

**Implicación de la tirosín
quinasa Src en la
adquisición de la
hormonoindendencia
en tumores de mama**

Tesis doctoral

Enrique Barraón Catalán

Instituto de Biología Molecular y Celular

Universidad Miguel Hernández





Miguel Saceda Sánchez, Doctor en Ciencias Biológicas, investigador del Sistema Nacional de Salud y profesor asociado a la Universidad Miguel Hernández, y Antonio V. Ferrer Montiel, Doctor en Ciencias Químicas y profesor titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado "Implicación de la tirosín quinasa *Src* en la adquisición de la hormonoindendencia en tumores de mama" que conduce a la obtención del grado de Doctor ha sido realizado bajo su dirección por Enrique Barraón Catalán en el Instituto de Biología Celular y Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que conste y surta a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche, a 20 de julio de 2005.

Fdo. Miguel Saceda Sánchez

Fdo. Antonio V. Ferrer Montiel



José Manuel González Ros, Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

da su conformidad a la lectura de la tesis doctoral titulada: "Implicación de la tirosín quinasa *Src* en la adquisición de la hormonoindependencia en tumores de mama", presentada por Enrique Barrajon Catalán.

Para que conste y surta a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 20 de julio de 2005.

Fdo. José Manuel González Ros

“Hay dos tipos de hombres: los que navegan y los que no”

Platón

1. Introducción	1
El cáncer de mama	3
El receptor de estrógenos α (ER α)	7
Supresión génica	8
El gen	9
La proteína	10
Función y mecanismo de acción	12
Regulación de la expresión y la actividad	13
La tirosín-quinasa <i>Src</i>	23
El gen y la proteína	24
Expresión y supresión génica	26
Función	27
Regulación	27
Relación entre cáncer de mama, ER α y <i>Src</i>	29
2. Objetivos	33
3. Resultados	37
Generación de la líneas MCF7 <i>src</i>	39
Las células MCF7 <i>src</i> no responden a estradiol	45
Alteraciones en la expresión del ER α	55
Estudio de la hormonoindendencia	61
4. Discusión	65
5. Conclusiones	75
6. Materiales y métodos	79
Cultivo celular	81
Transfecciones	82
Extractos celulares, electroforesis e inmunoblots	86
Medida de la actividad de genes marcadores	91
Expresión del ARNm de la quinasa transfectada	92
PCR cuantitativa	95
Medidas de hormonoindendencia y/o proliferación	98
Cálculos estadísticos	100
7. Abreviaturas	103
8. Agradecimientos	107
9. Bibliografía	112



Introducción



El cáncer de mama

En la actualidad el cáncer es uno de los problemas clínicos de mayor relevancia. En Europa se diagnosticaron el pasado año 2004 más de 2.9 millones de casos de cáncer y hubo 1.7 millones de muertes relacionadas con enfermedades oncológicas. De entre todos los cánceres, uno de los de mayor importancia social y económica, es el de mama. Esto es así fundamentalmente debido a su gran incidencia. Se estima que el cáncer de mama es la segunda causa de muerte no natural entre las mujeres occidentales. En España se diagnostican unos 15.000 nuevos casos de cáncer de mama al año, siendo ésta la duodécima causa de muerte no natural en la población española (**figura 1**).

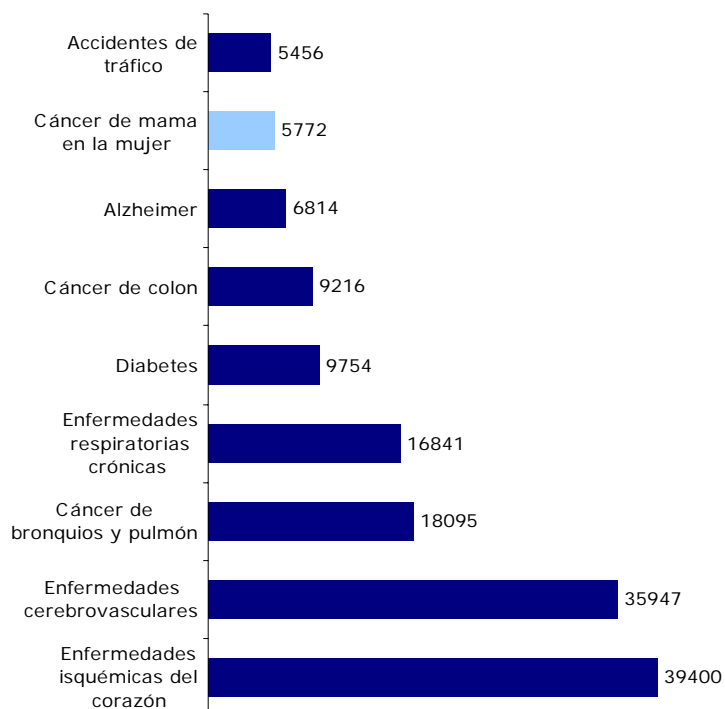


Figura 1: número de muertes no naturales agrupadas por su causa. Fuente I.N.E. (2002), en azul claro se resaltan las debidas al cáncer de mama.

Los tumores de mama suelen aparecer en la gran mayoría de los casos (95-99 %) en mujeres adultas entre los 40 y 60 años, siendo en este grupo de población la primera causa de muerte. Los índices de curación rondan el 60% en nuestro país, si bien la detección precoz, hace que el porcentaje de curación se eleve casi al 90% (1).

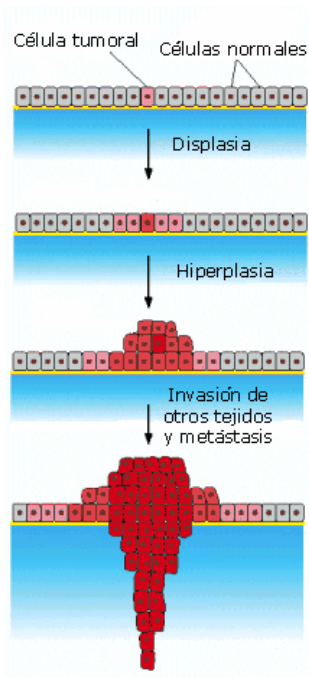


Figura 2: proceso de evolución de un tumor.

Metástasis: aparición de células tumorales en un órgano diferente del de origen.

El crecimiento y desarrollo de los tumores de mama es similar al del resto de los tumores (2;3): los tumores evolucionan desde un primer estadio normal, cuyo crecimiento es controlado, a otros en los que el control de su proliferación se pierde. El primer estado por el que se pasa es por un crecimiento anormal del tejido (displasia), es lo que se conoce como adenoma; si el crecimiento del tumor persiste en su proliferación (hiperplasia) puede llegar a provocar lo que se denomina carcinoma in situ (llamado en muchos casos tumor benigno). En este estado, el tumor está circunscrito sólo al tejido en que se originó. A continuación, el tumor puede evolucionar invadiendo otros tejidos originando un carcinoma maligno, el cual, puede dar origen a su vez a fenómenos de **metástasis** (figura 2)(4).

Muchos de los tumores de mama presentan una particularidad que los distingue de la mayoría de los otros tumores: la hormonodependencia o dependencia de hormonas estrogénicas (estrógenos) para su desarrollo y crecimiento (5-8). El tejido mamario requiere el aporte de estrógenos para su crecimiento, en consecuencia, los tumores originados a partir de este tejido van a conservar en un principio la dependencia de los estrógenos para su proliferación, en definitiva, van a ser hormonodependientes. Los tumores que se encuentran en este estadio son tratados en la mayoría de las ocasiones mediante terapias antiestrogénicas las cuales son, en un principio, capaces de controlar el crecimiento del tumor en un gran número de casos.

Sin embargo, en muchos de los casos, la hormonodependencia del tumor se pierde, las células cancerosas sufren una serie de transformaciones adicionales que las vuelven hormonoindependientes (8) y las hace capaces de crecer en ausencia de estrógenos. En este nuevo estadio, los tumores presentan un peor pronóstico, ya que la adquisición de la hormonoindependencia se acompaña de un aumento en la agresividad del tumor, lo que provoca la utilización de tratamientos más agresivos (quimio y radioterapia) (7-10).

Los mecanismos moleculares responsables de la transición desde un fenotipo hormonodependiente a otro en el que la dependencia de hormonas ha desaparecido, no han sido determinados completamente. No se conocen con exactitud los mecanismos que hacen que ésta suceda, y las proteínas implicadas, también son en su mayoría desconocidas. La necesidad de aclarar esta transición ha sido la que ha estimulado la realización de este trabajo, ya que desentrañar el mecanismo y las proteínas implicadas permitirá entender la evolución de la enfermedad y diseñar mejores tratamientos antitumorales.

No obstante, aunque los mecanismos íntimos de la transición no están claros, no todo es desconocido. Se sabe que existen proteínas íntimamente relacionadas con la progresión de este tipo de tumores, entre ellas están el receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) y la tirosín quinasa *Src*. Ambas han sido implicadas tanto en el desarrollo tumoral, como en la adquisición de la hormonodependencia (9-19). Sin embargo, la relación entre ellas, así como los mecanismos implicados, no han sido aclarados todavía, requiriéndose nuevos estudios encaminados a desentrañar su relación e implicación en estos fenómenos.

El receptor de estrógenos α

El receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) es el principal encargado de recibir los estímulos estrogénicos y convertirlos en una respuesta que implique la proliferación de las células; por tanto, en cualquier alteración de la respuesta a los estímulos estrogénicos, forzosamente debe estar implicado el receptor de estrógenos.

El $ER\alpha$ es un receptor nuclear que a su vez actúa como un factor de transcripción que controla la expresión de un determinado número de genes, en su mayoría relacionados con la proliferación (20). La unión de los estrógenos al $ER\alpha$ activa su función transcripcional, originando la denominada *respuesta estrogénica*.

Actualmente, además del $ER\alpha$, se conoce otro receptor de estrógenos, el denominado receptor de estrógenos beta ($ER\beta$), cuyo descubrimiento fue posterior. Se sabe que los dos receptores no son isoformas de un mismo gen, de hecho los genes que codifican para cada uno de ellos se encuentran en diferentes cromosomas (25). A pesar de esto, ambos pueden reconocer las mismas secuencias nucleotídicas dado que presentan un 96% de identidad en el dominio de unión al ADN (24;25). La mayor divergencia entre sus otros dominios (**figura 3**) les confiere la capacidad de interactuar con ligandos y proteínas diferentes.

Está aceptado también la existencia de una subpoblación citosólica de $ER\alpha$ asociada a la membrana plasmática. Esta población no actúa como factor de transcripción y su actividad se relaciona con la interacción con otras vías de transducción de señales, constituyendo lo que se denomina vía no genómica o no clásica de actuación del $ER\alpha$ (21-24).

Los receptores nucleares constituyen una gran superfamilia estructuralmente relacionada, constituida por aproximadamente 150 proteínas, dividida en 6 clases y a la que se supone un ancestro común. Todos ellos son factores de transcripción activados por ligando y regulan importantes procesos implicados en la diferenciación sexual, el desarrollo, el metabolismo y la homeostasis. (5; 6; 11; 26).

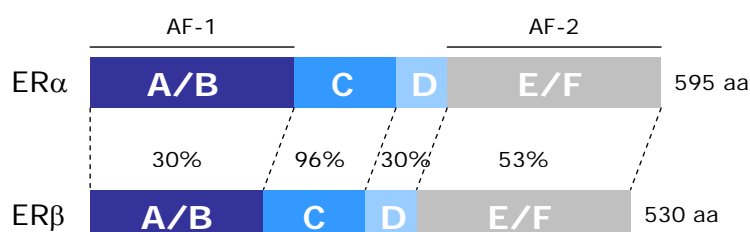


Figura 3: porcentaje de identidad entre los diferentes dominios de los receptores de estrógenos α y β .

El tamaño de ambos receptores es también distinto, el ER β posee 485 aminoácidos y un peso molecular de 54 KDa mientras que el ER α posee 595 aminoácidos y un peso molecular que ronda los 66 KDa.

Antiguamente se acotaba la expresión del ER α a los tejidos que "reproductivos femeninos", es decir, ovarios, vagina, oviductos y mamas. Hoy en día se conoce que el receptor además de expresarse predominantemente en esos tejidos lo hace también, en mayor o menor medida, y en ambos sexos, en otros muchos tejidos como la pituitaria, hipotálamo, algunas regiones del cerebro, huesos, hígado, sistema cardiovascular e incluso en testículos (25;27;28).

Hasta la fecha no se poseen datos de ninguna respuesta ante estímulos estrogénicos mediada exclusivamente por el ER β , los resultados obtenidos apuntan a una heterodimerización entre el ER β y el ER α (24;25), siendo la presencia de heterodímeros una diferencia entre ambos receptores; el ER β , a diferencia del ER α , prefiere formar heterodímeros antes que homodímeros. Otra diferencia entre ambos tipos son los tejidos en donde se expresan, el ER β , se expresa mayoritariamente en la próstata, folículos ováricos, tracto urogenital, pulmón e intestino (28), mientras que el ER α lo hace fundamentalmente en ovarios, vagina, oviductos y mamas (25;27;28). Ambos se expresan en el cerebro, pero siempre en regiones distintas.

Supresión génica

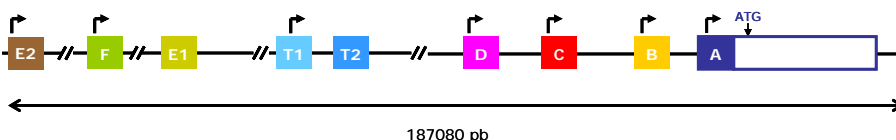
En la actualidad se ha conseguido la supresión génica de los dos receptores de estrógenos, disponiéndose en estos momentos de ratones en los que se ha suprimido la expresión del ER α (ratones α ERKO) y del ER β (ratones β ERKO). Ninguno de los dos casos ha originado ratones inviables por lo que la supresión de cualquiera de los genes no es letal. Sin embargo, sí aparecen importantes alteraciones relacionadas en su mayoría con problemas en la fertilidad y con alteraciones en los tejidos en donde se expresan los receptores (24). Los ratones α ERKO de ambos sexos no son fértiles mientras que los β ERKO presentan una menor fertilidad en las hembras (las camadas son más pequeñas) y ausencia de alteraciones en la fertilidad de los machos. Las alteraciones más importantes en los tejidos se dan en las mamas y tracto reproductivo de las hembras de

Los ratones α ERKO tiene además una mayor susceptibilidad a sufrir tumores de ovario y ciertos tipos de adenocarcinoma (25).

ambos tipos de ratones, y se caracterizan por una pérdida de respuesta a los estrógenos y un menor desarrollo (25).

De los dos ER, el ER α es el que está implicado en mayor medida en la biología de los tumores de mama (6;12), ya que está implicado tanto en la transformación celular como en el control de la dependencia de hormonas de los mismos, por lo tanto, este trabajo se centrará en el estudio del ER α .

Como en otros muchos casos, la proteína se descubrió antes que el gen. El descubrimiento del receptor data de la década de 1960 (29;30), sin embargo, el gen no fue clonado hasta la década de 1980 por el grupo dirigido por P.Chambon (31;32). Hoy se sabe que el gen humano que codifica para el ER α se encuentra situado a lo largo de unas 450 Kb en el locus 6q25 del cromosoma 6 (33). Dentro de ese gen se encuentran los 8 exones codificantes, varios exones no codificantes (hasta 9 exones más) y numerosos promotores diferentes en la región 5' anterior a la secuencia codificante (**figura 4**) (34). También posee una larga región 3' no traducida (4.3 Kb) típica de los receptores nucleares y de importancia en la regulación de la vida media del transcrito (35). Los promotores son específicos de tejido y su fuerza es muy variable, careciendo algunos de ellos de secuencias consenso como las cajas TATA, GC o CCAAT. Todos los promotores, si bien originan diferentes transcritos, comparten la misma secuencia codificante por lo que dan lugar en todos los casos a la misma proteína (35).



El gen del ER α

El transcrito más común es el que se origina a partir del promotor A y consta de unos 6300 pb.

Figura 4: organización genómica de la secuencia 5' anterior a la región codificante (CDS) del gen del ER α humano. En diferentes colores se muestran los exones no codificantes. Las flechas indican la posición de los diferentes promotores encontrados (34). El codón de inicio ATG marca el comienzo de la CDS.

La proteína

La transcripción y posterior traducción del gen origina un producto de 595 aminoácidos con un peso molecular cercano a los 66 KDa. La proteína se organiza en 5 dominios (**figura 6**):

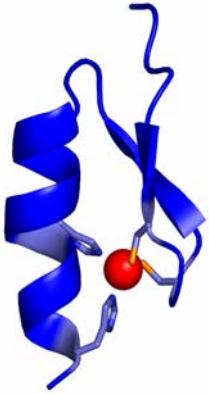


Figura 5: *dedos de Zinc*: Estructura proteica típica de unión a ácidos nucleicos. Está formada por una hélice alfa y una lámina beta antiparalela. Esta estructura se mantiene gracias a interacciones hidrofóbicas y la presencia de un ion Zn^{2+} (en rojo en la figura), es cual está acomplejado por 2 cisteínas y 2 histidinas. El tramo de secuencia que une la hélice α a la hebra β es el encargado de establecer interacciones con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos dotando de especificidad a la unión. Este tipo de motivos suelen aparecer en grupos, aumentando así la fuerza de la interacción.

- Dominio A/B: situado en el extremo N-terminal de la proteína. En él se encuentra la región de transactivación 1 (AF-1) que tiene gran importancia en la regulación del receptor en ausencia de su ligando (36-38).
- Dominio C: en este dominio se encuentra la secuencia de unión al ADN por lo que también se le conoce como dominio de unión a ADN. Está altamente conservado entre todos los receptores nucleares y se organiza en dos *dedos de zinc* (**figura 5**), que se unen a secuencias consenso en el ADN denominadas secuencias ERE (Estrogen Response Element o secuencias de respuesta a estrógenos) (39-41).
- Dominio D: es una región flexible en la que se encuentra la principal señal de localización nuclear (42).
- Dominio E: en él están localizadas la región de unión al ligando y la implicada en la dimerización del receptor así como un segundo dominio de transactivación denominado AF-2 (6).
- Dominio F: es el más desconocido de todos los existentes si bien hay indicios de que participa en la regulación de la actividad del receptor (43).

Figura 6: organización en dominios de ER α humano en el cual se marca la posición numérica de los aminoácidos de inicio y final de los diferentes dominios.



En la actualidad el conocimiento estructural detallado del ER está restringido a la región de los dominios E y F ya que son de los que se dispone su estructura atómica detallada (44). La estructura secundaria de la misma está formada por doce hélices α y dos láminas β (**figura 7a e 7b**). El núcleo central lo forman 11 de las hélices α que se disponen formando una estructura tipo sándwich, con tres niveles antiparalelos entre sí, existiendo un cuerpo central formado por las hélices H5/6, H9 y H10, que está flanqueado por los otros dos grupos de hélices, el formado por las H1-4, y el de las H7, H8 y H11 (**figura 7c e 7d**). El resto de las estructuras secundarias ordenadas, la H12 y las dos hojas β se encuentran en las cercanías del dominio E pero sin formar parte del núcleo central de su estructura (6;44).

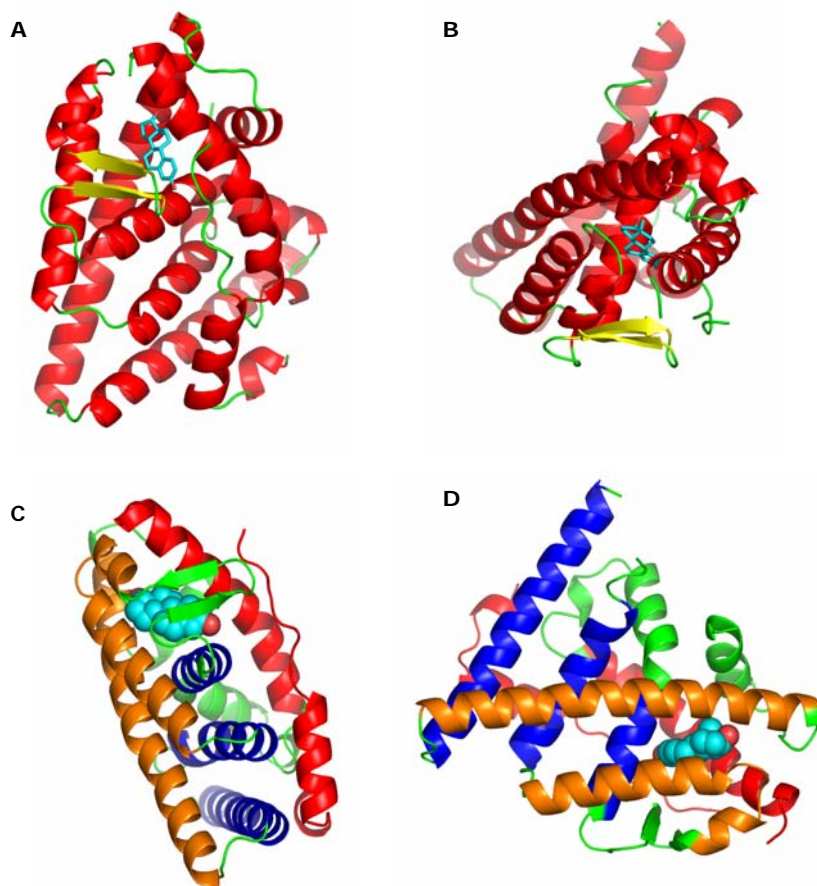


Figura 7: imágenes de la estructura tridimensional de los dominios E y F de ER α obtenidas mediante el programa SwissPDB Viewer. Vista frontal (**A**) y apical (**B**) de ambos dominios con una molécula de estradiol (coloreada en azul claro) unida a él. Imagen desde una vista frontal (**C**) y apical (**D**) del detalle de las tres capas de hélices α en donde cada capa está coloreada de un color diferente: azul, amarillo y rojo. En color verde se representan las estructuras no implicadas en estas capas. De nuevo se muestra una molécula de estradiol unida a él (en azul claro y rojo).

Función y mecanismo de acción

La función principal del ER α es regular la expresión de determinados genes en respuesta a la llegada de un estímulo estrogénico que lo active (45).

El ER α es un receptor nuclear con actividad de factor de transcripción activado por ligando. Hasta su activación, el receptor de estrógenos se encuentra en forma monomérica acompañado por numerosas proteínas entre las que se encuentran algunas chaperonas como la hsp70, la hsp90, la hsp56 y la proteína p23 (6;46). La activación del receptor, normalmente por la llegada del ligando, promueve la liberación del ER α (**figura 9**) y su unión a otro ER α formando un dímero (**figura 8**) que se une a las secuencias ERE del genoma. La unión del dímero a estas secuencias, que suelen estar secuencia arriba del promotor de los genes diana, consigue el reclutamiento de la maquinaria protéica necesaria para la transcripción de los mismos (5;47). Existen numerosos coactivadores que se unen a los dímeros activados del ER facilitando el comienzo de la transcripción de los genes diana (5;6;20;24;47;48). Así mismo también existen algunos correpresores que se encargan de atenuar la señal (5;20;27;47-50).

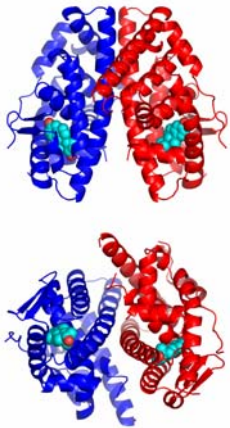
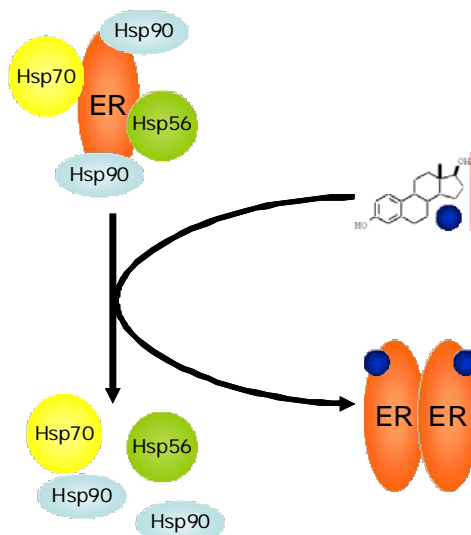


Figura 8: dos vistas de la estructura del dímero en la cual se muestran los dominios de unión a ligando. En azul claro y rojo se muestra el E2.

Figura 9: mecanismo de activación del ER α por E2 (en azul).



Los principales reguladores de la expresión y actividad del ER α son sus ligandos, los estrógenos (**figura 10**). Entre ellos destaca el **estradiol** (en adelante E2) como principal ligando del receptor (51). La expresión del ER α está controlada por los estrógenos. La presencia de los mismos aumenta su actividad y disminuye su expresión a nivel de ARNm y proteína (51-54), hecho este último que ocurre mediado por el propio receptor y sin que sea necesario la síntesis de otras proteínas (55).

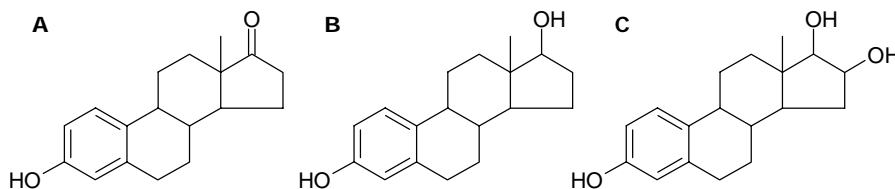


Figura 10: estructuras químicas de la estrona (**A**), el estradiol (**B**) y el estriol (**C**).

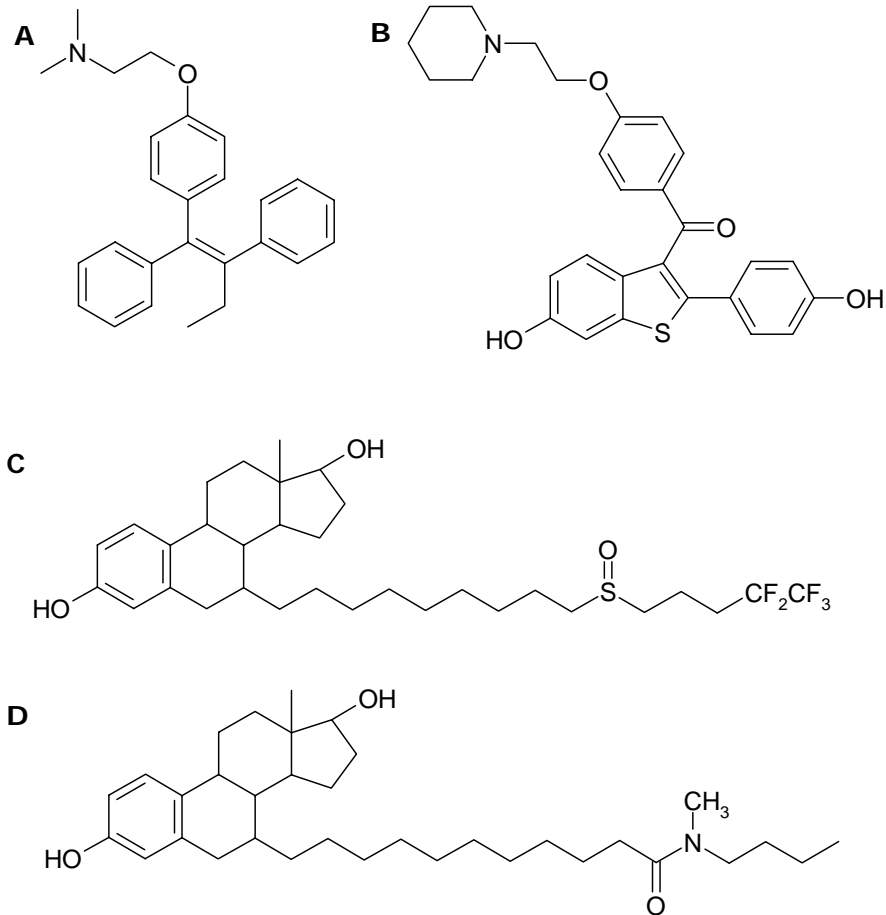
Además de los estrógenos existen compuestos antiestrogénicos cuya unión al ER α inhibe su actividad. Los **antiestrógenos**, como se ha contado anteriormente, constituyen la terapia más eficaz en los primeros estadios del cáncer de mama, cuando éste depende todavía de los estrógenos para crecer. El sitio de unión de los antiestrógenos es el mismo que el del E2, si bien los modos de unión y las interacciones que se forman son diferentes para cada caso (44).

El antiestrogénico más conocido es el tamoxifeno (TXF) (**figura 11a**). En la actualidad es el agente antineoplásico más frecuentemente prescrito en el cáncer de mama en todo el mundo. Sin embargo, a pesar de su amplio uso, no es un antiestrogénico puro ya que a bajas concentraciones actúa como un agonista; lo mismo le ocurre a otro de los antiestrógenos más conocidos, el raloxifeno (**figura 11b**). Este hecho ha motivado el desarrollo de los denominados

El **estradiol** (1, 3, 5 [10]- estratrien-3, 17 β -diol) es el estrógeno más importante, se trata de una hormona sexual femenina que se sintetiza en los ovarios. Es responsable del desarrollo sexual normal en las mujeres y de la regulación del ciclo menstrual. Existen otros estrógenos de menor relevancia por su escasa potencia como son la estrona y el estriol. La estructura de todos ellos se muestra en la **figura 10**.

antiestrógenos puros, que carecen de ese carácter de agonista a bajas concentraciones (56). El ejemplo más claro de estos antiestrógenos puros son los llamados ICIs (p.ej.: ICI164,384 y el ICI182,780) (38;57) (**figura 11c – d**).

Figura 11: estructura de los antiestrógenos más conocidos: el tamoxifeno (**A**), el raloxifeno (**B**), ICI 182,780 (**C**) y el ICI 164,384 (**D**).



El **tamoxifeno** (4-hidroxitamoxifeno) fue sintetizado en 1966 por primera vez y se desarrolló como agente anticonceptivo. Posteriormente se observó su capacidad para inducir la ovulación, así como la capacidad de suprimir tumores mamarios inducidos en ratas.

Los estrógenos, además de regular la expresión del ER α , regulan también su **actividad**. La unión al ER α de su principal ligando, el E2, provoca como se ha explicado anteriormente la activación y la posterior dimerización del ER α desencadenando la expresión de aquellos genes regulados por el receptor (58-61).

La activación por ligando constituye el principal mecanismo de regulación de la actividad, pero la existencia de dos

lugares de transactivación (AF-1 y AF-2) dentro de su estructura, permite que sea regulado de otras maneras. Los efectos activadores de los dominios de transactivación son sinérgicos (5), si bien, su mecanismo de acción es diferente: la transactivación vía AF-1 es independiente de ligando, mientras que la mediada por el AF-2 parece necesitar de la presencia de un ligando (62).

Así como en la regulación por ligando existe unanimidad sobre los efectos que se dan, en la regulación por cualquiera de estas rutas que implican a los dominios de transactivación AF-1 y AF-2, existen, como se verá a continuación, numerosas discrepancias fruto de las dosis y las estrategias de estudio usadas.

Las principales vías de regulación del ER α , ajenas a la presencia del ligando y que implican a estas regiones de transactivación, se pueden resumir en cuatro:

1. Las dependientes de receptores de membrana con actividad tirosín-quinasa (5;6;38;62) .
2. Las dependientes de la proteína quinasa C (PKC) (10;36;63-65).
3. Las dependientes de la proteínas quinasa dependiente de AMPcíclico (PKA) (36;62;63).
4. La dependiente de la regulación por la tirosín quinasa *Src*. Esta vía será tratada más adelante en una sección aparte .

Regulación por receptores de membrana con actividad tirosín-quinasa:

Los receptores de membrana con actividad tirosín-quinasa son los encargados de activar las vías de transducción de señales ante la llegada de estímulos extracelulares como son diversos factores de crecimiento (p.ej. EGF, IGF y PDGF). La acción de estos factores de crecimiento desencadena una cascada de señalización intracelular que acaba con la activación de proteínas y programas de expresión génica relacionados, en la mayoría de los casos, con la proliferación celular. En el caso particular de la regulación de la actividad del ER α , el hecho más aceptado es que la activación de esta vía aumenta su actividad, como se deduce del aumento de la transcripción de los genes regulados por el ER α (6; 62; 63; 66; 67). Al igual que ocurre con los estrógenos, los mitógenos que ejercen su acción a través de los receptores de membrana con actividad tirosín-quinasa, regulan la expresión del ER α además de hacerlo con su actividad. La adición de estos mitógenos disminuye la expresión del receptor, haciendo disminuir los niveles de ARNm y de proteína (66).

Las discrepancias en este apartado se hallan fundamentalmente en que en algunos casos, las dosis de factores de crecimiento usadas en los ensayos superan en mucho las fisiológicas y en otros, el uso de dosis fisiológicas o no ocasiona ningún efecto o incluso llega a disminuir la actividad del ER α (78; 81).

A pesar de los resultados contradictorios, la vía de regulación más aceptada implica la unión a los receptores de los factores de crecimiento, la activación de los mismos por auto-fosforilación y la estimulación de la de la ruta Ras/Raf, que acaba con la activación de una MAPK. Las MAPKs (quinasas activadas por mitógenos) están implicadas en numerosas vías de transducción de señales (69-70), siendo

la MAPK implicada en la activación del ER α la ERK. Ésta, fosforila el residuo S118 del ER α (36; 38; 70; 71), y a su vez, activa a la proteína RSK, que es responsable de la fosforilación del residuo S167 del ER α (36). La fosforilación de ambos residuos provoca un aumento en la transcripción mediada por el ER α independiente de estrógenos ya que la adición de antiestrógenos no bloquea dicho efecto (6; 62; 63).

Los receptores de membrana con actividad tirosín-quinasa activan otra serie de vías que al final confluyen en la fosforilación de los mismos residuos del ER α y que complican así el estudio de su regulación. De esta manera, la tirosín quinasa *Src* se ve también activada por estos receptores (72; 73) y es capaz de estimular a su vez la vía Ras/Raf desde otro punto. De manera paralela, la ruta de la PI3K (3'-fosfoinositol quinasa) también es estimulada; esta ruta es capaz por sí misma, vía Akt, de fosforilar el residuo S167 del ER α (36; 66) y se entrecruza con las dos rutas anteriores al nivel de la RSK (36), la Ras (74) y la *Src* (75-77). Esta complejidad se puede observar en el esquema que se muestra en la **figura 12** donde se puede ver las numerosas conexiones entre las proteínas implicadas.

A pesar de que ambos residuos de serina son fosforilados, el S167 parece ser el más importante ya que su fosforilación depende de RSK la cual es activada establemente por la ERK y permanece activa durante más tiempo, esto hace que el tiempo que permanece el residuo S167 fosforilado sea mayor (36); además los mutantes S118A tienen menos afectada su activación por esta vía que los S167A (36)

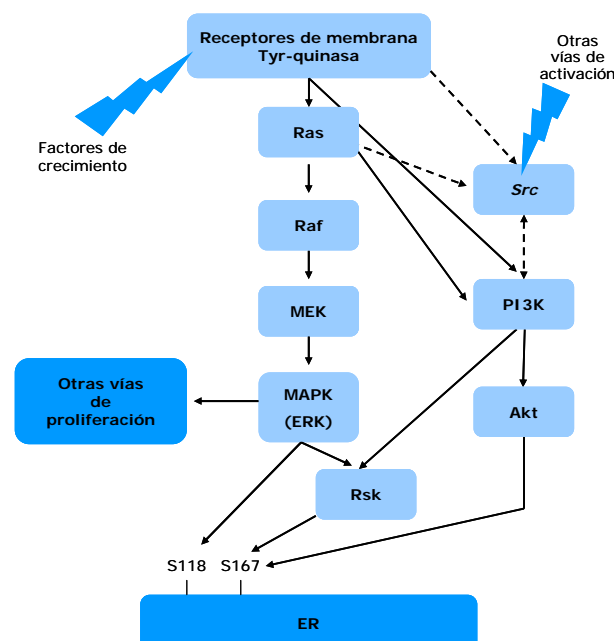


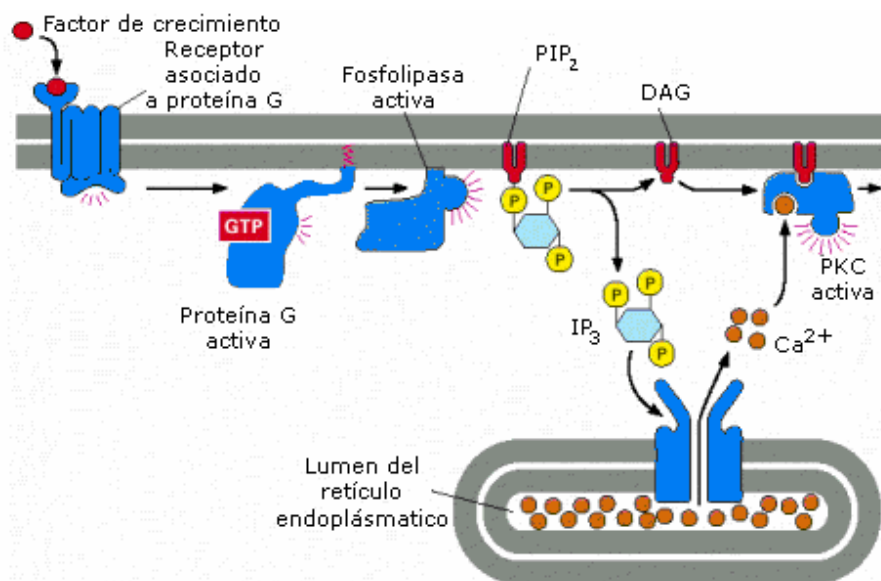
Figura 12: esquema de las conexiones entre las proteínas implicadas en la regulación de la actividad del ER α por la vía de los receptores de membrana con actividad tirosín-quinasa.

Regulación por proteína quinasa C

Bajo el nombre de proteína quinasa C o PKC se engloban una serie de familias de serín-treonín quinasas dependientes en su mayoría de calcio. En realidad existen tres familias de PKCs: Las *clásicas* (α , β y γ) las *nuevas* (δ , ϵ y η), que no requieren calcio, y las *atípicas* (ξ y λ), que no precisan más que la fosfatidilserina para activarse. El mecanismo de funcionamiento de las PKCs clásicas es el más conocido y parece ser el implicado en la regulación del ER α (36;63;64): la llegada de estímulos extracelulares activa los receptores de membrana acoplados a proteínas G, que a su vez estimulan a la fosfolipasa-C, que hidroliza moléculas de fosfatidilinositol 4, 5- bifosfato (PIP₂), dando como productos el diacilglicerol (DAG) y el inositol trisfosfato (IP₃). El IP₃ es liberado al citoplasma en donde promueve la liberación de calcio de los almacenes intracelulares del retículo endoplasmático. La liberación de este calcio es la que promueve y la migración a la membrana (4;80) de la PKC desde el citoplasma, en donde estaba localizada de forma inactiva (**figura 13**).

Las distintas familias se diferencian entre sí por sus requerimientos de calcio y lípidos, así como por su afinidad por los ésteres de forbol, su localización celular y tisular y por su susceptibilidad a ser degradadas (79).

Figura 13: ruta de activación de las PKCs clásicas (4).



Está descrito que la PKC ejerce su efecto sobre la actividad y la expresión del ER α a través de una vía dependiente de MAPK. De este modo, la activación de receptores de membrana por estímulos extracelulares que activen la PKC, tiene similares efectos a los provocados por la activación de receptores con actividad tirosín-quinasa, a saber, un aumento de la actividad del receptor, tras un incremento de la fosforilación del mismo en residuos de serina, y una disminución en la expresión del propio receptor (36;63;64).

Pero también existe controversia a propósito del verdadero efecto de la PKC sobre el ER α . En este sentido, hay datos que demuestran que la activación de la PKC por tratamientos con TPA (12-O-tetradecanoílforbol-13-acetato) disminuyen, tanto la cantidad de ER α a niveles de proteína y ARNm, como su actividad (10;65). La principal diferencia entre estos dos tipos de resultados, los que afirman que la PKC activa aumenta la actividad del receptor y los que lo dicen lo contrario radica en los diferentes tiempos de incubación usados: tiempos cortos activan al receptor mientras que tiempos más largos suelen disminuir su actividad y expresión.

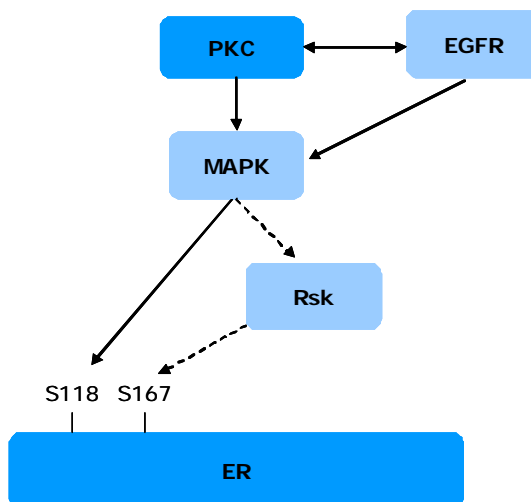
Los ésteres de forbol como el TPA (12-O-tetradecanoílforbol-13-acetato) se utilizan como activadores de la PKC ya que mimetizan al DAG sin ser degradados tan rápidamente como lo es él.

Otro dato que aumenta la controversia es el hecho de que la activación de la PKC por tratamientos con TPA provoca, en células de cáncer de mama, un bloqueo del ciclo celular de las mismas en fase G1 y un paso tardío por fase G2/M (65), lo cual no es consecuente con la activación de la ruta de las MAPKs, que es de carácter mitogénico.

Además de lo anterior, está aceptado que las PKCs pueden ser activadas por receptores de membrana con actividad tirosín-quinasa como el EGFR (**figura 14**), y que éstas participan en la propia regulación de los receptores mediante un mecanismo de retroalimentación negativo

(79). De esta manera, se establece un nexo de unión adicional entre la vía de regulación por receptores de membrana con actividad tirosín quinasa y la vía de regulación por PKC.

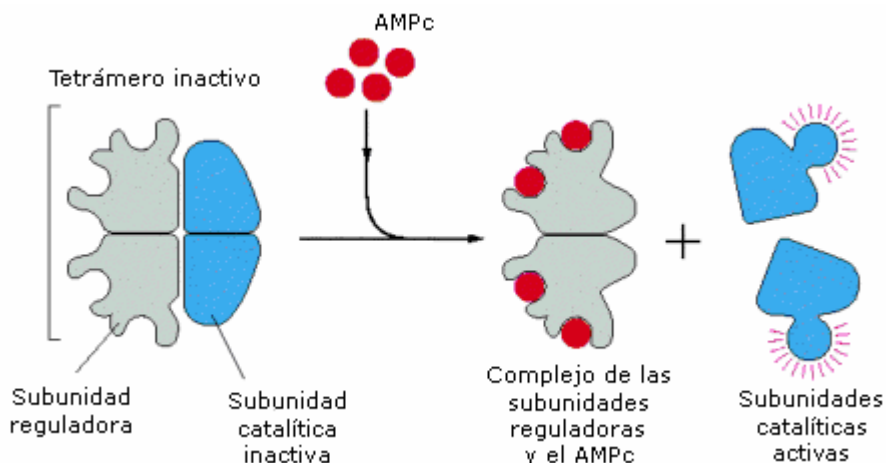
Figura 14: representación esquemática de las conexiones entre las proteínas implicadas en la regulación de la actividad del ER α por la vía de los receptores de la PKC.



Regulación por proteína quinasa A

La proteína-quinasa activada por AMP cíclico (AMPc) o PKA, es una serín-treonín-quinasa que se activa ante los estímulos que desencadenan un aumento de la concentración intracelular de AMPc (**figura 15**).

Figura 15: mecanismo de regulación de la PKA. La PKA es en realidad un tetrámero compuesto por dos unidades reguladoras y dos catalíticas. En su estado inactivo el tetrámero permanece unido hasta que la unión de varias moléculas de AMPc desencadena la disociación del mismo, liberándose las subunidades catalíticas que son las encargadas de continuar con la transducción de la señal (4).



La PKA, en su estado activo, es capaz de fosforilar in vitro e in vivo varios residuos de Ser del ER α activando la transcripción mediada por él (62). Algunos de los residuos, S104, S108 y S118, son también fosforilados por otras vías (63), sin embargo, la PKA es capaz de fosforilar en exclusiva el residuo S236 (36) cuya mutación hace perder la capacidad de activar la transcripción mediada por el ER α en respuesta a estímulos de AMPc (36;62). También existen diferentes versiones sobre el papel de esta fosforilación, en este caso, la discrepancia subyace en si las fosforilaciones son capaces de activar el receptor independientemente de ligando o bien potencian la activación del receptor por su ligando (36;63).

Además de la fosforilación directa se han descrito otros dos caminos de actuación de la PKA sobre la actividad del ER α (63). El primero de ellos supondría la fosforilación de algún cofactor que activara al ER α ; el segundo de ellos implicaría los efectos mediados por el factor de transcripción CREB (63).

Las vías de regulación se relacionan entre ellas

Como se vio en apartados anteriores, existen conexiones entre varias de las vías de activación del ER α , pero la regulación del receptor por estas vías posee un grado de complejidad aún mayor, ya que la presencia del E2 es capaz de estimular la actividad de algunas de las vías que se han nombrado anteriormente que, a su vez, regulan la actividad del receptor de estrógenos. Se sabe que:

- El E2 es capaz de activar la vía de las MAPKs y este efecto es bloqueado por antiestrógenos (15;23;57;82).

- El E2 aumenta la actividad de la vía PI3K/Akt (63;83).
- Tratamientos con E2 activan la PKA mediante el aumento de los niveles de AMPc (58;63).
- El E2 es capaz de estimular la producción de EGF en células mamarias (16).
- Cuando se usa una dosis elevada de EGF, los efectos de éste, pueden llegar a ser sinérgicos con los del E2 (62).
- Anticuerpos contra el EGF-R atenúan la respuesta a E2 y la adición de antiestrógenos es capaz de reducir la respuesta a EGF (16;24).

Todos estos datos se relacionan en la bibliografía con la población de ER α no nuclear, complicando más aún el estudio de la regulación del receptor, ya que indican que el propio receptor, cuando es activado por su ligando natural, es capaz de activar otras vías de proliferación celular que, además de promover la proliferación celular, son capaces de activarle a él mismo. Este cruce de rutas pone de manifiesto una nueva función del ER α que es la activación de rutas implicadas en la proliferación celular ante estímulos estrogénicos de una manera "no genómica" que implicaría la intervención de la población no nuclear del ER α y la existencia de interacciones directas entre el propio receptor y proteínas clave de otras rutas de transducción.

Finalmente, como se ha visto a lo largo de estos apartados, la regulación del ER α es sumamente compleja y está sometida a numerosas controversias todavía sin aclarar.

La tirosín-quinasa Src

La quinasa *Src* es una de las tirosín-quinásas más conocidas y estudiadas por su relevante posición en numerosas vías de transducción celular y su papel como proto-oncogen. Pertenece al grupo de tirosín-quinásas sin función de receptor de membrana (84), y es la cabeza de una serie de quinásas denominada "quinásas de la familia *Src*", integrada por otras 8 proteínas más: *Blk*, *Fgr*, *Fyn*, *Hck*, *Lck*, *Lyn*, *Yes* e *Yrk*.

El origen de su estudio (85;86) se remonta a principios del siglo XX, a los experimentos llevados a cabo por Peyton Rous (**figura 16**). Los experimentos de Rous dieron como resultado el descubrimiento del primer virus animal capaz de provocar la aparición de tumores, dicho virus se denominó "*virus del sarcoma de Rous*" en su honor. Mucho tiempo pasó hasta que en la década de 1970 se supo que el agente causante de la transformación de las células infectadas era una proteína, que se denominó *Src*. En 1976, se descubrió que en las células no infectadas por el virus esta proteína también estaba presente, por lo que a partir de entonces, se empezó a hablar de *v-Src* para referirse a la proteína de origen vírico y *c-Src* para hacerlo sobre la celular. Este hallazgo fue de vital importancia ya que supuso el descubrimiento del primer proto-oncogen. Sobre 1980 se descubrió que *Src* era una proteín-quinasa que en principio se pensó que fosforilaba residuos de treonina, sin embargo, pronto se vio que lo hacía en residuos de tirosina. Con los avances de la bioquímica y la biología molecular y celular, pronto se vio que la quinasa *c-Src* (en adelante sólo *Src*) estaba implicada en numerosas vías de transducción de señales, y que alteraciones en su actividad o regulación, estaban presentes en numerosos tumores (84,87-89).



Figura 16: Peyton Rous (1879-1970), fue galardonado en 1966 con el Premio Nobel de Medicina por "sus descubrimientos en los virus inductores de tumores".

El gen y la proteína

El gen que codifica para la quinasa *Src* se encuentra en el cromosoma 20 y se compone de 11 exones que se extienden a lo largo de 19.5 Kb (90;91). La proteína-quinasa *Src* es un prototipo de proteína modular, su estructura está compuesta por varios dominios (**figura 17**), claramente diferenciados y caracterizados que están repetidos en otras muchas proteínas. En la actualidad no se dispone de la estructura tridimensional de la quinasa completa, sólo de parte de la misma (92).

Figura 17: esquema de los dominios que forman la quinasa *Src*. Los números de la parte inferior indican la numeración dentro de la secuencia de aminoácidos según la numeración de la quinasa humana (76).

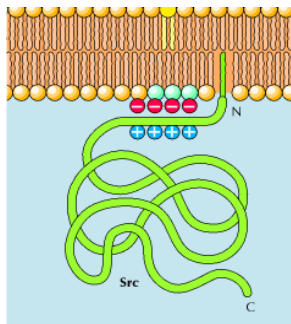
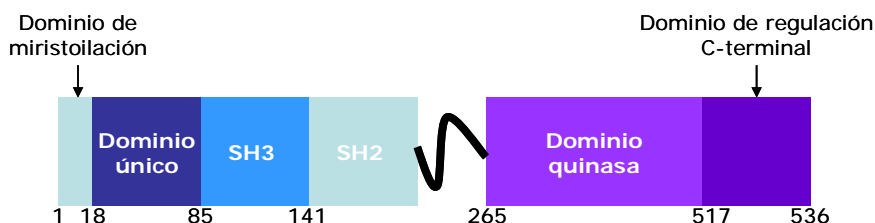


Figura 18: la miristoilación es una modificación postraduccional típica en que un residuo de Gly reacciona con un grupo mirístico. Esta modificación permite a la proteína final anclarse a membrana a través del ácido graso (80). En el caso de la quinasa *Src* varios residuos básicos de la cola N-terminal forman interacciones electrostáticas con los lípidos de la membrana facilitando el anclaje en la misma (93).

La proteína está compuesta por 536 aminoácidos y tiene un peso molecular de 60 KDa por lo que en ocasiones es nombrada como p60^{src}. Su estructura terciaria se divide en 6 dominios (**figura 17**) (92-97) si bien, el primero y el último, no cumplen en realidad la definición de dominio y en ocasiones se nombran aparte. Estos seis dominios son los siguientes:

- **Dominio de miristoilación:** también es llamado en ocasiones SH4 (por "*Src* homology domain 4", dominio de homología a *Src* número 4), en el se encuentra un sitio de miristoilación (**figura 18**) (98) en el residuo Gly1. A través de esta modificación postraduccional la quinasa se asocia a la cara interna de la membrana citoplasmática.
- **Dominio único:** es propio y único de la quinasa *Src* y no encuentra homología con las otras quinasa que integran

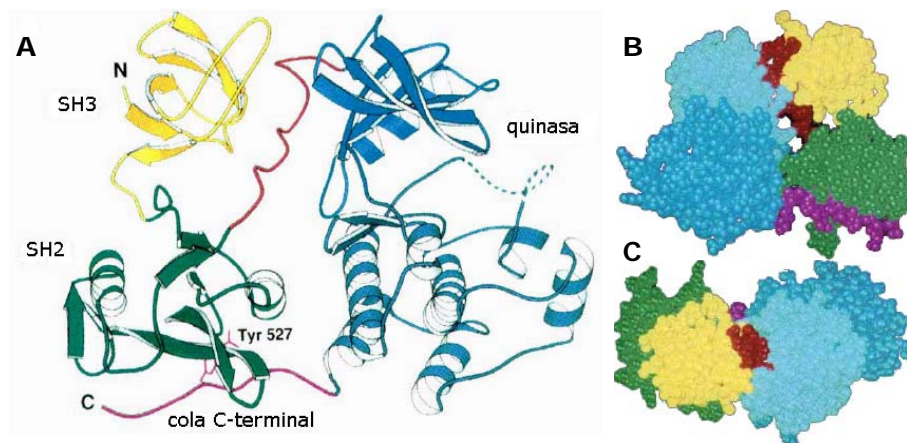
la familia, en este dominio se encuentran diversos residuos importantes en la interacción con otras proteínas.

- **Dominio SH3:** es un dominio implicado en interacciones proteína-proteína capaz de unirse a secuencias amonoacídicas ricas en residuos de prolina y que adopten estructura en forma de hélice (hélices de poliprolina). Es un dominio globular formado por un barril β consistente en 5 hojas β antiparalelas (**figura 19**). En uno de sus lados contiene una hendidura hidrofóbica que es donde se realiza el contacto con las hélices de poliprolina.
- **Dominio SH2:** dominio implicado en la interacción con residuos de tirosina fosforilados. Su estructura secundaria se basa en una hoja β central con una hélice α empaquetada a cada uno de sus dos lados (**figura 19**). Esta estructura forma dos sitios de unión dentro del dominio: el primero de ellos se encarga de reconocer y unir los residuos de tirosina fosforilados y está altamente conservado; el otro sitio de unión se encarga de reconocer los residuos que rodean al de tirosina fosforilado. Este último sitio está menos conservado entre las distintas proteínas que poseen el dominio SH2, y permite cierto grado de variedad en las interacciones entre este dominio y las proteínas que reconoce.
- **Dominio quinasa:** también llamado en ocasiones dominio SH1. Está muy conservado entre las proteínas de la familia e incluso entre las quinasas en general. Es un dominio globular que presenta la estructura bilobular típica de muchas quinasas estando localizado el centro catalítico en el hueco entre ambos lóbulos (99). El lóbulo N-terminal es el más pequeño y presenta una estructura formada por cinco láminas β y una hélice α ; el C-terminal presenta una estructura mayoritariamente con forma de hélice α (**figura 19**). Dentro de este dominio se

encuentra el residuo Tyr 418, residuo clave para la actividad de la quinasa como se verá en apartados posteriores.

- **Cola C-terminal:** está compuesta por los pocos aminoácidos que se encuentran después del segundo lóbulo del dominio quinasa. A pesar de esto, en ella se encuentra situado el residuo Tyr 529, residuo de tirosina altamente conservado e implicado en la regulación de la quinasa. Los últimos 19 residuos C-terminales de la *c-Src* están sustituidos por 12 diferentes en la proteína vírica (*v-Src*) constituyendo esto la mayor diferencia estructural entre ambas. Esta diferencia acarrea importantes consecuencias en la actividad de la quinasa.

Figura 19: diagrama de cintas que muestra la estructura tridimensional de la quinasa *Src* (A). Vista frontal (B) y apical (C) de la misma quinasa representada como diagrama de bolas (92). Los distintos dominios se muestran en diferentes colores. Los dos lóbulos del dominio quinasa se representan en dos tonos distintos de azul.



Expresión y supresión génica

La importancia de de la quinasa *Src* como punto clave en numerosas vías de regulación y transducción de señales hace que su expresión sea ubicua, si bien, hay tipos de células en los que es más importante como en el caso de neuronas, fibroblastos y plaquetas (76; 93; 100).

Los ratones que han sufrido la supresión génica de la quinasa *Src* son viables pero mueren a las pocas semanas de **osteopetrosis** severa (85;101). Hoy se sabe que la

ausencia durante el desarrollo de la quinasa *Src* puede ser suplida en el resto de tejidos diferentes al óseo por otras quinastas de la familia, como son *Fyn* y *Yes*. De hecho, ratones con doble supresión génica para *Src/Fyn* o *Src/Yes* mueren antes de nacer y los triples mueren en las primeras etapas del desarrollo (102).

La **osteopetrosis** se origina por fallos en la actividad de los osteoclastos los cuales son necesarios para la resorción ósea. Ante estos fallos los huesos crecen de manera desorbitada invadiendo la médula ósea y disminuyendo la producción de células sanguíneas.

La quinasa *Src* es una tirosín-quinasa que cataliza la fosforilación específica de residuos de tirosina de las numerosas proteínas que son sustrato de ella. Su papel fundamental se centra en vías de transducción de señales en las que participa formando parte de las cascadas de fosforilación/desfosforilación que llevan la señal desde la membrana hasta sus efectores finales dentro del citoplasma y/o el núcleo (93;95;103-105). Su papel en la regulación de la proliferación es así mismo muy importante ya que es capaz de activar numerosas vías de proliferación (93;95;103), pudiendo su bloqueo incluso causar la parada del ciclo celular (17). También es importante para aumentar la adhesión y regular la migración en fibroblastos, favorecer la maduración de neuronas o evitar la apoptosis ante la irradiación o la privación de citoquinas en fibroblastos y algunas células hematopoyéticas (76).

Función

La quinasa *Src* puede adoptar dos conformaciones muy relacionadas con su actividad (76;93;95), la primera de ellas es la denominada **conformación abierta**. La adopción de esta conformación es requisito necesario para que la quinasa sea activa ya que en ella los diferentes dominios están accesibles para las proteínas sustratos y permite las interacciones necesarias entre la quinasa y

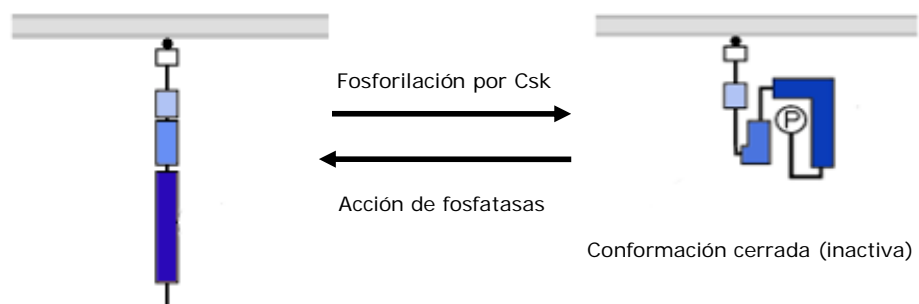
Regulación

diferentes proteínas a través de sus dominios SH2 y SH3. La otra conformación es la denominada **conformación cerrada**, inactiva y en la que la proteína sufre una serie de interacciones intramoleculares que mantienen tanto su centro activo con sus dominios de interacción SH2 y SH3 inaccesibles.

Además de la adopción de una de las conformaciones, existen dos residuos clave, que son, según la numeración de la quinasa *c-Src* humana, el **Y529** y el **Y418** (93;95). El residuo **Y529** es fosforilado por la quinasa Csk y desfosforilado por fosfatasas (18) (**figura 20**); esta fosforilación es responsable de la inactivación de la quinasa *Src*, ya que el residuo de fosfotirosina resultante interactúa con el dominio SH2 de la propia quinasa haciendo que la quinasa adopte la conformación cerrada, inactiva (97). Esta interacción intramolecular se acompaña por otra en la que la secuencia que conecta el dominio SH2 con el dominio quinasa es capaz de adoptar una disposición que le permite interactuar con el dominio SH3 (92;97). La mutación de este residuo Y529 (93;95) o su desaparición como en el caso de la *v-Src* origina quinasas constitutivamente activas.

Por otro lado, el residuo **Y418** es un lugar de autofosforilación (93;95;97) de la propia quinasa y su fosforilación es requisito necesario para que la misma sea activa.

Figura 20: la fosforilación de la Y529 por la quinasa Csk hace que la quinasa pase a una conformación cerrada la cual no es activa



Relación entre cáncer de mama, ER α y Src

El 70-80% de los tumores de mama expresan el ER α y por ello se consideran ER α positivos. La pérdida de su expresión y/o actividad suele acompañarse de la pérdida de la hormonodependencia y de la adquisición de un fenotipo más agresivo (9-13).

El aumento de la actividad de la quinasa Src, bien por una mayor expresión de la misma o por un aumento en la actividad propiamente dicho, se presenta también en un elevado porcentaje de los tumores de mama (87-89; 103; 106; 107). Además la quinasa Src está implicada en la ruta del EGF-R, ruta de gran importancia en el estudio del cáncer de mama (72; 73; 105; 107-111).

Ambas proteínas son pues importantes en el desarrollo de los tumores de mama, pero hasta la fecha no se ha aclarado la relación entre ellas, así como el verdadero papel que cada una juega en la adquisición del fenotipo hormonoindependiente.

La mayoría de los estudios sobre la fosforilación del ER α han tratado sobre su fosforilación en residuos de serina, de hecho, en un principio se pensaba que el ER α sólo se fosforilaba en este tipo de residuos (112; 113), por lo que tradicionalmente se le ha dado más importancia a este tipo de fosforilación.

Hoy se conoce que el ER α es fosforilado en residuos de tirosina, en concreto en su residuo tirosina 537, por tirosín

quinasas de la familia de la quinasa Src (36;114-117;121), habiendo sido posible en algunos casos concretos la coinmunoprecipitación del receptor con la propia quinasa Src (16;118).

Aunque está plenamente aceptado que la fosforilación en tirosinas ocurre, el efecto de esta fosforilación, como en menor medida ocurre con la fosforilación en residuos de serina, es objeto de mucha controversia (36), ya que no hay datos concluyentes para otorgarle un papel claro a la misma. El resultado más aceptado es que la fosforilación del residuo Tyr537 es condición *suficiente pero no necesaria* para facilitar la unión del E2 al ER α (116) y promover la proliferación de las células (64).

El hecho que la fosforilación sea *condición suficiente* para mejorar esta unión, está corroborado por datos estructurales que demuestran que la fosforilación del residuo Y537, posibilita la formación de interacciones favorables en el lugar de unión del ligando que hacen más propicia la unión del E2 (119). Además, la mutación del residuo Y537, por aminoácidos de carácter ácido (Asp y Glu), que mimetizan la carga negativa que origina la fosforilación, origina receptores constitutivamente activos (6;120).

El que la fosforilación no sea *condición necesaria* para la unión del E2, lo demuestra la mutación Y537F, que impide la fosforilación del residuo, pero origina mutantes del ER α cuya capacidad de unir E2 no se ve alterada (119). Sin embargo, hay otros estudios que defienden que el ER α silvestre es capaz de unir 10 veces más eficientemente E2 que el mutante Y537F (116), por lo que la afinidad del receptor por su ligando sí se vería alterada, si bien este cambio se puede deber a la menor estabilidad del mutante (121).

Además del papel que puede jugar en la afinidad por el ligando, el papel de esta fosforilación sobre la afinidad del ER α por las secuencias ERE es otro punto de discrepancia, ya que hay autores que estiman necesaria la fosforilación del residuo Y537 para la unión a estas secuencias (114), y la homodimerización del ER α (115) hecho que demuestran bloqueando estos efectos con péptidos fosforilados en residuos de tirosina (115). Por el contrario, existen otros estudios que demuestran que el mutante Y537F conserva intacta su capacidad de unión a las secuencias ERE (121) por lo que la fosforilación no sería necesaria ni para la homodimerización ni para la unión a sus secuencias diana en el ADN.

También existen resultados que relacionan directamente la quinasa Src con la activación del receptor, pero de una manera indirecta e independiente de ligando, es decir, sin que exista fosforilación en tirosinas del ER α (75), por lo que la fosforilación en tirosinas del receptor sería irrelevante.

Por otro lado, existen datos que indican que el tratamiento con E2 es capaz de activar a la quinasa Src (122) y que esta activación aumenta la fosforilación en tirosinas del ER α de una manera rápida y transitoria que, además, es bloqueada por antiestrógenos (123).

Finalmente, además de la relación directa entre ambas proteínas, la compleja regulación del ER α , el papel de la quinasa Src en otras importantes vías de transducción de señales que acaban en la activación del ER α (ver **figura 12**) y su papel como proto-oncogen, capaz de provocar por sí mismo la transformación y consiguiente proliferación de las células (95;124), complica el estudio de su relación.

En este contexto de controversia, en donde ni el papel de la fosforilación, ni sus consecuencias están aclaradas, es

donde surge el presente trabajo que trata de aclarar en primer lugar, la relación que existe entre ambas proteínas, Src y ER α para, posteriormente, encontrar el papel que juegan ambas en la transición de células de cáncer de mama hacia un fenotipo hormono independiente.

La necesidad de aclarar las discrepancias existentes, así como el escaso número de resultados que abordan la implicación de la quinasa Src en la adquisición de la hormono independencia, justifican el desarrollo del presente estudio.



El **objetivo general** del presente trabajo es aclarar la relación entre la quinasa *Src*, el ER α y la adquisición de un fenotipo hormonoindependiente dentro del contexto de los tumores de mama. Para llevar a cabo este objetivo general el trabajo se desarrollará buscando los siguientes **objetivos específicos**:

1. Generar y caracterizar un modelo de estudio adecuado a partir de las células de carcinoma de mama humano MCF7.
2. Estudiar la expresión y actividad del ER α como principal regulador de la respuesta a hormonas tanto en el nuevo modelo celular como en las células MCF7.
3. Descubrir los posibles mecanismos que expliquen los fenómenos encontrados.
4. Estudiar la proliferación en función de la dependencia de estrógenos de los diferentes modelos celulares obtenidos.

Resultados

3

Generación de las líneas MCF7src

La línea celular MCF7 es una de las más usadas para los estudios relativos al cáncer de mama y constituye un modelo para los estudios relacionados con esta enfermedad. Esta línea procede de un adenocarcinoma humano de mama, concretamente de un tumor secundario originado por metástasis en la pleura (125). Es una línea celular epitelial que crece adherida a la superficie de cultivo y que, a pesar de ser una línea transformada, conserva características propias del epitelio mamario, como su dependencia de los estrógenos como mitógenos (126).

Las células MCF7 presentan una expresión basal de la quinasa *c-Src* (127) detectable mediante inmunoblot usando anticuerpos específicos frente a la misma (**figura 21**).

Uno de los objetivos del presente estudio ha sido generar, a partir de la línea celular MCF7, un modelo celular en el cual una isoforma constitutivamente activa de la quinasa *c-Src* estuviera presente de forma estable. Esta situación, en la cual la quinasa está presente de manera constitutivamente activa, pero no excesivamente sobreexpresada, es una de las condiciones típicas en las que se presenta el cáncer de mama (73;128).

Para conseguir el nuevo modelo celular que expresara las quinasa *c-Src* constitutivamente activa se decidió transfectar establemente células de la línea MCF7 con un mutante constitutivamente activo de la quinasa *c-Src* de ratón, concretamente el Y534F (95). Dicha tirosina es la equivalente a la Y529 en la quinasa humana y es, en

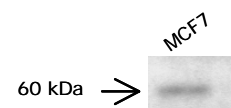


Figura 21: inmunoblot de un extracto celular total procedente de células MCF7 cultivadas en medio DMEM con rojo fenol tras una inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-*Src*.

El ADNc que codificaba para la expresión de la quinasa *Src* Y534F de ratón estaba clonado dentro de un plásmido que contenía también el gen de resistencia a geneticina. Este plásmido se transfectó mediante el uso de Superfect en células MCF7. Como control para seguir el proceso de selección, se utilizó una construcción que codificaba para la proteína fluorescente verde de intensidad aumentada (EGFP). Tras realizar la transfección, se llevó a cabo un proceso de selección por presión selectiva con 0.4 mg/ml de geneticina. Tras este proceso se consiguió aislar dos clones de la línea establemente transfectada con EGFP y seis de la línea transfectada con el mutante de la quinasa *Src*.

Con el fin de conocer si el proceso de selección había modificado la morfología de las células se analizaron con detenimiento todos los clones obtenidos mediante el uso de microscopía visible y no se detectó ninguna anomalía o cambio aparente en la morfología de los mismos con respecto a la línea parental MCF7 (**figura 24**).

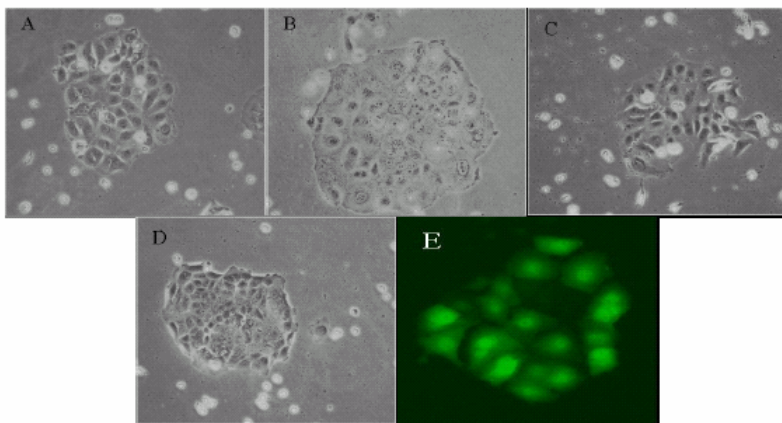
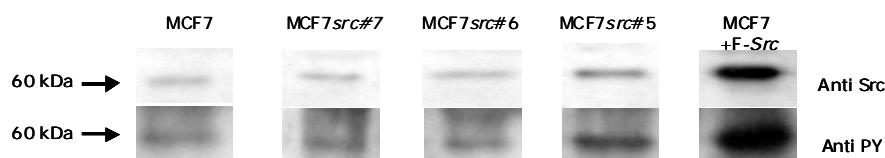


Figura 24: imágenes obtenidas mediante microscopía visible de los clones #3 (A), #5(B), #6 (C) y #7 (D) de la línea MCF7src y del clon #3 (E) de la línea control transfectada con EGFP, obtenida mediante microscopía de fluorescencia.

La nueva línea estable que expresaba la quinasa *Src* constitutivamente activa se denominó MCF7src, y los clones se numeraron sucesivamente como MCF7src#i donde "i" representa el número del clon.

Los seis clones de línea MCF7src obtenidos se analizaron para buscar aquel que presentara una mejor relación expresión/actividad de *Src*. Con este fin, se obtuvieron extractos celulares que fueron analizados mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo frente a la quinasa *Src*. De esta manera se determinó la expresión a nivel de proteína de la quinasa (**figura 25**). Para establecer su nivel de actividad de una manera sencilla, se decidió estudiar la fosforilación en tirosinas de la propia quinasa, ya que para que la quinasa esté activa, requiere la autofosforilación de su Y423 (Y418 en la *Src* humana) (95,129). Para realizar esta medida se eliminaron los anticuerpos del anterior blot y se volvió a inmunomarcarse éste, usando como anticuerpo primario un anti-fosfotirosina (anti-PY) (**figura 25**).

Figura 25: inmunoblots de algunos de los clones estudiados así como de la línea parental MCF7 sin transfectar (primera columna) y transfectada transitoriamente con la quinasa (mutante constitutivamente activo, marcado como F-*Src* en la figura) (última columna), ambas como controles. En todos los casos se partió de la misma cantidad de proteína total. En la primera fila de bandas se muestra la expresión total de quinasa *Src* obtenida con un anticuerpo frente a la propia quinasa (anti-*Src*), mientras que en la segunda fila se muestra los resultados obtenidos para esas mismas muestras con un anticuerpo anti-fosfotirosina (anti-PY).



A continuación, y comparando los resultados de uno y otro blot para todos los clones, se seleccionó para su posterior estudio el clon número 5 (MCF7src#5) ya que era el que presentaba una mejor relación de expresión/actividad.

Con el fin de comprobar la expresión en la línea MCF7src de la quinasa con la que fue transfectada establemente, se realizó una PCR, en la que, usando cebadores específicos para amplificar el gen de la quinasa insertado, se comprobó la presencia de la misma a nivel de ARNm. Para diseñar estos cebadores se alinearon las secuencias nucleotídicas de la quinasa humana y de ratón usando la herramienta PALIGN (<http://fasta.bioch.virginia.edu/>) que usa motivos locales como ventana para realizar el alineamiento. Una vez

Por simplificación del texto, a partir de este punto al hacer referencia a la línea MCF7src siempre se estará hablando de este clon, el MCF7src#5, a no ser que se indique lo contrario.

realizado el alineamiento, se buscó una zona del mismo en donde ambas secuencias no alinearan, de manera que usando cebadores que hibridaran en ese tramo de la secuencia sólo se amplificara mediante la reacción de PCR la secuencia de la quinasa transfectada establemente (de ratón) y no la endógena (humana). En la **figura 26** se muestra como los cebadores usados son capaces de amplificar las muestras tanto de la línea MCF7src, como la del control positivo en la que se usó como molde la construcción purificada donde estaba subclonada la quinasa. Sin embargo los cebadores fueron incapaces de amplificar la muestra proveniente de las células MCF7 (control negativo del ensayo). Este resultado pone de manifiesto que el gen del mutante Y534F de la quinasa *Src* de ratón se expresa en la línea MCF7src.

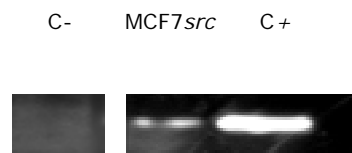


Figura 26: expresión del ARNm de la quinasa transfectada. La imagen representa el gel de agarosa del 0.6% donde se corrieron los productos de PCR tanto de la muestra de interés como los del controles negativo

Por último, para determinar si la quinasa transfectada se expresaba dando lugar a una proteína funcional, se decidió ver si era capaz de activar la vía de los STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription), ya que está documentado, por estudio previos (76;130-132), que la quinasa *Src* es capaz de estimular esta vía. Para ello, se transfectaron células MCF7 y MCF7src con una colección de construcciones que contenían un elemento de respuesta a los STATs fusionado al gen de la luciferasa. De esta manera, una activación de la vía STAT por la quinasa *Src* provocaría un aumento en la expresión de la luciferasa, fácilmente medible mediante el análisis de la luminiscencia

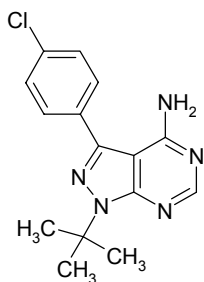
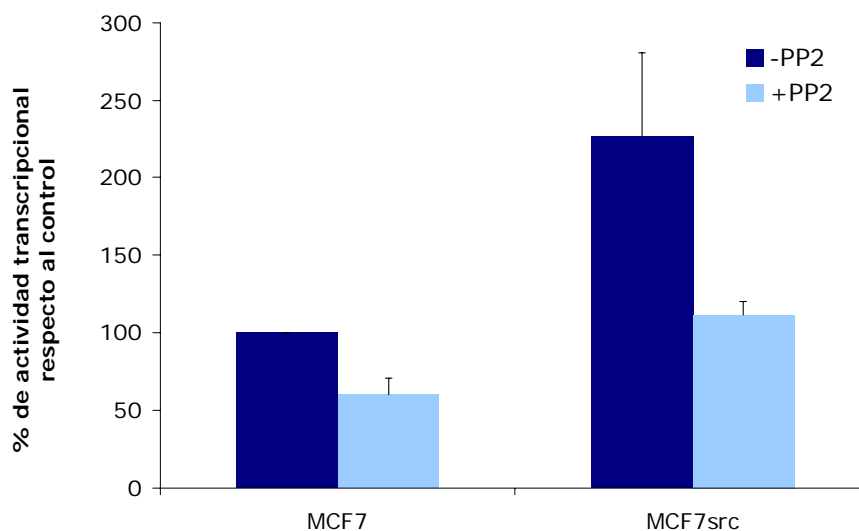


Figura 27: el PP2 (4-Amino-5-(4-clorofenil)-7-(*t*-butil)pirazol[3,4-d]pirimidina) es uno de los principales inhibidores de las tirosin quinasa de la familia *Src* por su gran especificidad (22-24).

de las muestras. En el mismo ensayo, y para corroborar que el aumento de la señal era debido de manera específica a la quinasa *Src*, se decidió usar un inhibidor específico de la misma, el PP2 (Calbiochem) (**figura 27**).

En la **figura 28** se observa como la línea MCF7src presenta una mayor actividad transcripcional, cercana a dos veces y media mayor, que la de la línea MCF7, que es fruto de la expresión basal de la quinasa endógena (*c-Src* humana), y siendo esta actividad inhibida por el PP2 en ambas líneas celulares. Estos resultados ponen de manifiesto que la diferencia en la actividad transcripcional entre ambas líneas se debe a una mayor actividad quinasa en las células MCF7src atribuible a la quinasa establemente transfectada.

Figura 28: medida de la actividad transcripcional de las células MCF7 y MCF7src, en presencia o ausencia de PP2 (10 nM). Las señales provenientes del luminómetro fueron normalizadas frente a la cantidad de proteína total de los extractos para cada y representadas de manera relativa a la muestra MCF7 en ausencia de PP2 (señal control).



Por lo tanto, a través de la transfección y posterior selección de clones, se ha conseguido un nuevo modelo celular denominado MCF7src que expresa de manera estable y funcional la isoforma constitutivamente activa de la quinasa *Src*. La obtención de este modelo celular representa la consecución del primer objetivo propuesto y permite el desarrollo de los objetivos siguientes.

Las células MCF7src no responden a estradiol

Una vez creado el modelo celular de trabajo adecuado, y con el fin de aclarar si la quinasa *Src* influye sobre la actividad del ER α , el paso siguiente fue determinar si la expresión estable de la quinasa constitutivamente activa, alteraba la actividad del ER α .

En primar lugar, para comprobar si los distintos niveles de expresión/actividad de la quinasa *Src* vistos en los diferentes clones de la línea MCF7src (**figura 25**) se veían reflejados en un cambio de la respuesta estrogénica, se realizó un experimento en el que células MCF7 y diferentes clones de la línea MCF7src fueron transfectadas con una construcción marcadora que lleva el gen de la luciferasa bajo el control de una serie de elementos de respuesta a estrógenos o EREs, (**figura 29**) (39). Este ensayo sirvió además como **control de selección** (ver nota al margen).

Las células fueron transfectadas con la construcción anteriormente citada y denominada ERE-Luc y crecidas en presencia (E2, 1 nM) o ausencia de estrógenos durante 36 horas. Posteriormente, se hicieron los extractos celulares y se midió la actividad luciferasa, representando los resultados en la **figura 30**. En esta figura se puede ver que la línea MCF7 presenta una clara respuesta a estradiol tal y como estaba documentado previamente (39). Esta respuesta es menor en los diferentes clones analizados de la línea MCF7src, los cuales se comportan de manera homogénea. También se puede observar la existencia de una correlación entre el nivel de expresión/actividad de la quinasa *Src* y la pérdida de esta respuesta a estradiol.

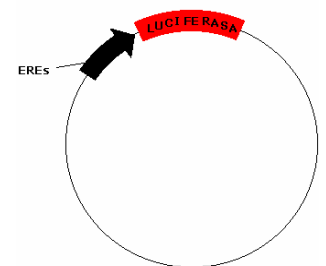
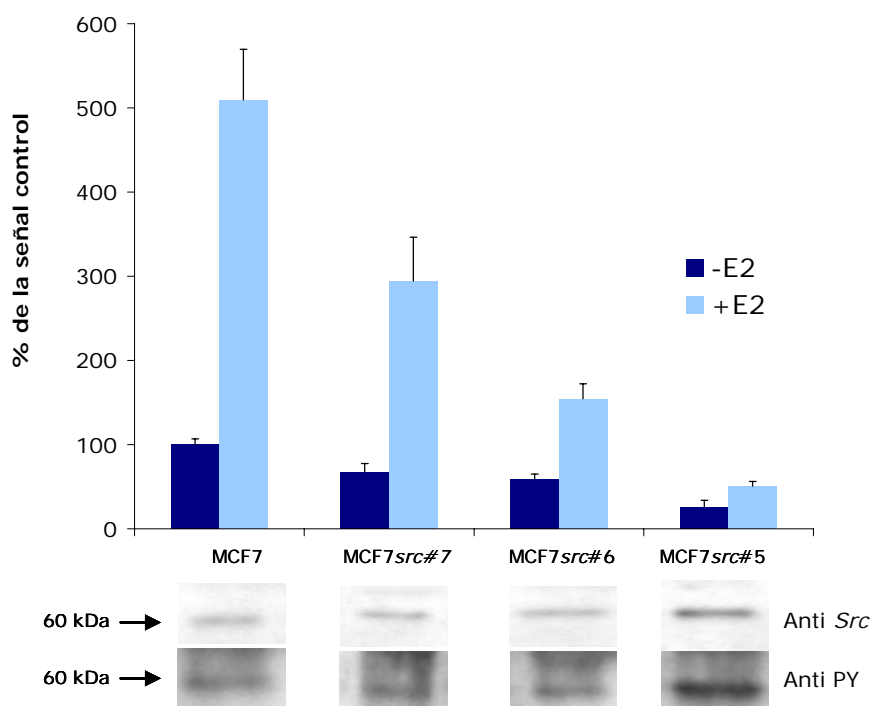


Figura 29: imagen esquemática de la construcción denominada ERE-Luc. La flecha negra indica la posición de los elementos ERE y el fragmento rojo la del ADNc que codifica para la expresión de la luciferasa.

Control de selección: en el caso de que los clones no se comportaran de la misma manera, la variación de la respuesta se puede atribuir a un artificio propio del proceso de selección clonal. Un comportamiento homogéneo de los clones indica que la selección se ha realizado con éxito.

Cuanto mayor es este nivel, menor es la respuesta a E2. Esto último se deduce de la comparación del gráfico de barras con el inmunoblot situado en la misma figura en el cual se muestran los niveles de expresión y autofosforilación de la quinasa *Src* para cada uno de los clones. Esta correlación se puede hacer extensiva a la respuesta basal en ausencia de estrógenos la cual es también menor conforme el nivel de expresión/actividad es mayor.

Figura 30: respuesta estrogénica medida mediante la construcción ERE-Luc. El gráfico de barras muestra los resultados de normalizar la señal de la actividad luciferasa con respecto a la concentración de proteína total de cada muestra, a continuación todos los valores se relativizaron frente al de las células MCF7 en ausencia de estrógenos (señal control) al que se le otorgó un valor arbitrario de 100. En la parte inferior del gráfico se muestra los inmunoblots de la figura 25 para su comparación con los valores obtenidos.



Estos experimentos ponen de relieve que la actividad del receptor de estrógenos en los diferentes clones de la nueva línea MCF7src está significativamente disminuída. En concreto, en el clon MCF7src#5, el cual se había seleccionado anteriormente para posteriores estudios, por su mayor relación expresión/actividad de la quinasa *Src*, la pérdida de actividad del receptor, medida como la falta de respuesta a estradiol, es de casi tres veces. Además, la respuesta basal en ausencia de estradiol en este clon, es también un 75% más baja que en las MCF7(**figura 31**).

Por lo tanto, la expresión de la isoforma de la quinasa *Src* constitutivamente activa ha modificado tanto la actividad basal del receptor como su respuesta a E2.

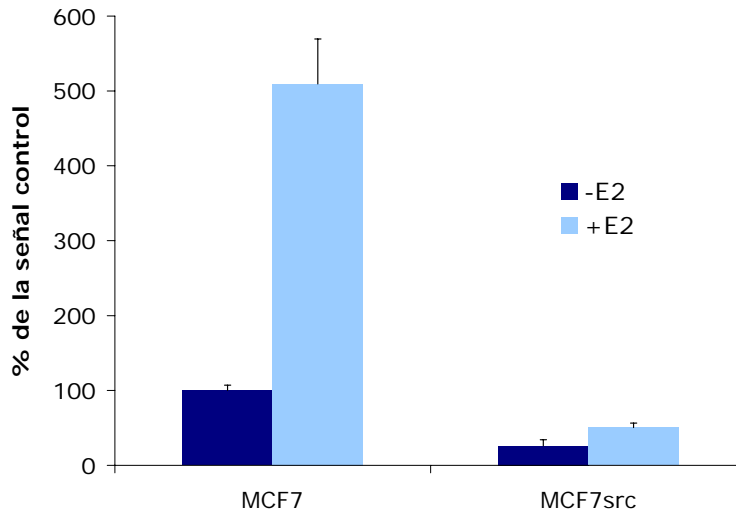


Figura 31: respuesta a la construcción ERE-Luc en las células MCF7 y MCF7src. En esta figura se representan los mismos datos de la figura 30 pero sólo se hace con la línea MCF7 y la MCF7src (clon MCF7src#5) para su mejor comparación.

Para demostrar que los resultados obtenidos eran mediados por el receptor de estrógenos, en un ensayo igual al anterior se añadió al medio de cultivo tamoxifeno (TXF) que, a una concentración de 0.05 μ M, bloqueó los efectos del estradiol. Como se observa en la **figura 32**, la actividad del ER α inducida por el E2 en las células MCF7, es bloqueada por el tamoxifeno. Por el contrario, el tamoxifeno no afecta la actividad basal del ER α presente en las células MCF7src.

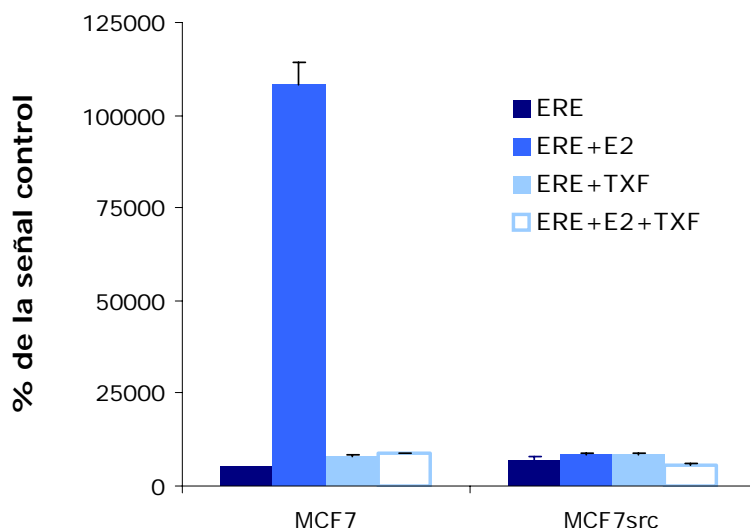
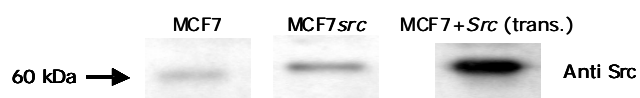


Figura 32: efecto del tamoxifeno. Las medidas de la actividad luciferasa se normalizaron frente a la concentración de proteína total del extracto y se representaron de manera relativa tomando como referencia la medida de las células MCF7 transfectadas únicamente con el elemento ERE-luc (nombrado como ERE en el gráfico).

Los resultados presentados hasta ahora demuestran que la transfección estable de células MCF7 con la forma constitutivamente activa de la quinasa *Src* disminuye la respuesta a E2. En estudios anteriores, se había visto que, por el contrario, células MCF7 transfectadas transitoriamente con la quinasa *Src* constitutivamente activa, presentan una mayor respuesta a los estímulos estrogénicos (75), sugiriendo diferencias fenotípicas importantes entre la expresión estable y la transitoria, probablemente debidas a los mayores niveles de expresión de *Src* en transfecciones transitorias. Para comprobar esta hipótesis, se estudió el nivel de expresión de la quinasa *Src* en las células MCF7, en la línea MCF7src y en células MCF7 transfectadas transitoriamente con la quinasa. (**figura 33**).

Figura 33: inmunoblots anti-*Src* de las células MCF7, MCF7src y de la línea MCF7 transfectada transitoriamente con la misma quinasa usada para la transfección estable.



De la cuantificación de la **figura 33** mediante la densitometría de las bandas obtenidas, se deduce que, el nivel de expresión de la quinasa alcanzado en las células transfectadas transitoriamente, es de más 100 veces mayor que en las células MCF7 sin transfectar, mientras que en las transfectadas establemente, es solamente unas 10 veces mayor que la basal. Este resultado pone de manifiesto que, tal y como se había propuesto anteriormente, las diferencias fenotípicas encontradas, pueden deberse a los distintos niveles de expresión de quinasa *Src* alcanzados .

Para determinar si efectivamente el aumento de la respuesta estrogénica documentado anteriormente (75), se debía a los niveles de sobreexpresión alcanzados por la transfección transitoria, se decidió realizar diversos

experimentos encaminados a estudiar el efecto, sobre la respuesta estrogénica, de la transfección transitoria en comparación con la estable .

En primer lugar, se comprobó si la transfección transitoria de la quinasa *Src* aumentaba la actividad transcripcional del ER α . Para ello, usando el reactivo Superfect, se transfectaron transitoriamente células MCF7 con la quinasa *Src* y la construcción ERE-Luc anteriormente citada y se compararon con células únicamente transfectadas con el elemento ERE-Luc. Los resultados obtenidos de la medida de la actividad luciferasa fueron normalizados frente a la concentración de proteínas total para cada muestra (**figura 34**). Estos, muestran que en efecto la transfección transitoria del mutante constitutivamente activo de la quinasa *Src* en la línea celular MCF7 produce un considerable aumento de la actividad transcripcional del ER α .

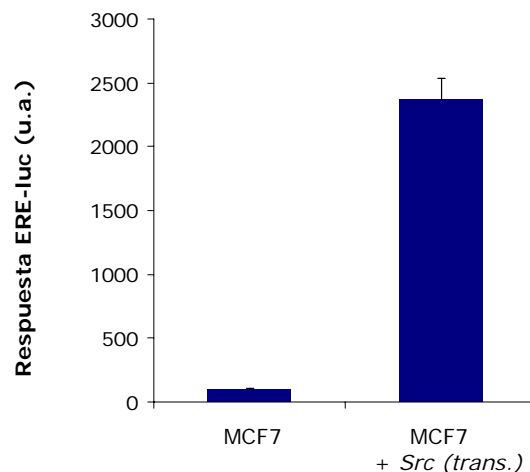
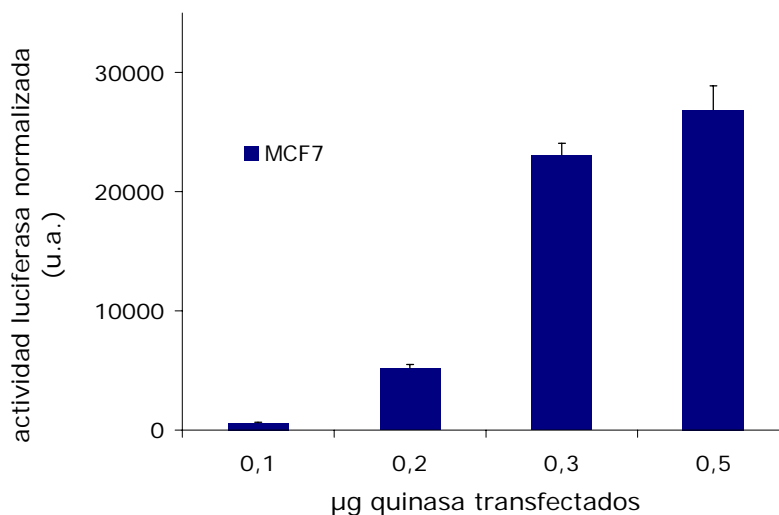


Figura 34: transfección transitoria con la quinasa *Src*. En el eje de ordenadas se muestra, en unidades arbitrarias, la actividad transcripcional, medida mediante el uso de la construcción ERE-Luc, normalizada frente a la concentración de proteínas de cada muestra.

Seguidamente, mediante la cotransfección de cantidades crecientes de quinasa *Src* con la construcción ERE-Luc, se comprobó que el aumento de la respuesta estrogénica, medida como aumento de la actividad transcripcional en respuesta al estradiol, es dependiente de la cantidad de

quinasa *Src* transfectada, con una saturación de la respuesta con 0.5 μg de quinasa (**figura 35**).

Figura 35: experimento dosis-respuesta. Las células fueron transfectadas en una placa de 24 pocillos con lipofectamina y las cantidades de quinasa mostradas en el eje de abcisas y una cantidad constante (0.3 μg) de la construcción ERE-Luc, se incubaron las células durante 36 horas, se realizaron los extractos celulares y se midió la señal luciferasa. La señal fue normalizada frente a la obtenida midiendo la actividad β -galactosidasa, cuya construcción fue cotransfectada en todos los casos y representada de manera relativa a la obtenida en las muestras sin quinasa transfectada.



Finalmente se comprobó que el efecto de subida de la respuesta estrogénica tras la transfección transitoria con la quinasa *Src* era temporal. Para ello se cotransfectó 0.3 μg de la quinasa constitutivamente activa y la construcción ERE-Luc en las células MCF7. A continuación, se comparó la respuesta con la obtenida en células MCF7src transfectadas únicamente con la construcción ERE-Luc en extractos celulares obtenidos a diferentes tiempos. En la **figura 36** se muestran los resultados obtenidos; en ella se puede observar como el aumento de la respuesta, inducido por la quinasa, desaparece a las 72 horas conforme la expresión de la quinasa, al ser una transfección transitoria, desaparece. Sin embargo, la señal en las células MCF7src, sólo transfectadas con la construcción ERE-Luc, no se ve alterada en el tiempo, de lo que se deduce, que el efecto de subida es un efecto temporal mientras que el de bajada lo es permanente.

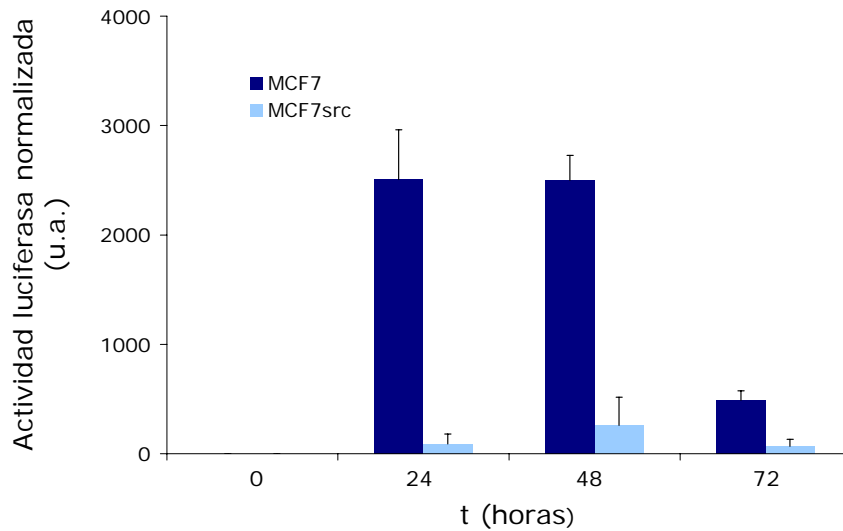


Figura 36: evolución temporal: tras la transfección se realizaron los extractos a las horas indicadas en el eje de abscisas. La señal fue normalizada frente a la obtenida midiendo la actividad β -galactosidasa, cuya construcción fue cotransfectada en todos los casos y representada de forma relativa a la señal e tiempo cero para la línea MCF7.

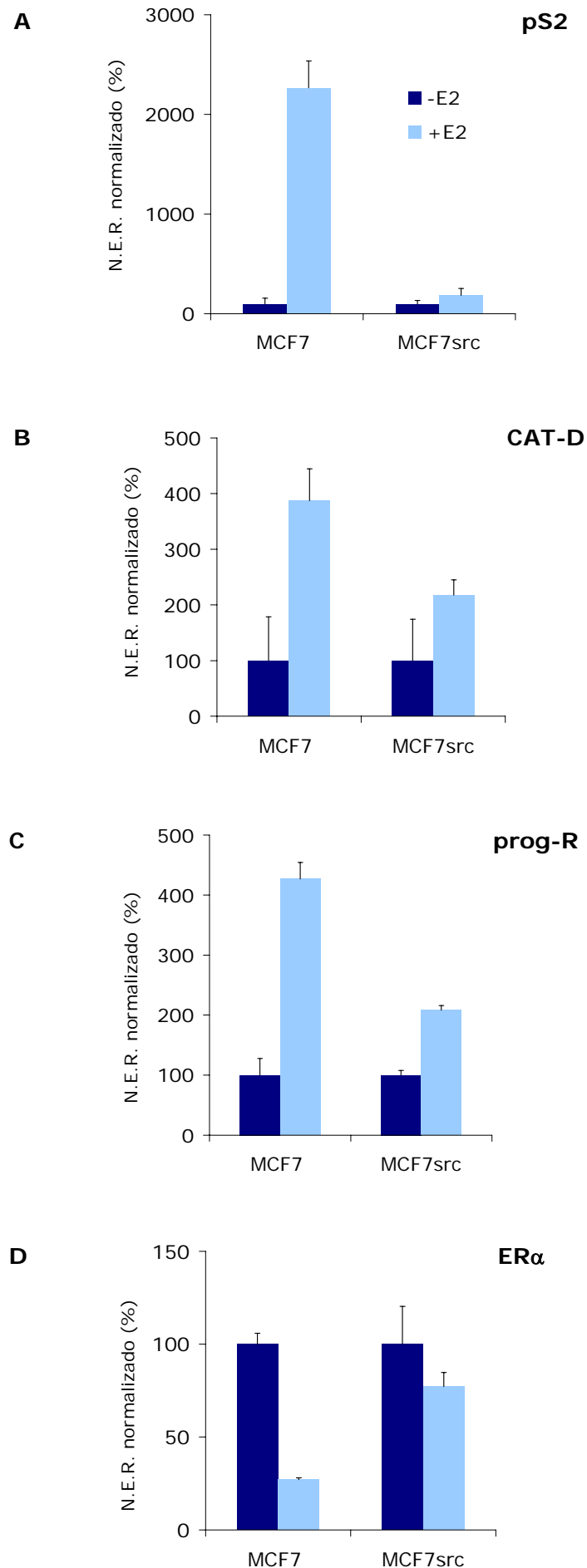
Con estos resultados (**figuras 33-36**) se demuestra que la diferencia hallada con estudios previos (75) a propósito del efecto de la quinasa Src sobre la actividad del ER α se debe a los niveles de expresión de la misma en los diferentes estudios. La validez del modelo de transfección estable frente al de transfección transitoria se discutirá posteriormente en el apartado de discusión.

Una vez que se ha comprobado que la expresión estable de la quinasa modificaba la actividad transcripcional del receptor de estrógenos alfa de manera permanente, y dada la importancia de este hecho, se decidió estudiar si el efecto observado con la construcción marcadora (ERE-Luc), se veía reflejado en cambios en la regulación de los genes endógenos regulados por estrógenos. Los genes regulados por estrógenos que se decidió estudiar fueron: el de pS2 (59;61), el del receptor de progesterona (58;136), el de la catepsina-D (59;60;137) y el del propio receptor de estrógenos (51-54;138). Para ello, se utilizó la técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real (25;26) que permite cuantificar de manera relativa la expresión del ARNm de un gen en diferentes muestras y/o condiciones experimentales (141).

La expresión de estos genes endógenos regulados por estrógenos es utilizada en clínica como marcador de la función del ER α y como indicador de respuesta ante terapias antiestrogénicas en tumores de mama.

Figura 36: resultados de las PCR cuantitativas. En los gráficos se representa el resultado de normalizar el nivel de expresión relativa (**N.E.R.**) de las muestras frente al de las células MCF7 sin E2 para los genes pS2 (**A**), catepsina-D (**B**), receptor de progesterona (**C**) y ER α (**D**).

El nivel de expresión relativa (**N.E.R.**) (139-141) representa cuantas veces es mayor la expresión de un gen en una muestra respecto a una muestra control cuyo N.E.R. es 1 por asignación.



Los datos obtenidos se muestran en la **figura 36**, en donde se representa el nivel de expresión relativa de cada muestra normalizado frente a la muestra control MCF7 sin tratar con E2. Como se puede ver en dicha figura, la adición de estradiol al medio de cultivo provoca el esperado aumento de la expresión de los genes pS2, catepsina D (CAT-D) y receptor de progesterona (prog-R), y un descenso en la expresión del ER α en las células MCF7, que es estadísticamente significativo en todos los casos (n=4, P<0.01). Esto concuerda con lo conocido sobre la regulación de estos genes (51-54; 58; 61; 138; 142).

Por el contrario, en las células MCF7src, se observa como la respuesta al estímulo por E2, medida como cambio en los niveles de expresión de los diferentes genes, es menor en todos los casos. No se produce ningún cambio significativo en la expresión de estos genes (n=4, P>0.1), salvo en el caso del receptor de progesterona (**figura 36c**), en donde a pesar de que el E2 provoca un aumento significativo en su expresión (n=4, P<0.01), dicho aumento es claramente menor que el que ocurre en las células MCF7.

La pérdida de la capacidad del estradiol de regular la expresión de los genes estudiados, así como los resultados del estudio mediante elementos ERE, pone de manifiesto que la expresión estable de la isoforma constitutivamente activa de la quinasa *Src* en las células MCF7src, modifica la actividad del ER α impidiendo que responda a los estímulos estrogénicos de la manera en que lo haría en las condiciones silvestres, representadas en todos los casos por los resultados de la línea MCF7.

Alteraciones en la expresión del ER α

Tras comprobar que la actividad del ER α estaba alterada en las células MCF7*src*, el siguiente paso fue estudiar el mecanismo molecular implicado. Para ello, se decidió investigar la expresión del receptor con el fin de hallar cualquier alteración en la misma que pudiera explicar este fenómeno.

En primer lugar, se estudió la expresión del ER α a nivel de proteína, para ello, se evaluó la cantidad de la misma a través de su detección, mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal anti-ER α , en extractos celulares de las líneas MCF7 y MCF7*src* (**figura 38**). El análisis de los inmunoblots obtenidos mostró que la expresión de la proteína del receptor era superior en las células MCF7*src*, y que este aumento en la expresión era revertido por la presencia de PP2 (10 nM), indicando así que este mayor nivel de expresión estaba mediado por la actividad de la quinasa (**figura 39**).

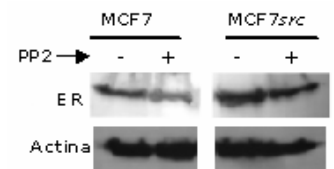


Figura 38: blot representativo de la acumulación del ER α en el que se cargó igual cantidad de proteína total en todas las calles. Se muestra así mismo el blot control con la banda obtenida con un anticuerpo contra la β -actina.

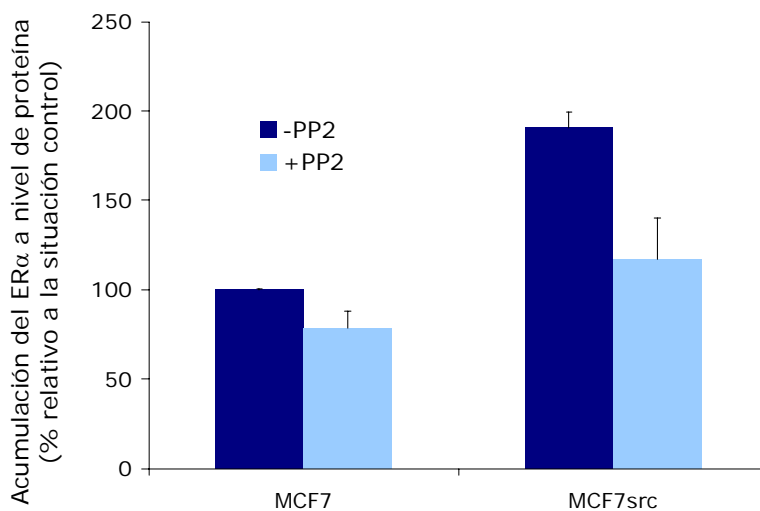
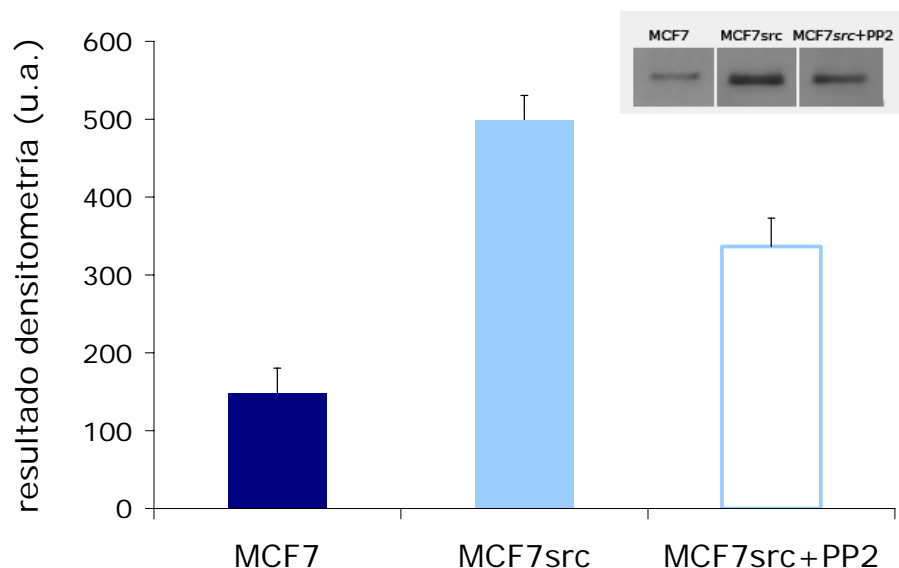


Figura 39: acumulación de proteína del ER α el gráfico representa el resultado de la densitometría de las bandas (n=3) obtenidas en los inmunoblots, los datos se representan de manera relativa al nivel de acumulación en las células MCF7.

Dada la mayor actividad de la quinasa *Src* en las células MCF7*src* y que el ER α es sustrato de esta quinasa (114;116;117;143), se planteó si además de acumularse la proteína, su nivel de fosforilación estaba también alterado en esta línea celular. Para estos estudios se inmunoprecipitó el ER α . La fosforilación en tirosinas del ER α inmunopurificado se evaluó mediante un inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina. La **figura 40** muestra que el nivel de fosforilación del ER α es más de tres veces mayor en las células MCF7*src*, y que esta fosforilación es mediada por la quinasa *Src* como demuestra su inhibición por PP2 (10 nM).

Figura 40: fosforilación en tirosinas del ER α . El gráfico muestra el resultado de la densitometría de las bandas (n=3) obtenidas tras realizar un inmunoblot usando un anticuerpo anti-fosfotirosina sobre los inmunopurificados usados en la **figura 38** y para una misma cantidad total de ER α . Junto al gráfico de barras se presenta uno de los inmunoblots obtenidos en el que se muestra el ER α fosforilado en tirosina detectado con anticuerpo anti-fosfotirosina.



Por lo tanto, la quinasa *Src* está provocando dos efectos sobre la proteína del ER α : en primer lugar, provoca un aumento de su fosforilación en residuos de tirosina y en segundo lugar, provoca un aumento de los niveles de proteína totales.

Para determinar si la acumulación de proteína se debía a una mayor cantidad de ARN mensajero se investigó,

mediante PCR cuantitativa, los niveles basales (en ausencia de estrógenos) del ARNm del ER α . Como se muestra en la **figura 41**, las células MCF7src presentan una expresión a nivel de mensajero aproximadamente 4 veces mayor (n=4, P<0.01) que la mostrada por las células MCF7.

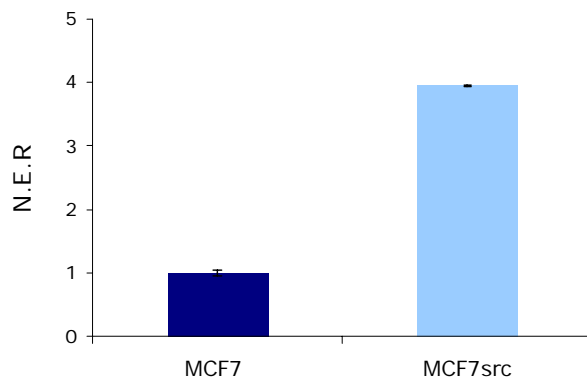


Figura 441: nivel de expresión relativo del ER α medido por PCR cuantitativa en las células MCF7 y células MCF7src.

A continuación se estudió si la mayor cantidad de ARNm del ER α en las células MCF7src, se debía a un aumento en la transcripción del gen del ER α . La estrategia experimental consistió en evaluar la actividad transcripcional del promotor del ER α . Para ello, se emplearon diferentes construcciones, en las que, fragmentos del promotor del ER estaban fusionados al gen de la luciferasa (**figura 42**) (142).

El promotor que se usó fue el promotor A ya que es el que presenta una mayor actividad en las células MCF7 (34).

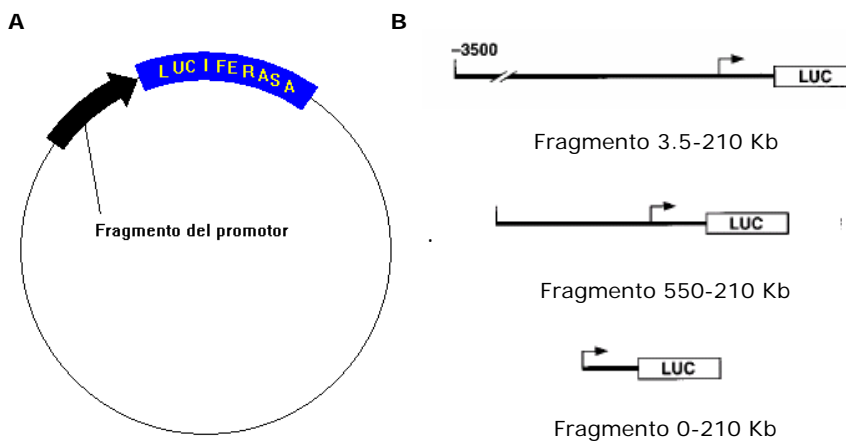
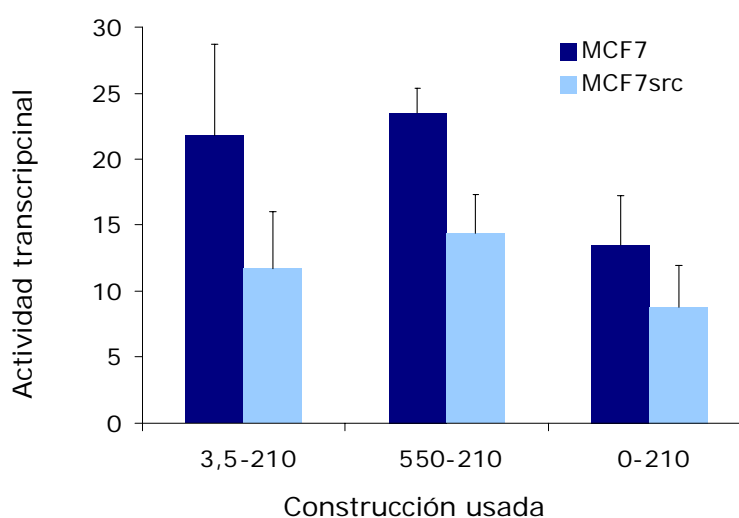


Figura 42: esquemas de las construcciones usadas. **A**, imagen tipo de los plásmidos usados. **B**, detalle de los fragmentos del promotor y su unión al gen de la luciferasa (142).

Usando estas construcciones se puede detectar cualquier variación en los niveles de expresión del ER α a nivel transcripcional, ya que ésta se vería reflejada en la expresión de la luciferasa. Las diferentes construcciones fueron transfectadas, usando el reactivo Lipofectamina 2000, en las células MCF7 y MCF7src y se evaluó la actividad luciferasa (**figura 43**) para todas las muestras.

Figura 43: medida de la actividad transcripcional del promotor el ER α . Los resultados de la medida de la luciferasa fueron normalizados con los obtenidos para la expresión del gen control β -galactosidasa, que fue cotransfectado con las construcciones del promotor. Los resultados así obtenidos se representaron como medida de la actividad transcripcional de cada una de las construcciones transfectadas, definidas en la **figura 42**.

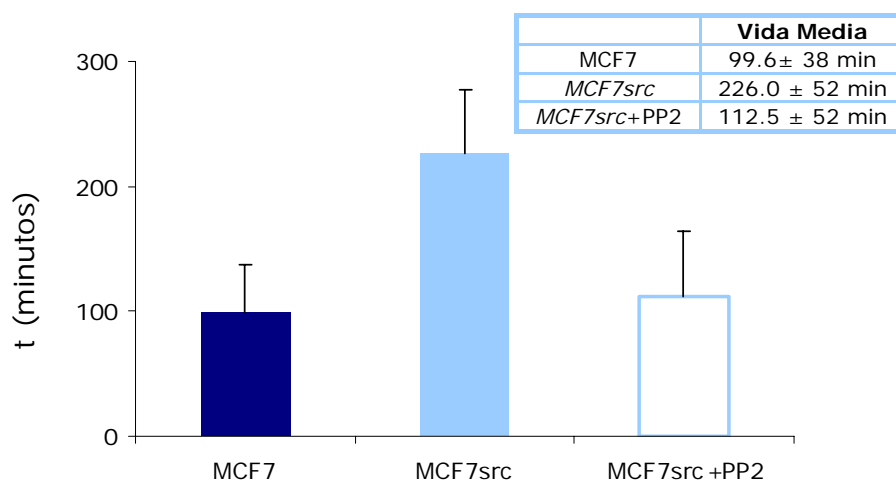


Los elementos necesarios para la transcripción basal se encuentran entre +550 y el -210, esta es la razón de porqué no hay diferencia entre los dos primeros fragmentos utilizados, aconteciendo la bajada de la transcripción cuando se eliminan parte de estos elementos en el tercer fragmento estudiado (24;144).

Los resultados de la **figura 43** muestran una leve diferencia entre ambas líneas celulares, existiendo incluso una mayor actividad transcripcional en la línea MCF7, lo que va en contra del efecto observado en los niveles de ARNm. Este hecho, junto con que las diferencias entre las líneas no sean significativas para el segmento mayor (n=6, P>0.4, para el fragmento 3,5-210) hace descartar que el mayor nivel de ARNm del ER α en las células MCF7src sea debido a una mayor transcripción del gen y sugiere un efecto post-transcripcional.

Para estudiar la regulación post-transcripcional del ER α , se decidió ver si la mayor cantidad de mensajero presente en las células MCF7src se debía a un incremento en la

estabilidad del mismo. Para ello, se evaluó la vida media de éste bloqueando la transcripción mediante la adición al cultivo de actinomicina-D (a una concentración final de 8 μ M) y siguiendo de la caída de las cantidades de mensajero mediante PCR cuantitativa y oligonucleótidos cebadores específicos para el ER α . Los resultados obtenidos indicaron que la vida media del ARNm del ER α se incrementa aproximadamente dos veces en las células MCF7src (n=28, P<0.01) (**figura 44**). Este aumento está mediado por la quinasa *Src*, puesto que el tratamiento de las células MCF7src con PP2, inhibidor específico de la misma, reduce la vida media del mensajero a valores similares a los que se encuentran en las células MCF7 (**figura 44**) (n=28, P<0.01).



El bloqueo de la transcripción y el seguimiento de la caída de la cantidad de ARNm mediante el uso de la PCR cuantitativa es una técnica novedosa y extremadamente sensible ya que es capaz de detectar mínimas variaciones en la cantidad de molde, siendo precisamente esta sensibilidad, la que provoca que los datos obtenidos en este trabajo difieran de los anteriormente publicados (35:52).

Figura 44: vida media del ARNm del ER α para las diferentes condiciones mostradas en el eje de abscisas; se muestra también los valores numéricos en la tabla junto al gráfico.

El aumento de la vida media del ARNm del ER α sí explica la mayor cantidad de del mismo en las células MCF7src, así como el subsiguiente aumento de las cantidades de proteína.

Por lo tanto, y en su conjunto, los resultados obtenidos, ponen de manifiesto que la expresión estable de la quinasa

Src en su forma constitutivamente activa, provoca en las células MCF7*src* una alteración en la expresión y función del ER α , aumentando, tanto su expresión a nivel de ARNm y de proteína, como su fosforilación en tirosinas. Ambos hechos pueden ser los responsables de la pérdida de la sensibilidad de estas células al E2. Estos resultados, junto con los obtenidos en el capítulo anterior completan el estudio de los objetivos 2 y 3 del presente trabajo.

Estudio de la hormonodependencia

Como se ha demostrado anteriormente, la presencia activa de la quinasa *Src* provoca una pérdida de sensibilidad a los estrógenos mediada por el ER α . Ante este hecho surge la pregunta de si esta pérdida de respuesta es acompañada por la adquisición de hormonoindependencia en las células MCF7*src*, permitiéndoles crecer/proliferar en ausencia de estrógenos. Para comprobar esta hipótesis se realizaron diferentes ensayos en los cuales se estudió el crecimiento de las células MCF7*src*, en comparación con las MCF7, en presencia y ausencia de estrógenos.

En primer lugar, se cuantificó el crecimiento en función del tiempo de las dos líneas celulares en ausencia de estrógenos mediante conteo celular. Como muestra la **figura 45**, la privación de estrógenos ralentiza el crecimiento de las células MCF7 hasta casi detenerlo, sin embargo, el crecimiento de las células MCF7*src* no se ve alterado por esta circunstancia.

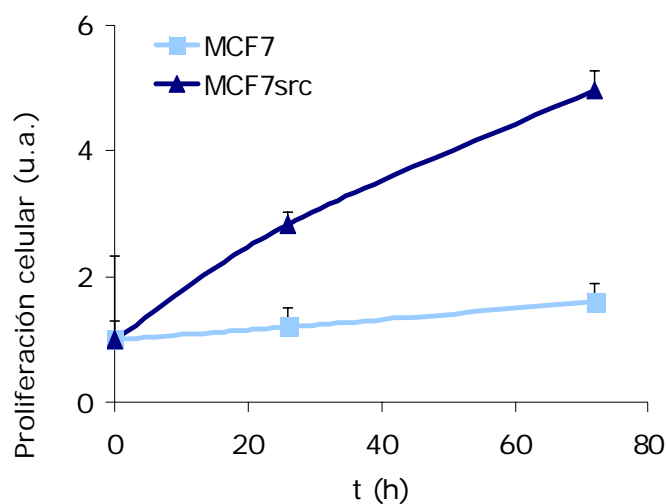
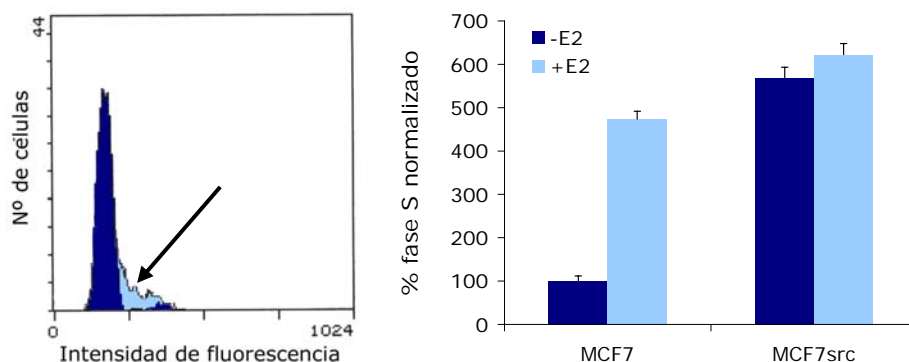


Figura 45: proliferación medida por conteo celular. El eje de ordenadas representa proliferación celular medido como el número de células a cada tiempo normalizadas frente a las presentes a tiempo cero (unidades arbitrarias).

Una vez visto que las células *MCF7src* eran capaces de proliferar en ausencia de estrógenos, se procedió a analizar, mediante un estudio del patrón de fases del ciclo celular, cuál era el origen de esta diferencia entre la línea *MCF7* y la *MCF7src*. Usando la citometría de flujo (145) se obtuvo el patrón de fases del ciclo celular para ambas líneas en ausencia y presencia de E2 1 nM (**figura 46**).

Figura 46: ciclo celular. **A.** Gráfico de la distribución de células según su marcaje con yoduro de propidio en ausencia de E2; en azul oscuro se muestran las células *MCF7* y en azul claro las *MCF7src*. **B.** Porcentaje de células en fase S tras los distintos tratamientos.



Del estudio del patrón de fases del ciclo celular se deduce, en primer lugar, que en ausencia de estímulos estrogénicos, las células *MCF7src* presentan una mayor tasa de proliferación. Como se puede ver en la **figura 46a**, el solapamiento de los picos de ambas líneas, muestra que las células *MCF7* se acumulan en la fase G1, mientras que en las células *MCF7src* aparece de un hombro (marcado por una flecha negra en la figura) que no se encuentra presente en las *MCF7*. Este hombro se corresponde con un mayor porcentaje de fase S, tal y como se puede ver en la **figura 46b**, donde se ve el porcentaje de células en esta fase es cercano a cinco veces mayor en las células *MCF7src* que en las *MCF7*. En esta misma **figura 46b** se puede ver como el estímulo por E2 es capaz de activar la proliferación de las *MCF7* (control positivo del ensayo) pero apenas aumenta la tasa de proliferación de las *MCF7src*.

Para confirmar que el aumento de la proliferación tenía como origen una mayor fase S en las células MCF7src se usó una segunda técnica basada en la citometría de flujo: el estudio de la incorporación de BrdU. Durante la fase S se produce la síntesis de ADN previa a la división celular; en esta técnica se estudia la incorporación de BrdU en lugar de la timidina durante dicha síntesis. El BrdU es luego marcado con un anticuerpo conjugado a una sonda fluorescente (FTIC, tioisocianato de fluoresceína) cuya señal es reconocida por el citómetro de flujo, de esta manera, una mayor señal del citómetro implica una mayor síntesis de ADN y por lo tanto una mayor proliferación.

En la **figura 47** se comprueba que, en condiciones de ausencia de estrógenos, las células MCF7src presentan una mayor síntesis de ADN que las MCF7, lo cual es consecuente con el aumento de la fase S visto en el análisis del patrón de fases del ciclo celular. En la misma **figura 47** se aprecia también como la presencia de estradiol en el medio de cultivo hace aumentar la tasa de síntesis de ADN de las células MCF7 (control positivo) y como esta subida en respuesta al E2 es menor en el caso de la MCF7src, resultado que es también coherente con lo visto anteriormente.

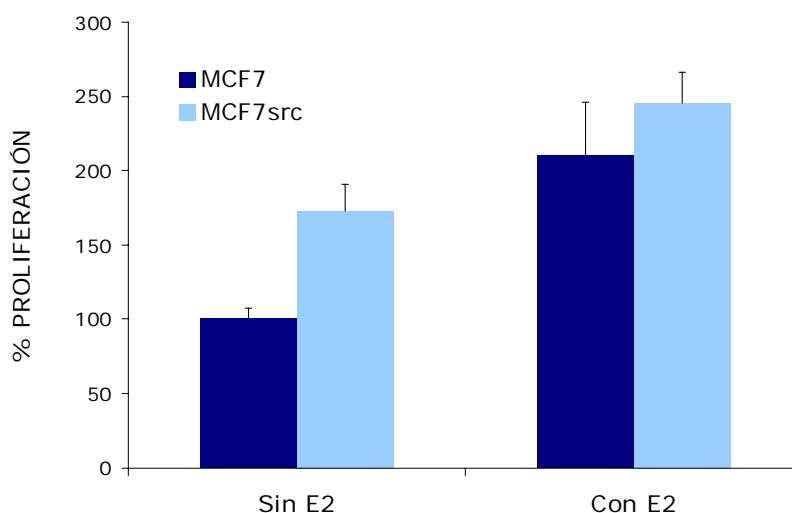
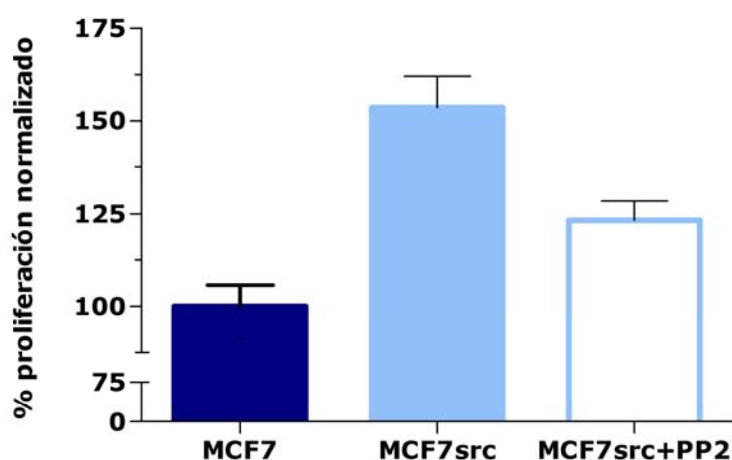


Figura 47: incorporación de BrdU. El porcentaje de proliferación se calculó estimando el número de células que presentaban marcaje con el conjugado BrdU-anticuerpo-FTIC.

Para confirmar que la proliferación en ausencia de estradiol era debida a la presencia activa de la quinasa *Src* transfectada, se evaluó el efecto del inhibidor específico de PP2 sobre la proliferación celular. Para ello se realizó un ensayo de incorporación de BrdU en el cual se incubaron las células en medio sin estrógenos durante 48 horas en presencia y ausencia del inhibidor PP2 (10 nM).

Figura 48: inhibición de la proliferación por PP2. El porcentaje de proliferación obtenido del análisis de las muestras con el citómetro de flujo se normalizó frente al valor de las células MCF7 sin tratar y se representó dando de manera arbitraria el valor de 100% a las células MCF7.



En la **figura 48** se observa como la mayor tasa de proliferación de las células *MCF7src* es parcialmente bloqueada por el inhibidor PP2, sugiriendo que la hormonoindependencia en la proliferación de estas células está mediada por la actividad de la quinasa *Src*.

Tras el análisis de todos los resultados, se pone de manifiesto que la expresión de la quinasa *Src* altera la hormonodependencia de las células *MCF7src*, dotándolas de la capacidad de proliferar en ausencia de estrógenos, siendo este efecto mediado por la quinasa *Src*. Estos resultados culminan el estudio del objetivo número 4.



D i s c u s i ó n

4

La generación de nuevos modelos celulares que permitan el estudio del papel de determinadas proteínas en los fenómenos celulares, es algo común dentro de la investigación en oncología. Si estos modelos se basan en la expresión estable de la proteína de interés, el valor de los mismos aumenta, ya que presentan una mayor relevancia biológica (146-148).

Hasta ahora, el estudio del papel de la quinasa *Src* en la regulación del ER α , se había estudiado mediante ensayos *in vitro* (115;116;118) o tras sobreexpresar, mediante transfecciones transitorias, alguno de los componentes implicados (*Src* o el ER α) (75;114;118). Los ensayos *in vitro*, si bien suponen una aproximación al problema, carecen de la relevancia de un ensayo *in vivo*. En cuanto a las transfecciones transitorias, este tipo de transfecciones, concentran un gran nivel de expresión en un corto espacio de tiempo, pudiendo llegar a aumentar más de 100 veces la cantidad de proteína en un intervalo de 24-48 horas.

En el caso concreto de la quinasa *Src*, las condiciones obtenidas tras transfectarla transitoriamente, se alejan de las que se dan en tumores reales, en los que, la sobreexpresión de la quinasa *Src*, cuando esta ocurre, está aumentada entre 4 y 20 veces solamente, pero de manera estable y continuada (149). Además, la sobreexpresión que provocan las transfecciones transitorias, provoca alteraciones graves en la homeostasis de las células transfectadas.

Sin embargo, las transfecciones estables tienen como resultado la integración en el genoma de las células del gen que codifica la proteína de interés por lo cual si se conserva una leve presión selectiva, la expresión de la misma ni se pierde ni se concentra en un determinado instante. Además de este control temporal, la cantidad de proteína que se expresa permanece constante y no es tan grande como en

las transfecciones transitorias, por lo que las células no se ven desbordadas de manera súbita por una ingente cantidad de la misma proteína.

La nueva línea celular MCF7*src* presenta unos niveles de expresión de la quinasa *Src* muy cercanos a los que aparecen en los tumores de mama en los que la quinasa *Src* está implicada. Por lo tanto, la expresión de la forma constitutivamente activa de la quinasa en las células MCF7*src*, que es unas 10 veces mayor que la basal, es una aproximación a los niveles que se dan en los tumores de mama, más cercana que las transfecciones transitorias.

Se ha comprobado que tras el proceso de selección, la quinasa transfectada se expresa a nivel de ARNm en las células MCF7*src*, lo cual es indicativo de que la expresión de la misma permanece estable y no se pierde con el tiempo. También se ha demostrado mediante el uso de construcciones marcadores basadas en los elementos STAT, que la nueva línea MCF7*src* posee una mayor actividad tirosín quinasa y que este aumento se debe específicamente a la quinasa transfectada establemente, ya que es revertido por el inhibidor específico de la quinasa *Src* PP2.

Este parecido con los tumores reales permite afirmar que los resultados aquí presentados tienen mayor validez que otros estudios previos basados en la sobreexpresión transitoria de la quinasa, y otorga a este modelo celular una gran solidez y relevancia para el estudio de lo que realmente sucede en los tumores de mama.

A lo largo de los diferentes resultados del presente trabajo, se ha demostrado que el papel que juega la quinasa en el presente modelo es paradójico, por un lado, aumenta la expresión del ER α y por otro, disminuye su actividad.

El mecanismo por el que *Src* modifica la expresión del ER α ha sido estudiado en profundidad. Se ha estudiado con detalle la expresión del ER α , desde la transcripción del gen hasta los niveles de proteína. Esto se ha hecho de manera progresiva, ordenada y razonada, encontrando siempre el motivo a cada alteración.

En primer lugar, se encontró una acumulación del receptor a nivel de proteína, a continuación se demostró que esta acumulación estaba originada por una mayor cantidad del ARNm que codificaba para el ER α .

El siguiente paso fue encontrar el origen de dicha acumulación; se comprobó en primer lugar que la transcripción del gen no estaba aumentada y posteriormente se halló que el origen de dicha acumulación era un aumento de la vida del ARNm de más de dos veces.

Por último se comprobó que este efecto era provocado de manera específica por la quinasa *Src*, para ello se usó su inhibidor específico PP2, el cual consiguió revertir el aumento de la vida media y consecuentemente la acumulación de ARNm y proteína del ER α .

El aumento de la vida media del ARNm es un ejemplo de regulación de la expresión a nivel post-transcripcional. Este tipo de regulación, es un hecho común en la expresión del ER α (52;55;65;150). La existencia de ribonucleasas que reconocen secuencias en la región 3'-UTR de los ARNm y controlan su estabilidad es un ejemplo de este tipo de regulación (52;151-155). En el caso concreto del ARNm del ER α se ha visto que existe una ribonucleasa que se asocia a los polirribosomas y regula la estabilidad del ARNm (52). Poco se conoce aún sobre la regulación de estas ribonucleasas (152), pero el que algunas de ellas tengan secuencias consenso de fosforilación por tirosín quinasas o bien estén reguladas por proteínas que las poseen (151)

Aumento de la expresión del ER α

explicaría por qué la presencia de la quinasa *Src* constitutivamente activa altera la vida media del mensajero del ER α . Existen datos que avalan esta hipótesis (156) pero serán necesarios más estudios para aclarar este apartado.

Disminución de la actividad del ER α

La regulación del ER α es un mecanismo altamente complejo tal y como se ha mostrado en la introducción del presente trabajo. Existen numerosos datos contradictorios y opiniones enfrentadas sobre los efectos que causan las diferentes vías de regulación en la actividad del receptor. Esto se debe fundamentalmente a la falta de un modelo de estudio apropiado y ajustado a la realidad celular. En este trabajo, el desarrollo de un modelo celular, y su posterior caracterización, han permitido resolver una de las mayores controversias dentro del estudio de la actividad del receptor: la relación entre el ER α y la quinasa *Src*.

En este trabajo se ha comprobado que la respuesta estrogénica tras transfectar transitoriamente la quinasa es, como se había documentado anteriormente (75), mayor que la de células sin transfectar. También se ha demostrado que dicha subida se debe a la sobreexpresión de la quinasa en grandes cantidades y está concentrada en un corto espacio de tiempo. Esto se ha comprobado mediante experimentos en los que se ha confirmado que:

- La cantidad de proteína está por encima de 100 veces la basal presente en las células MCF7.
- El efecto de subida de la respuesta estrogénica depende de la cantidad de quinasa transfectada.
- Dicha subida se pierde rápidamente conforme la expresión de la quinasa desaparece fruto de la transitoriedad de la transfección.

Este aumento de la respuesta estrogénica es debido a un efecto indirecto, ya que el ER α no ve alterado el estado de fosforilación de sus residuos de tirosina (75). Este efecto indirecto podría ser tener su origen en la capacidad de la quinasa *Src* es capaz de activar otras rutas que acaban en la activación del receptor (**figura 12**) y que implicarían a otras proteínas como Akt o las MAPKs (75-77).

Los resultados aquí presentados demuestran que, por el contrario, la expresión estable de la quinasa, lo que provoca es una disminución de la actividad del ER α y que esto se hace a través de un efecto directo: el ER α es fosforilado en tirosinas. De acuerdo con la bibliografía esta fosforilación se lleva a cabo en el residuo Y537 (36;114-117;121). En el presente trabajo se ha comprobado que la tirosín-quinasa *Src* es capaz de fosforilar el receptor en residuos de tirosina de manera específica como el uso del inhibidor PP2 ha confirmado. Esta fosforilación provoca un descenso en la actividad del receptor, hecho que se ha comprobado tanto mediante el análisis de la actividad del receptor sobre la construcción marcadora ERE-Luc en diferentes condiciones, así como mediante el análisis de la expresión de los genes endógenos controlados por el ER α , hecho que constituye la verdadera actividad del receptor. Este último ensayo se ha realizado mediante el uso de la PCR cuantitativa, técnica extremadamente sensible y que permite comparar de manera muy precisa la expresión de un gen en diferentes muestras, lo que da a los resultados un mayor valor significativo.

El hecho de que la fosforilación en tirosinas reduzca la actividad del receptor resuelve en parte la presente controversia sobre el papel que ejerce la quinasa *Src* sobre el ER α , y otorga a la fosforilación del residuo Y537, un carácter inhibitorio. Esta afirmación está respaldada por estudios en los se describen mutantes del ER α .

constitutivamente activos que presentan este residuo mutado, hecho que impide la inhibición mediante la fosforilación del mismo (157;158).

Sin embargo, los resultados aquí presentados, no explican por sí solos si la fosforilación causa la disminución de la respuesta de manera directa, o bien provoca una acumulación del receptor, que es la que origina una inhibición de la misma. Para resolver esta incógnita serán necesarios estudios futuros. De cualquier manera, la regulación del ER α por la quinasa *Src* se revela como de gran importancia, ya que su efecto, la fosforilación y posterior disminución de la actividad del receptor, se da en unas condiciones en que la expresión del propio receptor está aumentada, tanto a nivel de proteína, como de mensajero.

Adquisición de la hormonoindependencia

La expresión de la quinasa, además de disminuir la actividad y provocar la acumulación del ER α , ha aumentado la proliferación de las células MCF7*src* en ausencia de estrógenos, es decir, ha dotado a estas células de un grado de hormonoindependencia en su crecimiento que sus predecesoras las células MCF7 no disponen. De esta manera, a los otros efectos provocados por la quinasa, hay que añadirle otro más: la consecución de un fenotipo hormonoindependiente.

A través de técnicas basadas en la citometría de flujo, se ha demostrado que este aumento de la proliferación en ausencia de estrógenos, se basa en un mayor porcentaje de células MCF7*src* en fase S en ausencia de estrógenos. Este hecho es provocado por la quinasa *Src* ya que el uso de su inhibidor específico PP2 revierte este aumento de la fase S.

La consecución de un fenotipo hormonodependiente implica que las células son capaces de proliferar en ausencia de estímulos estrogénicos. Esto está perfectamente de acuerdo con la falta de actividad del ER α , que es el encargado de transmitir esos estímulos y convertirlos en una respuesta que implique la proliferación, pero a su vez, implica que la quinasa *Src* está provocando la proliferación de las células a través de una vía no dependiente del ER α , ya que éste tiene su actividad disminuída.

La activación de la ruta de Ras/RAF por la quinasa *Src* es la principal candidata a ser la responsable de este aumento de la proliferación. Existen datos previos que indican que la activación de esta ruta en tumores de mama (159) provoca un crecimiento del tumor independiente de estrógenos. Sin embargo, la implicación de la quinasa *Src* en otras vías de transducción de señales que acaban con la puesta en marcha de programas de proliferación celular (128;132;160-163) hacen necesarios futuros estudios que expliquen este hecho.

Finalmente el presente trabajo posee dos características de importancia adicional:

La primera de ellas es el amplio abanico de técnicas que se han usado y que ha permitido dar una explicación a cada uno de los resultados encontrados. Este acercamiento multidisciplinar al problema, da a las respuestas encontradas un mayor valor experimental.

La segunda de estas características es el hecho de que se ha obtenido un nuevo modelo celular, la línea celular MCF7*src*, apropiado para estudios posteriores. Esta línea celular ha sido detalladamente caracterizada en este estudio y aventaja a otros posibles modelos por su parecido a la situación real de tumores, ya que como se ha dicho

anteriormente, los niveles de quinasa *Src* en las células MCF7*src* conseguidos están dentro de los márgenes habituales en clínica, tanto en cantidad, como en estabilidad en el tiempo. De este hecho se infiere que cualquier ensayo basado en el uso de este modelo celular, va a tener una mayor verosimilitud con lo que ocurre en tumores reales, y va a presentar la ventaja de poder trabajar con una línea celular estable y de fácil manejo en el laboratorio.

El uso de estas células y de futuros ensayos basados en su estudio, puede permitir en el futuro, tanto el desarrollo de nuevas terapias antitumorales, encaminadas al bloqueo de la adquisición de la hormonoindependencia, como el cribado de nuevos fármacos y/o estrategias terapéuticas.

Conclusiones

5

- La línea celular MCF7*src* expresa de manera estable la isoforma constitutivamente activa Y534F de la quinasa *Src*.
- Esta línea presenta una actividad del ER α disminuída.
- La expresión de la quinasa provoca una acumulación de la proteína del ER α en las células MCF7*src*. Este efecto proviene de una acumulación en los niveles de ARNm.
- La acumulación del ARNm del ER α en las células MCF7*src* se debe al efecto de la quinasa sobre su vida media, la cual se ve aumentada más de dos veces.
- La quinasa *Src* provoca un aumento en la fosforilación en residuos de tirosina del ER α en las células MCF7*src*.
- Esta fosforilación y/o su acumulación es la causa de la disminución de la actividad del ER α .
- La presencia de la quinasa dota/proporciona a las células MCF7*src* de un grado de hormonoindependencia que sus predecesoras, las células MCF7 no poseen.
- La adquisición de la hormonodependencia permite a las células MCF7*src* crecer en ausencia de estrógenos.
- Las células MCF7*src*, por su parecido a tumores reales, constituyen un modelo estudio válido para la búsqueda de nuevas terapias frente el cáncer de mama.



Material es y métodos



6

Cultivo celular

Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Biowhitaker) suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO), 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO) y 1% glutamina. Se cultivaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Todos los experimentos, si no se indica lo contrario, fueron llevados a cabo en DMEM sin rojo fenol (SIGMA) suplementado con un 5% de suero bovino fetal tratado con charcol dextrano para eliminar toda traza de componentes estrogénicos y con las mismas cantidades de penicilina/estreptomicina y glutamina.

Para mantener el cultivo de células, cuando las células estaban a un nivel de confluencia entre de 90-100%, fueron tripsinizadas para darles un pase usando tripsina-EDTA (GIBCO) y una dilución 1:6.

El material de cultivos usado fue de la marca COSTAR y FALCON en el caso de las placas y SARSTEDT, CORNING y COSTAR en el caso de los frascos.

Transfecciones

Transfecciones con Superfect

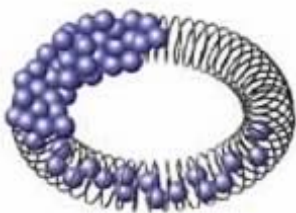


Figura 49: estructura del complejo formado por el ADN y el reactivo Superfect.

El Superfect (Quiagen) es una molécula que forma complejos con los ácidos nucleicos (cargados negativamente) facilitando así la inclusión de ácidos nucleicos exógenos dentro de células eucariotas. Las moléculas de Superfect interaccionan con el ADN formando una estructura de tipo toroidal, con el ADN en su interior y las moléculas de Superfect en la superficie (**figura 49**). Para determinar la mejor relación plásmido/Superfect (peso/volumen) a usar durante la transfección, se probaron varias combinaciones, desde 1:1 a 1:3, siendo la relación 1:2.5 la que proporcionó una mayor eficiencia de transfección y la que se usó en todos los casos para los que se utilizó Superfect como reactivo de transfección.

Transfección estable y selección

Control de expresión: para que este control sea válido es necesario que durante, y tras finalizar el proceso de selección, la expresión de la proteína insertada siga aconteciendo y no únicamente se haya convertido a las células en resistentes al antibiótico. En este caso, la expresión de la EGFP se comprobó tanto a lo largo del proceso de selección como a su finalización mediante microscopía de fluorescencia (**figura 24e**).

Se partió de aproximadamente unas 500.000 células MCF7 en una placa de 60 mm de diámetro y a un nivel de confluencia de 70%. Usando el reactivo Superfect se transfectaron dos placas de 60 mm dejando una más sin transfectar como control.

En la primera de las placas transfectadas, se usó 12.5 μ l de Superfect y 5 μ g del plásmido pRC-CMV, en el cual estaba subclonada la mutante Y534F de la quinasa *c-Src* de ratón. En la otra placa transfectada se utilizó 8.5 μ l de Superfect y 3.4 μ g del plásmido pEGFP, que codificaba para la expresión de la proteína fluorescente verde de intensidad aumentada (EGFP) como **control de expresión** (ver nota al margen).

Se siguió el protocolo comercial de la casa Quiagen (ver **figura 50**) para preparar las muestras. Se incubaron las

células con la mezcla de transfección durante 3 horas a 37°C tras las cuales se realizó un lavado con **PBS** (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄ y pH 7.4, todos ellos de SIGMA) y se reemplazó el medio por medio completo fresco. A las 24 horas de la transfección se cambió el medio por otro de igual composición pero suplementado con 0.4 mg/ml de geneticina (G418) (GIBCO) para dar inicio a la selección de las células transformadas establemente.

Durante el proceso de selección, que duró dos semanas, se fue haciendo lavados con PBS para eliminar las células muertas reponiendo el medio suplementado con geneticina (0.4 mg/ml) en todos los casos. Una semana después de dar comienzo a la selección aparecieron los primeros clones en las dos placas transfectadas mientras que en las no transfectadas todas las células murieron. Como control positivo, las células que fueron transfectadas con el plásmido pEGFP, fueron analizadas bajo el microscopio de fluorescencia (Leica DM IRB) para comprobar que los clones aparecidos expresaban la proteína fluorescente verde.

Tras dos semanas de selección los clones fueron aislados y transvasados a una placa de 24 pocillos, un clon por pocillo. Para hacerlo se usaron los denominados aros o anillos de clonaje (**figura 51**), los cuales se colocaron sobre la placa rodeando los clones sellando la unión con la placa con grasa estéril. Se añadió después unas gotas de tripsina en la luz del anillo, se dejó actuar ente 1 y 2 minutos, se añadió medio completo y se extrajo todo el contenido del interior del anillo pasándolo al pocillo limpio en donde se añadió medio de cultivo suplementado con geneticina 0.2 mg/ml como concentración de mantenimiento.

Una vez los clones crecieron lo suficiente fueron trasvasados a frascos de cultivo de 25 cm² en donde se

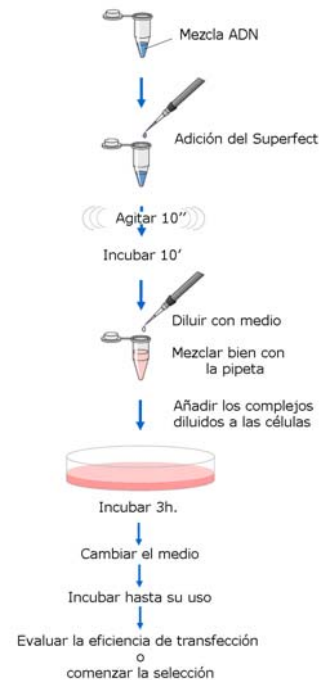


Figura 50: protocolo comercial de la casa Quiagen para la transfección usando el reactivo Superfect.



Figura 51: imagen de varios anillos de clonaje dentro de una placa de cultivo.

crecieron de la manera habitual usando el medio suplementado con la concentración de geneticina de mantenimiento (0.2 mg/ml).

Transfección de los elementos de respuesta a STATs y otras transfecciones transitorias

Para realizar este ensayo se transfectaron células de las líneas MCF7 y MCF7_{src} con una mezcla de iguales cantidades de cada uno de los elementos de respuesta a STATs del "Mercury System 5" de Clontech (164), se dejó expresar durante 36 horas en presencia o ausencia de PP2 10 nM en medio DMEM con rojo fenol. A continuación se realizaron extractos celulares y se midió la actividad luciferasa de las muestras con un luminómetro. Para el resto de transferencias con Superfect se emplearon diferentes cantidades de ADN según el formato de cultivo pero siempre guardando una proporción 1:2.5 (p/v) con el Superfect. El resto de protocolo coincide con el citado para la transfección estable y que se muestra en la **figura 50**, con la diferencia de que en el caso de las transfecciones transitorias, no se cambió el medio a las 24 horas por otro suplementando con geneticina si no que se dejó expresar las construcciones transfectadas durante 36-48 horas.

Transfecciones con lipofectamina

En los casos indicados en el texto, en lugar de usar como reactivo de transacción el Superfect se usó la Lipofectamina 2000 (Invitrogen). En este caso el reactivo es un lípido catiónico que forma complejos con el ADN gracias a la carga negativa del mismo y facilita así su entrada en las células (**figura 52**). El protocolo seguido para llevar a cabo la transfección fue el suministrado por la casa comercial usando en todo momento una relación ADN/Lipofectamina de 1:3 (p/v). En primer lugar se realizó la mezcla del lípido con el ADN y se incubó 15 minutos a

temperatura ambiente para dar a los complejos tiempo para formarse. A continuación se añadió la mezcla sobre las células a un nivel de confluencia de alrededor del 90-95%. A las 5 horas se retiró el medio y tras realizar un lavado con PBS, se añadió medio completo dejando expresar las construcciones durante 36-48 horas.

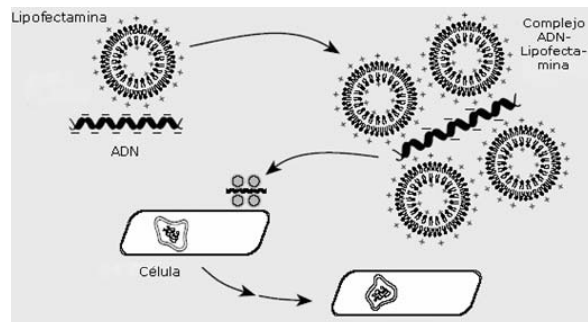


Figura 52: mecanismo de acción de la Lipofectamina.

La mutante Y534F constitutivamente activa de la quinasa estaba subclonada en el plásmido pRc/CMV. Las construcciones usadas para el estudio de la señal mediada por STAT fueron las incluidas en el "Mercury System 5" de Clontech. La construcción ERE-Luc usada para medir la respuesta estrogénica consta de varios elementos de respuesta a estrógenos (ERE) fusionados al gen de la luciferasa (39). Otros plásmidos comerciales usados fueron pSV- β -Galactosidasa (Promega), pEGFP (Clontech), pcDNA3 (Invitrogen).

Construcciones usadas

Extractos celulares, electroforesis e inmunoblots

Extractos celulares para inmunoblot o inmunoprecipitación

Las células fueron lavadas dos veces con tampón PBS. Posteriormente con ayuda de un rascador y en presencia de PBS las células fueron extraídas de su superficie de cultivo y pasadas con ayuda de una micropipeta a un tubo eppendorf donde tras centrifugar y eliminar el PBS se les añadió tampón **RIPA** (Tris-HCl 50 mM, NP-40 1%, deoxicolato sódico 0.25%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y pH 7.4) en una proporción de 100 μ l de RIPA por cada 2 cm² de superficie de cultivo. Al tampón se le añadieron PMSF a una concentración final 1 mM, mezcla de inhibidores de proteasas (SIGMA) 1 μ l por cada 100 μ l de volumen final y mezcla de inhibidores de fosfatasas (SIGMA) en igual proporción. Las células fueron incubadas en hielo durante 15 minutos y sometidas posteriormente a un ciclo de congelación-descongelación. Finalmente se centrifugó a 12.000 rpm y temperatura ambiente durante 1 minuto con el fin de eliminar el material insoluble, pasando el sobrenadante, a un tubo limpio para su posterior uso. La concentración de proteínas del extracto fue calculada, cuando resultó necesario, mediante la reacción con el reactivo BCA (Pierce).

Extractos celulares para medir actividad luciferasa y/o β -galactosidasa

En este caso se usó el protocolo comercial de la casa PROMEGA. Las células tras lavarse un par de veces con PBS fueron transvasadas con ayuda de un rascador y en presencia de PBS a un eppendorf limpio en donde, después de centrifugar y eliminar el PBS se les añadió 100 μ l del tampón de lisis comercial (Reporter Lysis Buffer de PROMEGA) por cada 2 cm². Se agitó con ayuda de un vórtex durante 10-15 segundos y se dejó lisar las células

durante 15 minutos en hielo. Se realizó un ciclo de congelación-descongelación. Finalmente se centrifugó a 12.000 rpm y temperatura ambiente durante 30 segundos el extracto con el fin de eliminar el material insoluble pasando el sobrenadante a un tubo limpio para su posterior uso.

En primer lugar se preparó el gel separador del 12%. En recipiente limpio se mezclaron la acrilamida/bisacrilamida (37.5:1) (Pronadisa), el tampón TRIS (SIGMA), el SDS (MERK) y el agua partir de las disoluciones stock ya preparadas, siguiendo la **tabla 1**. Se desgasificó la mezcla antes de añadir los agentes polimerizantes persulfato amónico (PSA, BIORAD) y temed (BIORAD) y se depositó la mezcla entre los cristales. Se preparó la mezcla para el gel concentrador del 4% poniendo las cantidades que se indican en la **tabla 1**, se desdesgasificó y se comprobó que el gel separador estaba perfectamente polimerizado, retirando el agua con papel de filtro. Se añadió el PSA y TEMED a la disolución del gel concentrador y se rellenó el espacio que queda entre los cristales, colocándose inmediatamente el peine entre los mismos.

Preparación de geles de electroforesis

	Gel separador 12%	Gel concentrador 4%
Agua (ml)	3,25	3,05
Tris 1,5M pH 8,8(ml)	2,5	1,25
SDS 10% (μl)	100	50
Acrilamida (ml)	4,08	0,65
PSA 10% (μl)	70	60
Temed (μl)	7	7

Tabla 1: cantidades necesarias para la preparación de un dos geles de poliacrilamida del 12% con un tramo concentrador del 4%.

Se dejó polimerizar 15 minutos y una vez hecho se retiró el peine despacio y suavemente y se rellenaron las calles (o

pocillos) con agua destilada o con tampón de electroforesis (TRIS 20 mM, glicina 0.2 M, SDS 0.1% p/v, pH 8,3) hasta su uso.

Las muestras que se cargaron en las geles fueron preparadas diluyéndolas 1:1 con el *tampón de muestra* (preparado según la **tabla 2**) y calentadas a 95°C durante 5 minutos en un bloque térmico.

Tabla 2: cantidades necesarias para la preparación de 8 ml de tampón de carga

Agua	3,8 ml
Tris 0,5 M (ml) pH 6,8	1 ml
Glicerol	0,8 ml
SDS 10%	1,6 ml
β mercaptoetanol	0,4 ml
azul bromofenol 1%	0,4 ml

Desarrollo de la electroforesis

Los geles fueron colocados en sus respectivos soportes y las muestras fueron cargadas en ellos usando una micropipeta y puntas de plástico especiales para cargar geles (Eppendorf). La electroforesis se llevó a cabo en tampón de electroforesis a un voltaje constante de 140 V.

Se dejó transcurrir el proceso hasta que se consideró necesario, tomando el avance del frente como referencia del transcurso de la electroforesis (165).

Transferencia y marcaje con los anticuerpos

Se partió de los extractos celulares obtenidos según el protocolo descrito en apartados anteriores. En primer lugar se preparó un gel de poliacrilamida del 12%. Se llevó a cabo la electroforesis y se electrotransfirió el contenido del gel a una membrana de nitrocelulosa durante 2 horas a un voltaje 100 V en frío (4 °C) . Dicha acción se llevó a cabo en presencia del tampón de transferencia (20 mM TRIS, 0.2 M glicina, 20% MeOH v/v).

Tras la electrotransferencia la membrana se lavó 2 veces con **tampón 2** (PBS + 0.05% Tween-20) durante 7 minutos en agitación y se bloqueó con BSA al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C y en agitación suave. Después se lavó la membrana de nuevo tres veces con tampón 2 durante 7 minutos en agitación. A continuación se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, marcado con peroxidasa en todos los casos, durante una hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Finalmente se realizaron tres lavados de 10 minutos con tampón 2 en agitación y se procedió al revelado.

Para el revelado de los anticuerpo se usó el kit de revelado ECL-Plus de la casa Amersham Biosciences, siguiendo las indicaciones del protocolo de la casa comercial. Las películas usadas fueron de la misma casa comercial (Amersham Biosciences). El aparato revelador usado fue de la marca Kodak, modelo X-OMAT-1000 Processor.

Revelado

Las bandas obtenidas en los inmunoblots fueron cuantificadas usando un procesador de imágenes GELPrinterPlus (TDI S.A.) y los programas informáticos 1-D Manager 2.0 (TDI S.A.) y SigmaGel (Jandel Scientific).

Densitometría: Cuantificación de las bandas

Los anticuerpos usados y sus correspondientes diluciones, siempre en **tampón 2**, fueron los siguientes: anti-*Src* (Calbiochem), usado a una dilución 1:500; anti-ER α (sc-8005, Santa Cruz Biotechnology),

Anticuerpos usados

usado a una dilución 1:500; anti fosfo-tirosina clon PT-66 (SIGMA), usado a una dilución 1:1000; anti-ratón conjugado con peroxidasa (HRP) (F9006, SIGMA), usado a una dilución 1:2000 ; anti β -actina (A-2066, SIGMA) a una dilución 1:1000

Eliminación de anticuerpos de una membrana

Se sumergió la membrana en el tampón de eliminación (100mM β -mercaptoetanol, 2% SDS, 62.5 mM TRIS, pH 6.7) durante 30 minutos a 50 °C. A continuación se lavó la membrana 2 veces durante 10 minutos con grandes volúmenes de tampón 2. Tras estos lavados la membrana estuvo lista para su marcaje con otros anticuerpos.

Inmunoprecipitación

Los extractos celulares, obtenidos como se he detallado en la sección correspondiente, fueron incubado durante toda una noche a 4°C en presencia del 1 μ g del anticuerpo apropiado para inmunoprecipitar la proteína de interés. Por otro lado, se lavó 30 μ l de resina de proteína G (Pierce) con el tampón usado para realizar el extracto de proteínas (tampón RIPA). Se puso en contacto el extracto incubado con el anticuerpo con la resina lavada y se dejó durante una hora a temperatura ambiente. La resina fue posteriormente lavada 5 veces con un exceso de tampón RIPA. Finalmente, los inmunopurificados fueron eluidos mediante la adición de tampón de carga.

Medida de la actividad de genes marcadores

Los extractos obtenidos según el método descrito en su correspondiente apartado fueron atemperados a 37°C junto con el reactivo para la luciferasa (PROMEGA) en un bloque térmico. Posteriormente 10 μ l del extracto se pusieron en contacto con 50 μ l del reactivo y se midió la actividad luciferasa al momento en un luminómetro Berthold FB12.

Medida de la actividad luciferasa

Los extractos celulares obtenidos según se ha descrito anteriormente fueron atemperados a 37°C en un bloque térmico junto con el tampón de reacción para β -galactosidasa ($MgCl_2$ 2 mM, o-nitrofenil- β -galactopiranosido 26 mM, Na_2HPO_4 0.2 M, β -EtSH 90 mM y pH 7.5). En un placa de 96 pocillos se pusieron en contacto 84 μ l del tampón de reacción y 31 μ l del extracto celular en cada pocillo, se incubó 30 minutos a 37°C y se midió la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 405 nm.

Medida de la actividad β -Galactosidasa

Expresión del ARNm de la quinasa transfectada

Incubación previa de las células

Se partió de una placa de 60 mm de diámetro en la que se sembraron entre 350.000 y 500.000 células. A las 12 horas se cambió el medio de cultivos por DMEM sin rojo fenol suplementado como se describe en el apartado de relativo al cultivo celular (condiciones de ausencia de estrógenos). Las células se mantuvieron en el incubador durante 48 horas más.

Extracción de ARN total con el reactivo TRI

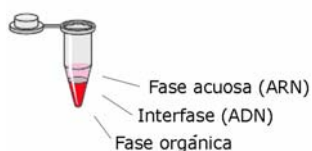


Figura 53: disposición de las fases tras la extracción con el reactivo TRI.

Las células tratadas como se indica en el apartado anterior fueron lavadas dos veces con tampón PBS y posteriormente se les añadió reactivo 2 ml de reactivo TRI (SIGMA). Se dejó un par de minutos y se pasaron a un eppendorf homogeneizando bien la muestra. Luego se añadió 400 μ l de cloroformo y se agitó durante 15 segundos en un vórtex. Se dejó reposar la mezcla entre 5 y 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó 15 minutos a 12.000 g y 4°C. Tras esta centrifugación la muestra se separó en tres fases: acuosa superior (ARN) interfase (ADN) y orgánica inferior (proteínas), ver **figura 53**.

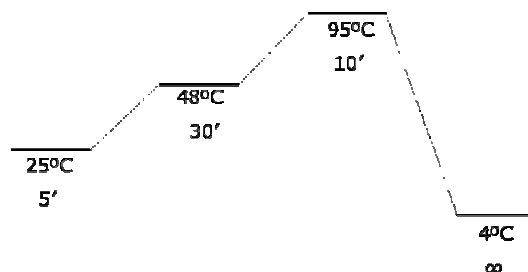
Se recuperó con cuidado la fase superior y se pasó a un tubo limpio en donde se añadió 1/10 de volumen de isopropanol para precipitar los restos de ADN que puedan contaminar la muestra, se dejó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g y 4°C. Se retiró el sobrenadante a un tubo limpio en donde se añadieron los 9/10 de volumen de isopropanol restantes para precipitar el ARN. De nuevo se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g y 4°C. El precipitado

de ARN se lavó con al menos 1 ml de etanol al 75 % en agua y se dejó secar al aire sin que llegara a hacerlo totalmente. Se resuspendió finalmente en agua tratada con DEPC incubando el tubo 10 minutos a una temperatura de entre 55 y 60°C para favorecer la disolución del ARN.

Para eliminar posibles contaminaciones por ADN se trataron las muestras con la ADNasa RQ1 (Promega) durante 30 minutos a 37°C seguidos de 2 minutos a 94 °C. Todo este proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para evitar tanto contaminaciones de ARN exógeno como la degradación del que se estaba purificando.

Para obtener el ADNc total se partió de 1 µg de ARN total obtenido según el protocolo del apartado descrito anteriormente y se usó para la retrotranscripción el kit de Applied Biosystems, el respectivo protocolo de la casa comercial y hexámeros aleatorios como cebadores. Una vez hecha la mezcla de reacción se procedió a la reacción de RT-PCR por la cual se retrotranscribió la muestra a ADNc. La reacción se llevó a cabo en un solo ciclo con la configuración de temperaturas y tiempos que se muestra a continuación:

Reacción de retrotranscripción y obtención del ADNc



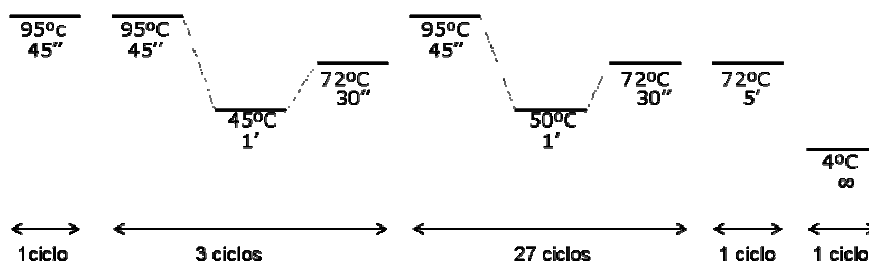
PCR para comprobar la inserción

Tomando como molde el ADNc total obtenido como se detalla en apartados anteriores, se realizó una PCR. Para la misma se usó la enzima Taq polimerasa (Roche) y como cebadores los siguiente oligonucleótidos:

Cebador "sentido": 5' AGT CAT GAA GAA ACT GAG GCA 3'

Cebador "antisentido": 5' TCT ATG AGC CGG GCC AAC 3'

Las condiciones de la PCR (ciclos y las temperaturas) se muestran en la siguiente gráfica:



Seguidamente las muestras fueron sometidas a una electroferesis en un gel de agarosa al 0.6% en tampón TAE (40 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH8, SIGMA) suplementado con bromuro de etidio para marcar los ácidos nucleicos. Los resultados fueron observados en un transiluminador y fotografiados con ayuda de una cámara.

PCR cuantitativa

Se sembraron e incubaron las células como se detalla en el apartado relativo a la incubación previa al estudio de la inserción en el genoma, suplementando las mismas con estradiol (E2) (1, 3, 5[10]- estratrien-3, 17 β -diol, SIGMA) 1 nM, actinomicina-D 8 μ M (SIGMA) y/o PP2 (4-Amino-5-(4-chlorofenil)-7-(*t*-butil)pirazol[3,4-d] pirimidina 10 nM, Calbiochem) cuando procedió. Tras 48 horas se extrajo el ARN total usando el reactivo TRI como se indica en el apartado correspondiente. Se retrotranscribió 1 μ g mediante el protocolo descrito en el apartado anterior y se realizó una PCR usando como molde 20 ng de muestra de ADNc en el termociclador ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Según el gen a estudiar se usaron oligonucleótidos cebadores o bien sondas TAQMAN. Todas las muestra fueron analizadas por triplicado en placas de 96 pocillos y usando como control interno de reacción el gen GAP-DH.

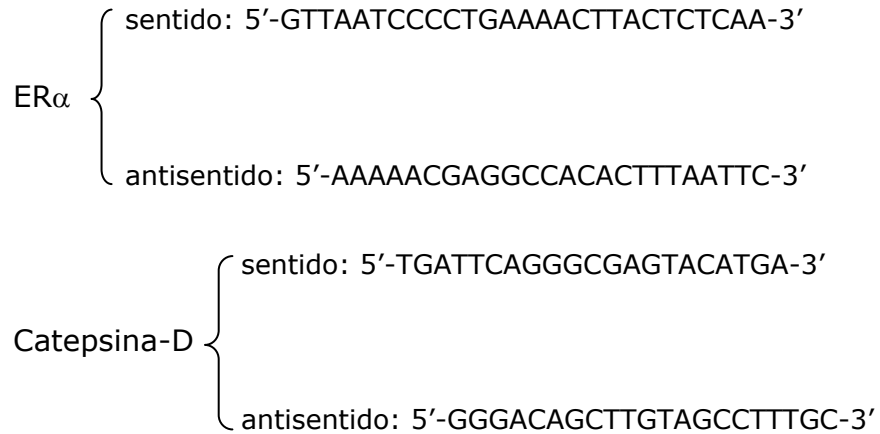
Incubación de las células

En primer lugar se diseñaron cebadores específicos usando el programa "Primer Express" de la casa Applied Biosystems. La PCR se llevó a cabo usando la "SyBRGreen PCR mastermix" de Applied Biosystems. Los cebadores usados fueron los siguientes:

PCR cuantitativas con cebadores

pS2 {
 sentido: 5'-GGGTCCCCTGGTGCTTCTA-3'
 antisentido: 5'-CAGAAAGTGTCTAAAATTCACACTCCTCTT -3'

El SyBr-green es un agente fluorescente que se une al surco mayor de los ácidos nucleicos, emitiendo su señal fluorescente sólo cuando está unido a ellos, de esta manera al amplificarse durante la reacción de PCR la cantidad de ADN de doble cadena crece y la señal fluorescente sube, siendo esta señal lo que mide el termociclador.



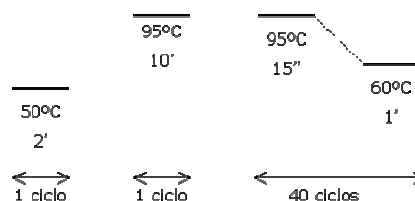
PCR cuantitativas con sondas TAQMAN

En este caso se usaron ensayos comerciales ("assay on demand" de la casa Applied Biosystems) para analizar los siguientes genes: receptor de progesterona (assay n^o HS00172183_m1) y GAP-DH (4326317E). El mecanismo de funcionamiento de las sondas taqman está descrito en la **figura 54**.

Como mezcla de reacción se usó en este caso la "Taqman PCR mastermix" (Applied Bio.). La señal en este caso al ser específica no necesitó de un posterior estudio de la temperatura de desnaturalización del amplificado.

Reacción y análisis de los resultados

Se llevó a cabo la reacción de PCR en el termociclador el ABI PRISM 7700 de la casa Applied Biosystems, con las condiciones mostradas a continuación y siempre en "singleplex", es decir, midiendo un/a solo/a gen/señal por pocillo.



Tras finalizar la reacción, se obtuvieron los valores de Ct de cada una de las muestras y se procesaron según el método de comparación de Ct usando como control interno el GAP-DH (141;166) y consiguiendo finalmente el nivel de expresión relativa (N.E.R.) de cada gen para las distintas líneas celulares.

En los genes analizados con SyBr-Green y tras llevar a cabo la PCR en el termociclador se realizó una curva de desnaturalización del producto amplificado para comprobar la especificidad de la reacción efectuada, ya que la señal proporcionada por el SyBR-Green no es específica sino que depende sólo de la cantidad total de ADN de doble cadena presente en la muestra. En todos los casos analizados la reacción mostró ser específica, rindiendo un único producto de PCR que presentó una única temperatura de desnaturalización.

Para el cálculo de la vida media del ARNm del ER α , se agruparon los valores de Ct de seis PCR independientes (con sus tres valores para cada uno de los puntos analizados) descartando aquellos valores que se salían del intervalo de confianza. Tras hacer la media de los valores se siguió la decaída del mensajero tomando como referencia la cantidad total de mensajero a tiempo cero para cada una de las muestras.

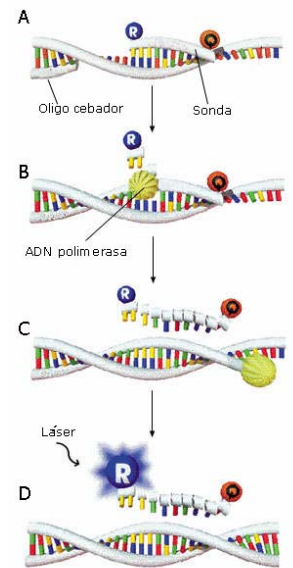


Figura 54: **A**, la sonda y los oligonucleótidos cebadores hibridan en los lugares para los que fueron diseñados, la sonda tiene conjugado un fluoróforo y un "quencher" que impide que éste emita señal. **B**, la polimerasa va avanzando y a su paso libera la sonda gracias a su actividad exonucleasa. **C**, la sonda ha sido destruida como tal encontrándose sólo nucleótidos sueltos. **D**, una vez separado el "quencher" del fluoróforo, la excitación por el láser que emite el termociclador es capaz de provocar una señal fluorescente que es la que mide el progreso de la reacción.

Medidas de proliferación y/o hormonodependencia

Medida de la proliferación por conteo celular

Se sembró una placa de 24 pocillos con unas 25.000 células en medio DMEM con rojo fenol. Se estimó como tiempo cero 24 horas después de la siembra, momento en el cual tras varios lavados con PBS estéril se cambió el medio por medio DMEM sin rojo fenol (SIGMA) suplementado con un 5% de suero bovino fetal tratado con charcol dextrano para eliminar toda traza de componentes estrogénicos.

A los tiempos indicados se extrajo de la placa las células con ayuda de un rascador y se resuspendió en NaCl al 0.9% en agua. Posteriormente fueron contabilizadas usando un contador celular electrónico. Los resultados de cada línea fueron normalizados frente a los obtenidos a tiempo cero para esa misma línea.

Medida del ciclo celular

Se sembraron células en placas de 60 mm de diámetro a un nivel de confluencia del 50% para impedir la posible inhibición con contacto. Las células se crecieron en las condiciones de ausencia de estrógenos anteriormente citadas durante 24 horas o bien con estradiol 1 nM como estímulo.

Posteriormente se retiró el medio y se lavó las células con PBS. Posteriormente, con ayuda de un rascador celular, éstas fueron traspasadas a un tubo limpio donde se resuspendieron en PBS hasta una perfecta homogeneidad. A continuación se fijó las células en etanol al 75% en agua durante 1 hora a -20°C de temperatura.

Seguidamente se resuspendió las células en PBS con 0.5% de tritón X-100 (Biorad) y se le añadió ARNasa (SIGMA) 10 mg/ml para eliminar los restos de ARN y yoduro de propio al 1% para marcar el ADN. Finalmente las células fueron analizadas en un citómetro de flujo Epics XL (Beckman Coulter) obteniéndose el porcentaje de células para cada fase del ciclo celular.

Se partió de de un millón de células en frasco de cultivo de 25 cm². Las células fueron cultivadas en condiciones de ausencia de estrógenos suplementadas en los casos indicados con estradiol 1 nM. Se mantuvieron las células 24 horas en el incubador, tras ese tiempo, se cambió el medio por otro igual pero suplementado con BrdU (bromodexosiuracilo, SIGMA) 10 µM, manteniendo a continuación las células 24 horas más en el incubador.

Ensayo de incorporación de BrdU

A continuación se tripsinizó las células y se las resuspendió en PBS suplementado con BSA al 1%. Se fijó las células con etanol al 75% durante 30 minutos a -20°C, centrifugándolas posteriormente a 500g en una centrifuga de mesa (Beckman Couler Allegr 25R) y resuspendiéndolas en HCl 2 M suplementado con 0.5% de tritón X-100 (Biorad). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se centrifugó las células y se las resuspendió en una disolución de Na₂B₄O₇ 0.5 M y pH 8.5 para neutralizar el ácido. Se centrifugó las células de nuevo resuspendiéndose el precipitado celular en PBS suplementado con 1% BSA y 0.5% tritón X-100. Se añadió el anticuerpo contra el BrdU conjugado a FTIC y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad.

Finalmente, las muestras fueron analizadas con el citómetro de flujo Epics XL (Beckman Coulter) y se determinó el número de células que estaban proliferando basándose en la señal fluorescente proporcionada por el anticuerpo usado.

Cálculos estadísticos

Las fórmulas usadas para los cálculos estadísticos fueron las siguientes:

Para la desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Para la comparación de valores mediante la t de Student:

$$t = \frac{\bar{x}_a - \bar{x}_b}{\sqrt{\frac{n_a S_a^2 + n_b S_b^2}{n_a + n_b} \frac{n_a + n_b}{n_a n_b}}}$$

Donde x representa cada uno de los valores \bar{x} el valor medio de la serie y el denominador n el número de datos de la serie.

Los valores obtenidos de la t de Student se compararon con las tablas al efecto (167).



ADN → ácido dexosiribonucléico
ADNc → ADN copia
AMPc → adenosín monofosfato cíclico
anti-PY → anti-fosfotirosina
ARN → ácido ribonucléico
ARNm → ARN mensajero
BrDU → bromodexosiuracilo
CAT-D → Catepsina D
CDS → región codificante
DAG → diacilglicerol
E2 → 17 β -estradiol
EGFP → proteína fluorescente verde de intensidad aumentada
ER α → receptor de estrógenos alfa
ER β → receptor de estrógenos beta
FTIC → tioisocianato de fluoresceína
IP₃ → inositol trifosfato
Kb → kilobases
KO → knocked out, noqueado, eliminado
MAPK → MAP quinasa, quinasa activada por mitógenos
MeOH → metanol
N.E.R. → nivel de expresión relativa
ONPG → o-nitrofenil- β -galactopiranosido
pb → pares de bases
PBS → tampón salino fosfato
PCR → reacción en cadena de la polimerasa
PI3K → fosfatidilinositol 3'-quinasa
PIP₂ → fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA → proteína quinasa A
PKC → proteína quinasa C
PP2 → 4-Amino-5-(4-clorofenil)-7-(*t*-butil)pirazol[3,4-d]pirimidina
Prog-R → receptor de progesterona
PSA → persulfato amónico
RT-PCR → retrotranscripción seguida de una PCR
STATs → Signal Transducers and Activators of Transcription,
activadores y transductores de la señal de transcripción
TA → temperatura ambiente
TPA → 12-O-tetradecanoílfربول-13-acetato
TXF → tamoxifeno
u.a. → unidades arbitrarias



Agradecimientos

A lo largo de mi estancia en el IBMC son infinidad de personas las que me han ayudado en mi trabajo, especialmente las de la “vieja guardia”, pero hay algunas de ellas cuya ayuda ha sido de gran importancia para la realización de este trabajo en particular y por eso les he reservado este hueco.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, Antonio y Miguel. A Antonio, por darme la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación, confiando en mí durante tanto tiempo y por ver siempre cosas positivas hasta en lo más negativo. A Miguel, por aportarme en el justo momento la chispa necesaria y demostrarme que todavía hay gente que trabaja con verdadera ilusión por lo que hace.

Gracias a Javier, Carmen y May su ayuda en los temas administrativos y su sonrisa siempre que he necesitado algo de ellos.

A Ángeles por su paciencia y ayuda con las PCRs cuantitativas, a Mariló y Beta por su ayuda con el citómetro, y a Gregorio por su ayuda con las figuras sobre las estructuras.

A mis compañeros de trabajo, tanto los que están, como los que se fueron ya, especialmente a aquellos que han sufrido directamente mi presencia y que han pasado a ser algo más que meros compañeros. Gracias a Aaron por su eterna sonrisa, a Ana y Cloti por ser infatigables compañeras de trabajo y penurias, a Reme por sus “midis” y otras muchas cosas más y al resto de mi grupo de investigación.

También quiero dar las gracias a aquellos que han soportado más mis ausencias y enfados, a mi familia: a mis padres y mi hermano por estar siempre allí y apoyarme en mis decisiones. A Mónica y Anselmo por toda su ayuda en tantos miles de cosas que no caben aquí y por las cuales nunca les estaré suficientemente agradecido.

Y finalmente quiero dar las gracias a la que seguro tengo más que agradecer, a Cristina, mi verdadera compañera y apoyo en este duro viaje. Gracias por enseñarme en su día a trabajar con rigor y por estar detrás de mí cada uno de los días que han pasado desde entonces y los muchos que nos quedan aún por compartir.



Bibliografía

1. <http://elmundosalud.elmundo.es/elmundosalud/especiales/cancer/index.html>
2. Así se produce el cáncer. *Weinberg, R.A. Investigación y Ciencia* (noviembre de 1996); 10-18.
3. Así se propaga el cáncer. *E Ruoslathi. Investigación y Ciencia* (noviembre de 1996); 20-26.
4. *Alberts, B., Johnson, A. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Publishing (2002).
5. *Barkhem, T. Molecular mechanism of estrogen and antiestrogen action.* Tesis doctoral (2002).
6. Molecular mechanisms of steroid hormone action. *White R y Parker MG. Endocrine related cancer* (1998). 5: 1-14.
7. Hormone dependence of breast cancer cells and the effects of tamoxifen and estrogen: 31P NMR studies. *Ruiz-Cabello, J., Berghmans, K., Kaplan, O., Lippman, M. E., Clarke, R., y Cohen, J. S. Breast Cancer Res.Treat.* (1995); 33: 209-217.
8. The process of malignant progression in human breast cancer. *Clarke, R., Dickson, R. B., y Brunner, N. Ann.Oncol.* (1990); 1: 401-407.
9. Estrogen receptor-negative breast cancer cells transfected with estrogen receptor exhibit decreased tumour progression and sensitivity to growth inhibition by estrogen. *Shao, Z., Jiang, M., Yu, L., Han, Q. y Shen, Z. Chin Med. Sci. J.* (1997); 12: 11-14.
10. Effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on estrogen receptor activity in MCF-7 cells. *Martin, M. B., Garcia-Morales, P., Stoica, A., Solomon, H. B., Pierce, M., Katz, D., Zhang, S., Danielsen, M. y Saceda, M. J. Biol. Chem.* (1995); 270: 25244-25251
11. Progression of human breast cancer cells from hormone-dependent to hormone-independent growth both in vitro and in vivo. *Clarke, R., Brunner, N., Katzenellenbogen, B. S., Thompson, E. W., Norman, M. J., Koppi, C., Paik, S., Lippman, M. E. y Dickson, R. B. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1989); 86, 3649-3653.
12. The biology of breast carcinoma. *Keen, J. C. y Davidson, N. E. Cancer* (1 de febrero de 2003); 97 (supl. 3): 825.-33.
13. Gene expression signature of estrogen receptor alpha status in breast cancer. *Abba, M. C., Hu, Y., Sun, H., Drake, J. A., Gaddis, S., Baggerly, K., Sahin, A. y Aldaz, C. M. BMC.Genomics* (11 de marzo de 2005); 6 (1): 37.
14. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E. y Auricchio, F. EMBO J.* (1996); 15: 1292-1300
15. Membrane association of estrogen receptor alpha mediates estrogen effect on MAPK activation. *Zhang, Z., Maier, B., Santen, R. J., y Song, R. X. Biochem. Biophys. Res. Commun.* (28 de junio de 2002); 294 (5): 926.-33.
16. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Shupnik, M. A. Oncogene* (18 de octubre de 2004); 23(48):7979-89.

El formato de las referencias es el siguiente:

Título. *Autores. Revista* (fecha de publicación); volumen (subvolumen): páginas.

17. Inhibition of Src kinases by a selective tyrosine kinase inhibitor causes mitotic arrest. *Moasser, M. M., Srethapakdi, M., Sachar, K. S., Kraker, A. J., y Rosen, N. Cancer Res.* (1999); 59: 6145-52
18. Protein tyrosine phosphatase α regulates src family kinases and alters cell substratum adhesion. *Harder, K.W., Moller, N.P.H. y Jirik, F.R. Journal of biological chemistry* (noviembre 1998); 273 (48): 31890-31900.
19. *Alberts, B., Johnson, A. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. Molecular Biology of the Cell.* 4th ed. New York: Garland Publishing (2002).
20. Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *Collingwood, T. N., Urnov, F. D. y Wolffe, A. P. J. Mol. Endocrinol.* (1999); 23: 255-275
21. Membrane restraint of estrogen receptor alpha enhances estrogen-dependent nuclear localization and genomic function. *Xu, Y., Traystman, R. J., Hurn, P. D. y Wang, M. M. Mol. Endocrinol.* (enero de 2004) ; 18 (1): 86.-96.
22. Palmitoylation-dependent estrogen receptor α membrane localization: regulation by 17 β -estradiol. *Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P. y Marino, M. Mol. Biol. Cell.* (enero de 2005); 16 (1): 231.-237.
23. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells. *Klinge, C. M., Blankenship, K. A., Risinger, K. E., Bhatnagar, S., Noisin, E. L., Sumanasekera, W. K., Zhao, L., Brey, D. M. y Keynton, R. S. J. Biol. Chem.* (4 de marzo de 2005); 280(9):7460-8.
24. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *Hall, J. M., Couse, J. F., y Korach, K. S. J. Biol. Chem.* (5 de octubre de 2001); 276 (40): 36869 -72.
25. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Couse, J. F. y Korach, K. S. Endocr. Rev.* (1999); 20: 358-417.
26. Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. *Steinmetz, A. C., Renaud, J. P. y Moras, D. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (2001); 30: 329.-59.
27. Estrogen receptors: Bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Katzenellenbogen, B. S. Biology of Reproduction* (1996); 54: 287-293.
28. Update on estrogen signaling *Weihua, Z., Andersson, S., Cheng, G., Simpson, E. R., Warner, M., y Gustafsson, J. A. FEBS Lett.* (3 de julio de 2003); 546 (1): 17-24.
29. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Jensen, E.V., Jacobson, H.I. Recent. Prog. Horm. Res.*(1962); 18: 387-414.
30. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Toft, D. y Gorski, J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1966); 55: 1754-1581
31. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M. y Chambon, P. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*(1985); 82: 7889-7893
32. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-

- erb-A. Green, S., Walter, P., Kurmar, A., Bornert, J.M., Argos, P. y Chambon, P. **Nature** (1986); 320: 134-139.
33. Complexity in gene expression: the estrogen receptor gene. Gannon, F. **EMBL research reports** (2001).
34. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. Kos, M., Reid, G., Denger, S. y Gannon, F. **Mol. Endocrinol.** (15 de diciembre de 2001); 15 (12): 2057.-63.
35. The 3'-untranslated region of the human estrogen receptor alpha gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover. Kenealy, M. R., Flouriot, G., Sonntag-Buck, V., Dandekar, T., Brand, H. y Gannon, F. **Endocrinology** (agosto 2000); 141 (8): 2805-13.
36. Estrogen receptor phosphorylation. Lannigan, D. A. **Steroids** (enero de 2003); 68 (1): 1-9.
37. Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action. Nilsson, S. y Gustafsson, J. A. **Breast Cancer Res.** (2000); 2 (5): 360-6.
38. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E. y Kawashima, H. **Science** (1995); 270: 1491-1494.
39. Estrogen induction of TGF-alpha is mediated by an estrogen response element composed of two imperfect palindromes. El-Ashry D., Chrysogelos S.A., Lippman M.E. y Kern F.G. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** (noviembre 1996); 59 (3-4):261-269.
40. Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. Sanchez, R., Nguyen, D., Rocha, W., White, J. H. y Mader, S. **Bioessays** (marzo 2004); 24(3): 244.-54.
41. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. Klinge, C. M. **Nucleic Acids Res.** (15 de julio de 2001); 29(14): 2905.-19.
42. Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. Picard, D., Grandien, K., Chambon, P., Yamamoto, K.R. **Cell Regul.** (1990); 1: 291-299.
43. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. Montano, M. M., Muller, V., Trobaugh, A. y Katzenellenbogen, B. S. **Mol Endocrinol.** (1995); 9: 814-825.
44. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A. y Carlquist, M. **Nature** (1997); 389: 753-758.
45. Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. Charpentier, A. H., Bednarek, A. K., Daniel, R. L., Hawkins, K. A., Laflin, K. J., Gaddis, S., MacLeod, M. C. y Aldaz, C. M. **Cancer Res.** (1 de noviembre de 2000); 60.(21): 5977.-83.
46. Probing the structure and function of the estrogen receptor ligand binding domain by analysis of mutants with altered transactivation characteristics.

- Eng, F. C., Lee, H. S., Ferrara, J., Willson, T. M. y White, J. H. Mol.Cell Biol.* (1997); 17: 4644-4653.
47. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Metivier, R., Penot, G., Hubner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M. y Gannon, F. Cell* (12 de diciembre de 2003); 115 (6): 751-63.
48. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Smith, C. L., Nawaz, Z. y O'Malley, B. W. Mol.Endocrinol.* (1997); 11: 657-666.
49. Estrogen receptor corepressors, a role in human breast cancer? *Dobrzycka, K. M., Townson, S. M., Jiang, S. y Oesterreich, S. Endocr. Relat Cancer* (10 de diciembre de 2003); 10 (4): 517.-36.
50. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Montano, M. M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P. y Katzenellenbogen, B. S. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1999); 96: 6947-6952.
51. Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol. *Saceda, M., Lippman, M. E., Chambon, P., Lindsey, R. L., Ponglikitmongkol, M., Puente, M. y Martin, M. B. Mol.Endocrinol.* (1988); 2: 1157-1162.
52. Estradiol regulates estrogen receptor mRNA stability. *Saceda, M., Lindsey, R. K., Solomon, H., Angeloni, S. V. y Martin, M. B. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* (1998); 66: 113-120.
53. Regulation of estrogen receptor expresión. *Martin, M. B., Saceda, M., Garcia-Morales, P. y Gottardis, M. M. Breast Cancer Res.Treat.* (1994); 31: 183-189.
54. Models of estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines. *Pink, J. J. y Jordan, V. C. Cancer Res.* (1996); 56: 2321-2330.
55. Role of an estrogen receptor-dependent mechanism in the regulation of estrogen receptor mRNA in MCF-7 cells. *Saceda, M., Lippman, M. E., Lindsey, R. K., Puente, M., y Martin, M. B. Mol Endocrinol.* (1989); 3: 1782-1787
56. <http://www.opolanco.es/Apat/Boletin13/profilax.htm>
57. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Wong, C. W., McNally, C., Nickbarg, E., Komm, B. S. y Cheskis, B. J. Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* (12 de noviembre de 2002); 99 (23): 14783-8.
58. Regulation of progesterone receptor gene expression in MCF-7 breast cancer cells: a comparison of the effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, estradiol, insulin-like growth factor-I, and serum factors. *Cho, H., Aronica, S. M., y Katzenellenbogen, B. S. Endocrinology* (1994); 134: 658-664.
59. Regulation of cathepsin-D and pS2 gene expression by growth factors in MCF7 human breast cancer cells. *Cavailles, V., Garcia, M., y Rochefort, H. Mol.Endocrinol.*(1989); 3: 552-558.
60. Cathepsin D gene of human MCF7 cells contains estrogen-responsive sequences in its 5' proximal flanking region. *Cavailles, V., Augereau, P., y*

- Rochefort, H. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** (1991); 174: 816-824.
61. Regulation of the estrogen-responsive pS2 gene in MCF-7 human breast cancer cells. Kim, J., Petz, L. N., Ziegler, Y. S., Wood, J. R., Potthoff, S. J., y Nardulli, A. M. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** (15 de noviembre de 2000); 74 (4): 157-68.
62. Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. El-Tanani, M. K. y Green, C. D. **Mol. Endocrinol.** (1997); 11: 928-937.
63. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. Driggers, P. H. y Segars, J. H. **Trends Endocrinol Metab.** (13 de diciembre de 2002); 13 (10): 422-7.
64. Activation of MAP kinase by muscarinic cholinergic receptors induces cell proliferation and protein synthesis in human breast cancer cells. Jimenez, E. y Montiel, M. **J Cell Physiol.** (2005); 204 (2): 678-86.
65. Post-transcriptional destabilization of estrogen receptor mRNA in MCF-7 cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Saceda, M., Knabbe, C., Dickson, R. B., Lippman, M. E., Bronzert, D., Lindsey, R. K., Gottardis, M. M. y Martin, M. B. **J. Biol. Chem.** (1991); 266: 17809-17814.
66. A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. Martin, M. B., Franke, T. F., Stoica, G. E., Chambon, P., Katzenellenbogen, B. S., Stoica, B. A., McLemore, M. S., Olivo, S. E. y Stoica, A. **Endocrinology** (diciembre 2000); 141 (12): 4503-11.
67. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA síntesis. Castoria, G., Barone, M. V., Di Domenico, M., Bilancio, A., Ametrano, D., Migliaccio, A. y Auricchio, F. **EMBO J.** (1999); 18: 2500-2510.
68. Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by epidermal growth factor. Stoica, A., Saceda, M., Doraiswamy, V. L., Coleman, C. y Martin, M. B. **J. Endocrinol.** (mayo 2000); 165 (2): 371-8.
69. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Zhang, W. y Liu, H. T. **Cell Res.** (marzo de 2002); 12(1): 9-18.
70. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. Yang, S. H., Sharrocks, A. D. y Whitmarsh, A. J. **Gene** (27 de noviembre de 2003); 320: 3-21.
71. Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. Ali, S., Metzger, D., Bornert, J. M. y Chambon, P. **EMBO J.** (1993); 12: 1153-1160.
72. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer. Biscardi, J. S., Ishizawa, R. C., Silva, C. M., y Parsons, S. J. **Breast Cancer Res.** (2000); 2 (3): 203-10.
73. Involvement of pp60c-src with two major signaling pathways in human breast cancer. Luttrell, D. K., Lee, A., Lansing, T. J., Crosby, R. M., Jung, K. D., Willard, D., Luther, M., Rodriguez, M., Berman, J. y Gilmer, T. M. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1994); 91: 83-87.
74. Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III, E. **Cancer Medicine** (2003).

6th ed. Kufe editors, Hamilton (Canada), BC Decker Inc.

75. Potentiation of estrogen receptor activation function 1 (AF-1) by Src/JNK through a serine 118-independent pathway. *Feng, W., Webb, P., Nguyen, P., Liu, X., Li, J., Karin, M. y Kushner, P. J. Mol.Endocrinol.* (enero 2001); 15 (1): 32-45.
76. Kinases of the Src family: structure and functions. *Tatosyan, A. G. y Mizenina, O. A. Biochemistry (Mosc.)* (enero 2000); 65 (1): 49-58.
77. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Bromann, P. A., Korkaya, H. y Courtneidge, S. A. Oncogene* (18 de octubre de 2004); 23 (48): 7957-68.
78. Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by epidermal growth factor. *Stoica, A., Saceda, M., Doraiswamy, V. L., Coleman, C., y Martin, M. B. J. Endocrinol.* (mayo de 2000); 165 (2): 371-8.
79. Dual regulation of the epidermal growth factor family of growth factors in breast cancer by sex steroids and protein kinase C. *Martinez-Lacaci, I. y Dickson, R. B. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (1996); 57: 1-11
80. *Stryer, L. Bioquímica*, 4ª edición. Editorial Reverté (1995).
81. Decrease in estradiol-stimulated progesterone receptor production in MCF-7 cells by epidermal growth factor and possible clinical implication for paracrine-regulated breast cancer growth. *Cormier, E. M., Wolf, M. F., and Jordan, V. C. Cancer Research* (1989); 49: 576-580.
82. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E. y Auricchio, F. EMBO J.* (1996); 15: 1292-1300.
83. Akt activation by estrogen in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Tsai, E. M., Wang, S. C., Lee, J. N. y Hung, M. C. Cancer Res.* (diciembre de 2001); 61 (23): 8390-2.
84. Protein tyrosine kinase and cancer. *Kolibaba K.S. y Druker B.J. Biochimica et Biophysica Acta* (1997); F217-F248.
85. The hunting of the Src. *Martin, G. S. Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (junio de 2001); 2(6): 467-75.
86. The road to Src. *Martin, G. S. Oncogene* (18 de octubre de 2004); 23(48): 7910-7.
87. Involvement of pp60c-src with two major signaling pathways in human breast cancer. *Luttrell, D.K., Lee, A., Lansing, T.J., Crosby, R.M., Jung, K.D., Willard, D., Luther, M., Rodriguez, M., Berman, J. y Gilmer, T.M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1994); 91: 83-87.
88. Tyrosine kinase inhibition and cancer. *Boutin, J.A. Int J Biochem* (1994); 26: 1203-1226.
89. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: tyrosine kinase-mediated signal transduction in transgenic mouse models of human breast cancer. *Andrechek, E. R. y Muller, W. J. Breast Cancer Res.* 2000; 2 (3): 211-6.
90. Human cellular src gene: nucleotide sequence and derived amino acid sequence of the region coding for the carboxy-terminal two-thirds of

- pp60c-src. *Anderson, S. K., Gibbs, C. P., Tanaka, A., Kung, H. J. y Fujita, D. J. Mol. Cell Biol.* (1985); 5: 1122-1129.
91. DNA sequence encoding the amino-terminal region of the human c-src protein: implications of sequence divergence among src-type kinase oncogenes. *Tanaka, A., Gibbs, C. P., Arthur, R. R., Anderson, S. K., Kung, H. J. y Fujita, D. J. Mol. Cell Biol.* (1987); 7: 1978-1983.
92. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Xu, W., Harrison, S. C. y Eck, M. J. Nature* (1997); 385: 595-602.
93. Regulation, substrates and functions of src. *Brown, M. T. y Cooper, J. A. Biochim.Biophys.Acta* (1996); 1287: 121-149
94. Structure and regulation of Src family kinases. *Boggon, T. J. y Eck, M. J. Oncogene* (18 de octubre de 2004);23 (48): 7918-7927.
95. Regulation of the Src protein tyrosine kinase. *Superti-Furga, G. FEBS letters* (1995); 369: 62-66.
96. Variation on an Src-like Theme. *Harrison, S. C. Cell* (marzo de 2003); 112 (6): 737-40.
97. In silico activation of Src tyrosine kinase reveals the molecular basis for intramolecular autophosphorylation. *Mendieta, J. y Gago, F. J. Mol. Model.* (octubre de 2004); 23: 189-198.
98. Myristylation and palmitoylation of Src family members: The facts of the matter. *Resh, M.D. Cell* (11 de febrero de 1994); 76: 411-412.
99. The conformational plasticity of protein kinases. *Huse M y Kuriyan J. Cell* (3 de mayo de 2002); 109: 275-282.
100. Analysis of pp60c-src protein kinase activity in human tumor cell lines and tissues. *Rosen, N., Bolen, J. B., Schwartz, A. M., Cohen, P., DeSeau, V. y Israel, M. A. J. Biol. Chem.* (1986); 261: 13754-13759.
101. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R. y Bradley, A. Cell* (1991); 64: 693-702.
102. Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Stein, P. L., Vogel, H. y Soriano, P. Genes Dev.* (1994); 8: 1999-2007
103. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Parsons, S. J. y Parsons, J. T. Oncogene* (18 de octubre de 2004); 23 (48):7906-9.
104. *Alberts, B., Johnson, A. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Publishing (2002).
105. Inhibition of Src family kinases blocks epidermal growth factor (EGF)-induced activation of Akt, phosphorylation of c-Cbl, and ubiquitination of the EGF receptor. *Kassenbrock, C. K., Hunter, S., Garl, P., Johnson, G. L. y Anderson, S. M. J. Biol. Chem.* (12 de julio de 2002); 277 (28): 24967-75.
106. c-Src protein expression is increased in human breast cancer, an immunohistochemical and biochemical analysis. *Verbeek, B.S., Vroom, T.M. y G Rijksen. Journal of Pathology* (1996); 180: 383-388.

107. Epidermal growth factor stimulation can substitute for c-Src overexpression in promoting breast carcinoma invasion. *Lotz, M., Wang, H. H., Cance, W., Matthews, J. y Pories, S. J. Surg. Res.* (2003); 109: 123-129
108. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer. *Biscardi, J. S., Ishizawa, R. C., Silva, C. M., y Parsons, S. J. Breast Cancer Res.* (2000); 2 (3): 203-10.
109. ErbB2 promotes Src synthesis and stability: novel mechanisms of Src activation that confer breast cancer metastasis. *Tan, M., Li, P., Klos, K. S., Lu, J., Lan, K. H., Nagata, Y., Fang, D., Jing, T. y Yu, D. Cancer Res.* (marzo de 2005); 65 (5): 1858-67.
110. Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Maa, M. C., Leu, T. H., McCarley, D. J., Schatzman, R. C. y Parsons, S. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1995); 92: 6981-6985.
111. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Tice, D. A., Biscardi, J. S., Nickles, A. L. y Parsons, S. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1999); 96: 1415-1420.
112. Estrogen receptor phosphorylation. Hormonal dependence and consequence on specific DNA binding. *Denton, R. R., Koszewski, N. J. y Notides, A. C. J. Biol. Chem.* (1992); 267: 7263-7268.
113. Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *Le Goff, P., Montano, M. M., Schodin, D. J., y Katzenellenbogen, B. S. J. Biol. Chem.* (1994); 269: 4458-4466.
114. Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor is required for binding to an estrogen response element. *Arnold, S. F., Vorobjikina, D. P. y Notides, A. C. J. Biol. Chem.* (1995); 270: 30205-30212.
115. An antiestrogen: a phosphotyrosyl peptide that blocks dimerization of the human estrogen receptor. *Arnold, S. F. y Notides, A. C. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1995); 92: 7475-7479.
116. Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Arnold, S. F., Melamed, M., Vorobjikina, D. P., Notides, A. C., y Sasson, S. Mol. Endocrinol.* (1997); 11, 48-53.
117. Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro. *Arnold, S. F., Obourn, J. D., Jaffe, H. y Notides, A. C. Mol. Endocrinol.* (1995); 9: 24-33.
118. Interaction of estrogen receptor alpha with protein kinase C alpha and c-Src in osteoblasts during differentiation. *Longo, M., Brama, M., Marino, M., Bernardini, S., Korach, K. S., Wetsel, W. C., Scandurra, R., Faraggiana, T., Spera, G., Baron, R., Teti, A. y Migliaccio, S. Bone* (enero de 2004); 34 (1): 100-11.
119. Identification of amino acids in the hormone binding domain of the human estrogen receptor important in estrogen binding. *Ekena, K., Weis, K. E., Katzenellenbogen, J. A. y Katzenellenbogen, B. S. J. Biol. Chem.* (1996); 271: 20053-20059.
120. An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer. *Zhang, Q. X., Borg, A., Wolf, D. M.,*

- Oesterreich, S. y Fuqua, S. A. Cancer Res.* (1997); 57: 1244-1249.
121. Function of estrogen receptor tyrosine 537 in hormone binding, DNA binding, and transactivation. *Yudt, M. R., Vorobjikina, D., Zhong, L., Skafar, D. F., Sasson, S., Gasiewicz, T. A. y Notides, A. C. Biochemistry* (1999); 38: 14146-14156.
122. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *Haynes, M. P., Li, L., Sinha, D., Russell, K. S., Hisamoto, K., Baron, R., Collinge, M., Sessa, W. C. y Bender, J. R. J. Biol. Chem.* (24 de enero de 2003); 278 (4): 2118-23.
123. Immediate and transient stimulation of protein tyrosine phosphorylation by estradiol in MCF-7 cells. *Migliaccio, A., Pagano, M. y Auricchio, F. Oncogene* (1993); 8: 2183-2191.
124. *Mathews. Bioquímica*; capítulo sobre transducción de señales, oncogenes y cáncer. 2ª ed. Editorial McGraw Hill . (1999).
125. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. y Brennan, M. J. Natl. Cancer Inst.* (1973); 51: 1409-1416.
126. Origen de la información: **Archivos de la A.T.C.C.**
127. Elevated activity and expression of Src-family kinases in human breast carcinoma tissue versus matched non-tumor tissue. *Reissig, D., Clement, J., Sanger, J., Berndt, A., Kosmehl, H. y Bohmer, F. D. J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (abril de 2001); 127 (4): 226-30.
128. Mammary tumors expressing the neu proto-oncogene possess elevated c-Src kinase activity. *Muthuswamy, S. K., Siegel, P. M., Dankort, D. L., Webster, M. A. y Muller, W. J. Mol. Cell Biol.* (1994); 14: 735-743
129. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *Li, S., Couet, J. y Lisanti, M. P. J. Biol. Chem.* (1996); 271: 29182-29190.
130. STATs and gene regulation. *Darnell, J. E. J. Science* (1997); 277: 1630-1635.
131. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R. P. y Jove, R. Mol. Cell Biol.* (1998); 18: 2545-2552.
132. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *Olayioye, M. A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J. M. y Hynes, N. E. J. Biol. Chem.* (1999); 274: 17209-17218.
133. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A. y Connelly, P. A. J. Biol. Chem.* (1996); 271: 695-701
134. Src Family Kinase Inhibitor PP2 Restores the E-Cadherin/Catenin Cell Adhesion System in Human Cancer Cells and Reduces Cancer Metastasis. *Nam, J. S., Ino, Y., Sakamoto, M. y Hirohashi, S. Clin. Cancer Res.* (8 de julio de 2002); 8 (7): 2430-6.

135. 17 β -estradiol-dependent activation of signal transducer and activator of transcription-1 in human fetal osteoblasts is dependent on Src Kinase activity. *Kennedy, A.M., Shogren, K.L., Zhang, M., Turner, R. T., Spelsberg, T. C. y Maran, A. Endocrinology* (enero 2005); 146 (1): 201-7.
136. Regulatory mechanisms in breast cancer. Estrogen and progesterone receptors. *Martin, M. B., Saceda, M. y Lindsey, R. K. Cancer Treat. Res.* (1991); 53: 273-288.
137. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Garcia, M., Platet, N., Liaudet, E., Laurent, V., Derocq, D., Brouillet, J. P. y Rochefort, H. Stem Cells* (1996); 14: 642-650.
138. Regulation of estrogen receptor expression in breast cancer. *Martin, M. B., Saceda, M. y Lindsey, R. K. Adv. Exp. Med Biol.* (1993); 330: 143-153.
139. Real-time quantitative PCR. *Schmittgen, T. D. Methods* (2001); 25: 383-385
140. Real-time polymerase chain reaction. *Wilhelm, J. y Pingoud, A. ChemBiochem.* (7 de noviembre de 2003); 4 (11): 1120-8.
141. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} Method. *Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. Methods* (diciembre 2001); 25 (4): 402-8.
142. Transcriptional regulation of estrogen receptor in breast carcinomas. *deConinck E.C., McPherson L.A. y Weigel R.J. Molecular and cellular biology* (1995); 15: 2191-2196.
143. An antiestrogen: a phosphotyrosyl peptide that blocks dimerization of the human estrogen receptor. *Arnold, S. F. y Notides, A. C. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1995); 92: 7475-7479.
144. Activation of Src family kinases by colony stimulating factor-1, and their association with its receptor. *Courtneidge, S. A., Dhand, R., Pilat, D., Twamley, G. M., Waterfield, M. D. y Roussel, M. F. EMBO J.* (1993); 12: 943-950.
145. Fundamentals of flow cytometry. *Jarozeski, M. J. y Radcliff, G. Mol Biotechnol.* (1999); 11: 37-53.
146. COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells. *Singh, B., Berry, J. A., Shoher, A., Ramakrishnan, V. y Lucci, A. Int. J. Oncol.* (mayo de 2005); 26 (5): 1393-9.
147. Selective downregulation of the MDR1 gene product in Caco-2 cells by stable transfection to prove its relevance in secretory drug transport. *Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Rhedin, M., Regardh, C. G., Lowenadler, B. y Langguth, P. Mol. Pharm.* (enero-febrero de 2005); 2 (1): 64-73.
148. Acquisition of chemoresistant phenotype by overexpression of the antiapoptotic gene testosterone-repressed prostate message-2 in prostate cancer xenograft models. *Miyake, H., Nelson, C., Rennie, P. S. y Gleave, M. E. Cancer Res.* (mayo de 2000); 60 (9): 2547-54.
149. Expression of pp60c-src protein kinase in adult and fetal human tissue: high activities in some sarcomas and mammary carcinomas. *Jacobs, C. y Rubsamen, H. Cancer Res.* (1983); 43: 1696-1702.
150. Protein phosphatase 2A (PP2A) regulates estrogen receptor alpha (ER) expression through modulation of ER mRNA stability. *Keen, J. C., Zhou, Q.,*

- Park, B. H., Pettit, C., Mack, K. M., Blair, B., Brenner, K. y Davidson, N. E. **J. Biol. Chem.** (17 de junio de 2005); versión electrónica pendiente de publicación impresa.
151. Polysomal ribonuclease 1 exists in a latent form on polysomes prior to estrogen activation of mRNA decay. *Cunningham, K. S., Hanson, M. N. y Schoenberg, D. R.* **Nucleic Acids Res.** (1 de marzo de 2001); 29 (5): 1156 -62.
152. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Dodson, R. E. y Shapiro, D. J.* **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.** (2002); 72: 129 - 64.
153. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Wilusz, C.J., Wormington, M. y Peltz, S.W.* The cap-to-tail guide to mRNA turnover. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** (abril de 2001); 2 (4): 237-46.
154. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Dreyfuss, G., Kim, V.N. y Kataoka, N.* Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** (marzo de 2002); 3(3): 195 -205.
155. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Maquat, L.E.* Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** (febrero de 2004); 5 (2): 89-99.
156. Platelet-derived growth factor stimulates Src-dependent mRNA stabilization of specific early genes in fibroblasts. *Bromann, P. A., Korkaya, H., Webb, C. P., Miller, J., Calvin, T. L. y Courtneidge, S. A.* **J. Biol. Chem.** (18 de marzo de 2005); 280 (11): 10253 -63.
157. An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer. *Zhang, Q. X., Borg, A., Wolf, D. M., Oesterreich, S. y Fuqua, S. A.* **Cancer Res.** (1997); 57: 1244-1249.
158. Constitutively active human estrogen receptors containing amino acid substitutions for tyrosine 537 in the receptor protein. *Weis, K. E., Ekena, K., Thomas, J. A., Lazennec, G. y Katzenellenbogen, B. S.* **Mol. Endocrinol.** (1996); 10: 1388-1398.
159. Hyperactivation of MAPK induces loss of ERalpha expression in breast cancer cells. *Oh, A. S., Lorant, L. A., Holloway, J. N., Miller, D. L., Kern, F. G., and El Ashry, D.* **Mol Endocrinol** (agosto de 2001); 15 (8.): 1344 -59.
160. Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Maa, M. C., Leu, T. H., McCarley, D. J., Schatzman, R. C. y Parsons, S. J.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** (1995); 92: 6981-6985.
161. Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Kypta, R. M., Goldberg, Y., Ulug, E. T. y Courtneidge, S. A.* **Cell** (1990); 62: 481-492.
162. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *Datta, K., Bellacosa, A., Chan, T. O. y Tsichlis, P. N.* **J. Biol. Chem.** (1996); 271: 30835-30839.
163. C-Src activation by ErbB2 leads to attachment-independent growth of human epithelial cells. *Sheffield, L. G.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.** (1998); 250: 27-31.

164. <http://www.bdbiosciences.com/ptProduct.jsp?backLink=ptProductList.jsp&backName=Product%20List&prodId=428916>
165. *Segura, J.M., Gavilanes J.G., et al.* **Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica**. Editorial Síntesis.
166. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System: User Bulletin #2, **Applied Biosystems**.
167. Skoog, West y Holer. **Fundamentos de química analítica**.

