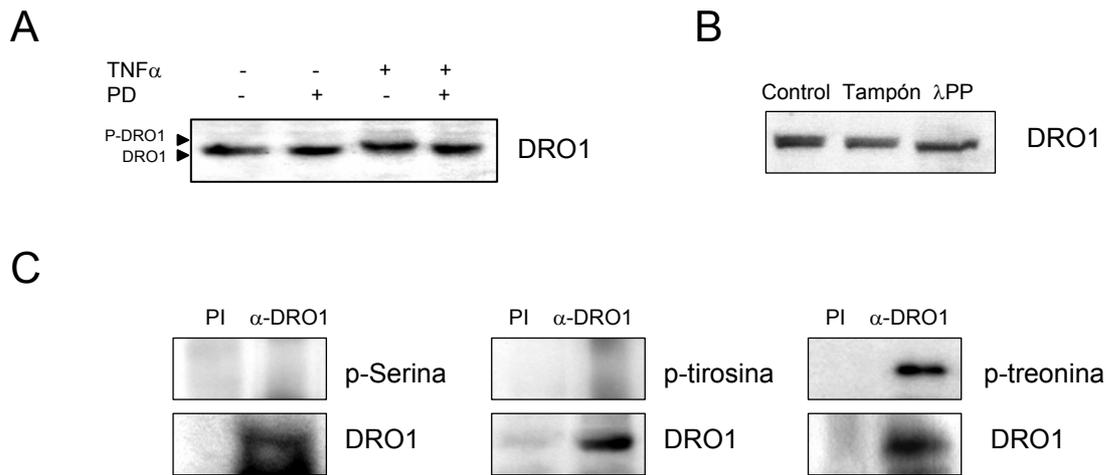


Figura 31. DRO1 se fosforila en al menos una treonina. A) Cultivos HeLa fueron bloqueados con el inhibidor de MEK1 PD98059, 4 horas antes de la lisis celular (calles 2 y 4). Paralelamente, otros cultivos fueron estimulados con 100 ng/ml TNF α una hora después (calles 3 y 4). **B)** Ensayo de defosforilación *in vitro* con fosfatasa lambda (λ -PP) o sin la enzima (tampón), durante 45 minutos a 30° C en lisados de DRO1 procedentes de cultivos HeLa. En la calle 1 (control) se cargaron 30 μ g de lisado HeLa sin tratamiento. **C)** Lisados totales de células MCF-7 fueron inmunoprecipitados con suero pre-inmune (PI) o con suero anti-DRO1 (α -DRO1). Los inmunocomplejos se analizaron por “western blot” con anticuerpos anti-fosfoserina, anti-fosfotirosina o anti-fosfotreonina (paneles superiores). La eficiencia de la inmunoprecipitación con DRO1 se comprobó con anticuerpos anti-DRO1 (paneles inferiores).

5.1.7 Generación de mutantes de DRO1 en potenciales sitios de fosforilación de Erk

Una vez demostrada la capacidad de DRO1 de inducir apoptosis y su susceptibilidad de ser fosforilado, nos propusimos analizar si la fosforilación era el mecanismo activante responsable de la translocación de DRO1 a la mitocondria y por tanto, la desencadenante de la acción pro-apoptótica. Con objeto de determinar la cascada de señalización responsable de la fosforilación de DRO1, lisados celulares de la línea HeLa tratados con TNF α y con el inhibidor específico de MEK1 PD98059, fueron inmunoprecipitados con anti-DRO1. Los inmunocomplejos se analizaron con anti-fosfotreonina, revelando que el tratamiento con TNF α aumentaba el grado de fosforilación en treonina de DRO1 y que PD98059 inhibía completamente dicha fosforilación (Fig. 32A). Los resultados sugieren una implicación directa de la ruta MEK/Erk en la fosforilación de DRO1.

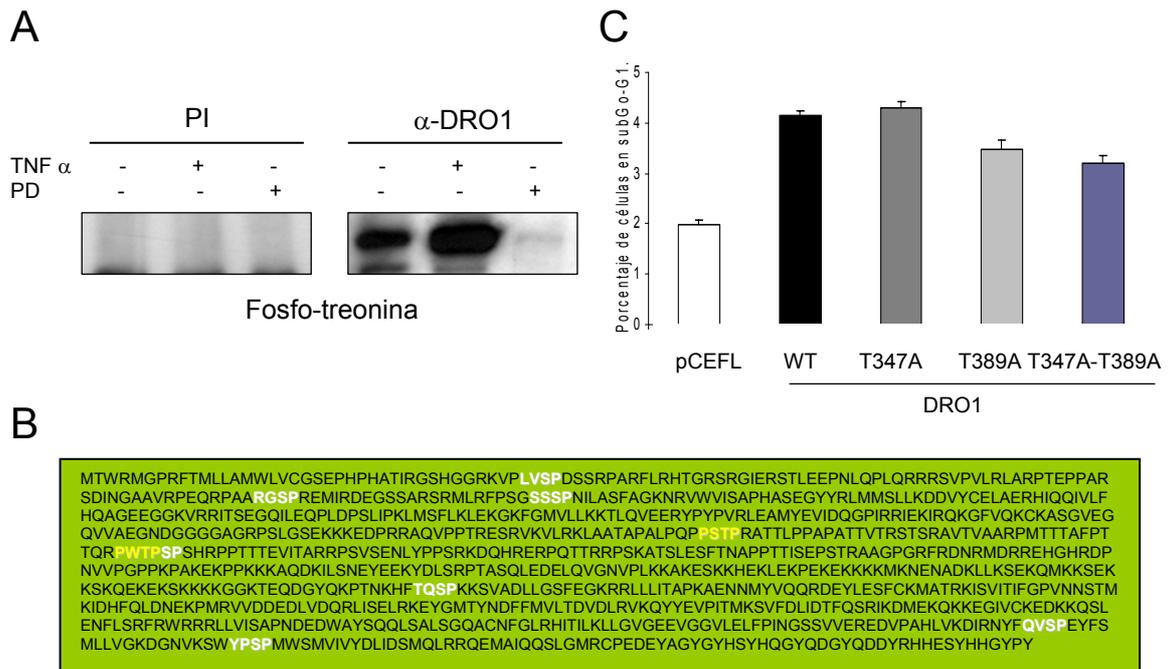


Figura 32. Función de la ruta MEK1/Erk en la fosforilación de DRO1. **A)** Células HeLa fueron sometidas a dos tratamientos independientes, el primero consistente en la estimulación con 100 ng/ml TNF α 3 horas antes de la lisis, en segundo lugar los cultivos fueron bloqueados con el inhibidor de MEK1 PD98059, 1 hora antes de la lisis. Posteriormente 1 mg de lisado total en cada caso, fue inmunoprecipitado con sueros pre-inmunes (PI) o sueros anti-DRO1 (α -DRO1). Análisis por “western blot” con anticuerpos anti-fosfotreonina revelaron el grado de fosforilación de DRO1. **B)** Secuencia aminoacídica completa de DRO1. En amarillo se marcan los sitios con treoninas potenciales de fosforilación por Erk1 que fueron mutadas. En blanco se marcaron los restantes sitios consenso de fosforilación en serinas. **C)** Gráfico representativo de tres experimentos independientes en los que se cuantificó el porcentaje de células MCF-7 en la fase subG0-G1 del ciclo celular por citometría de flujo. La barra en blanco corresponde a la transfección del vector control pCEFL-AU5 y en negro pCEFL-AU5-DRO1, posteriormente fueron transfectados los mutantes T347A, T389A y T347A-T389A según lo indicado en la tabla.

MEK1 es activada en respuesta a estímulos y factores de crecimiento fosforilando a Erk y desencadenando una cascada de señalización que promueve procesos biológicos como la supervivencia y la proliferación celular y está implicado en la transformación maligna y la resistencia a drogas terapéuticas (McCubrey et al. 2007). En coherencia con ésta observación y considerando a DRO1 como un modulador pro-apoptótico, los resultados sugieren que la fosforilación de DRO1 por Erk sería inactivante de su función. Del análisis de la secuencia primaria de DRO1 hemos encontrado 9 sitios consenso de fosforilación por Erk: P-x-S/T-P o P-x-x-S/T-P (donde P prolina, x cualquier aa y S serina). Dos de éstos sitios correspondían a posibles fosforilaciones en treoninas (T347 y T389, Fig. 32C). Usando el plásmido pCEFL-AU5-DRO1 como molde, hemos generado mutaciones puntuales que sustituyen las treoninas por alaninas, de modo que la proteína mutante ya no es fosforilable en estas posiciones. Quisimos determinar si la mutación específica en alguno de estos sitios tendría consecuencias biológicas en la actividad pro-apoptótica de DRO1. Transfectamos

células HeLa con los distintos mutantes simples y el doble mutante (Fig. 32C). Tal y como habíamos observado en experimentos anteriores, la sobre-expresión de DRO1 va acompañada de un incremento en el porcentaje de células apoptóticas. Sin embargo, ninguno de los mutantes produjo diferencias significativas en este comportamiento.

5.2 DRO1 y proliferación celular.

Muchos de los genes supresores de tumores, además de favorecer la muerte celular, tienen la capacidad de reprimir la proliferación celular (Sherr 2004). En ocasiones, esta actividad antiproliferativa es consecuencia de la represión transcripcional de ciertos genes importantes en el crecimiento y la proliferación celular (Zhao y Day 2001; Raj et al. 2008). Dado que DRO1 es un potencial gen supresor de tumores (Bommer et al. 2005), quisimos definir la capacidad efectiva de éste gen como posible supresor de la proliferación celular.

5.2.1 La sobre-expresión de DRO1 reduce el porcentaje de células en G2-M

Con la finalidad de definir la capacidad moduladora de DRO1 en la proliferación celular, células MCF-7 y HeLa fueron transfectadas con DRO1 y analizadas posteriormente por citometría de flujo. Se comparó el porcentaje de células en fase G2-M del ciclo celular (Fig. 33). Observamos un descenso significativo del porcentaje de células proliferativas, si bien más acusado en HeLa que en MCF-7.

Este resultado no es totalmente concluyente porque el aumento del porcentaje de apoptosis (Fig. 27) procede del descenso del porcentaje de las demás fases del ciclo. Sin embargo, podría por otro lado implicar a DRO1 en procesos antiproliferativos, bien de forma indirecta (por ejemplo a través de “checkpoints”) o bien de manera directa como represor transcripcional de genes proliferativos. Las proteínas represoras de la transcripción se unen a secuencias específicas del DNA evitando el inicio de la transcripción (Wang et al. 2002a). La afirmación anterior conlleva una localización nuclear de DRO1 bajo determinadas circunstancias o estadios del ciclo celular. Mediante análisis de la secuencia aminoacídica, se han localizado en DRO1 un total de 5 sitios de localización nuclear, NLS, y 2 sitios de localización nuclear bipartidos (Liu et al. 2004).

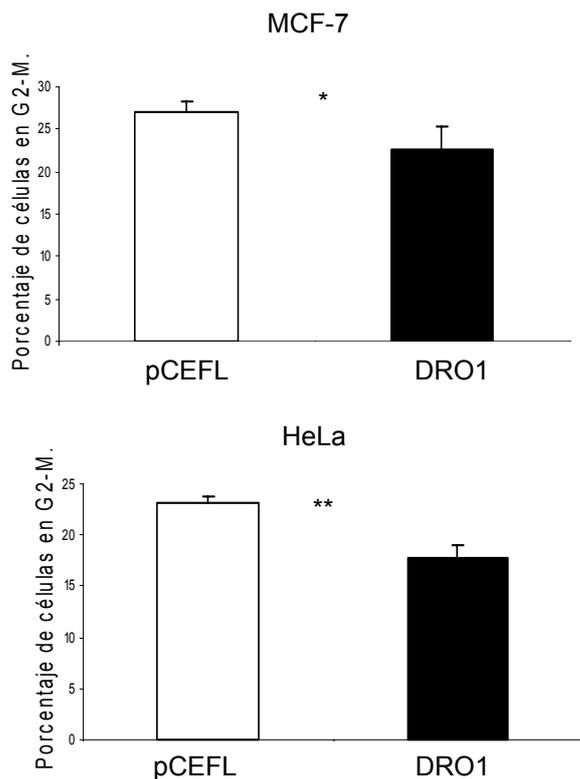


Figura 33. La sobre-expresión de DRO1 reduce el porcentaje de células en G2-M. Gráficas representativas de tres experimentos independientes en los que se transfirió pCEFL-AU5 o pCEFL-AU5-DRO1 en cultivos celulares MCF-7 (panel superior) o HeLa (panel inferior). El análisis por citometría de flujo permitió determinar el porcentaje de células en fase G2-M del ciclo celular, como una medida del índice proliferativo en ambas líneas. *P = 0.08, **P = 0.02.

5.2.2 Localización parcial de DRO1 en el núcleo

La existencia de dos isoformas de DRO1 había sido descrita por algunos autores (Bommer et al. 2005), sin embargo ninguno de los análisis realizados define con precisión el origen de éstas distintas formas de DRO1. Hicimos un análisis detallado de la expresión de DRO1 en diversas fracciones subcelulares en la líneas MCF-7 y U-2 OS. El suero obtenido frente a DRO1 detectó dos bandas en los lisados totales de ambas líneas. Una primera banda que migró aproximadamente a 105 KDa y otra segunda banda a una altura de 130 KDa (Fig. 34A). Los fraccionamientos subcelulares revelaron una localización subcelular preferente de cada forma. La forma de menor tamaño se detectó principalmente en el núcleo, mientras que la forma de mayor tamaño se detectó asociada a membranas y en menor grado en la fracción citosólica, tal y como habíamos observado anteriormente (Fig. 26C). Análisis de inmunofluorescencia confirmaron las observaciones anteriores (Fig. 34A, paneles de la derecha). Acompañando a la distribución de DRO1 asociada a membranas, detectamos una sub-población nuclear, ocupando concretamente los nucleolos (Fig. 34A, flechas blancas).

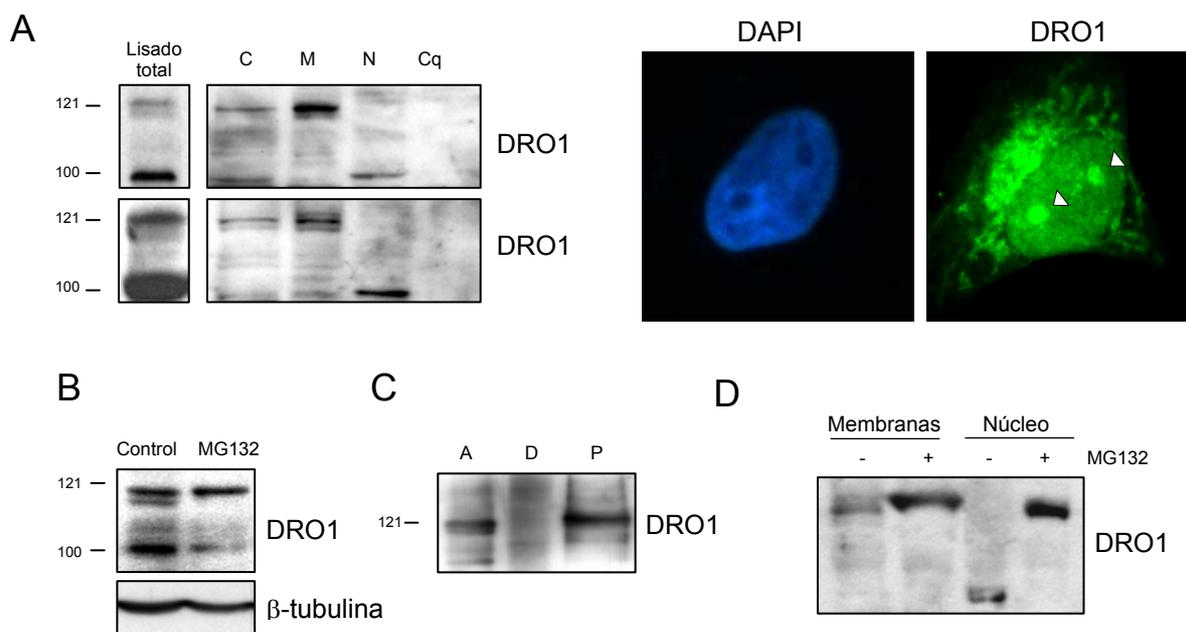


Figura 34. DRO1 posee una forma que se se procesa en el núcleo y es sensible al inhibidor del proteasoma. A) “Western blot” de fracciones subcelulares de MCF-7 (panel superior) y U-2 OS (panel inferior). Las distintas fracciones citosol (C), membranas (M), núcleo (N) y citoesqueleto (Cq) así como un control con lisado total, fueron incubadas con anticuerpos anti-DRO1. Los paneles de la derecha corresponden a inmunofluorescencias de cultivos MCF-7 marcados con anticuerpos anti-DRO1 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). **B)** Cultivos MCF-7 fueron tratados con el inhibidor del proteasoma MG132 a una concentración final de 20 μ M 15 horas antes de la lisis celular. El “western blot” de cultivos control o tratados con MG132 se analizó con anticuerpos anti-DRO1. β -tubulina fue empleada como control de carga. **C)** Se analizaron lisados protéicos de células HeLa (ubiquitina-6xHis) por “western blot” para detectar la población de DRO1 ubiquitinada. Lisados antes de purificar por Ni^{+2} (A), después de purificar (D) y complejos copurificados (P). **D)** Cultivos MCF-7 fueron tratados con el inhibidor del proteasoma MG132 a una concentración final de 20 μ M 15 horas antes del fraccionamiento subcelular. Posteriormente, la movilidad de las formas de DRO1 fue analizada mediante “western blot” en las fracciones de membrana y núcleo con anticuerpos anti-DRO1.

DRO1 posee un péptido de señalización de 22 aminoácidos para transporte a mitocondria o ER en su dominio amino-terminal, pero no es plausible que éste sea el causante de la diferente movilidad electroforética observada entre la especie molecular del núcleo y la detectada en membranas (de unos 25 KDa). Aunque son escasos los casos descritos, el complejo de degradación ubiquitina-proteasoma tiene la capacidad de procesar proteínas precursoras mediante cortes proteolíticos específicos sin llegar a una degradación total (Palombella et al. 1994). Ésta capacidad explicaría la diferente movilidad electroforética de DRO1. Con el objetivo de estudiar esta posibilidad, células MCF-7 fueron tratadas durante 12 horas con el inhibidor específico de la degradación mediada por proteasoma MG132. Mientras que en los lisados celulares control se detectaron las dos bandas específicas de DRO1, en los lisados celulares tratados con MG132 sólo se detectó la banda de 120 KDa (Fig. 34B). Además de ésta, otra evidencia nos sugirió fuertemente que DRO1 se estaba degradando por el proteasoma. Células HeLa que sobre-expresan ubiquitina junto a una

etiqueta con 6 histidinas fueron usadas para analizar la capacidad de ubiquitinación de DRO1. Análisis por “western blots” revelaron que DRO1 estaba siendo ubiquitinado (Fig. 34C). Nuestra hipótesis fue corroborada en lisados celulares fraccionados que previamente fueron tratados con MG132 (Fig. 34D). Los resultados sugieren que DRO1 posee una forma procesada de 105 KDa con una localización preferentemente nuclear. La naturaleza de ésta forma protéica está relacionada directamente con la degradación mediada por el proteasoma. Sin embargo, no podemos descartar otras posibilidades como por ejemplo que el procesamiento de DRO1 esté mediado por una proteasa sensible a la degradación por el proteasoma.

5.2.3 DRO1 se internaliza en el núcleo durante la fase G1 y se procesa en G2-M

Los resultados obtenidos sugieren que DRO1 posee una forma procesada por mecanismos sensibles al proteasoma, que en algún momento del ciclo celular es exportada al núcleo.

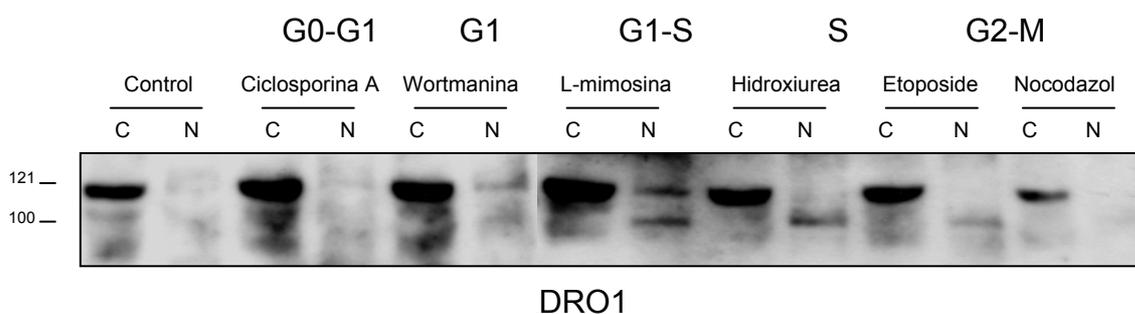


Figura 35. Tránsito y procesamiento de DRO1 durante las distintas fases del ciclo celular. A) Células MCF-7 fueron sincronizadas en las distintas fases del ciclo celular usando los agentes indicados. Las concentraciones empleadas se indican en la Tabla 3 de materiales y métodos. Después de cada tratamiento los cultivos tratados fueron sometidos a una lisis fraccionada, aislando citosol (C) y núcleos (N). Las distintas fracciones se analizaron por “western blot” con anticuerpos anti-DRO1.

Quisimos entonces definir la translocación y el procesamiento de DRO1 con el ciclo celular. Células MCF-7 fueron sincronizadas con inhibidores específicos que bloquean a las células en distintas fases del ciclo celular. El mayor porcentaje de DRO1 se detectó en las fracciones citosólicas. Sin embargo, a medida que las células iban entrando en G1 (bloqueadas con wortmanina y sucesivas) DRO1 empezó a aparecer en la fracción nuclear (Fig. 35). Las dos formas de DRO1 se detectaron en el núcleo durante la fase G1. En la fase S del ciclo celular sólo se detectó la forma de menor peso en el núcleo. En G2 y sobre todo en la entrada en M disminuyen los niveles de ambas formas.

5.2.4 Represión transcripcional de ciclina A2 y c-myc

Los resultados anteriores apoyan la hipótesis de que parte de la población celular de DRO1 se transloca al núcleo, en donde se procesa a medida que las células entran en S pasando a la isoforma de menor tamaño molecular. En G2 y sobre todo en la entrada en mitosis parece haber un importante procesamiento de DRO1. Con objeto de definir las consecuencias funcionales de la translocación de DRO1 al núcleo decidimos estudiar la posibilidad de que DRO1 estuviera reprimiendo la transcripción de genes cruciales para la progresión celular.

Ciclina A2 se transcribe principalmente durante la fase S del ciclo celular, formando posteriormente parte del complejo ciclina A2-Cdk2 que regula la transición G2-M (Blanchard 2000). Se sobre-expresó DRO1 en células MCF-7 con la finalidad de analizar la modulación en la expresión de ciclina A2. La sobre-expresión de DRO1 fue comprobada por PCR en tiempo real (Fig. 36). El análisis cuantitativo confirmó la sobre-expresión de DRO1 en las células transfectadas (Fig. 36, gráfica de la izquierda). En estas mismas células los niveles de ciclina A2 quedaron significativamente reducidos (Fig. 36, gráfica central).

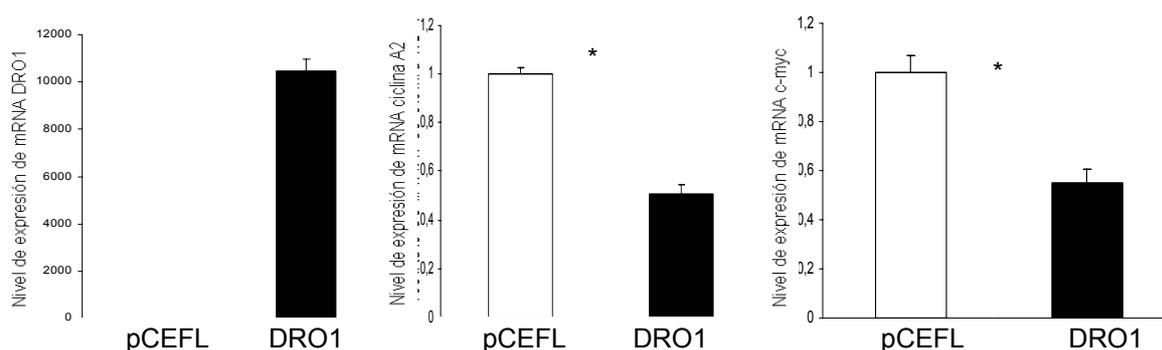


Figura 36. La sobre-expresión de DRO1 reduce los niveles de mRNA de ciclina A2 y c-myc. Niveles de expresión de mRNA de DRO1 (gráfica izquierda, control de la sobre-expresión de DRO1), ciclina A2 (gráfica central) y c-myc (gráfica derecha) de células MCF-7 transfectadas con pCEFL·AU5 (barras abiertas) o pCEFL·AU5·DRO1 (barras cerradas). Las distintas gráficas representan la media de tres experimentos independientes. * $P \leq 0.05$.

El oncogén c-myc promueve la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis (Sears et al. 2000). Su transcripción está favorecida entre otros oncogenes por AIB1 (Ho et al. 2005) y reprimida por genes supresores de tumores como p53, que curiosamente bloquean su transcripción en la fase S del ciclo celular (Ho et al. 2005). Las afirmaciones anteriores convierten a c-myc como un firme candidato susceptible de ser reprimido transcripcionalmente por DRO1. Para validar nuestra hipótesis analizamos los niveles de expresión de c-myc en las muestras descritas en la Figura 34. De forma análoga a ciclina A2, los resultados revelaron una represión importante de los niveles del mRNA de c-myc en las células que sobre expresan DRO1 (Fig. 36, gráfica derecha).

Los resultados mostrados demuestran que una parte de la población citosólica-mitocondrial de DRO1 se moviliza, por mecanismos que aún desconocemos y se internaliza en el núcleo durante la fase G1 del ciclo celular. El descenso de células en G2-M por la sobre-expresión de DRO1 podría ser consecuencia de la represión de genes como c-myc y ciclina A2. Estas observaciones refuerzan el papel de DRO1 como gen supresor de tumores.

6. Identificación y caracterización de la interacción de DRO1 y PLZF.

6.1 El sistema del doble híbrido de levadura revela nuevas proteínas que interaccionan con DRO1.

Actualmente no hay descrita ninguna interacción de DRO1 con otras proteínas. La identificación de nuevos efectores de DRO1 nos ayudaría a definir de forma más precisa las funciones fisiológicas de DRO1 en la célula. Con el objetivo de identificar la interacción con otras proteínas, hemos empleado el sistema de doble híbrido de levaduras para cribar una librería de cDNA de riñón humano. El sistema de doble híbrido es una de las herramientas más poderosas que hay en biología molecular para la identificación de interacciones protéicas y consiste en suplir auxotroffias que permiten el crecimiento de la levadura pero sólo cuando hay interacción entre la proteína cebo de interés y la nueva proteína que se pretende identificar. Existen varias aproximaciones al sistema del doble híbrido de levaduras. Nosotros hemos empleado el sistema del operón *lexA* o también conocido como sistema de "interaction trap" (Gyuris et al. 1993). El cebo se construyó a partir del plásmido pCEFL·AU5·DRO1, subclonando DRO1 en fase con el dominio al DNA de *LexA* en el plásmido pEG202. La segunda proteína híbrida proviene de un segundo plásmido que contiene un dominio ácido de activación de la transcripción seguido de una librería de cDNA que codifican para potenciales proteínas o dominios de proteínas que interaccionan con el cebo.

Tabla 8. Clones positivos reconfirmados.

Gen aislado	Número de acceso	Función celular	Actividad β -galactosidasa
Citocromo bc1	NP 536855	Enzima de la cadena respiratoria mitocondrial	● ● ● ● ●
ATP sintetasa	NM 001003696	Enzima responsable de la interconversión de ADP y ATP	● ● ● ● ●
PLZF	NM 006006	Represor transcripcional asociado diferenciación mielóide	● ● ● ● ●
RNA ribosomal	NM 12009529	Enzima responsable de la transducción protéica	● ● ● ● ●
Subunidad 4 NADH DH	NP 4538	Proteína de membrana de la cadena respiratoria mitocondrial	● ● ● ● ●

De un total de 1.78×10^6 transformantes, 104 clones crecieron en ausencia de leucina a la vez que mostraron color azul por expresar el gen de *LacZ* que confiere actividad β -galactosidasa. Los clones positivos fueron nuevamente seleccionados mediante réplicas para confirmar la validez de las interacciones. Tras la eliminación de interacciones artefactuales, nos quedamos con 12 clones positivos que representaban 5 secuencias de cDNA con

distintos tamaños moleculares, correspondiendo a 5 genes diferentes. Los plásmidos rescatados fueron secuenciados, revelando los 5 genes que se indican en la Tabla 8.

6.2 PLZF interacciona *in vitro* e *in vivo* con DRO1

Con objeto de eliminar falsos positivos, cada uno de los plásmidos correspondientes a los 5 clones positivos fue cotransformado individualmente con la proteína cebo LexA-DRO1. El ensayo β -galactosidasa reveló que 1 de los clones era un falso positivo, el que codificaba para la ATP sintetasa. El clón que codificaba para el gen de PLZF resultó ser el de mayor actividad β -galactosidasa y por tanto, supuestamente el de interacción más fuerte con DRO1 (Fig. 37).

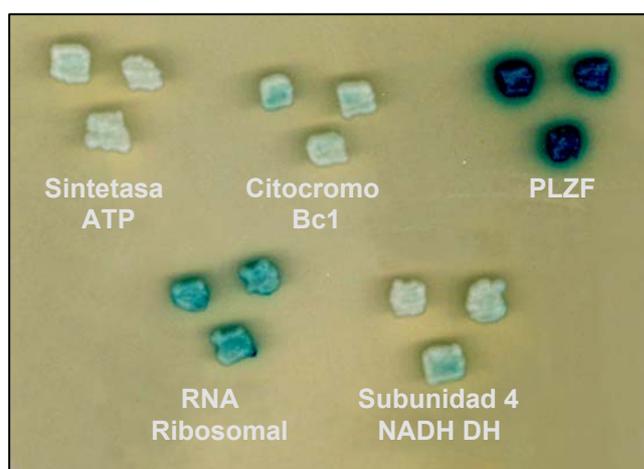


Figura 37. PLZF interacciona con DRO1. Resultado final del ensayo de doble híbrido. Los 5 clones positivos fueron cotransformados de manera independiente con el vector pEG202-DRO1 en la cepa EGY48. La intensidad de la actividad β -galactosidasa, color verdoso, es proporcional a la intensidad de la interacción entre ambas proteínas.

PLZF fue inicialmente descrito como una proteína fusionada al receptor de ácido retinóico alpha en un paciente con leucemia promielocítica aguda (APL) (Chen et al. 1993a). Esta fusión es consecuencia de la translocación cromosómica t(11;17)(q23;q21), que genera las proteínas quiméricas PLZF-RAR α y RAR α -PLZF, responsables del potencial oncogénico en algunos casos de APL (Grignani et al. 1998). Cabe resaltar que PLZF posee un dominio conservado en represores transcripcionales y que diversos estudios han relacionado la actividad de PLZF con el control negativo de la proliferación y diferenciación celulares y aumentando la apoptosis (Shaknovich et al. 1998).

Con la finalidad de validar la interacción entre DRO1 y PLZF utilizando una aproximación diferente, probamos la especificidad de la interacción en cultivos celulares humanos. Subclonamos la secuencia de PLZF obtenida del cribado de la librería de cDNA en el vector de expresión pGEX-4T-1 en fase de lectura con la proteína GST. PLZF se escindió del plásmido pJG4-5 como fragmento EcoRI/XhoI, correspondiente a la proteína completa de PLZF menos los 32 primeros aminoácidos. Las proteínas GST y GST-PLZF las purificamos de los lisados con bolas de glutatión-sefarosa y analizamos la expresión y grado de

purificación de las proteínas mediante gel de SDS-PAGE y tñido con azul de Coomassie (Fig. 38A). Una vez verificada y cuantificada la proteína quimérica expresada, lisados celulares de U-2 OS se incubaron con la proteína quimérica GST-PLZF y con GST como control. El material resultante de la interacción se sometió a análisis por “western blot” con anticuerpos anti-DRO1. Los resultados corroboraron la interacción entre DRO1 y PLZF (Fig. 38B)

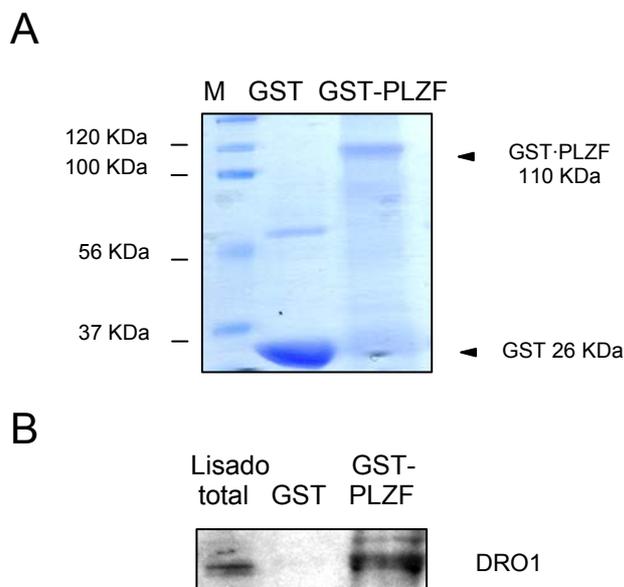


Figura 38. DRO1 interacciona en cultivos celulares humanos con el factor represor de la transcripción PLZF. A) Se indujo la expresión de las proteínas GST y GST-PLZF en *E. coli*, se resolvieron en gel SDS-PAGE y el gel fue tñido con azul de Coomassie para determinar el grado de expresión y de pureza de las proteínas. La calle 1 muestra el marcador con los pesos moleculares indicados, GST en la calle 2 y GST-PLZF en la calle 3. **B)** Experimento de “pull-down” para investigar la interacción de PLZF con DRO1. Lisados celulares de U-2 OS se incubaron con GST, calle 2 o GST-PLZF, calle 3. Los complejos se analizaron por “western blot” con anticuerpos específicos anti-DRO1.

6.2.1 La interacción con DRO1 se produce por el extremo carboxi-terminal de PLZF

Para definir los dominios responsables de la interacción, clonamos la secuencia completa de PLZF a partir del RNA de células HMEC y generamos a partir de él distintos fragmentos de PLZF. Inicialmente, el cDNA completo de PLZF lo obtuvimos por RT-PCR con oligonucleótidos específicos de PLZF. Esto resultó en la amplificación de un fragmento de aproximadamente 2000 pb, en coherencia con el tamaño esperado del mRNA de PLZF (2022 pb) (Fig. 39A). El mRNA de 2022 pb codifica una proteína de 673 aminoácidos que posee tres dominios conservados (Fig. 39B). El primero se encuentra en el extremo amino-terminal y consiste en un dominio funcional BTB/POZ responsable de la represión transcripcional y de interacciones proteína-proteína (Melnick et al. 2002). En la zona central se sitúa el dominio RD2, responsable de la interacción con otros corepresores transcripcionales como N-CoR, SMRT y mSIN3A (Hong et al. 1997; Grignani et al. 1998). Por último, en el extremo carboxi-terminal posee 9 repeticiones del dominio de dedos de zinc, responsable de la unión al DNA (Chen et al. 1993b).

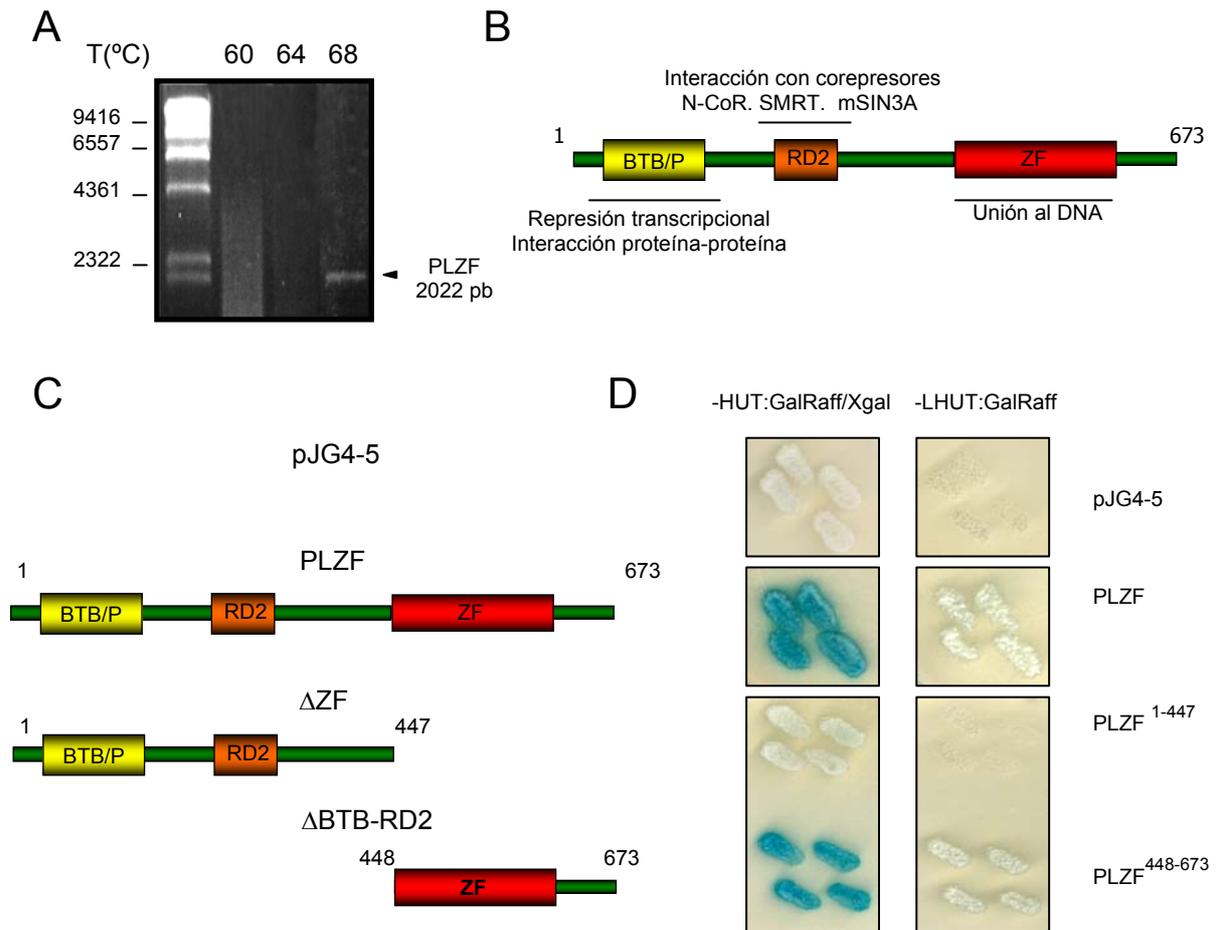


Figura 39. DRO1 interacciona con PLZF por el extremo carboxi-terminal. A) Clonación del mRNA completo de PLZF a partir de RNA de células HMEC. La amplificación se efectuó con distintas temperaturas de anillamiento resultando la Tm 68°C (calle 4) la óptima para la amplificación de las 2022 pb que codifican a PLZF. **B)** Esquema representativo de los dominios funcionales de PLZF. **C)** Esquema de los dos mutantes de delección que se construyeron. **D)** El vector pJG4-5 vacío así como las distintas construcciones indicadas en C), se cotransformaron con el vector pEG202·DRO1 en la cepa de levaduras EGY48. Se determinó la intensidad de color resultante de la actividad β-galactosidasa sobre el sustrato X-gal (paneles de la izquierda) y el crecimiento de la levadura en ausencia de leucina (paneles de la derecha).

Para localizar el dominio responsable de la interacción, generamos dos mutantes deletionados (Fig. 39C). El primer fragmento generado, ΔZF, comprendía los aa 1-447 y carecía del dominio ZF. El segundo fragmento, ΔBTB/POZ-RD2, comprendía los aa 448-673 y carecía de los dominios BTB/POZ y RD2. Basándonos en la técnica del doble híbrido, las dos construcciones fueron subclonadas en el vector pJG4-5 y cotransformadas con pEG202·DRO1 en la cepa EGY48. El gen reportero LacZ (color azul resultante de la actividad β-galactosidasa) y el rescate de la auxotrofia LEU2 nos reveló que el dominio ZF era el responsable de la interacción con DRO1 (Fig. 39D).

6.2.2 DRO1 interacciona con PLZF en el núcleo

PLZF es un factor de transcripción, siendo su localización subcelular preferentemente nuclear (Hummel et al. 1999; Bernardo et al. 2007). Sin embargo, nuestros resultados mostraban que la localización subcelular de DRO1 era más heterogénea. Por ello, quisimos estudiar en qué compartimento subcelular se estaba produciendo la interacción entre ambas proteínas. Lisados fraccionados de U-2 OS se incubaron con anticuerpos específicos para PLZF, resultando su localización claramente nuclear (Fig. 40A). El análisis por inmunofluorescencia confirmó la localización nuclear de PLZF (Fig. 40B). El análisis por inmunoprecipitación confirmó la localización nuclear de PLZF (Fig. 40C).

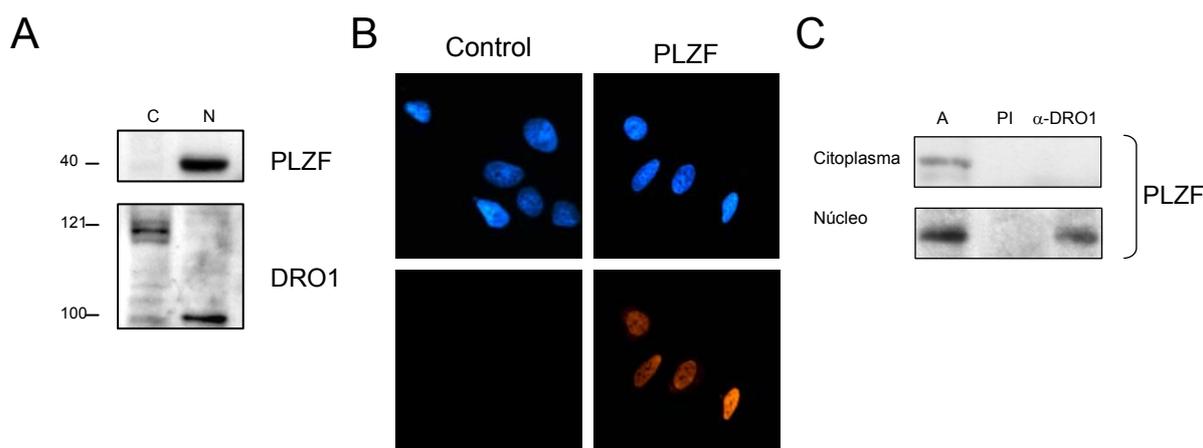


Figura 40. DRO1 interacciona con PLZF en el núcleo. **A)** Fracciones subcelulares citosólicas, C y nucleares N, de cultivos U-2 OS fueron analizadas por “western blot” con anticuerpos específicos anti-DRO1 y anti-PLZF. **B)** Inmunofluorescencia con suero control y anticuerpos anti-PLZF en cultivos subconfluentes de la línea celular U2-OS. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **C)** Inmunoprecipitación con suero pre-inmune (PI) y suero anti-DRO1 (α -DRO1) de lisados fraccionados de U2-OS. La calle 1 corresponde a 30 μ g de lisado total antes de la inmunoprecipitación (A). Los inmunocomplejos precipitados se detectaron por “western blot” con anticuerpos anti-PLZF.

Algunos estudios han reseñado que la estructura primaria de DRO1 contiene siete sitios potenciales de localización nuclear (Liu et al. 2004) y además, nuestros resultados revelan la existencia de una forma de DRO1 de menor peso molecular con localización preferentemente nuclear (Fig. 40A o apartado 5.2.2). En coherencia con éstas observaciones, quisimos estudiar la posibilidad de una interacción a nivel nuclear.

Para estudiar la posibilidad de una interacción en el núcleo de la célula, inmunoprecipitamos con anticuerpos anti-DRO1 lisados celulares fraccionados de U-2 OS. Los inmunocomplejos los analizamos por “western blot” con anticuerpos anti-PLZF. Detectamos una banda correspondiente a PLZF en la fracción nuclear inmunoprecipitada (Fig. 40C), sugiriendo que la interacción entre DRO1 y PLZF se producía en el núcleo celular.

6.2.3 DRO1 reprime la expresión de ciclina A2 por medio de PLZF

Numerosos estudios relacionan la represión transcripcional de PLZF con la inhibición proliferativa (McConnell et al. 2003; Rho et al. 2007; Kang et al. 2003), otros han descrito un papel crucial de PLZF en la inducción apoptótica (Rho et al. 2006; Bernardo et al. 2007). Curiosamente, nuestros resultados obtenidos apuntan a un papel de DRO1 en idénticas funciones celulares, sugiriendo que la interacción de ambas proteínas podría constituir un mecanismo importante en la regulación de estos procesos. Más concretamente, estudios recientes demuestran que PLZF interacciona físicamente con el promotor de la ciclina A2 reprimiendo su expresión (Rho et al. 2006).

Estudiamos la posibilidad de que la represión transcripcional de PLZF en el promotor de ciclina A2 estuviera modulada por DRO1. Diseñamos oligonucleótidos de RNA específicos para silenciar PLZF y los transfectamos en células MCF-7 con pCEFL·AU5, como control o junto a pCEFL·AU5·DRO1. La eficiencia del silenciamiento del mRNA de PLZF fue comprobado por PCR semi-cuantitativa (Fig. 40A), mientras que los niveles de expresión de ciclina A2 los analizamos por PCR en tiempo real (Fig. 40B). Como cabía esperar, la sobre-expresión de DRO1 produjo una disminución significativa en los niveles de ciclina A2 (Fig. 41B, dos primeras barras o Fig. 36B). En los cultivos silenciados con siPLZF se produjo un importante incremento de los niveles de de ciclina A2. Este incremento se vio significativamente reducido con la sobre-expresión concomitante de DRO1, sugiriendo que la regulación de la expresión de ciclina A2 ocurre de manera dependiente de ambas proteínas. Esta interacción de PLZF con DRO1 revela un nuevo mecanismo de regulación del ciclo celular mediante la represión de ciclina A2.

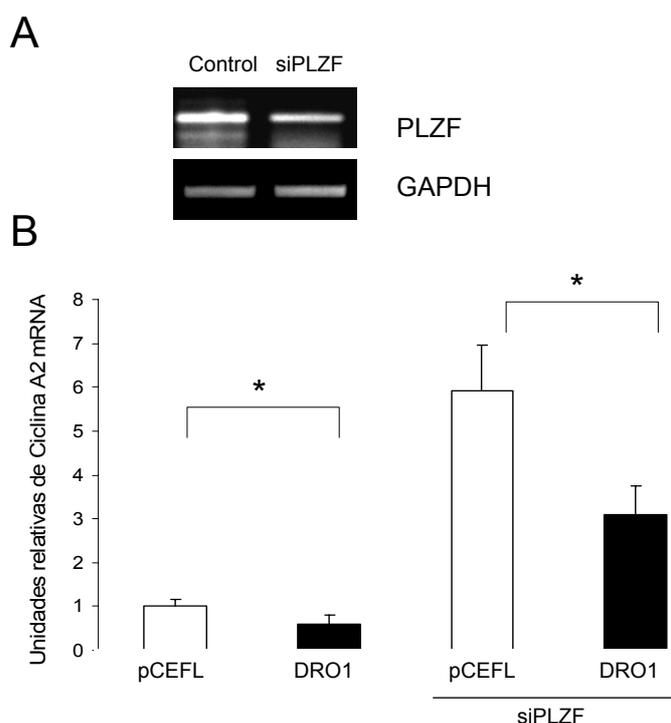


Figura 41. DRO1 reprime la expresión de ciclina A2 por medio de PLZF. **A)** Eficiencia del silenciamiento de PLZF con siRNA control, calle 1 y siPLZF, calle 2. Dos días después del silenciamiento se aisló RNA de los correspondientes cultivos y se analizaron los niveles de expresión de PLZF mediante PCR semi-cuantitativa con oligos específicos para PLZF y para GAPDH como control interno. **B)** Cuantificación mediante PCR en tiempo real de los niveles de expresión de ciclina A2 en células MCF-7 dos días después de la transfección de pCEFL·AU5, barras abiertas, o pCEFL·AU5·DRO1, barras cerradas. Paralelamente se silenció PLZF con siRNA, como se indica en la gráfica. Las gráficas representan la media de tres experimentos independientes. *P ≤ 0.05

DISCUSIÓN

AIB1 favorece la proliferación induciendo hiperplasia en el tejido mamario de animales AIB1-tg.

Para estudiar la contribución de la sobre-expresión de AIB1 en el desarrollo de la glándula mamaria, usamos nuestro modelo de animales transgénicos que sobre-expresan el transgén MMTV-*hAIB1* en epitelio de mama. El análisis histológico reveló una significativa hiperplasia ductal respecto a los controles WT, acompañada de un incremento en el número de ramificaciones secundarias, engrosamiento de las terminaciones ductales y una mayor ocupación del estroma (Avivar et al. 2006). Los animales AIB1-tg presentaban aproximadamente un 25% más de ocupación del estroma y un mayor índice de proliferación de las células epiteliales de la mama.

La potencialidad oncogénica de AIB1 *per se* ha quedado demostrada en otras líneas de animales transgénicos donde la elevada sobre-expresión de AIB1 es suficiente para desarrollar tumores en la mama (Torres-Arzayus et al. 2004). En otros estudios la eliminación de AIB1 inhibe la iniciación y progresión de cánceres de mama inducidos por oncogenes, como Ras (Kuang et al. 2004). En nuestro modelo demostramos que bajas dosis de sobre-expresión de AIB1 generan hiperplasia y predisponen para el desarrollo de cáncer de mama. Probablemente, modificaciones secuenciales a nivel genético y/o epigenético en AIB1 así como en otros oncogenes predispondrían a los animales AIB1-tg a padecer neoplasias en la mama. Así, anormalidades genómicas como amplificaciones en el gen de AIB1 junto a la amplificación de otros oncogenes como *c-myc*, han sido detectadas frecuentemente en el carcinoma hepático (Wang et al. 2002b). Igualmente, modificaciones en las repeticiones poliglutamínicas del extremo carboxi-terminal de AIB1 junto con mutaciones puntuales en los genes supresores de tumores BRCA1 y BRCA2, han sido constatadas como inductoras de cambios epigenéticos que favorecen la tumorigénesis en mama (Kadouri et al. 2004). Así, para la transición hiperplasia a neoplasia de animales AIB1-tg se requerirá la acumulación secuencial de modificaciones desestabilizadoras en AIB1 y otros oncogenes que supongan una ventaja selectiva para la proliferación de las células epiteliales de mama.

Además de su función clásica como coactivador de ER, AIB1 interacciona con un gran número de factores de transcripción, multiplicando así su efecto y su importancia en el mantenimiento de la homeostasis celular. Por ejemplo, AIB1 interacciona con E2F1 promoviendo la progresión celular independiente de ER (Louie et al. 2004). La familia de factores de transcripción E2F juega un papel crucial en la progresión del ciclo celular, controlando la expresión de genes esenciales en la transición del ciclo celular de G1-S y G2-M (Sidle et al. 1996). Basándonos en dichas observaciones usamos la línea celular ER-independiente COS-1 para estudiar la capacidad intrínseca de AIB1 de promover el ciclo celular. Una sobre-expresión del 38% de AIB1 en cultivos COS-1 (pcDNA3.1(+)-AIB1) con respecto a cultivos control COS-1 (pcDNA3.1), fue suficiente para producir un incremento

significativo en la población de células proliferativas. AIB1 se encuentra reclutado en el promotor de ciclina D1 en condiciones de proliferación normales, promoviendo su expresión (Planas-Silva et al. 2001). Además de ciclina D1, otros genes importantes en la regulación del ciclo celular se encuentran regulados por AIB1 como ciclina E1 y E2, ciclina A2, E2F1, c-myc, MCM7 o cdc25a. Sería plausible por tanto, que una hiperactivación de AIB1 produjera una sobre-expresión de un grupo de genes implicados en la regulación de ciclo celular, promoviendo en definitiva la progresión celular.

Numerosos estudios han demostrado que AIB1 cumple un papel crucial no sólo en el crecimiento y la proliferación celular sino además como modulador negativo de la apoptosis. Trabajos como los de Torres-Arzayus y colaboradores (2004) y más recientemente Colo y colaboradores (2007) han demostrado que la eliminación de AIB1 provoca un aumento significativo de la apoptosis. Sin embargo, actualmente se desconocen los mecanismos intrínsecos que controlan la función antiapoptótica de AIB1. Es más, se desconoce si es una actividad inducida directamente por AIB1 o si por el contrario es consecuencia de la inducción o represión transcripcional de intermediarios apoptóticos. Apoyando esta segunda hipótesis, estudios comparativos de expresión de genes en animales WT y AIB1-tg por “micro-arrays”, nos han permitido identificar nuevos genes modulados por AIB1 implicados en apoptosis, como DRO1 o BFAR. En nuestros estudios demostramos que AIB1 reprime fuertemente la expresión de DRO1, gen pro-apoptótico, de modo que estaríamos ante un novedoso mecanismo molecular que explicaría la insensibilización de AIB1 a la apoptosis.

Las observaciones anteriores refuerzan la importancia de AIB1 no sólo como oncogén promotor de la progresión celular, sino además como proteína clave en la modulación de la muerte celular. Diseccionando los mecanismos que controlan la actividad de éstos nuevos genes diana de AIB1 podríamos establecer nuevas rutas reguladoras de la apoptosis e identificar así, nuevas dianas potenciales para mejorar el diagnóstico y las terapias para el tratamiento de distintos tipos de cáncer.

AIB1 contrarresta la deficiencia de p27^{Kip1} en animales p27^{Kip1}^{-/-} y coopera con Her2/neu en la hiperplasia ductal.

Aunque los animales AIB1-tg de nuestro estudio no desarrollan tumores de mama como ocurre con otras líneas de transgénicos que sobre-expresan AIB1 en mayores niveles (Torres-Arzayus et al. 2004), sí que muestran hiperplasia mamaria desde los comienzos de la pubertad, lo que sugiere que nuestro modelo constituye una nueva herramienta para el estudio de los primeros estadios del desarrollo del cáncer de mama inducido por AIB1. Probablemente, mayores niveles de expresión de AIB1 causan alteraciones adicionales necesarias para la transición de hiperplasia a neoplasia.

Uno de los genes más frecuentemente alterados en cánceres de mama es Her2/neu. Además, la sobre-expresión de Her2/neu con AIB1 ocurre en los tumores de peor pronóstico. Por ello, quisimos analizar si el cruce de los animales transgénicos de AIB1 y MMTV/*neu* podría cooperar en la formación de tumores. Los animales MMTV/*neu* generan tumores espontáneos en la mama, favoreciendo además la metástasis a pulmón. En humanos, la sobre-expresión de *neu* ocurre en etapas tempranas del desarrollo del cáncer de mama, sugiriendo su implicación en la iniciación del tumor. La estirpe genética FVB en la que se generó el modelo MMTV/*neu* está comúnmente reconocida como más sensible a los tumores de mama que la estirpe C57Bl/6 (Lifsted et al. 1998). No obstante, estudios previos de cruces entre FVB-MMTV/*neu* y la estirpe C57/CBA mostraron que el oncogen *neu* era igualmente capaz de formar tumores con la misma incidencia en la generación filial F1 que en la parental F0 (Muraoka et al. 2003). Por ello decidimos estudiar el cruce del transgén MMTV/*neu* y AIB1-tg, suponiendo que la herencia fenotípica sería similar. Desgraciadamente y en contra de lo esperado, la mezcla del fondo genético resultante de cruzar los dos modelos de ratones transgénicos produjo una fuerte inhibición de la formación de tumores, tanto en los transgénicos simples de MMTV/*neu* como en los dobles AIB1-tg/MMTV/*neu*. Estos resultados revelan la resistencia del fondo genético C57Bl/6 a la formación de tumores por el transgén MMTV/*neu* y nos llevaron a pensar que la sobre-expresión de los bajos niveles de AIB1 en los ratones AIB1-tg pudiera no ser la única causa de la ausencia de tumores. Sin embargo, recientemente hemos generado ratones AIB1-tg en el fondo genético FVB mediante diez cruces sucesivos con animales silvestres FVB. Los resultados preliminares revelan que tampoco hay desarrollo de tumores en el fondo genético FVB, sugiriendo que es la baja sobre-expresión de AIB1 la que necesitaría ser aumentada para promover la formación de tumores. Diversos trabajos han mostrado la importancia del fondo genético en modelos de cáncer de próstata (Bianchi-Frias et al. 2007), cáncer de mama (Davie et al. 2007) o incluso en tumores inducidos por isotransplantes de hipófisis (van der Gugten et al. 1985). Estas observaciones sugieren que el cruce de los dos fondos genéticos C57Bl/6 y FVB estaría enmascarando algunas de las características fenotípicas específicas de los dos transgenes.

A pesar de la ausencia de tumores en la generación filial resultante del cruce de ambas estirpes genéticas, estudios histológicos con los dobles transgénicos AIB1-tg/MMTV/*neu* revelaron que la actividad del transgén MMTV/*neu* aumentaba significativamente la hiperplasia ductal inducida por AIB1. Este aumento se producía tanto en hembras en pubertad como en adultas. Nuestros resultados revelan que existe una cooperación o confluencia de las señales promovidas por ambos transgenes y por extrapolación a los tumores humanos, podríamos confirmar que la presencia de ambos marcadores tumorales no es sólo mera coincidencia sino que supone un mayor grado de agresividad del tumor.

Las observaciones fenotípicas obtenidas del cruce de animales AIB1-tg con el modelo de animales “knockout” de p27^{Kip1} coincidieron con los resultados esperados. Trabajos previos han demostrado que la ausencia de p27^{Kip1} en la glándula mamaria inhibe la progresión del ciclo celular, mientras que la pérdida de uno de los dos alelos tiene un efecto opuesto, favoreciendo la transición G1-S (Muraoka et al. 2001; Muraoka et al. 2002). Este efecto se ha tratado de justificar alegando que un poco de p27^{Kip1} es necesario para estabilizar el complejo de ciclina D1/Cdk4 (Cheng et al. 1999), mientras que la ausencia completa lo desestabiliza y la presencia abundante lo inhibe. Nuestros estudios revelan que la pérdida de un alelo de p27^{Kip1} aumenta la hiperplasia inducida por AIB1. Animales p27^{Kip1}^{-/-} mostraron un significativo retraso en la proliferación (determinada por la ocupación estromal), una disminución de las ramificaciones laterales y unas TEBs muy reducidas. p27^{Kip1} es requerido por la glándula mamaria para una correcta morfogénesis y una tasa normal de proliferación del epitelio mamario. Este retraso en la morfogénesis de la mama fue restituido parcialmente por la sobre-expresión de AIB1 en los ratones AIB1-tg/ p27^{Kip1}^{-/-}. Este resultado nos revela que la acción proliferativa de AIB1 es independiente de p27^{Kip1}. Una hipótesis interesante es que AIB1 aumente suficientemente los niveles de ciclina D1 como para compensar la pérdida de estabilidad por la ausencia de p27^{Kip1}. Sin embargo, el análisis preliminar por “western blot” de mamas totales nos ha revelado que no hay un aumento significativo de ciclina D1 cuando se compara p27^{Kip1} en presencia y ausencia de AIB1-tg. Este resultado no está todavía confirmado. La restitución del fenotipo hiperplásico en mamas AIB1-tg/p27^{Kip1}^{-/-}, apoya dicha hipótesis. La sobre-expresión de ciclina D1, compensaría la desestabilización del complejo ciclina D1-Cdk4 debida al déficit de p27^{Kip1} en las mamas AIB1-tg/p27^{Kip1}^{-/-}. Las observaciones anteriores apoyan la existencia de un nuevo mecanismo de señalización, por el cual AIB1 evitaría la restricción de p27^{Kip1} en la transición de G1-S, favoreciendo la progresión celular en fases tempranas de la tumorigénesis. Los ratones “knockout” de ciclina D1 también tienen un pobre desarrollo de la glándula mamaria (Sicinski et al. 1995) mientras que la sobre-expresión de ciclina D1 es un fenómeno muy frecuente en cáncer de mama, por lo que otra posibilidad es que la sobre-expresión de AIB1 estaría compensando indirectamente el déficit de ciclina D1 de los ratones p27^{Kip1} a través de otras moléculas reguladoras de ciclo. En este sentido, la represión de DRO1 podría ser una de ellas.

Resulta particularmente interesante que en cultivos epiteliales primarios AIB1-tg detectamos cambios en la expresión de algunos mediadores de la adhesión celular como Twist. Twist promueve la transición epitelio-mesénquima, por lo que estaríamos ante un novedoso mecanismo que implicaría directamente a AIB1 en procesos invasivos. Otra molécula implicada en adhesión celular y desregulada es cadherina E, sobre-expresada en ratones AIB1-tg. Una hipótesis interesante implicaría a AIB1 en la represión transcripcional de

Snail mediada por ER (Fujita et al. 2003). La disminución en la expresión de cadherina E en células epiteliales es un proceso que ocurre en las etapas tardías del cáncer (Shiozaki et al. 1996), por lo que nuestros resultados sugieren que modificaciones en la expresión/actividad de AIB1 ocurren en etapas tempranas de los tumores hormono-dependientes, necesitando posteriormente de otras alteraciones que conlleven la pérdida de expresión de cadherina E. Nuestros resultados revelan la importancia de AIB1 en la desrepresión transcripcional de cadherina E (Batlle et al. 2000) y de Twist (Vesuna et al. 2008), constituyendo nuevas rutas de señalización a considerar para el diagnóstico y tratamiento eficaz del cáncer de mama en etapas tumorigénicas tempranas.

Diferencias en rutas de señales y en la distribución subcelular de AIB1 determinan su vida media en distintas líneas celulares de cáncer.

Nuestras observaciones revelan que el contenido celular de AIB1 varía entre distintas líneas celulares de cáncer y que estas diferencias están relacionadas con la localización subcelular y la vida media de la proteína. Como coactivador transcripcional, AIB1 ejerce su actividad en el núcleo. De hecho, AIB1 se localiza en el citoplasma de células quiescentes epiteliales de mama, mientras que en células epiteliales proliferativas la localización es preferente nuclear (Avivar et al. 2006). Creemos que el estudio de los mecanismos que regulan la localización subcelular y la estabilidad de AIB1 merecen de un estudio detallado ya que nos permitirán entender mejor los mecanismos que llevan a la sobre-expresión/activación de AIB1 en los tumores. Existen estudios con resultados contradictorios con respecto a la localización subcelular de la degradación de AIB1. Algunos autores sitúan la degradación de AIB1 en el citosol (Mani et al. 2006). Usando un modelo comparativo entre líneas celulares de cáncer hemos observado que hay dos grupos claramente diferenciados, las que tienen AIB1 mayoritariamente en el núcleo como (MCF-7 y BT-474) y las que tienen un AIB1 principalmente citosólico (como HeLa y H1299) (Ferrero et al. 2008). La localización citoplasmática lleva asociada una vida media bastante más larga que la localización nuclear, sugiriendo que la degradación es nuclear. El tratamiento de células MCF-7 con ciclosporina A produjo un cambio de localización de AIB1 del núcleo al citosol acompañado de un considerable aumento de su vida media. Por otro lado, el tratamiento con el inhibidor específico del proteasoma MG132 indujo la acumulación de AIB1 en el núcleo en HeLa y también en MCF-7. Todos estos resultados apoyan la degradación nuclear de AIB1 por el proteasoma, en coherencia con Li y colaboradores (Li et al. 2007). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que exista también otro tipo de degradaciones (por ejemplo lisosomal) al margen de la nuclear, si bien nuestros resultados sugieren que se trataría de mecanismos minoritarios de reciclaje de AIB1.

Otros trabajos en nuestro laboratorio han mostrado que en las líneas de cánceres humanos arriba mencionadas, no hay diferencias en el patrón de expresión de proteínas implicadas en el transporte nuclear de AIB1, como importina $\alpha 3$ y SIP. Sin embargo, sí que hay mayor exporte del núcleo al citosol dependiente de Ran en las células en que se acumula en el citosol. Otras alteraciones que contribuyen a la diferente estabilidad de AIB1 entre éstas líneas celulares son también debidas a diferencias en el nivel de activación de ER α ya que agonistas de ER disminuyen la vida media de AIB1 mientras que antagonistas la aumentan. La importancia de ER α en la estabilidad de AIB1 ha sido extensamente estudiada. Precisamente la línea celular MCF-7 sobre-expresa ER α a diferencia de HeLa, pudiendo ser ésta sobre-expresión la responsable en parte de las diferencias en la estabilidad de AIB1.

La actividad de AIB1 a través de los complejos transcripcionales que constituye está finamente controlada por rutas de señalización dependientes de hormonas. Los distintos SERMs tienen una importancia vital en el tratamiento clínico de cánceres ER α positivos ya que agentes antagonistas como ICI182780 o tamoxifeno, son frecuentemente usados para reprimir la proliferación tumoral dependiente de estrógenos. Nuestros resultados sugieren un mecanismo de control en la estabilidad de AIB1 mediado por hormonas mediante el cual la molécula de AIB1 que forma parte de los complejos transcripcionalmente activos es rápidamente marcada para su degradación, evitando así una prolongada hiperactivación que pudiera resultar oncogénica. Los agentes antagonistas ICI182780 y tamoxifeno, por el contrario, incrementan considerablemente el tiempo de vida media de AIB1. Este aumento puede favorecer la coactivación de otros factores de transcripción como E2F o AP-1, importantes promotores del ciclo celular, resultando en la independencia de hormonas para crecer e incluso favoreciendo la resistencia del tumor a la propia terapia. Estaríamos ante un nuevo mecanismo por el que AIB1 favorece la tumorigénesis en cáncer en mama de manera ER α -independiente. Esto podría explicar la relación de la sobre-expresión de AIB1 y la resistencia al tamoxifeno de los cánceres de mama ER positivos (Osborne et al. 2003).

El reconocimiento y marcaje de proteínas que van a ser degradadas por el proteasoma, está mediado por las enzimas E3 ubiquitina-ligasas. Hasta hoy, se han descrito dos ubiquitina-ligasas responsables del marcaje y degradación de AIB1. La primera, E6-AP, fue identificada por Mani y colaboradores (2006). En un trabajo reciente identifican a SCF^{Fbw7 α} como la segunda ubiquitina-ligasa de AIB1 (Wu et al. 2007). Curiosamente, la subunidad Fbw7 α está frecuentemente implicada en la degradación de proteínas cruciales en la regulación del ciclo celular (Bornstein et al. 2003), lo que refuerza la importancia de AIB1 como regulador de ciclo celular. Hemos identificado dos nuevos dominios (DI 673-979; DII 1133-1424) requeridos simultáneamente para una efectiva activación transcripcional de AIB1 mediada por el proteasoma (Ferrero et al. 2008). En contra del mecanismo recientemente

postulado por el que GSK3 fosforila a AIB1 permitiendo la interacción con Fbw7 α y ubiquitinando a AIB1 (Wu et al. 2007), nuestros resultados revelan que estos dos dominios son ubiquitinados pero independientemente del sitio de fosforilación por GSK3.

Nuestros resultados demuestran que la capacidad oncogénica de AIB1 está modulada por varias rutas de señalización que regulan su localización subcelular y su susceptibilidad a la degradación mediada por el proteasoma. Uno de los mecanismos responsables de la actividad oncogénica de AIB1 es la amplificación a nivel cromosómico. Sin embargo, frente al 60% de tumores que sobre-expresan AIB1, sólo el 5% presentan amplificación de AIB1, por lo que otros mecanismos estarían modulando los niveles celulares de AIB1. Por ejemplo, mutaciones en dominios importantes para la estabilidad de AIB1 podrían favorecer sustancialmente su sobre-expresión. Nuestros resultados demuestran la existencia de dos nuevos dominios importantes para la regulación de la actividad transcripcional de AIB1, uno de ellos también implicado en su estabilidad. Un interesante proyecto de trabajo futuro será el localizar mutaciones en este dominio que estén asociadas a tumores que sobre-expresan AIB1.

DRO1 es una nueva proteína pro-apoptótica sensible a estrógenos, reprimida por AIB1 en múltiples líneas celulares humanas.

El análisis comparativo de la expresión de genes entre los transgénicos AIB1-tg *versus* WT reveló a DRO1 como un potencial gen fuertemente reprimido por AIB1. Nuestros resultados en distintos tejidos humanos apoyan que la represión mediada por AIB1 es un mecanismo molecular conservado. La posibilidad de que ésta represión constituya un mecanismo asociado a la tumorigénesis quedó reforzada al comparar los altos niveles de expresión de DRO1 en la línea epitelial de mama no cancerosa HMEC con la línea de carcinoma de mama MCF7, donde la expresión de DRO1 es muy baja.

Inicialmente DRO1 fue descrito en rata como una proteína sensible a estrógenos y asociada a la progresión del cáncer de mama (Marcantonio et al. 2001). Coincidiendo con este trabajo, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con E2 reprime la expresión transcripcional de DRO1 en células MCF-7.

DRO1 presenta una alta homología con la proteína supresora de tumores Drs (Bommer et al. 2005). Esta proteína es susceptible de reprimirse por oncogenes como v-Src, v-K-ras y v-abl y se ha demostrado que tiene capacidad de inducir apoptosis por mecanismos que conducen a la activación de caspasa-9 y caspasa-3 (Tambe et al. 2004). De forma análoga, DRO1 fue identificado por su capacidad de reprimirse por los oncogenes c-myc, β -catenina y H-ras. Su potencial como agente inductor apoptótico ha sido demostrado mediante la activación de caspasa-8 y caspasa-3 (Bommer et al. 2005). Estas similitudes entre Drs y

DRO1 nos permiten hipotetizar la función de DRO1 como gen supresor de tumores y AIB1 como oncogén responsable de su silenciamiento.

Los estudios sobre la distribución subcelular de DRO1 son contradictorios y poco precisos. Algunos autores describen a DRO1 como una proteína citoplasmática asociada al RE (Bommer et al. 2005), y en Golgi (Visconti et al. 2003). Otros postulan que DRO1 es una proteína que se secreta al exterior celular (Okada et al. 2008) y por último otro estudio describe la existencia de secuencias consenso de localización nuclear y sugiere una distribución nuclear de DRO1 (Liu et al. 2004). La falta de consenso sobre la distribución celular de DRO1 se debe, en parte, a la ausencia de dominios funcionales conservados en la proteína que nos permitan definir su función biológica en la célula y vislumbrar, así, su localización preferente. Existen solamente tres repeticiones internas en DRO1 que guardan una homología del 30% con la región carboxi-terminal de Drs. Nuestro análisis computacional de la secuencia aminoacídica de DRO1 reveló la existencia de un péptido señal en el extremo amino-terminal que con alta probabilidad marcaría a DRO1 para el transporte a la mitocondria.

Resulta sorprendente que a pesar de relacionar la actividad de DRO1 con la inducción apoptótica ninguno de los trabajos mencionados anteriormente estudie la posible localización mitocondrial de DRO1. Nuestros estudios revelan una localización de DRO1 mayoritariamente citosólica difusa que, tras la inducción del estímulo apoptótico pasa a una localización mitocondrial. Las repeticiones internas de DRO1, homólogas al dominio transmembrana de Drs, sugieren que podría asociarse preferencialmente a orgánulos membranales. Sin embargo, análisis por microscopía confocal con el marcador de RE calregulina revelaron que solamente una pequeña parte de la población celular de DRO1 coincide con el RE. Las observaciones anteriores resultan muy sugerentes ya que atribuyen a DRO1 una alta movilidad subcelular modulada por vías de señalización celular que aún desconocemos.

En conclusión, DRO1 se distribuye preferentemente en el citosol posiblemente asociado a varios orgánulos membranales como Golgi, mitocondrias o RE, dependiendo probablemente de su respuesta a diferentes estímulos no del todo conocidos. Nosotros hemos descrito uno de ellos, el mediado por $TNF\alpha/CHX$ que favorece su localización mitocondrial e implica directamente su función celular con la apoptosis.

La señalización apoptótica de $TNF\alpha/CHX$ transloca DRO1 a la mitocondria favoreciendo la apoptosis mediante liberación del citocromo c al citosol.

En el estudio de Bommer y colaboradores (2005) se demuestra que DRO1 sensibiliza células epiteliales RKE3 a anoikis (muerte celular programada inducida por una adhesión celular inapropiada) y a la apoptosis inducida por el receptor de Fas (CD95). Nuestros

resultados coinciden con estas observaciones. Además, observamos una activación de caspasa-3 en cultivos que sobre-expresan DRO1. Notablemente, Bommer y colaboradores (2005) no atribuyen a DRO1 la capacidad de inducir apoptosis directamente.

La inducción apoptótica en la línea celular MCF-7 deficiente en pro-caspasa-3 reveló un dato interesante. DRO1 puede inducir apoptosis de manera caspasa-3-independiente. Análisis paralelos por “western blot” reforzaron nuestra hipótesis. DRO1 puede inducir apoptosis por dos mecanismos diferentes e independientes, uno implicaría la activación de caspasa-3 y otro sería caspasa-3-independiente. La existencia de una vía de señalización apoptótica caspasa-3-independiente ha sido demostrada por otros estudios (Seol et al. 2001; Lin et al. 2006), lo que justificaría la acción dual de DRO1 en la apoptosis.

La nueva ruta apoptótica de señalización inducida por Drs implica una activación de la caspasa-12, caspasa localizada en el RE y relacionada con la apoptosis como respuesta a estrés mediada por el RE (Tambe et al. 2004). La baja colocalización de DRO1 con calregulina, marcador de RE, así como la liberación de citocromo c mediada por DRO1 y el defecto en la activación de caspasa-3 en cultivos tratados con el inhibidor de Apaf-1/caspasa-9/citocromo c apoyan la idea que DRO1 actúa de forma distinta a Drs. La implicación de la mitocondria en la apoptosis inducida por DRO1 parece por tanto sólida. Ensayos posteriores en los que observamos una movilización de DRO1 inducida por estímulo $TNF\alpha/CHX$ a la mitocondria, confirman la implicación de una vía mitocondrial-apoptótica.

Estaríamos, por tanto, ante una doble acción pro-apoptótica de DRO1. La primera acción transcurre por una vía mitocondrial, confirmada por los eventos anteriormente mencionados. La segunda acción implica una vía caspasa-3-independiente. No hemos encontrado evidencias que justifiquen esta segunda vía. Además, desconocemos si esta acción podría estar mediada directamente por DRO1 o alternativamente podría ser un efecto post-transcripcional, estando mediado por otras proteínas cuya síntesis ha sido estimulada o reprimida por la sobre-expresión de DRO1. La capacidad de DRO1 de interactuar con PLZF, factor de transcripción relacionado con la actividad pro-apoptótica, podría explicar esta posibilidad. Curiosamente, se han descrito vías de señalización apoptóticas caspasa-3-independientes en casos de leucemia promielocítica aguda en los que se encuentra activada la proteína de fusión PLZF-RAR α (Quignon et al. 1998; Sternsdorf et al. 1999).

El estímulo apoptótico $TNF\alpha/CHX$ induce la translocación de DRO1 desde el citosol a la mitocondria y además, favorece la inducción apoptótica mediada por DRO1. De forma análoga a otras proteínas pro-apoptóticas como Bax (Kim et al. 2006), la movilidad de DRO1 podría ser explicada por una fosforilación activante. Nuestros resultados revelan que al menos un residuo en treonina es susceptible de ser fosforilado. Debido a que la técnica empleada no es la óptima para la detección de fosforilaciones y que además las

fosforilaciones son respuestas específicas en ocasiones reversibles que se producen durante breves periodos de tiempo, no podemos descartar la existencia de otras fosforilaciones en residuos de serinas y/o tirosinas. Ensayos de desfosforilación *in vitro* confirmaron que DRO1 es una fosfoproteína.

Hemos observamos un cambio de movilidad electroforética de DRO1 en cultivos estimulados con $TNF\alpha$. El cambio de movilidad electroforética se revierte con el inhibidor específico de MEK1 PD98059, que actúa inhibiendo la activación de Erk. Aunque no podemos descartar completamente que la fosforilación por Erk regule la actividad pro-apoptótica de DRO1, este resultado podría ser explicado porque la fosforilación por Erk no se produce en los sitios consenso que hemos predicho. Alternativamente, otra explicación es que Erk no sería la responsable de la fosforilación. Sin embargo esta posibilidad es menos probable porque habría que pensar en un efecto secundario del inhibidor PD98059 o en otras quinasas por debajo de Erk. Otra justificación más probable es que la fosforilación no es una modificación post-traducciona para modular la actividad pro-apoptótica de DRO1, sino que estaría implicada en otros procesos como la regulación post-transcripcional dependiente de PLZF. Erk promueve la supervivencia, el crecimiento y la progresión celular previniendo por el contrario la apoptosis (McCubrey et al. 2007), pensamos que la fosforilación de DRO1, más que regular su capacidad pro-apoptótica, regularía su capacidad antiproliferativa. Mutaciones puntuales en los sitios consenso de fosforilación por Erk en treoninas no produjeron cambios significativos en su actividad pro-apoptótica.

DRO1 funciona como represor proliferativo a través de la represión transcripcional de c-myc y ciclina A2.

En nuestro estudio aportamos evidencias por las que DRO1, de forma análoga a otros genes supresores de tumores (Sherr 2004), posee la capacidad de reprimir la proliferación celular. En la mayoría de las ocasiones, esta actividad antiproliferativa es consecuencia de la represión transcripcional de genes que se encuentran en el núcleo (Raj et al. 2008). La afirmación anterior resulta controvertida ya que las proteínas represoras de la transcripción se localizan en el núcleo, aunque no de forma constitutiva (Wang et al. 2002a), mientras que la mayoría de la bibliografía describe una distribución extranuclear de DRO1. Sin embargo, tres evidencias nos sugirieron una distribución nuclear y por tanto una función dentro del núcleo. La primera y en concordancia con Liu y colaboradores fue la detección de varias secuencias consenso de localización nuclear en DRO1. La segunda evidencia fue reportada por ensayos de inmunofluorescencia y por “western blot” de fraccionamientos subcelulares donde detectamos una alta proporción de DRO1 en el núcleo. Por último, la interacción con PLZF, factor de transcripción localizado exclusivamente en el núcleo. Todos estos hechos cuestionaban fuertemente una distribución exclusivamente extranuclear de DRO1.

El bloqueo de células MCF-7 en las distintas fases del ciclo celular nos proporcionó un resultado muy sugerente. DRO1 se internaliza en el núcleo y es procesado por un mecanismo mediado por el proteasoma al final de la fase G1 y principios de S del ciclo celular. Este resultado también lo confirmamos con cultivos asincrónicos de MCF-7 tratados con MG132, en los que DRO1 se acumula. Acompañando a ésta acumulación, los resultados en la línea celular HeLa (ubiquitina 6xHis), demostraron que DRO1 es susceptible de ser ubiquitinado. De forma análoga a otras proteínas represoras transcripcionales como p53 (Brooks et al. 2007), la ubiquitinación de DRO1 podría ser un mecanismo bifuncional que comprendería el marcaje para el transporte nuclear y el control temporal de actividad represora transcripcional de sus genes diana. Así, la ubiquitinación y el posterior procesamiento nuclear de DRO1 podrían ser explicadas como un mecanismo de control de su actividad represora transcripcional, si bien, todavía nos faltan realizar experimentos que demuestren su actividad como corepresor transcripcional.

El complejo de degradación ubiquitina-proteasoma, además de degradar proteínas en pequeños oligopéptidos, posee la capacidad de procesar precursores generando proteínas activas. Así, el proteasoma degrada el extremo carboxi-terminal del precursor NF- κ B1 dejando el extremo amino-terminal que constituye la proteína NF- κ B (Palombella et al. 1994). Nuestros resultados y esta actividad menos estudiada del proteasoma, nos permiten hipotetizar la existencia de un procesamiento parcial de DRO1 en el núcleo por el proteasoma, bloqueando de esta forma su supuesta función como corepresor transcripcional.

Ensayos de PCR en tiempo real revelaron un fuerte descenso en los niveles de expresión de los genes ciclina A2 y c-myc, en cultivos que sobre-expresaban DRO1. Acompañando a la represión de dichos genes, los análisis de citometría de flujo reflejaron un pequeño descenso, aunque estadísticamente significativo, del porcentaje de células en la fase G2-M del ciclo celular. Este descenso podría ser consecuencia de la represión transcripcional de ciclina A2 y c-myc por PLZF favorecida por la sobre-expresión de DRO1. Ciclina A2 se transcribe durante la fase G1/S del ciclo celular y modula la transición de G2 a M con Cdk2 (Blanchard 2000). Igualmente, c-myc es reprimido por p53 en la fase S del ciclo celular (Ho et al. 2005). Notablemente, es en la fase S donde DRO1 es procesado y probablemente desactivado. Nuestra actual hipótesis de trabajo consiste en una translocación nuclear mediada por fosforilación, probablemente por la vía MEK/Erk, que induce el procesamiento de DRO1 por el sistema ubiquitina-proteasoma desactivándolo. Las moléculas de DRO1 nucleares no fosforiladas formarían complejos con represores transcripcionales como PLZF. Conjuntamente, las observaciones anteriores añaden a la función de efector proapoptótico anteriormente descrita, una nueva actividad de DRO1 como represor proliferativo.

No podemos afirmar que los efectos antiproliferativos inducidos por DRO1 se deban únicamente a la represión transcripcional de c-myc y ciclina A2. Uno de los genes supresores

de tumores mejor estudiado, p53, reprime la proliferación a varios niveles (Dutta et al. 1993; Di Leonardo et al. 1994). Es más, el efecto inhibidor proliferativo podría ser específico de las señales de muerte y estrés que reciba la célula (Ashcroft et al. 2000). Así, DRO1 podría estar inhibiendo la proliferación a distintos niveles que aún desconocemos. La activación de la expresión de genes antiproliferativos o la posibilidad de interacciones inactivantes que secuestren a intermediarios proliferativos podrían ser algunas de estas actividades paralelas de DRO1.

La represión transcripcional de ciclina A2 por DRO1 está mediada por PLZF.

En nuestro estudio aportamos evidencias por las que DRO1 interacciona físicamente con la proteína supresora de tumores PLZF. Esta interacción fue caracterizada inicialmente mediante el sistema de doble híbrido en levaduras, que al contrario de lo esperado no reflejó otras interacciones consistentes. Muchas de las proteínas potenciales de interacción con DRO1 se localizan en la mitocondria, como el citocromo Bc1 (implicado en procesos de despolarización de la membrana interna mitocondrial y apoptosis; Armstrong et al. 2004), y la sintetasa ATP (sobre-expresada en procesos apoptóticos; Singh et al. 2005). Desgraciadamente, el análisis de la secuencia de estos clones que mostraban interacción en el sistema del doble híbrido reveló cambios en la pauta correcta de lectura, resultando ser falsos positivos.

Por el contrario, la autenticidad de la interacción con PLZF fue confirmada por experimentos de “pull down” de lisados de la línea celular U-2 OS con la proteína de fusión GST-PLZF. Además, la generación de deleciones en PLZF nos permitió identificar el dominio responsable de la interacción en el extremo carboxi-terminal de PLZF. Mediante coimmunoprecipitaciones de fraccionamientos subcelulares, identificamos el núcleo como el compartimento celular en el que se producía la interacción. El resultado es coherente con lo esperado ya que PLZF es un factor de transcripción y su localización subcelular es nuclear (Hummel et al. 1999).

La actividad más estudiada de PLZF está estrechamente ligada a la leucemia promielocítica aguda en la que la translocación cromosómica t(11;17)(q23;21) genera dos oncogenes quiméricos resultado de la fusión de PLZF con el RAR α (Chen et al. 1993). Sin embargo, la existencia de un dominio amino-terminal conservado en represores transcripcionales relacionan estrechamente su actividad con el control de la proliferación, el crecimiento y la apoptosis celular (Shaknovich et al. 1998). Nuestros resultados relativos a la interacción entre DRO1 y PLZF podría explicar algunas de las observaciones anteriores ya que PLZF ha sido recientemente identificado como efector pro-apoptótico (Bernardo et al. 2007) y como factor represor proliferativo (Rho et al. 2007). PLZF aparece asociado al promotor de ciclina A2 y algunos trabajos demuestran que la expresión de PLZF reprime la

expresión de ciclina A2 (Yeyati et al. 1999; Rho et al. 2006). Igualmente, PLZF es un represor transcripcional de c-myc, previniendo la progresión celular mediante la represión de c-myc (McConnell et al. 2003). Sin embargo, en nuestro modelo experimental no hemos observado una conexión entre la represión de c-myc mediada por DRO1 y el silenciamiento de PLZF. Probablemente sea necesario un silenciamiento más efectivo de PLZF ya que una pequeña cantidad de PLZF no silenciada podría ser suficiente para reprimir transcripcionalmente c-myc. Una represión transcripcional de c-myc por DRO1 mediada por otros corepresores, explicaría igualmente nuestros resultados.

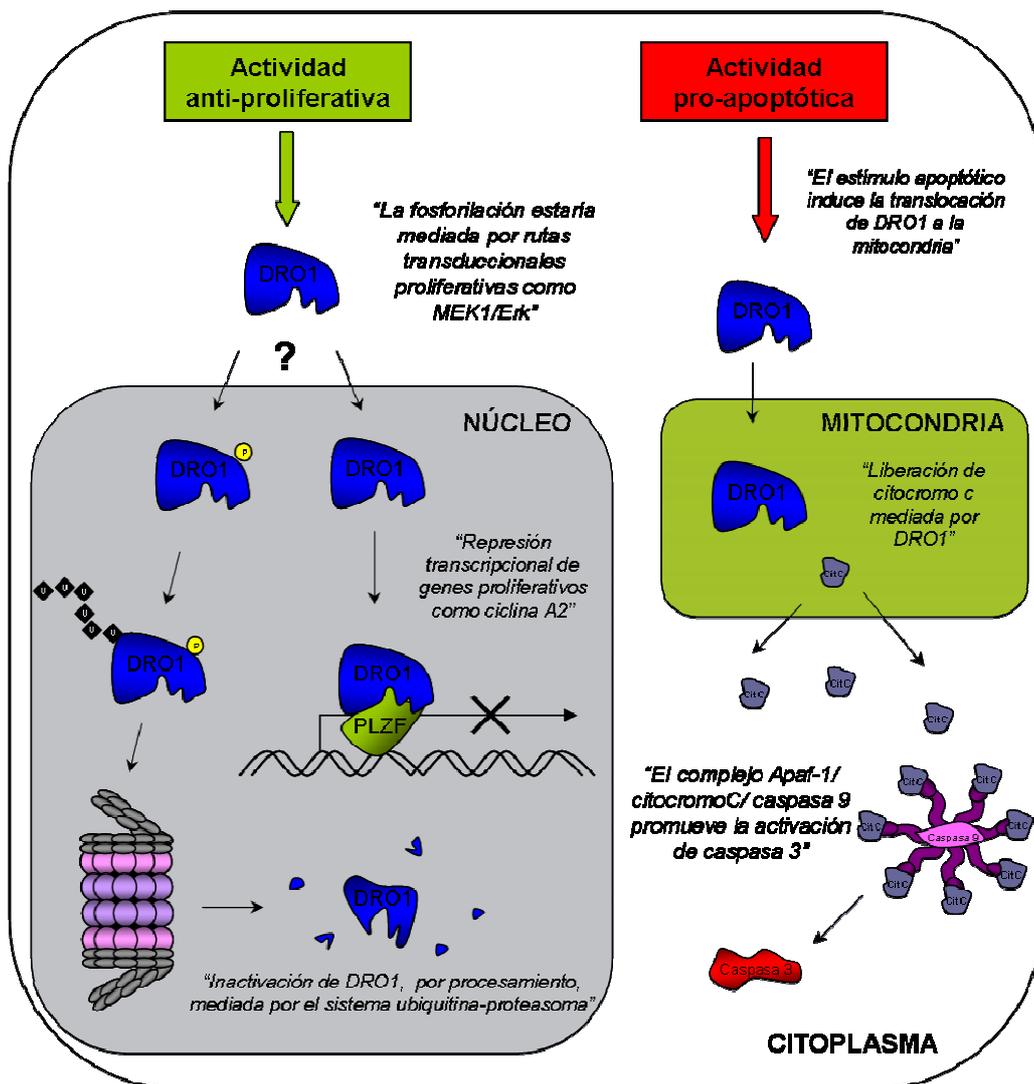


Figura 42. Modelo de la actividad bifuncional de DRO1. Mecanismos que aún desconocemos translocan a DRO1 al núcleo donde coreprime la expresión de genes proliferativos. Paralelamente, DRO1 puede ser translocado a la mitocondria mediante estímulos apoptóticos donde favorece la liberación del citocromo c y la activación de caspasa 3.

CONCLUSIONES

- Animales AIB1-tg presentan hiperplasia ductal en el tejido epitelial mamario como consecuencia de la actividad proliferativa de AIB1.
- AIB1 contrarresta la deficiencia de p27^{Kip1} rescatando la morfología anormal de las mamas en animales p27^{Kip1}^{-/-}.
- Animales dobles transgénicos AIB1-tg/MMTV/*neu* presentan un incremento en la hiperplasia ductal *versus* animales AIB1-tg, sin embargo y en contra de lo previsto, no desarrollan tumores como consecuencia de la mezcla de distintos fondos genéticos entre ambos modelos.
- AIB1 presenta diferencias en la distribución subcelular y en la estabilidad en varias líneas celulares de cáncer.
- Dos regiones en el dominio carboxi-terminal de AIB1 son necesarias para una eficiente activación transcripcional de AIB1 mediada por proteasoma.
- AIB1 se ubiquitina y degrada por el proteasoma en el núcleo durante la entrada de la fase M del ciclo celular.
- AIB1 puede insensibilizar a la apoptosis mediante la represión transcripcional de la proteína pro-apoptótica DRO1.
- La señalización apoptótica de TNF α /CHX transloca DRO1 a la mitocondria coincidiendo con un aumento en la apoptosis mediante liberación del citocromo c al citosol.
- DRO1 interacciona físicamente con el factor represor de la transcripción PLZF. Dicha interacción se produce por a través del dominio de dedos de zinc de PLZF.
- DRO1 funciona como represor proliferativo a través de la represión transcripcional de c-myc y ciclina A2.
- La represión transcripcional de ciclina A2 por DRO1 está mediada por PLZF.

REFERENCIAS

- Adams, J.M. and Cory, S. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* **26**(1): 61-66.
- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. 1985. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* **318**(6046): 533-538.
- Adler, V., Polotskaya, A., Wagner, F., and Kraft, A.S. 1992. Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem* **267**(24): 17001-17005.
- Alberts, B. 2002. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York.
- Alkarain, A., Jordan, R., and Slingerland, J. 2004. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**(1): 67-80.
- Altomare, D.A. and Testa, J.R. 2005. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* **24**(50): 7455-7464.
- Alle, K.M., Henshall, S.M., Field, A.S., and Sutherland, R.L. 1998. Cyclin D1 protein is overexpressed in hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* **4**(4): 847-854.
- Amazit, L., Pasini, L., Szafran, A.T., Berno, V., Wu, R.C., Mielke, M., Jones, E.D., Mancini, M.G., Hinojos, C.A., O'Malley, B.W., and Mancini, M.A. 2007. Regulation of SRC-3 intercompartmental dynamics by estrogen receptor and phosphorylation. *Mol Cell Biol* **27**(19): 6913-6932.
- Angel, P. and Karin, M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**(2-3): 129-157.
- Antonyak, M.A., Kenyon, L.C., Godwin, A.K., James, D.C., Emlet, D.R., Okamoto, I., Tnani, M., Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., and Wong, A.J. 2002. Elevated JNK activation contributes to the pathogenesis of human brain tumors. *Oncogene* **21**(33): 5038-5046.
- Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. 1997. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **277**(5328): 965-968.
- Aoki, K., Sun, Y.J., Aoki, S., Wada, K., and Wada, E. 2002. Cloning, expression, and mapping of a gene that is upregulated in adipose tissue of mice deficient in bombesin receptor subtype-3. *Biochem Biophys Res Commun* **290**(4): 1282-1288.
- Armstrong, J.S., Yang, H., Duan, W., and Whiteman, M. 2004. Cytochrome bc(1) regulates the mitochondrial permeability transition by two distinct pathways. *J Biol Chem* **279**(48): 50420-50428.
- Ashcroft, M., Taya, Y., and Vousden, K.H. 2000. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* **20**(9): 3224-3233.
- Atanaskova, N., Keshamouni, V.G., Krueger, J.S., Schwartz, J.A., Miller, F., and Reddy, K.B. 2002. MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance. *Oncogene* **21**(25): 4000-4008.
- Auricchio, F., Migliaccio, A., and Castoria, G. 2008. Sex-steroid hormones and EGF signalling in breast and prostate cancer cells: Targeting the association of Src with steroid receptors. *Steroids*.
- Avivar, A., Garcia-Macias, M.C., Ascaso, E., Herrera, G., O'Connor, J.E., and de Mora, J.F. 2006. Moderate overexpression of AIB1 triggers pre-neoplastic changes in mammary epithelium. *FEBS Lett* **580**(22): 5222-5226.
- Bai, J., Uehara, Y., and Montell, D.J. 2000. Regulation of invasive cell behavior by taiman, a Drosophila protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. *Cell* **103**(7): 1047-1058.
- Balkwill, F. 2006. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* **25**(3): 409-416.
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2**(2): 84-89.
- Bautista, S., Valles, H., Walker, R.L., Anzick, S., Zeillinger, R., Meltzer, P., and Theillet, C. 1998. In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clin Cancer Res* **4**(12): 2925-2929.

- Belandia, B. and Parker, M.G. 2000. Functional interaction between the p160 coactivator proteins and the transcriptional enhancer factor family of transcription factors. *J Biol Chem* **275**(40): 30801-30805.
- Bell, H.S. and Ryan, K.M. 2005. Intracellular signalling and cancer: complex pathways lead to multiple targets. *Eur J Cancer* **41**(2): 206-215.
- Bernardo, M.V., Yelo, E., Gimeno, L., Campillo, J.A., and Parrado, A. 2007. Identification of apoptosis-related PLZF target genes. *Biochem Biophys Res Commun* **359**(2): 317-322.
- Bianchi-Frias, D., Pritchard, C., Mecham, B.H., Coleman, I.M., and Nelson, P.S. 2007. Genetic background influences murine prostate gene expression: implications for cancer phenotypes. *Genome Biol* **8**(6): R117.
- Blanchard, J.M. 2000. Cyclin A2 transcriptional regulation: modulation of cell cycle control at the G1/S transition by peripheral cues. *Biochem Pharmacol* **60**(8): 1179-1184.
- Bloom, J. and Pagano, M. 2003. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol* **13**(1): 41-47.
- Blume-Jensen, P. and Hunter, T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**(6835): 355-365.
- Bommer, G.T., Jager, C., Durr, E.M., Baehs, S., Eichhorst, S.T., Brabletz, T., Hu, G., Frohlich, T., Arnold, G., Kress, D.C., Goke, B., Fearon, E.R., and Kolligs, F.T. 2005. DRO1, a gene down-regulated by oncogenes, mediates growth inhibition in colon and pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* **280**(9): 7962-7975.
- Bornstein, G., Bloom, J., Sitry-Shevah, D., Nakayama, K., Pagano, M., and Hershko, A. 2003. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem* **278**(28): 25752-25757.
- Bortner, D.M. and Rosenberg, M.P. 1997. Induction of mammary gland hyperplasia and carcinomas in transgenic mice expressing human cyclin E. *Mol Cell Biol* **17**(1): 453-459.
- Bouras, T., Southey, M.C., and Venter, D.J. 2001. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res* **61**(3): 903-907.
- Brooks, C.L., Li, M., and Gu, W. 2007. Mechanistic studies of MDM2-mediated ubiquitination in p53 regulation. *J Biol Chem* **282**(31): 22804-22815.
- Buckley, M.F., Sweeney, K.J., Hamilton, J.A., Sini, R.L., Manning, D.L., Nicholson, R.I., deFazio, A., Watts, C.K., Musgrove, E.A., and Sutherland, R.L. 1993. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* **8**(8): 2127-2133.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**(5392): 1318-1321.
- Clarke, M.F. 2006. Oncogenes, self-renewal and cancer. *Pathol Biol (Paris)* **54**(2): 109-111.
- Colo, G.P., Rosato, R.R., Grant, S., and Costas, M.A. 2007. RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* **581**(26): 5075-5081.
- Coqueret, O. 2002. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* **299**(1-2): 35-55.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., and Evans, R.M. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* **90**(3): 569-580.
- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D., and Evans, R.M. 1999. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**(5): 675-686.
- Chen, H.T. and Hahn, S. 2004. Mapping the location of TFIIIB within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex: a model for the structure of the PIC. *Cell* **119**(2): 169-180.
- Chen, J.D. and Evans, R.M. 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**(6548): 454-457.
- Chen, S.J., Zelent, A., Tong, J.H., Yu, H.Q., Wang, Z.Y., Derre, J., Berger, R., Waxman, S., and Chen, Z. 1993a. Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* **91**(5): 2260-2267.
- Chen, Z., Brand, N.J., Chen, A., Chen, S.J., Tong, J.H., Wang, Z.Y., Waxman, S., and Zelent, A. 1993b. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *Embo J* **12**(3): 1161-1167.
- Cheng, H.L. and Feldman, E.L. 1998. Bidirectional regulation of p38 kinase and c-Jun N-terminal protein kinase by insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem* **273**(23): 14560-14565.

- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M., and Sherr, C.J. 1999. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J* **18**(6): 1571-1583.
- Danial, N.N. and Rothman, P. 2000. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* **19**(21): 2523-2531.
- Das, M., Jiang, F., Sluss, H.K., Zhang, C., Shokat, K.M., Flavell, R.A., and Davis, R.J. 2007. Suppression of p53-dependent senescence by the JNK signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(40): 15759-15764.
- Davie, S.A., Maglione, J.E., Manner, C.K., Young, D., Cardiff, R.D., MacLeod, C.L., and Ellies, L.G. 2007. Effects of FVB/NJ and C57Bl/6J strain backgrounds on mammary tumor phenotype in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Transgenic Res* **16**(2): 193-201.
- Deane, N.G., Parker, M.A., Aramandla, R., Diehl, L., Lee, W.J., Washington, M.K., Nanney, L.B., Shyr, Y., and Beauchamp, R.D. 2001. Hepatocellular carcinoma results from chronic cyclin D1 overexpression in transgenic mice. *Cancer Res* **61**(14): 5389-5395.
- Della Fazia, M.A., Servillo, G., and Sassone-Corsi, P. 1997. Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. *FEBS Lett* **410**(1): 22-24.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z.J. 2000. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**(2): 351-361.
- Derynck, R. and Zhang, Y.E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**(6958): 577-584.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**(21): 2540-2551.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**(6366): 215-221.
- Dutta, A., Ruppert, J.M., Aster, J.C., and Winchester, E. 1993. Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* **365**(6441): 79-82.
- Duyao, M.P., Buckler, A.J., and Sonenshein, G.E. 1990. Interaction of an NF-kappa B-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12): 4727-4731.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.
- Ebina, Y., Takahara, Y., Kishi, F., Nakazawa, A., and Brent, R. 1983. LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene. *J Biol Chem* **258**(21): 13258-13261.
- Edwards, D.P. 2005. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* **67**: 335-376.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**(4): 953-971.
- Espana, L., Fernandez, Y., Rubio, N., Torregrosa, A., Blanco, J., and Sierra, A. 2004. Overexpression of Bcl-xL in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis. *Breast Cancer Res Treat* **87**(1): 33-44.
- Faraglia, B., Bonsignore, A., Scaldaferri, F., Boninsegna, A., Cittadini, A., Mancuso, C., and Sgambato, A. 2005. Caspase-3 inhibits the growth of breast cancer cells independent of protease activity. *J Cell Physiol* **202**(2): 478-482.
- Featherstone, M. 2002. Coactivators in transcription initiation: here are your orders. *Current opinion in genetics & development* **12**(2): 149-155.
- Fendly, B.M., Winget, M., Hudziak, R.M., Lipari, M.T., Napier, M.A., and Ullrich, A. 1990. Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product. *Cancer Res* **50**(5): 1550-1558.
- Feng, Q., Yi, P., Wong, J., and O'Malley, B.W. 2006. Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol Cell Biol* **26**(21): 7846-7857.
- Fernandez, Y., Espana, L., Manas, S., Fabra, A., and Sierra, A. 2000. Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer cells by induction of cytokines resistance. *Cell Death Differ* **7**(4): 350-359.
- Fernandez, Y., Gu, B., Martinez, A., Torregrosa, A., and Sierra, A. 2002. Inhibition of apoptosis in human breast cancer cells: role in tumor progression to the metastatic state. *Int J Cancer* **101**(4): 317-326.
- Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Broudy, V., Perlmutter, R.M., Kaushansky, K., and Roberts, J.M. 1996. A syndrome of multiorgan

- hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* **85**(5): 733-744.
- Ferrero, M., Avivar, Á., García-Macías, MC., Font de Mora, J. PI3K/AKT signaling can promote AIB1 stability independently of GSK3 phosphorylation. 2008. *Cancer Research*. (in press).
- Fiscella, M., Ullrich, S.J., Zambrano, N., Shields, M.T., Lin, D., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W., Mercer, W.E., and Appella, E. 1993. Mutation of the serine 15 phosphorylation site of human p53 reduces the ability of p53 to inhibit cell cycle progression. *Oncogene* **8**(6): 1519-1528.
- Font de Mora, J. and Brown, M. 2000. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* **20**(14): 5041-5047.
- Fontana, J.A., Sun, R.J., Rishi, A.K., Dawson, M.I., Ordonez, J.V., Zhang, Y., Tschang, S.H., Bhalla, K., Han, Z., Wyche, J., Poirer, G., Sheikh, M.S., Shroot, B., and Reichert, U. 1998. Overexpression of bcl-2 or bcl-XL fails to inhibit apoptosis mediated by a novel retinoid. *Oncology research* **10**(6): 313-324.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* **30**(2): 193-204.
- Friedrich, K., Wieder, T., Von Haefen, C., Radetzki, S., Janicke, R., Schulze-Osthoff, K., Dorken, B., and Daniel, P.T. 2001. Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. *Oncogene* **20**(22): 2749-2760.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E., and Cantley, L.C. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: 481-507.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Pincus, M.R., and Ronai, Z. 1998. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10541-10546.
- Fujita, N., Jaye, D.L., Kajita, M., Geigerman, C., Moreno, C.S., and Wade, P.A. 2003. MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell* **113**(2): 207-219.
- Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. 2001. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* **7**(2): 249-262.
- Gee, J.M., Robertson, J.F., Ellis, I.O., Willsher, P., McClelland, R.A., Hoyle, H.B., Kyme, S.R., Finlay, P., Blamey, R.W., and Nicholson, R.I. 1994. Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* **59**(5): 619-628.
- Ghadimi, B.M., Schrock, E., Walker, R.L., Wangsa, D., Jauho, A., Meltzer, P.S., and Ried, T. 1999. Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol* **154**(2): 525-536.
- Gianni, M., Parrella, E., Raska, I., Jr., Gaillard, E., Nigro, E.A., Gaudon, C., Garattini, E., and Rochette-Egly, C. 2006. P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RARalpha-mediated transcription. *Embo J* **25**(4): 739-751.
- Giguere, V. 1999. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocrine reviews* **20**(5): 689-725.
- Gillett, C., Fantl, V., Smith, R., Fisher, C., Bartek, J., Dickson, C., Barnes, D., and Peters, G. 1994. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* **54**(7): 1812-1817.
- Gingrich, J.R. and Greenberg, N.M. 1996. A transgenic mouse prostate cancer model. *Toxicol Pathol* **24**(4): 502-504.
- Glaros, S., Atanaskova, N., Zhao, C., Skafar, D.F., and Reddy, K.B. 2006. Activation function-1 domain of estrogen receptor regulates the agonistic and antagonistic actions of tamoxifen. *Mol Endocrinol* **20**(5): 996-1008.
- Greenberg, N.M., DeMayo, F., Finegold, M.J., Medina, D., Tilley, W.D., Aspinall, J.O., Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Matusik, R.J., and Rosen, J.M. 1995. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3439-3443.
- Grethe, S. and Porn-Ares, M.I. 2006. p38 MAPK regulates phosphorylation of Bad via PP2A-dependent suppression of the MEK1/2-ERK1/2 survival pathway in TNF-alpha induced endothelial apoptosis. *Cell Signal* **18**(4): 531-540.
- Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F.F., Zamir, I., Seiser, C., Grignani, F., Lazar, M.A., Minucci, S., and Pelicci, P.G. 1998. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* **391**(6669): 815-818.

- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B., and Davis, R.J. 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* **15**(11): 2760-2770.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., and Baldwin, A.S., Jr. 1999. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* **19**(8): 5785-5799.
- Guy, C.T., Webster, M.A., Schaller, M., Parsons, T.J., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. 1992. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22): 10578-10582.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**(4): 791-803.
- Hail, N., Jr., Carter, B.Z., Konopleva, M., and Andreeff, M. 2006. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis* **11**(6): 889-904.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**(5173): 808-811.
- Han, S.J., DeMayo, F.J., Xu, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. 2006. Steroid receptor coactivator (SRC)-1 and SRC-3 differentially modulate tissue-specific activation functions of the progesterone receptor. *Mol Endocrinol* **20**(1): 45-55.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hankinson, S.E., Willett, W.C., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Michaud, D.S., Deroo, B., Rosner, B., Speizer, F.E., and Pollak, M. 1998. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* **351**(9113): 1393-1396.
- Hayden, M.S. and Ghosh, S. 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**(3): 344-362.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**(6634): 733-736.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**(6805): 770-776.
- Hennighausen, L. and Robinson, G.W. 1998. Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes Dev* **12**(4): 449-455.
- Ho, J.S., Ma, W., Mao, D.Y., and Benchimol, S. 2005. p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* **25**(17): 7423-7431.
- Hong, S.H., David, G., Wong, C.W., Dejean, A., and Privalsky, M.L. 1997. SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and PLZF-RARalpha oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(17): 9028-9033.
- Horiguchi, K., Arai, S., Nishihara, T., and Nishikawa, J. 2006. AIB1 promotes DNA replication by JNK repression and AKT activation during cellular stress. *J Biochem* **140**(3): 409-419.
- Horikawa, T., Yang, J., Kondo, S., Yoshizaki, T., Joab, I., Furukawa, M., and Pagano, J.S. 2007. Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* **67**(5): 1970-1978.
- Howell, A., Dodwell, D.J., Anderson, H., and Redford, J. 1992. Response after withdrawal of tamoxifen and progestogens in advanced breast cancer. *Ann Oncol* **3**(8): 611-617.
- Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N., and Nunez, G. 1998. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(8): 4386-4391.
- Huang, Y., Fernandez, S.V., Goodwin, S., Russo, P.A., Russo, I.H., Sutter, T.R., and Russo, J. 2007. Epithelial to mesenchymal transition in human breast epithelial cells transformed by 17beta-estradiol. *Cancer Res* **67**(23): 11147-11157.
- Huang, Y., Ray, S., Reed, J.C., Ibrado, A.M., Tang, C., Nawabi, A., and Bhalla, K. 1997. Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* **42**(1): 73-81.
- Huang, Z.J., Edey, I., and Rosbash, M. 1993. PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. *Nature* **364**(6434): 259-262.
- Huang, Z.Q., Li, J., Sachs, L.M., Cole, P.A., and Wong, J. 2003. A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription. *Embo J* **22**(9): 2146-2155.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., and Howley, P.M. 1993. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol* **13**(8): 4918-4927.

- Hummel, J.L., Wells, R.A., Dube, I.D., Licht, J.D., and Kamel-Reid, S. 1999. Deregulation of NPM and PLZF in a variant t(5;17) case of acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* **18**(3): 633-641.
- Iannacone, E.A., Yan, A.W., Gauger, K.J., Dowling, A.L., and Zoeller, R.T. 2002. Thyroid hormone exerts site-specific effects on SRC-1 and NCoR expression selectively in the neonatal rat brain. *Mol Cell Endocrinol* **186**(1): 49-59.
- Igney, F.H. and Krammer, P.H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**(4): 277-288.
- Ihnatko, R. and Kubas, M. 2007. TNF signaling: early events and phosphorylation. *Gen Physiol Biophys* **26**(3): 159-167.
- Ince, B.A., Montano, M.M., and Katzenellenbogen, B.S. 1994. Activation of transcriptionally inactive human estrogen receptors by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and ligands including antiestrogens. *Mol Endocrinol* **8**(10): 1397-1406.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* **4**(9): 648-657.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., and Weinberg, R.A. 1992. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* **359**(6393): 295-300.
- Jackson, R.J., Adnane, J., Coppola, D., Cantor, A., Sebt, S.M., and Pledger, W.J. 2002. Loss of the cell cycle inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1) enhances tumorigenesis in knockout mouse models. *Oncogene* **21**(55): 8486-8497.
- Janicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., and Porter, A.G. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* **273**(16): 9357-9360.
- Joensuu, H., Pylkkanen, L., and Toikkanen, S. 1994. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol* **145**(5): 1191-1198.
- Jordan, V.C. 2003. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov* **2**(3): 205-213.
- . 2004. Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* **5**(3): 207-213.
- Joza, N., Susin, S.A., Dugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G., and Penninger, J.M. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**(6828): 549-554.
- Jung, Y.S., Kim, H.Y., Lee, Y.J., and Kim, E. 2007. Subcellular localization of Daxx determines its opposing functions in ischemic cell death. *FEBS Lett* **581**(5): 843-852.
- Kadouri, L., Kote-Jarai, Z., Easton, D.F., Hubert, A., Hamoudi, R., Glaser, B., Abeliovich, D., Peretz, T., and Eeles, R.A. 2004. Polyglutamine repeat length in the AIB1 gene modifies breast cancer susceptibility in BRCA1 carriers. *Int J Cancer* **108**(3): 399-403.
- Kallunki, T., Deng, T., Hibi, M., and Karin, M. 1996. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* **87**(5): 929-939.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. 1996. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**(3): 403-414.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J. 1997. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**(5): 649-659.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D., and Chambon, P. 1995. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* **270**(5241): 1491-1494.
- Kim, B.J., Ryu, S.W., and Song, B.J. 2006. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* **281**(30): 21256-21265.
- Kim, C.N., Wang, X., Huang, Y., Ibrado, A.M., Liu, L., Fang, G., and Bhalla, K. 1997. Overexpression of Bcl-X(L) inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* **57**(15): 3115-3120.
- Kim, H.E., Du, F., Fang, M., and Wang, X. 2005. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(49): 17545-17550.

- Klein-Hitpass, L., Ryffel, G.U., Heitlinger, E., and Cato, A.C. 1988. A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res* **16**(2): 647-663.
- Koh, S.S., Chen, D., Lee, Y.H., and Stallcup, M.R. 2001. Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem* **276**(2): 1089-1098.
- Kolch, W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **351 Pt 2**: 289-305.
- Korach, K.S., Couse, J.F., Curtis, S.W., Washburn, T.F., Lindzey, J., Kimbro, K.S., Eddy, E.M., Migliaccio, S., Snedeker, S.M., Lubahn, D.B., Schomberg, D.W., and Smith, E.P. 1996. Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent progress in hormone research* **51**: 159-186; discussion 186-158.
- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. 1993. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* **74**(4): 679-691.
- Kuang, S.Q., Liao, L., Zhang, H., Lee, A.V., O'Malley, B.W., and Xu, J. 2004. AIB1/SRC-3 deficiency affects insulin-like growth factor I signaling pathway and suppresses v-Ha-ras-induced breast cancer initiation and progression in mice. *Cancer Res* **64**(5): 1875-1885.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**(6630): 299-303.
- Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. 1995. Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* **377**(6548): 451-454.
- Lahusen, T., Fereshteh, M., Oh, A., Wellstein, A., and Riegel, A.T. 2007. Epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation and signaling controlled by a nuclear receptor coactivator, amplified in breast cancer 1. *Cancer Res* **67**(15): 7256-7265.
- Landis, M.D., Seachrist, D.D., Abdul-Karim, F.W., and Keri, R.A. 2006. Sustained trophism of the mammary gland is sufficient to accelerate and synchronize development of ErbB2/Neu-induced tumors. *Oncogene* **25**(23): 3325-3334.
- Lauritsen, K.J., List, H.J., Reiter, R., Wellstein, A., and Riegel, A.T. 2002. A role for TGF-beta in estrogen and retinoid mediated regulation of the nuclear receptor coactivator AIB1 in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* **21**(47): 7147-7155.
- Lee, B.H., Park, S.Y., Kang, K.B., Park, R.W., and Kim, I.S. 2002. NF-kappaB activates fibronectin gene expression in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **297**(5): 1218-1224.
- Li, A.J., Lerner, D.L., Gapuzan, M.E., and Karlan, B.Y. 2005. AIB1 polymorphisms predict aggressive ovarian cancer phenotype. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**(12): 2919-2922.
- Li, C., Wu, R.C., Amazit, L., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. 2007a. Specific amino acid residues in the basic helix-loop-helix domain of SRC-3 are essential for its nuclear localization and proteasome-dependent turnover. *Mol Cell Biol* **27**(4): 1296-1308.
- Li, J., O'Malley, B.W., and Wong, J. 2000. p300 requires its histone acetyltransferase activity and SRC-1 interaction domain to facilitate thyroid hormone receptor activation in chromatin. *Mol Cell Biol* **20**(6): 2031-2042.
- Li, L.B., Louie, M.C., Chen, H.W., and Zou, J.X. 2007b. Proto-oncogene ACTR/AIB1 promotes cancer cell invasion by up-regulating specific matrix metalloproteinase expression. *Cancer Lett*.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., Franssen, E., and Slingerland, J.M. 2002. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* **8**(10): 1153-1160.
- Liao, L., Kuang, S.Q., Yuan, Y., Gonzalez, S.M., O'Malley, B.W., and Xu, J. 2002. Molecular structure and biological function of the cancer-amplified nuclear receptor coactivator SRC-3/AIB1. *J Steroid Biochem Mol Biol* **83**(1-5): 3-14.
- Lifsted, T., Le Voyer, T., Williams, M., Muller, W., Klein-Szanto, A., Buetow, K.H., and Hunter, K.W. 1998. Identification of inbred mouse strains harboring genetic modifiers of mammary tumor age of onset and metastatic progression. *Int J Cancer* **77**(4): 640-644.
- Lilischkis, R., Sarcevic, B., Kennedy, C., Warlters, A., and Sutherland, R.L. 1996. Cancer-associated mis-sense and deletion mutations impair p16INK4 CDK inhibitory activity. *Int J Cancer* **66**(2): 249-254.
- Lin, J., Zhang, Z., Zeng, S., Zhou, S., Liu, B.F., Liu, Q., Yang, J., and Luo, Q. 2006. TRAIL-induced apoptosis proceeding from caspase-3-dependent and -independent pathways in distinct HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **346**(4): 1136-1141.

- Liu, Y., Monticone, M., Tonachini, L., Mastrogiacomo, M., Marigo, V., Cancedda, R., and Castagnola, P. 2004. URB expression in human bone marrow stromal cells and during mouse development. *Biochem Biophys Res Commun* **322**(2): 497-507.
- Lonard, D.M., Tsai, S.Y., and O'Malley, B.W. 2004. Selective estrogen receptor modulators 4-hydroxytamoxifen and raloxifene impact the stability and function of SRC-1 and SRC-3 coactivator proteins. *Mol Cell Biol* **24**(1): 14-24.
- Louet, J.F., Coste, A., Amazit, L., Tannour-Louet, M., Wu, R.C., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Auwerx, J., and O'Malley, B.W. 2006. Oncogenic steroid receptor coactivator-3 is a key regulator of the white adipogenic program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(47): 17868-17873.
- Louie, M.C., Revenko, A.S., Zou, J.X., Yao, J., and Chen, H.W. 2006. Direct control of cell cycle gene expression by proto-oncogene product ACTR, and its autoregulation underlies its transforming activity. *Mol Cell Biol* **26**(10): 3810-3823.
- Louie, M.C., Zou, J.X., Rabinovich, A., and Chen, H.W. 2004. ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol* **24**(12): 5157-5171.
- Ludwig, T., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., and Efstratiadis, A. 1997. Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of Brca1, Brca2, Brca1/Brca2, Brca1/p53, and Brca2/p53 nullizygous embryos. *Genes Dev* **11**(10): 1226-1241.
- Lundberg, A.S. and Weinberg, R.A. 1999. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* **35**(14): 1886-1894.
- Macleod, K.F. and Jacks, T. 1999. Insights into cancer from transgenic mouse models. *J Pathol* **187**(1): 43-60.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**(11): 630-641.
- Mani, A., Oh, A.S., Bowden, E.T., Lahusen, T., Lorick, K.L., Weissman, A.M., Schlegel, R., Wellstein, A., and Riegel, A.T. 2006. E6AP mediates regulated proteasomal degradation of the nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer 1 in immortalized cells. *Cancer Res* **66**(17): 8680-8686.
- Marcantonio, D., Chalifour, L.E., Alaoui-Jamali And, H.T.H.M.A., Alaoui-Jamali, M.A., Alaoui-Jamali, M.A., Huynh, H.T., and Huynh, H.T. 2001a. Steroid-sensitive gene-1 is an androgen-regulated gene expressed in prostatic smooth muscle cells in vivo. *J Mol Endocrinol* **26**(3): 175-184.
- Marcantonio, D., Chalifour, L.E., Alaoui-Jamali, M.A., Alpert, L., and Huynh, H.T. 2001b. Cloning and characterization of a novel gene that is regulated by estrogen and is associated with mammary gland carcinogenesis. *Endocrinology* **142**(6): 2409-2418.
- McConnell, M.J., Chevallier, N., Berkofsky-Fessler, W., Giltneane, J.M., Malani, R.B., Staudt, L.M., and Licht, J.D. 2003. Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol Cell Biol* **23**(24): 9375-9388.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M., and Franklin, R.A. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1263-1284.
- McGuire, K.L. and Iacobelli, M. 1997. Involvement of Rel, Fos, and Jun proteins in binding activity to the IL-2 promoter CD28 response element/AP-1 sequence in human T cells. *J Immunol* **159**(3): 1319-1327.
- McInerney, E.M. and Katzenellenbogen, B.S. 1996. Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *J Biol Chem* **271**(39): 24172-24178.
- Melnick, A., Carlile, G., Ahmad, K.F., Kiang, C.L., Corcoran, C., Bardwell, V., Prive, G.G., and Licht, J.D. 2002. Critical residues within the BTB domain of PLZF and Bcl-6 modulate interaction with corepressors. *Mol Cell Biol* **22**(6): 1804-1818.
- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R.J., Johnson, G.L., and Karin, M. 1994. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* **266**(5191): 1719-1723.
- Mondragon, L., Orzaez, M., Sanclimens, G., Moure, A., Arminan, A., Sepulveda, P., Messeguer, A., Vicent, M.J., and Perez-Paya, E. 2008. Modulation of cellular apoptosis with apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) inhibitors. *J Med Chem* **51**(3): 521-529.
- Morgan, D.O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-291.

- Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. 1990. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**(4940): 322-324.
- Muller, W.J., Arteaga, C.L., Muthuswamy, S.K., Siegel, P.M., Webster, M.A., Cardiff, R.D., Meise, K.S., Li, F., Halter, S.A., and Coffey, R.J. 1996. Synergistic interaction of the Neu proto-oncogene product and transforming growth factor alpha in the mammary epithelium of transgenic mice. *Mol Cell Biol* **16**(10): 5726-5736.
- Muraoka, R.S., Koh, Y., Roebuck, L.R., Sanders, M.E., Brantley-Sieders, D., Gorska, A.E., Moses, H.L., and Arteaga, C.L. 2003. Increased malignancy of Neu-induced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta1. *Mol Cell Biol* **23**(23): 8691-8703.
- Muraoka, R.S., Lenferink, A.E., Law, B., Hamilton, E., Brantley, D.M., Roebuck, L.R., and Arteaga, C.L. 2002. ErbB2/Neu-induced, cyclin D1-dependent transformation is accelerated in p27-haploinsufficient mammary epithelial cells but impaired in p27-null cells. *Mol Cell Biol* **22**(7): 2204-2219.
- Muraoka, R.S., Lenferink, A.E., Simpson, J., Brantley, D.M., Roebuck, L.R., Yakes, F.M., and Arteaga, C.L. 2001. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is required for mouse mammary gland morphogenesis and function. *J Cell Biol* **153**(5): 917-932.
- Murphy, K.L., Kittrell, F.S., Gay, J.P., Jager, R., Medina, D., and Rosen, J.M. 1999. Bcl-2 expression delays mammary tumor development in dimethylbenz(a)anthracene-treated transgenic mice. *Oncogene* **18**(47): 6597-6604.
- Musgrove, E.A., Davison, E.A., and Ormandy, C.J. 2004. Role of the CDK inhibitor p27 (Kip1) in mammary development and carcinogenesis: insights from knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**(1): 55-66.
- Nachmias, B., Lazar, I., Elmalech, M., Abed-El-Rahaman, I., Asshab, Y., Mandelboim, O., Perlman, R., and Ben-Yehuda, D. 2007. Subcellular localization determines the delicate balance between the anti- and pro-apoptotic activity of Livin. *Apoptosis* **12**(7): 1129-1142.
- Nawaz, Z., Lonard, D.M., Smith, C.L., Lev-Lehman, E., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. 1999. The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* **19**(2): 1182-1189.
- Nojek, I.M., Werbajh, S.E., Colo, G.P., Rubio, F.M., Franco, L.D., Nahmod, V.E., and Costas, M.A. 2004. [Different enzymatic activities recruitment by specific domains of TIF2 are involved in NF-kappaB transactivation]. *Medicina* **64**(2): 135-138.
- Ogawa, S., Chan, J., Chester, A.E., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. 1999. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12887-12892.
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. 1998. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **243**(1): 122-126.
- Okada, T., Nishizawa, H., Kurata, A., Tamba, S., Sonoda, M., Yasui, A., Kuroda, Y., Hibuse, T., Maeda, N., Kihara, S., Hadama, T., Tobita, K., Akamatsu, S., Maeda, K., Shimomura, I., and Funahashi, T. 2008. URB is abundantly expressed in adipose tissue and dysregulated in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **367**(2): 370-376.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**(5240): 1354-1357.
- Osborne, C.K., Bardou, V., Hopp, T.A., Chamness, G.C., Hilsenbeck, S.G., Fuqua, S.A., Wong, J., Allred, D.C., Clark, G.M., and Schiff, R. 2003. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **95**(5): 353-361.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., and Maniatis, T. 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* **78**(5): 773-785.
- Pardee, A.B. 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(4): 1286-1290.
- Peter, M.E. and Krammer, P.H. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* **10**(1): 26-35.
- Picard, F., Gehin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M.F., O'Malley, B.W., Chambon, P., and Auwerx, J. 2002. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* **111**(7): 931-941.
- Piwnicka-Worms, H. 1996. Reversible phosphorylation and mitotic control. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **128**(4): 350-354.

- Planas-Silva, M.D., Shang, Y., Donaher, J.L., Brown, M., and Weinberg, R.A. 2001. AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Res* **61**(10): 3858-3862.
- Porter, W., Saville, B., Hovivik, D., and Safe, S. 1997. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* **11**(11): 1569-1580.
- Quignon, F., De Bels, F., Koken, M., Feunteun, J., Ameisen, J.C., and de The, H. 1998. PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat Genet* **20**(3): 259-265.
- Raj, D., Liu, T., Samadashwily, G., Li, F., and Grossman, D. 2008. Survivin repression by p53, Rb and E2F2 in normal human melanocytes. *Carcinogenesis* **29**(1): 194-201.
- Reid, G., Hubner, M.R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J., and Gannon, F. 2003. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* **11**(3): 695-707.
- Rho, S.B., Chung, B.M., and Lee, J.H. 2007. TIMP-1 regulates cell proliferation by interacting with the ninth zinc finger domain of PLZF. *J Cell Biochem* **101**(1): 57-67.
- Rho, S.B., Park, Y.G., Park, K., Lee, S.H., and Lee, J.H. 2006. A novel cervical cancer suppressor 3 (CCS-3) interacts with the BTB domain of PLZF and inhibits the cell growth by inducing apoptosis. *FEBS Lett* **580**(17): 4073-4080.
- Ross, J.S. and Fletcher, J.A. 1998. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* **3**(4): 237-252.
- . 1999. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* **112**(1 Suppl 1): S53-67.
- Ruiz-Ruiz, C. and Lopez-Rivas, A. 2002. Mitochondria-dependent and -independent mechanisms in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis are both regulated by interferon-gamma in human breast tumour cells. *Biochem J* **365**(Pt 3): 825-832.
- Russo, J. and Russo, I.H. 2006. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**(1-5): 89-96.
- Sahar, S., Reddy, M.A., Wong, C., Meng, L., Wang, M., and Natarajan, R. 2007. Cooperation of SRC-1 and p300 with NF-kappaB and CREB in angiotensin II-induced IL-6 expression in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**(7): 1528-1534.
- Sakakura, C., Hagiwara, A., Yasuoka, R., Fujita, Y., Nakanishi, M., Masuda, K., Kimura, A., Nakamura, Y., Inazawa, J., Abe, T., and Yamagishi, H. 2000. Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer* **89**(3): 217-223.
- Saltiel, A.R. and Kahn, C.R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**(6865): 799-806.
- Sarkar, F.H., Rahman, K.M., and Li, Y. 2003. Bax translocation to mitochondria is an important event in inducing apoptotic cell death by indole-3-carbinol (I3C) treatment of breast cancer cells. *J Nutr* **133**(7 Suppl): 2434S-2439S.
- Sauer, B. 1998. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* **14**(4): 381-392.
- Schott, A.F., Apel, I.J., Nunez, G., and Clarke, M.F. 1995. Bcl-XL protects cancer cells from p53-mediated apoptosis. *Oncogene* **11**(7): 1389-1394.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J.R. 2000. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* **14**(19): 2501-2514.
- Sentman, C.L., Shutter, J.R., Hockenbery, D., Kanagawa, O., and Korsmeyer, S.J. 1991. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* **67**(5): 879-888.
- Seol, D.W., Li, J., Seol, M.H., Park, S.Y., Talanian, R.V., and Billiar, T.R. 2001. Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res* **61**(3): 1138-1143.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and DePinho, R.A. 1996. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**(1): 27-37.
- Shaknovich, R., Yeyati, P.L., Ivins, S., Melnick, A., Lempert, C., Waxman, S., Zelent, A., and Licht, J.D. 1998. The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol Cell Biol* **18**(9): 5533-5545.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., and Brown, M. 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**(6): 843-852.
- Shao, W., Keeton, E.K., McDonnell, D.P., and Brown, M. 2004. Coactivator AIB1 links estrogen receptor transcriptional activity and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(32): 11599-11604.

- Shapiro, L., Heidenreich, K.A., Meintzer, M.K., and Dinarello, C.A. 1998. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in HIV type 1 production in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7422-7426.
- Shaulian, E. and Karin, M. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**(19): 2390-2400.
- Shenolikar, S. 1986. Control of cell function by reversible protein phosphorylation. *Journal of cyclic nucleotide and protein phosphorylation research* **11**(7): 531-541.
- Shepard, H.M., Lewis, G.D., Sarup, J.C., Fendly, B.M., Maneval, D., Mordenti, J., Figari, I., Kotts, C.E., Palladino, M.A., Jr., Ullrich, A., and et al. 1991. Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic. *J Clin Immunol* **11**(3): 117-127.
- Sherr, C.J. 2004. Principles of tumor suppression. *Cell* **116**(2): 235-246.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* **95**(7): 927-937.
- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.Y., Bakin, A.V., Baselga, J., and Arteaga, C.L. 2002. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* **8**(10): 1145-1152.
- Shiozaki, H., Oka, H., Inoue, M., Tamura, S., and Monden, M. 1996. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* **77**(8 Suppl): 1605-1613.
- Sicinski, P., Donaher, J.L., Parker, S.B., Li, T., Fazeli, A., Gardner, H., Haslam, S.Z., Bronson, R.T., Elledge, S.J., and Weinberg, R.A. 1995. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* **82**(4): 621-630.
- Side, A., Palaty, C., Dirks, P., Wiggan, O., Kiess, M., Gill, R.M., Wong, A.K., and Hamel, P.A. 1996. Activity of the retinoblastoma family proteins, pRB, p107, and p130, during cellular proliferation and differentiation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **31**(3): 237-271.
- Singh, S. and Khar, A. 2005. Differential gene expression during apoptosis induced by a serum factor: role of mitochondrial F0-F1 ATP synthase complex. *Apoptosis* **10**(6): 1469-1482.
- Sinn, E., Muller, W., Pattengale, P., Tepler, I., Wallace, R., and Leder, P. 1987. Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* **49**(4): 465-475.
- Sirard, C., de la Pompa, J.L., Elia, A., Itie, A., Mirtsos, C., Cheung, A., Hahn, S., Wakeham, A., Schwartz, L., Kern, S.E., Rossant, J., and Mak, T.W. 1998. The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev* **12**(1): 107-119.
- Slamon, D.J. 1990. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast cancer. *Cancer Invest* **8**(2): 253.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**(4785): 177-182.
- Smaili, S.S., Hsu, Y.T., Sanders, K.M., Russell, J.T., and Youle, R.J. 2001. Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Death Differ* **8**(9): 909-920.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**(6647): 194-198.
- Stepniak, E., Ricci, R., Eferl, R., Sumara, G., Sumara, I., Rath, M., Hui, L., and Wagner, E.F. 2006. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes Dev* **20**(16): 2306-2314.
- Sternsdorf, T., Puccetti, E., Jensen, K., Hoelzer, D., Will, H., Ottmann, O.G., and Ruthardt, M. 1999. PIC-1/SUMO-1-modified PML-retinoic acid receptor alpha mediates arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol* **19**(7): 5170-5178.
- Sutherland, R.L. and Musgrove, E.A. 2004. Cyclins and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**(1): 95-104.
- Tambe, Y., Isono, T., Haraguchi, S., Yoshioka-Yamashita, A., Yutsudo, M., and Inoue, H. 2004. A novel apoptotic pathway induced by the drs tumor suppressor gene. *Oncogene* **23**(17): 2977-2987.
- Thomas, M.C. and Chiang, C.M. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**(3): 105-178.
- Thomas, W., Caiazza, F., and Harvey, B.J. 2008. Estrogen, phospholipase A and breast cancer. *Front Biosci* **13**: 2604-2613.

- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., and Nicholson, D.W. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**(29): 17907-17911.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. 1997. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* **387**(6634): 677-684.
- Torres-Arzayus, M.I., Font de Mora, J., Yuan, J., Vazquez, F., Bronson, R., Rue, M., Sellers, W.R., and Brown, M. 2004. High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell* **6**(3): 263-274.
- Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F., and Giguere, V. 1999. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* **3**(4): 513-519.
- van der Gugten, A.A., Ropcke, G., van Nie, R., and Hilgers, J. 1985. Mouse strain (STS/A) resistant to mammary tumor induction by hypophysial isografts. *Cancer Res* **45**(8): 3448-3453.
- van Grunsven, L.A., Verstappen, G., Huylebroeck, D., and Verschueren, K. 2005. Smads and chromatin modulation. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(4-5): 495-512.
- Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J.H., and Raman, V. 2008. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **367**(2): 235-241.
- Visconti, R., Schepis, F., Iuliano, R., Pierantoni, G.M., Zhang, L., Carlomagno, F., Battaglia, C., Martelli, M.L., Trapasso, F., Santoro, M., and Fusco, A. 2003. Cloning and molecular characterization of a novel gene strongly induced by the adenovirus E1A gene in rat thyroid cells. *Oncogene* **22**(7): 1087-1097.
- Wang, S., Fusaro, G., Padmanabhan, J., and Chellappan, S.P. 2002a. Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene* **21**(55): 8388-8396.
- Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**(22): 2922-2933.
- Wang, Y., Thakur, A., Sun, Y., Wu, J., Biliran, H., Bollig, A., and Liao, D.J. 2007. Synergistic effect of cyclin D1 and c-Myc leads to more aggressive and invasive mammary tumors in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* **67**(8): 3698-3707.
- Wang, Y., Wu, M.C., Sham, J.S., Zhang, W., Wu, W.Q., and Guan, X.Y. 2002b. Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray. *Cancer* **95**(11): 2346-2352.
- Wang, Z., Rose, D.W., Hermanson, O., Liu, F., Herman, T., Wu, W., Szeto, D., Gleiberman, A., Krones, A., Pratt, K., Rosenfeld, R., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. 2000. Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13549-13554.
- Webster, M.A., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. 1995. Induction of mammary epithelial hyperplasias and mammary tumors in transgenic mice expressing a murine mammary tumor virus/activated c-src fusion gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7849-7853.
- Webster, N.J., Resnik, J.L., Reichart, D.B., Strauss, B., Haas, M., and Seely, B.L. 1996. Repression of the insulin receptor promoter by the tumor suppressor gene product p53: a possible mechanism for receptor overexpression in breast cancer. *Cancer Res* **56**(12): 2781-2788.
- Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**(3): 323-330.
- Weiss, R.E., Xu, J., Ning, G., Pohlenz, J., O'Malley, B.W., and Refetoff, S. 1999. Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *Embo J* **18**(7): 1900-1904.
- Werbajh, S., Nojek, I., Lanz, R., and Costas, M.A. 2000. RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. *FEBS Lett* **485**(2-3): 195-199.
- Weston, C.R. and Davis, R.J. 2007. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* **19**(2): 142-149.
- Wingate, H., Zhang, N., McGarhen, M.J., Bedrosian, I., Harper, J.W., and Keyomarsi, K. 2005. The tumor-specific hyperactive forms of cyclin E are resistant to inhibition by p21 and p27. *J Biol Chem* **280**(15): 15148-15157.
- Winston, L.A. and Hunter, T. 1995. JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone. *J Biol Chem* **270**(52): 30837-30840.

- Witowsky, J.A. and Johnson, G.L. 2003. Ubiquitylation of MEKK1 inhibits its phosphorylation of MKK1 and MKK4 and activation of the ERK1/2 and JNK pathways. *J Biol Chem* **278**(3): 1403-1406.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**(5): 1281-1292.
- Wu, H. and Lozano, G. 1994. NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem* **269**(31): 20067-20074.
- Wu, H., Sun, L., Zhang, Y., Chen, Y., Shi, B., Li, R., Wang, Y., Liang, J., Fan, D., Wu, G., Wang, D., Li, S., and Shang, Y. 2006. Coordinated regulation of AIB1 transcriptional activity by sumoylation and phosphorylation. *J Biol Chem* **281**(31): 21848-21856.
- Wu, J., Shao, Z.M., Shen, Z.Z., Lu, J.S., Han, Q.X., Fontana, J.A., and Barsky, S.H. 2000. Significance of Apoptosis and Apoptotic-Related Proteins, Bcl-2, and Bax in Primary Breast Cancer. *Breast J* **6**(1): 44-52.
- Wu, R.C., Feng, Q., Lonard, D.M., and O'Malley, B.W. 2007. SRC-3 coactivator functional lifetime is regulated by a phospho-dependent ubiquitin time clock. *Cell* **129**(6): 1125-1140.
- Wu, R.C., Qin, J., Hashimoto, Y., Wong, J., Xu, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. 2002. Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol* **22**(10): 3549-3561.
- Wu, R.C., Qin, J., Yi, P., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. 2004. Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell* **15**(6): 937-949.
- Xie, D., Sham, J.S., Zeng, W.F., Lin, H.L., Bi, J., Che, L.H., Hu, L., Zeng, Y.X., and Guan, X.Y. 2005. Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* **36**(7): 777-783.
- Xu, J. and Li, Q. 2003. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* **17**(9): 1681-1692.
- Xu, J., Liao, L., Ning, G., Yoshida-Komiya, H., Deng, C., and O'Malley, B.W. 2000. The steroid receptor coactivator SRC-3 (pCIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6379-6384.
- Xuan Nguyen, T.L., Choi, J.W., Lee, S.B., Ye, K., Woo, S.D., Lee, K.H., and Ahn, J.Y. 2006. Akt phosphorylation is essential for nuclear translocation and retention in NGF-stimulated PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **349**(2): 789-798.
- Yan, F., Gao, X., Lonard, D.M., and Nawaz, Z. 2003. Specific ubiquitin-conjugating enzymes promote degradation of specific nuclear receptor coactivators. *Mol Endocrinol* **17**(7): 1315-1331.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**(7): 927-939.
- Yang, X.H., Edgerton, S., and Thor, A.D. 2005. Reconstitution of caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to radiation therapy. *Int J Oncol* **26**(6): 1675-1680.
- Yee, A.S., Paulson, E.K., McDevitt, M.A., Rieger-Christ, K., Summerhayes, I., Berasi, S.P., Kim, J., Huang, C.Y., and Zhang, X. 2004. The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene* **336**(1): 1-13.
- Yeyati, P.L., Shaknovich, R., Boterashvili, S., Li, J., Ball, H.J., Waxman, S., Nason-Burchenal, K., Dmitrovsky, E., Zelent, A., and Licht, J.D. 1999. Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* **18**(4): 925-934.
- Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. 1999. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **400**(6747): 886-891.
- Yoshida, H., Liu, J., Samuel, S., Cheng, W., Rosen, D., and Naora, H. 2005. Steroid receptor coactivator-3, a homolog of Taiman that controls cell migration in the Drosophila ovary, regulates migration of human ovarian cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* **245**(1-2): 77-85.
- Yoshida, R., Kimura, N., Harada, Y., and Ohuchi, N. 2001. The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol* **18**(3): 513-520.
- Zha, H., Aime-Sempe, C., Sato, T., and Reed, J.C. 1996. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* **271**(13): 7440-7444.
- Zhang, H., Yi, X., Sun, X., Yin, N., Shi, B., Wu, H., Wang, D., Wu, G., and Shang, Y. 2004. Differential gene regulation by the SRC family of coactivators. *Genes Dev* **18**(14): 1753-1765.

- Zhao, M., New, L., Kravchenko, V.V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E.N., Ulevitch, R.J., and Han, J. 1999. Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol* **19**(1): 21-30.
- Zhao, X. and Day, M.L. 2001. RB activation and repression of C-MYC transcription precede apoptosis of human prostate epithelial cells. *Urology* **57**(5): 860-865.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H., and Hung, M.C. 2001. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* **3**(3): 245-252.
- Zhou, H.J., Yan, J., Luo, W., Ayala, G., Lin, S.H., Erdem, H., Ittmann, M., Tsai, S.Y., and Tsai, M.J. 2005. SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res* **65**(17): 7976-7983.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AIB1	Amplificado en cáncer de mama tipo 1
AIF	Factor inductor de la apoptosis
Apaf-1	Factor activador 1 proteasa apoptótico
APC	Complejo promotor de la anafase
ASC-2	Cointegrador activador de la señal 2
ATF2	Factor de activación de la transcripción 2
bHLH/PAS	Dominio hélice vuelta hélice/Translocador del receptor AH de Sim y Per
BMP	Proteína morfogénica ósea
BrdU	5'-Bromo-2'-desoxi-uridina
BLG	Promotor de la β -lactoglobulina
CAD	Sintasa de carbamil-fosfato, dependiente de glutamina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CARM1	Metiltransferasa 1 asociada a coactivador
CHOP1	Proteína homóloga de C/EBP
CHX	Cicloheximida
CMV	Citomegalovirus
CREB	Proteína de regulación de unión del elemento cAMP e interferón- α
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindol
DISC	Complejo activo de señalización de muerte
DRO1	Gen 1 reprimido por oncogenes
E2	17- β -estradiol
E6-AP	Proteína asociada a E6
EDTA	Ácido Etilén Diamino Tetraacético
EGF	Factor de crecimiento de epitelio
ER	Receptor de estrógenos
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
FGF8	Factor de crecimiento de fibroblastos 8
Gal4·DBD	Dominio de unión a DNA de Gal4
GFP	Proteína verde fluorescente
GR	Receptor de glucocorticoides
GST	Glutatió S transferasa
HA	Hemaglutinina
HER2	Receptor 2 de epitelio humano
HGM-1	Proteína cromosómica no histona
IF	Inmunofluorescencia
IGF	Factor de crecimiento de tipo insulina
IGF-R	Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina
IP	Inmunoprecipitación
JNK	Quinasa N-terminal de c-jun
Kpb	Kilo pares de bases

LSC	Citometría por escáner láser
MAPK	Proteína-quinasa activada por factores mitóticos
MMTV	Virus de tumor de mama de ratón
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos
NF1	Gen 1 de la neurofibromatosis
NF- κ B	Factor nuclear kappa-B
NGF	Factor de crecimiento neural
NR	Receptores nucleares
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Preinmune
PI3K	Proteína-quinasa de fosfatidil inositolico 3
PLZF	Proteína con dedo de cinc de leucemia promielocítica
PP1	Proteína fosfatasa 1
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PRMT1	Proteína asociada a Metil-transferasa 1
RAR	Receptor del ácido retinoico
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Especies reactivas al oxígeno
RTK	Receptores Tirosina-quinasa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poli-acrilamida sodium-dodecil-sulfato
SERM	Moduladores selectivos de receptores de estrógenos
siRNA	RNA pequeño de interferencia
TAFII	Factores de transcripción asociados a TBP
TBP	Proteína de unión a TATA
TEB	Yemas terminales ductales
Tg	Transgénico
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF α	Factor de necrosis tumoral alpha
TR	Receptor de la hormona tiroidea
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF α
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
TSC1/TSC2	Genes 1 y 2 de esclerosis tuberosa
VEGF C	Factor de crecimiento endotelial vascular C
WB	Del inglés "western blot"
WT	Tipo silvestre
xg	Veces la fuerza de la gravedad