

DEPARTAMENT DE PATOLOGIA

MECANISMOS MOLECULARES QUE REGULAN LA
CAPACIDAD ONCOGÉNICA DE AIB1.

MACARENA FERRERO GIMENO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 16 de juliol de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Antonio Pellín Pérez
- Dr. Luis C. Antón Canto
- Dra. Rosa Farrás Rivera
- Dr. José Luis Zugaza Gurruchaga
- Dra. Rosario Gil Benso

Va ser dirigida per:

Dr. Jaime Font de Mora Saínz

Dr. Robert Carles Callaghan Pitlik

©Copyright: Servei de Publicacions
Macarena Ferrero Gimeno

Dipòsit legal: V-2063-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7923-3

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

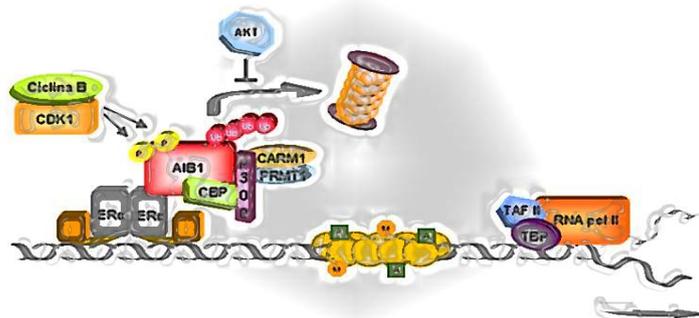
Spain

Telèfon:(0034)963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA



Mecanismos moleculares que regulan la capacidad oncogénica de AIB1



TESIS DOCTORAL
Macarena Ferrero Gimeno
Valencia, 2010



Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Patología



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

**Centro de Investigación
Príncipe Felipe**

Laboratorio de Biología Celular y
Molecular

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

Y

D. ROBERT CARLES CALLAGHAN PITLIK, PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

EXPONEN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: **Mecanismos Moleculares que regulan la capacidad oncogénica de AIB1**, ha sido realizada por Dña. Macarena Ferrero Gimeno, Licenciada en Ciencias Biológicas y en Bioquímica por la Universidad de Valencia, bajo nuestra dirección en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

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

Valencia, a 20 de Mayo de 2010

Fdo. Jaime Font de Mora Saínz

Fdo. Robert Carles Callaghan Pitlik

Esta memoria ha sido realizada siendo Macarena Ferrero Gimeno beneficiaria de una beca predoctoral Carmen y Severo Ochoa del Ayuntamiento de Valencia (Enero-Marzo 2006) y de una beca predoctoral de la Consellería d'Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana (2006-2010).

La investigación en el laboratorio ha sido financiada por los proyectos: SAF2006-12470, SAF2005-03499 del Ministerio de Ciencia e Innovación; EVES 047/2008 de la Consellería de Sanitat de la Generalitat Valenciana y ACOMP/2009/001 de la Consellería d'Educació i Ciència, de la Generalitat Valenciana.

Para ti

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Etiología del cáncer	12
2. Señalización en cáncer.....	15
2.1. Estimulación mitogénica	16
2.2. Control del ciclo celular.....	17
2.3. Potencial replicativo ilimitado.....	17
2.4. Evasión de la apoptosis.....	17
2.5. Angiogénesis y metástasis	18
3. Familia de los coactivadores de receptores esteroideos	18
3.1. Introducción a los Receptores Nucleares	18
3.2. La familia SRC.....	21
4. Funciones fisiológicas de AIB1	25
4.1. Función de AIB1 durante el desarrollo.....	25
4.2. Función de AIB1 en la reproducción.....	26
4.3. Función de AIB1 en el metabolismo	27
4.4. Función de AIB1 en otros tejidos	28
5. La sobreexpresión de AIB1 afecta a la iniciación y la progresión del cáncer.....	29
5.1. Evidencias de biopsias y modelos animales.....	30
5.2. Mecanismos moleculares de la actividad oncogénica de AIB1	33
5.2.1. MECANISMOS DEPENDIENTES DE HORMONA.....	33
5.2.1.1. Señalización mediada por receptores esteroideos	33
5.2.2. MECANISMOS INDEPENDIENTES DE HORMONA	35
5.2.2.1. Señalización mediada por factores de crecimiento	35
Vía de señalización IGF/PI3K/AKT	35
Vía de señalización ERBB/HER	38
5.2.2.2. Señalización mediada por citoquinas	39

Vía de señalización NF-κB	39
5.2.2.3. El ciclo celular y AIB1	41
5.2.3. MECANISMOS DE INVASIÓN	44
6. La sobreexpresión de AIB1 y HER2/neu correlaciona con resistencia a la terapia endocrina	47
7. Regulación de los niveles y de la actividad de AIB1.....	50
7.1. Niveles celulares de AIB1.....	50
7.2. Modificaciones postraduccionales y actividad de AIB1	52
8. Factores pronóstico: inhibición de AIB1 en terapia tumoral.....	55

OBJETIVOS	58
------------------------	----

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Métodos microbiológicos	60
1.1. Crecimiento y conservación de las cepas bacterianas	60
1.2. Transformación bacteriana	60
2. Cultivos de líneas celulares eucariotas.....	60
2.1. Crecimiento de líneas celulares.....	60
2.2. Transfección de DNA.....	63
3. Análisis de ciclo celular.....	64
3.1. Sincronización de células humanas transformadas.....	64
3.2. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	65
4. Técnicas de DNA.....	66
4.1. Purificación de DNA plasmídico	66
4.2. Electroforesis en geles de agarosa.....	66
4.3. Amplificación por PCR.....	66
4.4. Generación de plásmidos de DNA recombinante.....	67
4.5. Mutagénesis dirigida.....	67
5. Técnicas de RNA.....	69

5.1. Extracción y purificación de RNA.....	69
5.2. Transcripción inversa: RT-PCR semicuantitativa y RT-PCR en tiempo real.....	70
6. Técnicas de proteínas	71
6.1. Obtención de extractos totales de proteínas	71
6.2. Extracción y purificación de proteínas en condiciones desnaturalizantes	72
6.3. Fraccionamiento subcelular citosol/núcleo	73
6.4. Precipitación de proteína por TCA.....	73
6.5. Separación de proteínas por SDS-PAGE	73
6.6. Tinción de geles	74
6.7. Inmunotransferencia o “Western blot”.....	75
6.8. Inmunofluorescencia.....	75
6.9. Inmunohistoquímica de células	78
6.10. Determinación de la vida media de una proteína: experimentos de pulso y caza.....	78
6.11. Técnicas para revelar interacciones proteína-proteína.....	79
6.11.1. Inmunoprecipitación	79
6.11.2. “Cross-linking” <i>in vivo</i>	80
6.11.3. “Far Western Blot”	80
7. Espectrometría de masas.....	81
8. Sistemas de expresión de proteínas.....	81
8.1. Sistema de expresión libre de células	81
8.2. Sistema baculovirus-células de insecto	81
8.3. Sistema pGEX	82
9. Ensayos de actividad enzimática.....	85
9.1. Estudio de la degradación de AIB1 a partir de extractos de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	85
9.2. Ensayo de desubicitinación por USP2.....	87
9.3. Ensayos fosfatasa	87

9.4. Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> : p13 ^{suc1}	88
9.5. Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> : complejos recombinantes Cdc2- ciclina B/A.....	88
10. Medida de la actividad transcripcional con gen indicador de Luciferasa	89
11. Métodos estadísticos	90

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE AIB1	93
1.1. Diferencias en la distribución celular y en la estabilidad de AIB1 en varias líneas celulares	94
1.2. La actividad del receptor de estrógenos influye en la estabilidad de AIB1.....	97
1.3. AIB1 es degradado en el núcleo por el proteasoma	98
1.4. La degradación nuclear de AIB1 requiere su ubiquitinación	100
1.5. En busca de la ubiquitina ligasa de AIB1	105
1.5.1. Los complejos SCF y APC	105
1.5.2. La ubiquitina ligasa ZNRF.....	109
1.5.3. Proteínas que interaccionan con AIB1: experimentos de “cross- linking” y “Far Western Blot”	110
1.6. Diferencias en la localización subcelular de AIB1 en HeLa y MCF-7: niveles de SIP e importina $\alpha 3$	112
1.7. Señalización por AKT y estabilidad de AIB1.....	114
1.8. La actividad y la estabilidad de AIB1 se regulan de manera independiente de GSK3.....	117
1.9. Papel de AKT en la estabilización de AIB1.....	120
1.10. Además de SCF ^{Fbw7} , debe existir otra u otras ubiquitina ligasas para AIB1.....	121

1.11. La secuencia PEST es requerida para desestabilizar a AIB1	123
1.12. Actividad transcripcional intrínseca y degradación de AIB1	124
1.13. ¿Existen otros mecanismos para la degradación de AIB1?	125
2. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL DE AIB1 EN MITOSIS	128
2.1. Análisis de AIB1 a lo largo del ciclo celular: Una nueva forma mitótica	129
2.2. Naturaleza del doblete de Mitosis	129
2.3. AIB1 se fosforila en Mitosis por el complejo Cdk1-ciclina B	132
2.4. AIB1 se desfosforila a la salida de mitosis	135
2.5. La desfosforilación de AIB1 a la salida de mitosis es sensible a inhibidores de fosfatasa	139
2.6. El mutante S728A de AIB1 se fosforila en mitosis	141
2.7. El complejo Cdk1-ciclina A no fosforila a AIB1 <i>in vitro</i>	143
2.8. La fosforilación de AIB1 en mitosis es independiente del sitio consenso de unión a ciclina	146
2.9. La serina 728 es diana del complejo Cdk1-ciclina B	147
2.10. Localización subcelular de la fosforilación de AIB1 en mitosis	148
2.11. Actividad transcripcional de AIB1 en Mitosis	152

DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE AIB1	156
1.1. Diferencias en la distribución celular y en la estabilidad de AIB1 en varias líneas celulares	156
1.2. AIB1 se degrada en el núcleo por el sistema ubiquitina-proteasoma	158
1.3. En busca de la ubiquitina ligasa de AIB1	160
1.4. La secuencia PEST es requerida para desestabilizar a AIB1	163

1.5. Señalización por AKT y estabilidad de AIB1.....	164
1.6. Actividad transcripcional intrínseca y degradación de AIB1	167
1.7. ¿Existen otros mecanismos para la degradación de AIB1?	170
2. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL DE AIB1 EN MITOSIS.....	174
2.1. Una nueva forma mitótica de AIB1	175
2.2. AIB1 se fosforila en Mitosis por el complejo Cdk1-ciclina B	176
2.3. AIB1 se desfosforila a la salida de mitosis.....	177
2.4. ¿Qué residuo o residuos de AIB1 se fosforilan en mitosis?	180
2.5. Función de la fosforilación de AIB1 en Mitosis	183
CONCLUSIONES	189
REFERENCIAS	191
ABREVIATURAS	215
AGRADECIMIENTOS	218

— INTRODUCCIÓN

1. Etiología del cáncer

El cáncer o neoplasia maligna es una enfermedad celular con implicaciones genéticas y epigenéticas causantes de una deficiente respuesta fisiológica que viene acompañada de la falta de control en la proliferación y en la muerte celular programada o apoptosis. Adicionalmente, la evolución desfavorable de la célula cancerosa suele coincidir con una regresión de la diferenciación celular y un empeoramiento del pronóstico.

Con aproximadamente 3.2 millones de casos incidentes y 1.7 millones de muertes estimados para el pasado año 2006 (Ferlay et al., 2007), el cáncer representa uno de los problemas sanitarios más importante en Europa. Mama, colon y pulmón son 3 de los cánceres más comunes en la población, llegando casi a representar el 40% del total de los casos de cáncer diagnosticados (Ferlay et al., 2007).

La estrategia actual en la lucha contra el cáncer consiste en erradicar la enfermedad después de su detección. Sin embargo, la estrategia ideal es la prevención. Para lograr esta prevención es necesario conocer los agentes desencadenantes del cáncer, ya sean éstos externos o inherentes al individuo.

Se desconocen con exactitud los factores que van a determinar la aparición de un cáncer, pero diversos estudios han permitido identificar una serie de factores que, en mayor o menor medida, incrementan el riesgo de padecer esta patología. En la tabla 1 se citan algunos de los factores de riesgo conocidos para cánceres específicos.

El riesgo de sufrir cáncer es determinado por una combinación de factores ambientales y predisposición genética. La etiología del cáncer tiene un origen multifactorial en el cual diversos elementos impactan en la iniciación y progresión de esta patología con distintos grados de relevancia.

Un factor importante que predispone a padecer cáncer es la genética. La historia genética es una parte esencial de cada paciente y su conocimiento puede ayudar a la detección temprana del cáncer en

individuos de alto riesgo. El estudio de cánceres familiares ha permitido el descubrimiento de mutaciones específicas en genes que aumentan la posibilidad de desarrollar cáncer en los familiares que las heredan. Muchos de estos genes son supresores de tumores que están asociados con frecuencia a tejidos específicos, como por ejemplo BRCA1 y BRCA2 en mama y ovario (Radice, 2002) y APC en colon (Fodde, 2002).

Tabla 1: Factores de riesgo en cánceres específicos.

Cáncer	Factores de riesgo
Mama	Edad superior a 40 años; menarquia temprana; primer parto a edad avanzada; nuliparidad; historia familiar de cáncer de mama y/u ovario
Colorrectal	Edad superior a 50 años; poliposis familiar; colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn; dieta rica en grasa y pobre en fibra
Pulmón	Tabaquismo; exposición a asbesto, arsénico, uranio, berilio y níquel
Cérvix	Exposición al virus del papiloma humano
Piel	Individuos de piel clara con tendencia a quemaduras solares
Hígado	Virus hepatitis B; exposición a ácido tánico
Tiroides	Terapia con rayos X en el cuello
Vejiga	Exposición a anilina; exposición al parásito <i>Schistosoma haematobium</i> ; tabaquismo
Leucemia	Exposición a benceno; radiación ionizante

La contribución de los factores ambientales es más difícil de determinar. Estudios epidemiológicos y datos experimentales demuestran que el estilo de vida y los agentes ambientales son los principales causantes del cáncer en humanos. La evaluación del impacto de los carcinógenos ambientales es bastante complicada, ya que éstos tienen orígenes muy variados, diferentes potencias y están afectados por la genética, el metabolismo y el estilo de vida de cada individuo. Algunos de los factores ambientales que influyen en el desarrollo de un tumor son: la dieta, el ejercicio (Pan and DesMeules, 2009), el tabaquismo, el estrés

(Chida et al., 2008), infecciones virales (Ziegler and Buonaguro, 2009), obesidad (Pischon et al., 2008), etcétera.

La hipótesis más factible del origen del cáncer es que una alteración genética inducida por agentes ambientales resulta en una ventaja proliferativa frente al resto de células del entorno. El desarrollo de cáncer en humanos implica una compleja serie de eventos que normalmente ocurren a lo largo de varias décadas. Durante este proceso, los genomas adquieren alelos mutados de genes con carácter estimulador de la proliferación celular (proto-oncogenes) o supresor de la misma (genes supresores de tumores) y otros genes que controlan directa o indirectamente esta proliferación.

La mayoría de las células cancerosas parecen compartir una serie de características comunes, incluyendo la capacidad de generar sus propias señales mitogénicas y escapar de la senescencia natural; la habilidad para resistir a las señales que inhiben la proliferación, evadiendo la apoptosis; la capacidad de invadir el tejido adyacente; y en los cánceres más avanzados, el aumento de vascularización y la metástasis. El gran atributo que les confiere todas estas características es la inestabilidad cromosómica. La probabilidad de mutación de una célula normal es tan baja que sería casi imposible que se sumaran las mutaciones necesarias para completar un proceso neoplásico a lo largo de la vida de un individuo. Sin embargo, se puede adquirir mutabilidad o inestabilidad génica cuando los genes y las proteínas que mantienen la integridad del genoma son alterados.

Es muy difícil definir cómo los diferentes factores contribuyen en la etiología del cáncer, pero lo que está claro para la mayoría de los investigadores es que todos ellos convergen en la inestabilidad cromosómica. Esta inestabilidad acabará por alterar vías de transducción de la señal, provocando que las células no respondan de manera adecuada a las señales externas (Fig. 1). La progresión de un cáncer es el resultado

de modificaciones en las vías que regulan la expresión génica, el metabolismo celular, la proliferación y la supervivencia. Por tanto, es muy importante entender estas vías de señalización y cómo se alteran en cáncer para poder localizar dianas farmacológicas clave y nuevas estrategias que permitan una lucha más eficaz contra esta enfermedad.

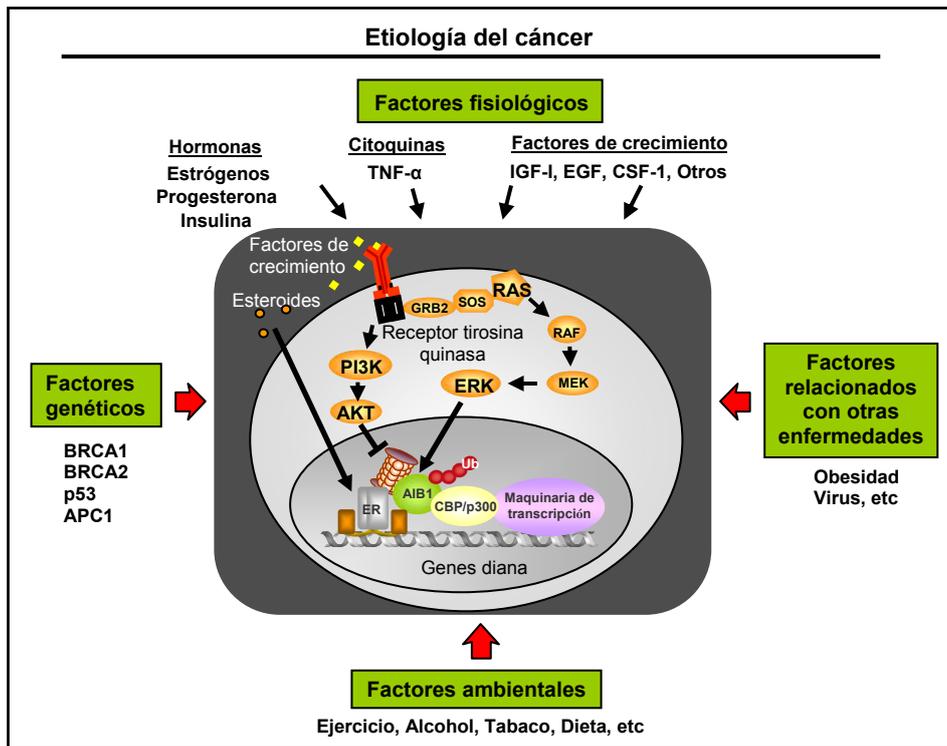


Figura 1: Etiología del cáncer. Vías de transducción de señales. El cáncer está influenciado por diversos factores que convergen en la inestabilidad cromosómica y en la alteración de las vías de señalización. Dos de las vías que con más frecuencia están alteradas en cáncer son: la vía PI3K/AKT y la vía RAS/MAPK.

2. Señalización en cáncer

La señalización es el proceso mediante el cual las células integran la información tanto del medio externo como del interior celular y responden de manera adecuada a los diferentes estímulos. Para este propósito existe un complejo sistema de comunicación intracelular en el que están implicadas moléculas de diversos tipos, tales como lípidos, iones, proteínas adaptadoras, proteínas con actividad enzimática (quinasas, fosfatasas, proteínas G, hidrolasas, etc.) y factores de transcripción. En último término se controlan procesos biológicos, como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la migración, la supervivencia y la homeostasis celular.

Los errores en el procesamiento de la información son responsables de numerosas enfermedades, como el cáncer. El correcto entendimiento de cómo funciona esta señalización en los procesos neoplásicos es clave para poder tratar esta enfermedad eficazmente. Veamos a continuación algunos de los procesos principales implicados en cáncer.

2.1. Estimulación mitogénica: La proliferación celular depende de la existencia de factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. La unión de estos ligandos a sus receptores inicia una cascada de transducción de la señal en la que se activan o inactivan diversas proteínas. Entre las vías principales activadas por estos factores se encuentran la vía de supervivencia celular mediada por la fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K)/AKT, la vía de proliferación celular controlada por las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) ERK1,2 y la vía inducida por estrés mediada por las proteínas quinasa p38MAPK y c-Jun N-Terminal (JNK).

A diferencia de las células normales, las células tumorales tienen una menor dependencia de señales de crecimiento y son capaces de mantener algunas vías de señalización constitutivamente activas. Este estado celular se puede alcanzar a través de la sobreexpresión de factores

de crecimiento o de sus receptores, como por ejemplo HER2/neu, sobreexpresado en aproximadamente un 23% de carcinomas mamarios (Press et al., 2005). Mutaciones activantes en el oncogén *Ras* son frecuentes en tumores de pulmón, páncreas y colon (Scharovsky et al., 2000). Adicionalmente, durante la progresión tumoral se inactivan reguladores negativos de las proteínas implicadas en las vías de señalización, como PTEN (Maehama, 2007).

2.2. Control del ciclo celular: El control del ciclo celular es un proceso fundamental para la regulación de la proliferación. En cáncer es frecuente encontrar alteradas las proteínas que regulan este proceso. Como ejemplos más claros tenemos el caso de los supresores de tumores p53 y la proteína del retinoblastoma (Rb), cuyas vías están mutadas en un gran número de tumores (Sellers and Kaelin, 1997; Wallace-Brodeur and Lowe, 1999).

2.3. Potencial replicativo ilimitado: El mantenimiento de los telómeros, secuencias de DNA repetitivo que se encuentran en los extremos de los cromosomas, es un proceso crucial en cáncer. Debido al proceso de replicación del DNA, las células normales van perdiendo parte de los telómeros tras cada ciclo celular. Cuando el acortamiento de los telómeros alcanza un límite, la célula entra en senescencia replicativa. Sin embargo, las células cancerosas han desarrollado mecanismos, como la reactivación de la telomerasa, para evitar el acortamiento de estas secuencias de DNA y poder proliferar sin límites (Satyanarayana et al., 2004).

2.4. Evasión de la apoptosis: Además de perder el control proliferativo, las células tumorales poseen mecanismos para evitar la apoptosis. Entre algunos de estos mecanismos están la sobreexpresión de

proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Cory et al., 2003), la inactivación de proteínas inductoras de la apoptosis como p53 (Shen and White, 2001) y la activación constitutiva de las vías de supervivencia que mantienen bloqueada la apoptosis.

2.5. Angiogénesis y metástasis: La activación de las vías de señalización RAS/ERK o PI3K/AKT es suficiente para promover la división y la supervivencia celular. Sin embargo, las células en crecimiento necesitan el aporte constante de nutrientes. Es particularmente interesante que estas dos vías pueden controlar la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), un factor clave en la vascularización o angiogénesis (Kranenburg et al., 2004). El aporte de nuevos vasos sanguíneos al tumor va a permitir el mayor suministro de nutrientes y oxigenación al mismo, pero también va a constituir el medio de colonizar nuevos tejidos distantes del tumor primario. La progresión tumoral permite a la célula cancerosa invadir otros tejidos en un proceso que requiere la expresión de genes implicados en la migración, invasión, intravasación/extravasación y colonización de tejidos distantes. En este proceso también es importante la señalización mediada por el factor de crecimiento transformante β (TGF β) (Janda et al., 2002).

3. Familia de los coactivadores de receptores esteroideos

Las proteínas de la familia de coactivadores de receptores esteroideos SRC o proteínas p160 fueron inicialmente identificadas como factores que interaccionaban y potenciaban la transcripción dependiente de receptores nucleares.

3.1. Introducción a los Receptores Nucleares

Los receptores nucleares, como los receptores de hormona tiroidea, los receptores de retinoides y los receptores esteroideos, comprenden una

gran familia de factores de transcripción implicados en numerosos aspectos de la fisiología humana, tales como la reproducción, el desarrollo y el metabolismo.

Las actividades de la mayoría de los receptores nucleares están reguladas por pequeñas moléculas lipofílicas, que incluyen hormonas esteroideas y tiroideas, ácidos biliares, ácidos grasos, ciertas vitaminas y prostaglandinas.

Los receptores nucleares comparten una organización estructural común con tres dominios funcionales principales: dominio de unión a DNA (DBD) en la región central, dominio de activación funcional 1 (AF-1) en el extremo amino-terminal y dominio de unión a ligando (LBD) que contiene el dominio de activación funcional 2 (AF-2) en la región carboxi-terminal (Kumar and Thompson, 1999) (Fig. 2).

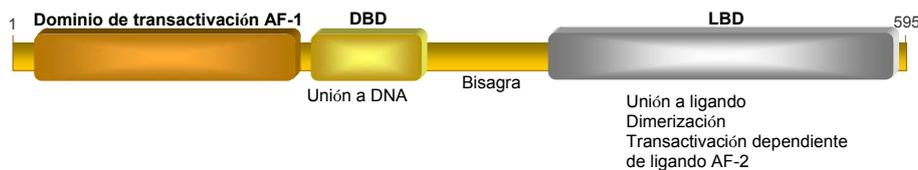


Figura 2: Estructura del receptor de estrógenos α : dominios y funciones. El receptor de estrógenos α (ER α) es un tipo de receptor esteroideo, al igual que ER β , cuyo ligando son los estrógenos. El DBD es el dominio más conservado y es responsable de la interacción con secuencias específicas en el DNA y de interacciones proteína-proteína. El LBD, moderadamente conservado, está formado por 12 hélices α plegadas en una estructura globular, y es responsable de la unión de ligando y de aspectos de homo y heterodimerización. Este dominio contiene la región de activación transcripcional dependiente de ligando 2 (AF2), que en algunos casos puede tener la conformación activa en ausencia de éste. La región amino-terminal es la menos conservada. En esta región se localiza el dominio AF-1, implicado en la transactivación independiente de ligando. Aunque tanto AF-1 como AF-2 pueden regular la transcripción de manera independiente, la plena actividad transcripcional requiere del sinergismo entre ambos dominios.

Para regular la expresión génica los receptores nucleares cooperan con una serie de moléculas reguladoras. Dependiendo del efecto activador o supresor de estos correguladores, se habla de coactivadores o correpresores respectivamente (Hermanson et al., 2002; Lonard and O'Malley, 2006). El paso inicial en la activación de la transcripción es la liberación de los receptores nucleares de sus correpresores. En general, después de la unión del ligando, el receptor nuclear sufre un cambio de conformación que le permite disociarse de estos inhibidores y reclutar varios coactivadores y moléculas reguladoras, formándose el complejo coactivador. A continuación, este complejo provoca modificaciones químicas y estructurales en la cromatina y comunica con la maquinaria de la transcripción basal para activar, finalmente, la expresión de los genes diana (Kishimoto et al., 2006) (Fig. 3).

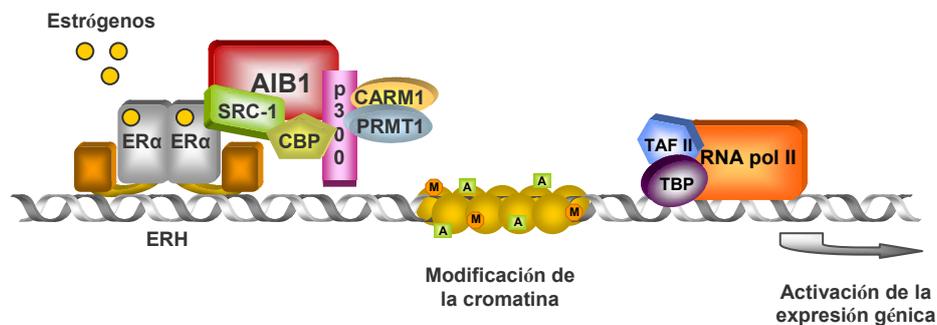


Figura 3: Modelo simplificado del mecanismo molecular de la función de los receptores nucleares. Hormonas, factores de crecimiento y citoquinas inducen la transcripción mediada por receptores nucleares. Los receptores nucleares unidos a hormona reconocen secuencias específicas en el DNA, conocidas con el nombre de elementos de respuesta a hormona (HREs), a través del dominio DBD. Una vez unidos, empiezan a reclutar coactivadores que a su vez interaccionan con histona acetiltransferasas (CBP/p300 y pCAF) y con histona metiltransferasas (PRMT1 y CARM1). Estos eventos resultan en la modificación de la cromatina, permitiendo su desplegamiento y facilitando el ensamblaje de la maquinaria de transcripción: RNA polimerasa II, proteína de unión a TATA (TBP) y factores asociados a TBP (TAFIIs). A, acetilación de histonas; M, metilación de histonas.

3.2. La familia SRC

Entre el amplio espectro de coactivadores conocidos para los receptores nucleares, las proteínas de la familia de coactivadores de receptores esteroideos SRC han sido las más estudiadas. Hasta la fecha, tres miembros comprenden esta familia: SRC-1/NCoA1 (coactivador de receptores nucleares 1) (Onate et al., 1995), SRC-2/NCoA2/TIF2 (factor intermediario transcripcional 2)/GRIP1 (proteína de interacción con el receptor de glucocorticoides 1) (Hong et al., 1997) y SRC-3/NCoA3/AIB1 (amplificado en cáncer de mama 1)/RAC3 (proteína de interacción con el receptor de ácido retinoico 3)/ACTR (molécula activada acetiltransferasa del receptor de hormona tiroidea 1) o p/CIP (proteína de interacción con p300/CBP) (Anzick et al., 1997; Chen et al., 1997; Li et al., 1997; Suen et al., 1998; Takeshita et al., 1997; Torchia et al., 1997).

Las proteínas SRC-1, TIF2 y AIB1 están codificadas por genes diferentes localizados en las regiones cromosómicas 2p23, 8q21.1 y 20q12 respectivamente (Anzick et al., 1997; Carapeti et al., 1998; Kalkhoven et al., 1998). Estos coactivadores tienen un tamaño de alrededor de 160 KDa y comparten un 50-55% de similitud de secuencia y un 43-48% de identidad de secuencia.

Estructuralmente (Fig. 4), la región amino-terminal es la más conservada. En esta región, todos los miembros poseen un dominio básico hélice-vuelta-hélice (bHLH) seguido de dos dominios PAS, identificados inicialmente en las proteínas Per, Arnt y Sim de *Drosophila* e implicados en la unión a DNA y en interacciones proteína-proteína (Huang et al., 1993). El dominio bHLH/PAS puede contribuir a la función coactivadora reclutando otros coactivadores, como GAC63, CoCoA, Flightless 1 y ANCO1 (Chen et al., 2005; Kim et al., 2003; Lee et al., 2004; Zhang et al., 2004) o interaccionando directamente con varios factores de transcripción, como la miogenina, el factor potenciador específico de miocitos 2C (MEF-2C), factores potenciadores de la transcripción (TEFs) y transductores y

activadores de la señal (STATs) (Belandia and Parker, 2000; Chen et al., 2000; Litterst et al., 2003).

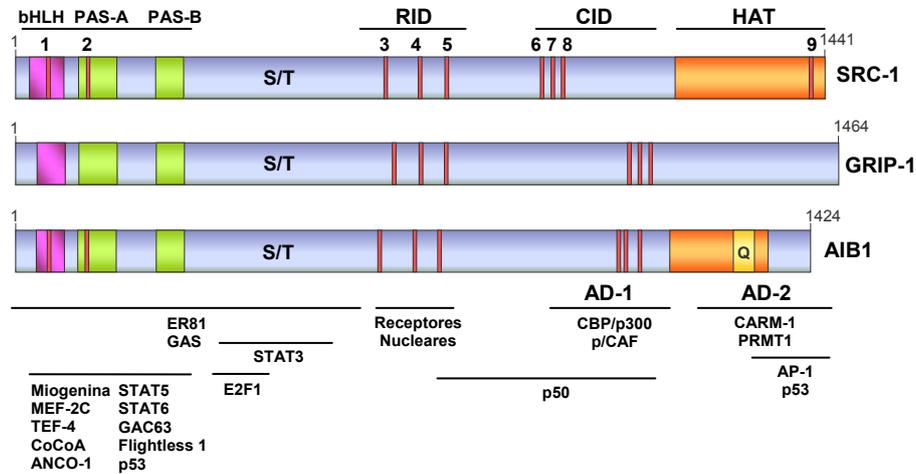


Figura 4: Dominios estructurales de las proteínas SRC. La región amino-terminal contiene el dominio bHLH/PAS que corresponde con el dominio más conservado; S/T, región rica en serinas y treoninas; 1-9, motivos LXXLL; RID, dominio de interacción con receptores nucleares; CID, dominio de interacción a CBP/p300; HAT, actividad histona acetiltransferasa intrínseca; Q, cadena de poliglutaminas; AD-1, dominio de activación transcripcional 1; AD-2, dominio de activación transcripcional 2. En la parte inferior de la figura se representan las zonas de interacción con diversas proteínas reguladoras y factores de transcripción.

La región central, que está relativamente conservada, contiene tres motivos LXXLL, donde L corresponde a leucina y X a cualquier aminoácido. Estos motivos también son conocidos con el nombre de cajas de receptores nucleares por ser los responsables de la interacción con estos factores de transcripción. A través de análisis cristalográficos se ha visto que el motivo LXXLL forma una hélice α anfipática que es capaz de interactuar con la superficie hidrofóbica del AF-2, formada tras la unión del receptor nuclear a su ligando (Shiau et al., 1998). Diversos estudios han demostrado que el

motivo LXXLL es suficiente y necesario para mediar la interacción con receptores nucleares (Ding et al., 1998; Heery et al., 1997; Li and Chen, 1998; Voegel et al., 1998). Sin embargo, no todos los motivos LXXLL exhiben la misma afinidad para los distintos receptores nucleares (Leo et al., 2000), sugiriendo que estos receptores muestran preferencias por los diferentes coactivadores. De hecho, el motivo LXXLL es necesario para la unión pero los aminoácidos flanqueantes son importantes para el reconocimiento específico del receptor nuclear (Savkur and Burris, 2004; Zhou et al., 2010).

En la región carboxi-terminal existen dos dominios de activación transcripcional, AD-1 y AD-2. El dominio de activación transcripcional se define mediante ensayos transcripcionales con genes indicadores y proteínas de fusión que contienen el dominio de unión a DNA de Gal4 y fragmentos de las proteínas SRC. El dominio AD-1 media la interacción con histona acetiltransferasas (HATs), como CBP/p300, pCAF y más recientemente, con GCN5 (Brown et al., 2003). En este dominio también existen varios motivos LXXLL, si bien son algo diferentes de aquellos que reconocen receptores nucleares. La mutagénesis directa en residuos clave o delección de estos motivos impide el reclutamiento de CBP/p300 y suprime la función coactivadora de los factores SRC (Demarest et al., 2004; McInerney et al., 1998; Voegel et al., 1998), sugiriendo la importancia de esta interacción en la función de estos coactivadores. Por otra parte, la región AD-2 es responsable de la interacción con las histona metiltransferasas CARM1 y PRMT1 (Chen et al., 1999a) que también están implicadas en el remodelamiento directo de la cromatina y en el ensamblaje de la maquinaria de transcripción. El extremo carboxi-terminal de SRC-1 y AIB1 contiene una débil actividad HAT, aunque su relevancia no está clara todavía (Chen et al., 1997; Spencer et al., 1997). Estos dos coactivadores podrían, por tanto, estar directamente implicados en el remodelamiento de la cromatina. Finalmente, AIB1 presenta una cadena de poliglutaminas

(entre 26 y 32 aminoácidos de este tipo) dentro de la región carboxi-terminal. Aunque se desconoce la importancia biológica de este polimorfismo, se ha observado que los genotipos más cortos promueven carcinomas de ovario más agresivos (Li et al., 2005). En cuanto a cáncer de mama, los estudios son controvertidos pero parecen indicar que no existe un mayor riesgo de cáncer asociado a la longitud de la cadena de glutaminas en portadores de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 (Haiman et al., 2000; Spurdle et al., 2006).

Funcionalmente, se ha propuesto que los coactivadores SRC podrían servir como proteínas puente entre los receptores nucleares y la maquinaria de transcripción basal. Sin embargo, los 3 miembros son capaces de interactuar y coactivar no sólo receptores nucleares, sino también numerosos factores de transcripción, como AP-1 (Lee et al., 1998; Yan et al., 2006), NF- κ B (Na et al., 1998; Werbajh et al., 2000; Wu et al., 2002), transductores y activadores de la señal (STATs) (Giraud et al., 2002; Litterst and Pfitzner, 2002; Razeto et al., 2004), factores nucleares de hepatocitos (HNFs) (Iordanidou et al., 2005; Soutoglou et al., 2000), factores de transcripción dependientes de MAP quinasas (Ets) (Goel and Janknecht, 2004; Myers et al., 2005), p53 (Lee et al., 1999) y E2F1 (Louie et al., 2004). Esto significa que las proteínas de la familia p160 desempeñan más funciones en la regulación celular de las que en principio se pensaban. De esta manera, cambios en los niveles y actividades de estos coactivadores podrían alterar en gran medida los niveles de expresión de muchos genes y, en consecuencia, afectar numerosos procesos celulares. La familia SRC y, en concreto AIB1, es bien conocida por su potencial oncogénico, por tanto, el estudio de los factores que afectan los niveles y las actividades de estos coactivadores es de gran importancia a la hora de investigar nuevas aproximaciones terapéuticas en cáncer.

4. Funciones fisiológicas de AIB1

La mayor parte del conocimiento que hoy se tiene sobre el papel de AIB1 en la fisiología viene directamente del estudio de modelos animales.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica utilizando el gen LacZ como indicador en un modelo murino “knock-in” se ha demostrado que AIB1 se expresa en ovocitos, musculatura lisa del oviducto, epitelio de la vagina, glándula mamaria, músculo liso de los vasos sanguíneos y del intestino, hepatocitos, hipocampo, bulbo olfatorio y en la capa granular interna del cerebelo (Xu et al., 2000). Como se puede apreciar, algunos de estos tejidos están relacionados con respuesta a hormonas, lo que sugiere que AIB1 tiene una función importante en la respuesta endocrina. El estudio con modelos knockout refuerza esta hipótesis. La disrupción génica de AIB1 en ratones resulta en un fenotipo pleiotrópico que muestra retraso en el crecimiento, tamaños corporales reducidos en los animales adultos, disminución de la función reproductora en hembras y retraso en el desarrollo de la glándula mamaria (Xu et al., 2000).

4.1. Función de AIB1 durante el desarrollo

El reducido crecimiento somático y tamaño corporal de los ratones deficientes para AIB1 (AIB1^{-/-}) es resultado de la pérdida de regulación en la expresión de IGF-I en tejidos específicos y de un defecto en la respuesta a este factor de crecimiento (Wang et al., 2000). En los ratones knockout de AIB1 no se encuentran diferencias significativas en los niveles de hormona del crecimiento, pero se observa un 40% de reducción en los niveles de IGF-I en suero (Xu et al., 2000).

A diferencia de los ratones AIB1^{-/-}, los ratones SRC1^{-/-} y TIF2^{-/-} exhiben un crecimiento normal, indicando funciones específicas para los diferentes coactivadores p160.

Estas observaciones sugieren que AIB1 es un importante modulador del crecimiento en mamíferos, y que la señalización mediada por IGF-I es un efector esencial en su función fisiológica.

4.2. Función de AIB1 en la reproducción

Aunque la función reproductora en machos AIB1^{-/-} sólo se halla ligeramente reducida, las hembras exhiben un desarrollo y una función anormal de su sistema reproductor. Lo primero que hay que destacar es el bajo nivel de estrógenos en las hembras AIB1^{-/-} de todas las edades, que podría ser la causa del retraso de la pubertad (Xu et al., 2000). Además, estas hembras presentan un bajo desarrollo de la glándula mamaria, en respuesta a estrógenos y progesterona, y una reducida capacidad de ovulación (Xu et al., 2000). El descenso en ovulación podría ser atribuido al pobre desarrollo folicular, debido a los bajos niveles de estrógenos o a un bloqueo parcial de la maduración del ovocito por la ausencia de AIB1 en este tipo celular.

A diferencia de lo que ocurre en AIB1^{-/-}, los ratones TIF2^{-/-} tienen fertilidad impedida en ambos sexos (Gehin et al., 2002). La baja fertilidad en machos es debida a degeneración testicular y defectos en la espermiogénesis (teratozoospermia), mientras que en hembras se debe a una hipoplasia de la placenta.

El receptor de progesterona (PR) es un mediador esencial de la fertilidad en hembras y del desarrollo de los tejidos reproductivos (Conneely et al., 2001). Se ha demostrado que PR coordina la actividad coactivadora de los SRCs de manera distinta en diferentes tejidos. Mientras AIB1 es el coactivador principal en mama, SRC-1 lo es en el útero y TIF2 es indispensable en ambos tejidos (Mukherjee et al., 2007). En ausencia de TIF2, las células uterinas son incapaces de facilitar la implantación del embrión. Además, a pesar de los niveles normales de PR, SRC-1 y AIB1, la morfogénesis de la ramificación ductal y la formación de alvéolos en la

glándula mamaria están impedidas cuando falta TIF2. Estas observaciones revelan la importancia de TIF2 en la biología de la implantación y en el desarrollo de la glándula mamaria inducido por progesterona, y sugieren su potencial como diana clínica para la salud reproductora y/o el cáncer de mama en mujeres.

4.3. Función de AIB1 en el metabolismo

Se ha observado que los ratones AIB1^{-/-} muestran signos de mayor gasto energético debido a una mayor función mitocondrial en el tejido adiposo pardo y en músculo esquelético. Estos animales exhiben un menor peso corporal (Coste et al., 2008). En cuanto al mecanismo molecular, AIB1 regula la expresión de la histona acetiltransferasa GCN5 que acetila y, en consecuencia, inhibe la actividad del coactivador de PPAR γ PGC-1 α , que es importante en la termogénesis adaptativa y en el metabolismo de la glucosa. La ingesta calórica induce la expresión de AIB1, lo que resulta en una inhibición de PGC-1 α y del gasto energético. Por el contrario, la restricción calórica reduce los niveles de AIB1, aumentando la actividad de PGC-1 α y, por tanto, el gasto energético (Coste et al., 2008). Además, AIB1 es un regulador crítico en el desarrollo del tejido adiposo blanco (Louet et al., 2006). En ausencia de AIB1, la diferenciación de los adipocitos está impedida debido a la reducción de la actividad de los factores de transcripción C/EBP α y δ y, en consecuencia, a la disminución de la expresión de PPAR γ 2, factor de transcripción esencial en la adipogénesis. De manera similar, SRC-1 y TIF2 también están implicados en el control de la homeostasis de energía (Picard et al., 2002). Sin embargo, mientras los ratones TIF2^{-/-} están protegidos frente a la obesidad y exhiben una elevada termogénesis adaptativa, los ratones SRC-1^{-/-} tienen tendencia a la obesidad debido a un reducido gasto energético.

4.4. Función de AIB1 en otros tejidos

AIB1 también se expresa en el músculo liso de los vasos sanguíneos y en las células endoteliales. Se ha visto que este coactivador puede facilitar los efectos vasoprotectores mediados por estrógenos a través de la inhibición de la formación de la neoíntima tras el daño vascular (Yuan et al., 2002).

Otra función importante la desempeña en el proceso inflamatorio. En macrófagos, AIB1 tiene una nueva función citoplásmica por la cual activa los silenciadores de la traducción TIA-1 y TIAR con la posterior inhibición de la traducción de citoquinas proinflamatorias (Yu et al., 2007). Este efecto fue inicialmente observado en los macrófagos de ratones AIB1^{-/-}. Estas células producían de manera significativa una mayor cantidad de IL-6, IL-1 β y TNF- α en respuesta a endotoxemia, aún cuando los niveles de sus RNA mensajeros (mRNA) permanecían inalterados. Este resultado indica que AIB1 tiene una función protectora frente al choque séptico desencadenado por una respuesta inflamatoria aguda.

Finalmente, se ha demostrado que la hematopoyesis en ratones AIB1^{-/-} también está afectada. La ausencia de AIB1 provoca un descenso de las plaquetas y un aumento en el número de linfocitos, de manera que con la edad se puede incluso llegar al desarrollo de linfomas de células B (Coste et al., 2006). Por tanto, AIB1 tiene un papel antiproliferativo en el sistema linfoide.

Todos estos estudios revelan que AIB1 posee múltiples funciones y que dependiendo del tipo celular puede inducir proliferación, por ejemplo en las células epiteliales de la glándula mamaria, o inhibirla en otros, como en la línea linfoide (ver esquema, Fig. 5). Además, se demuestra que a pesar de la similitud de secuencia y de dominios funcionales, las proteínas p160 exhiben funciones específicas en diferentes tejidos.

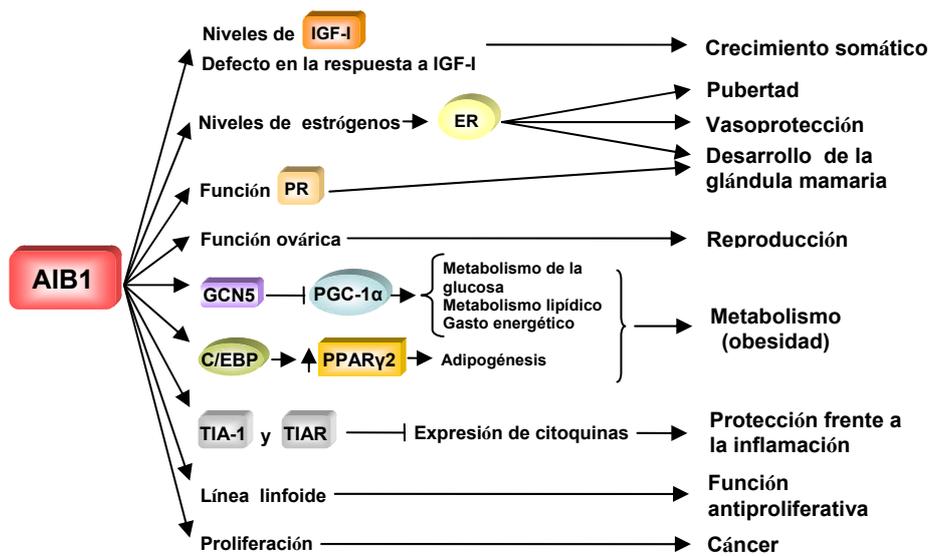


Figura 5: Esquema resumen de las funciones de AIB1. AIB1 regula el crecimiento somático afectando los niveles de IGF-I y la respuesta de los tejidos a este factor de crecimiento. AIB1 afecta los niveles de estrógenos y, por tanto, la función de ER, hecho importante en la regulación de la pubertad, el desarrollo de la glándula mamaria y en vasoprotección. AIB1 también es importante en la ovulación, regulando la función reproductora de las hembras a través de un mecanismo desconocido. AIB1 regula el metabolismo a través de PGC-1 α , y la adipogénesis a través de C/EBP. AIB1 está implicado en proliferación, y su expresión y función alteradas pueden ser importantes en tumorigénesis. Además, AIB1 posee una función antiproliferativa en linfocitos. Finalmente, AIB1 tiene un papel en la inflamación, inhibiendo la traducción de citoquinas.

5. La sobreexpresión de AIB1 afecta a la iniciación y la progresión del cáncer

Entre los tres coactivadores de la familia SRC, AIB1 es el que más atención ha recibido, ya que numerosas evidencias han demostrado que se trata de un oncogén que interviene en la iniciación y en la progresión del cáncer.

5.1. Evidencias de biopsias y modelos animales

En carcinomas de mama humano es frecuente encontrar amplificada la región cromosómica 20q11-12 (Guan et al., 1994). El intento por identificar posibles oncogenes en esta región llevó al aislamiento de tres candidatos, AIB1, AIB3 y AIB4 (Guan et al., 1996). Desde entonces las frecuencias de amplificación y sobreexpresión de AIB1 se han estudiado con minucioso cuidado.

En biopsias de cáncer de mama, la amplificación del gen de AIB1 se ha observado en un 2-10% de los casos (Anzick et al., 1997; Bautista et al., 1998; Iwase et al., 2003; Kirkegaard et al., 2007; Shibata et al., 2001). Sin embargo, la sobreexpresión de este coactivador se ha encontrado en un 13-64% de los tumores (Anzick et al., 1997; Bouras et al., 2001; Glaeser et al., 2001), indicando que es posible la sobreexpresión de un gen en ausencia de amplificación en cáncer de mama. Resulta particularmente interesante una variante de AIB1 (AIB1- Δ 3) que pierde el dominio bHLH/PAS y que también se ha visto sobreexpresada en biopsias de cáncer de mama y en la línea celular MCF-7 (derivada de un cáncer de este tipo) (Reiter et al., 2001).

La amplificación y la sobreexpresión de AIB1 no están restringidas a cáncer de mama. También se ha encontrado mayor número de copias y/o de expresión en otros tipos de cáncer, como cáncer de endometrio, ovario y próstata (Glaeser et al., 2001; Nessler-Menardi et al., 2000; Tanner et al., 2000), carcinoma de páncreas y carcinoma gástrico (Ghadimi et al., 1999; Sakakura et al., 2000), carcinoma de células escamosas del esófago (Xu et al., 2008; Xu et al., 2007), carcinoma nasofaríngeo (Liu et al., 2008), carcinoma urotelial (Luo et al., 2008), cáncer de colon (Grivas et al., 2009; Lassmann et al., 2007; Xie et al., 2005; Zeng et al., 2005), carcinoma hepatocelular (Wang et al., 2002), melanoma cutáneo (Rangel et al., 2006) y en cáncer de pulmón de células no pequeñas (He et al., 2010).

En general, los tumores malignos son clasificados en cuanto a su tamaño, grado de diferenciación, grado de expansión a los nódulos linfáticos y la presencia de metástasis. Los tumores de alto grado presentan poca diferenciación y mal pronóstico. Es importante destacar que la elevada expresión de AIB1 ha sido correlacionada con pronóstico pobre en cáncer (Harigopal et al., 2008). De acuerdo con esta observación, los tumores de mama que muestran altos niveles de AIB1 presentan tiempos de supervivencia y tiempos libres de enfermedad tras la extirpación del tumor más cortos (Zhao et al., 2003). Algo parecido ocurre en otros tipos de tumores, como por ejemplo en carcinomas de endometrio, donde se ha observado una correlación entre la sobreexpresión de AIB1 y el estadio clínico, la invasión del miometrio y la dediferenciación (Balmer et al., 2006; Han et al., 2007; Hirai et al., 2004; Sakaguchi et al., 2007). En cáncer de páncreas también se han encontrado mayores niveles de AIB1 y mayor localización nuclear de este coactivador a medida que el tumor progresa (Henke et al., 2004). Estas evidencias sugieren que la sobreexpresión de AIB1 puede ser importante en la adquisición de fenotipos invasivos y/o metastáticos y, por tanto, este coactivador podría ser utilizado como marcador pronóstico en cáncer.

El desarrollo de modelos murinos ha sido una de las herramientas más importantes a la hora de entender los mecanismos moleculares por los que AIB1 promueve la progresión en cáncer. Torres-Arzayus y colaboradores establecieron un modelo transgénico de AIB1 bajo el control del promotor MMTV para dirigir su expresión al epitelio mamario. Estos ratones presentaron un mayor número de lesiones hiperplásicas y una mayor incidencia de tumores no sólo en glándula mamaria, sino también en pulmón, pituitaria y útero, coincidiendo con la expresión ectópica de AIB1 en estos órganos y de acuerdo con la hipótesis de que este coactivador está implicado en una amplia variedad de cánceres. El análisis de las glándulas mamarias de estos ratones reveló que AIB1 activaba la vía de

señalización PI3K/AKT/mTOR al aumentar los niveles circulantes de IGF-I (Torres-Arzayus et al., 2004). Por tanto, parecía claro que AIB1 era un potente oncogén y que su mecanismo de oncogenicidad implicaba la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR. Por otra parte, también se generó el modelo murino que expresaba la isoforma truncada de AIB1 (AIB1- Δ 3) bajo el control del promotor de expresión constitutiva CMV (Tilli et al., 2005). Aunque no se observaron tumores, estos ratones mostraban una mayor masa de la glándula mamaria, así como una mayor proliferación. Probablemente, la ausencia de tumores era debida a la baja expresión del transgén y a la ausencia de elevados niveles sistémicos de IGF-I. En nuestro laboratorio también se creó un modelo transgénico que expresaba niveles moderados de AIB1 (Avivar et al., 2006). Al igual que en el modelo AIB1- Δ 3, los ratones no generaron tumores. Sin embargo, se observó una mayor hiperplasia mamaria durante el inicio de la pubertad, sugiriendo que la sobreexpresión de AIB1 podía representar uno de los cambios preneoplásicos en el tejido mamario.

El estudio de la pérdida de AIB1 en ratones knockout ha revelado información complementaria. Los ratones AIB1^{-/-} no generan tumores por sí solos, pero existen modelos que sí lo hacen, como MMTV/*v-Ha-ras* y MMTV-*Neu* en mama, TRAMP en próstata y TR β ^{PV/PV} en tiroides. En el caso de los ratones AIB1^{-/-}, la formación de tumores se puede conseguir a través del carcinógeno dimetilbenz[α]antraceno (DMBA). A diferencia de lo que ocurre en los ratones silvestres, la morfogénesis ductal de la glándula mamaria y la aparición de tumores palpables está significativamente retrasada en los ratones deficientes en AIB1 (Kuang et al., 2005). Parece que la ausencia de AIB1 protege frente a la carcinogénesis inducida por DMBA. Por otra parte, en los ratones transgénicos de oncogenes conocidos que sí generan tumores, la pérdida de AIB1 disminuye la incidencia tumoral y bloquea las metástasis (Chung et al., 2007; Fereshteh et al., 2008; Kuang et al., 2004; Ying et al., 2008). Estos resultados sugieren que el bloqueo de

la función de AIB1 podría ser una buena aproximación para suprimir la tumorigénesis.

Tanto los estudios clínicos como los modelos animales revelan una clara capacidad oncogénica para AIB1. Por tanto, los factores que influyen los niveles y la actividad de este coactivador serán de gran importancia a la hora de determinar el potencial oncogénico de un tejido.

5.2. Mecanismos moleculares de la actividad oncogénica de AIB1

Las células tumorales dependen de la señalización por diversas vías para su supervivencia y crecimiento. La importancia de AIB1 en estas vías ha sido demostrada en un gran número de estudios que a continuación se detallan.

5.2.1. MECANISMOS DEPENDIENTES DE HORMONA

5.2.1.1. Señalización mediada por receptores esteroideos

Las hormonas sexuales o esteroideos, como por ejemplo los estrógenos, andrógenos y la progesterona, afectan el crecimiento y la función de los órganos reproductores, el desarrollo de las características sexuales y el patrón de comportamiento de los animales. Sin embargo, estas hormonas también están estrechamente relacionadas con la tumorigénesis en cáncer de mama, ovario, endometrio y próstata.

Debido a que las hormonas esteroideas median su función a través de receptores nucleares, y que AIB1 es un coactivador de este tipo de factores de transcripción, es razonable pensar que la sobreexpresión de AIB1 junto a una mayor exposición a esteroideos pudiera resultar en una mayor actividad de los receptores nucleares (Fig. 6). En este sentido, la amplificación y la sobreexpresión de AIB1 han sido correlacionadas con la presencia de receptor de estrógenos (ER) y de receptor de progesterona (PR) en cáncer de mama y de ovario (Bautista et al., 1998; Kurebayashi et al., 2000; Rey et al., 2000; Tanner et al., 2000). Se ha demostrado que

AIB1 y ER pueden estar asociados y colocalizar en el núcleo de células ER-positivas (Azorsa et al., 2001), donde este coactivador es requerido para la unión de ER a los promotores de sus genes diana. De esta manera, el tratamiento con 17- β -estradiol induce un dramático incremento en la ocupación de ER α y de AIB1 en los promotores de CATD, pS2 y c-Myc en células MCF-7 (Shang et al., 2000). Por el contrario, la supresión de AIB1 con RNA de interferencia reduce esta ocupación (Shao et al., 2004b), disminuyendo el crecimiento celular y la proliferación inducida por estrógenos (List et al., 2001a). A diferencia de AIB1, SRC-1 interacciona en menor medida con ER tras el tratamiento con estrógenos en células MCF-7 (Tikkanen et al., 2000). Por tanto, AIB1 podría tener un papel específico mediando la transcripción dependiente de estrógenos en cáncer de mama.

Se plantea, pues, la hipótesis de que AIB1 está implicado en la progresión del cáncer a través de la sobreestimulación de la función de ER. Apoyando esta idea, se ha observado una mayor regulación de la señalización por ER en tumores ER-positivos durante la progresión del cáncer de mama. Esto es debido a un incremento en la expresión de factores que pueden activar la función de ER (Murphy et al., 2000). Hay que destacar que la isoforma AIB1- Δ 3 tiene una mayor eficacia a la hora de activar a ER α , probablemente, porque al perder el dominio bHLH/PAS está más disponible para los receptores nucleares. Los tumores que sobreexpresan esta isoforma pueden presentar una mayor proliferación celular inducida por estrógenos (Reiter et al., 2004).

Todos estos resultados sugieren que la sobreexpresión de AIB1 podría contribuir a la tumorigénesis sobreestimulando la transactivación mediada por receptores esteroideos. Sin embargo, aunque es probable que AIB1 contribuya a la progresión del cáncer a través de este mecanismo en tumores dependientes de hormona, la sobreexpresión de este coactivador también ha sido descrita en líneas celulares y tumores ER- y PR-negativos

(Bouras et al., 2001), indicando que existen mecanismos independientes de hormona en el proceso carcinogénico de AIB1.

5.2.2. MECANISMOS INDEPENDIENTES DE HORMONA

Existen datos que apoyan la idea de que AIB1 está implicado en tumorigénesis a través de vías de señalización diferentes de las mediadas por esteroides: 1- AIB1 es capaz de interactuar y coactivar no sólo receptores nucleares, sino también otros factores de transcripción, 2- su sobreexpresión no siempre correlaciona con la expresión de ER o PR y 3- se ha visto amplificación y sobreexpresión de AIB1 en varios cánceres independientes de regulación hormonal.

Durante los últimos años se han realizado numerosos esfuerzos para estudiar la importancia de AIB1 como coactivador de factores de transcripción no esteroideos en el crecimiento, en la proliferación celular y en el desarrollo del cáncer. Hasta la fecha, AIB1 ha sido implicado en varias vías de señalización, incluyendo la vía IGF/PI3K/AKT, la vía HER2/neu, la vía NF- κ B y la señalización mediada por E2F1. A continuación se estudiará cómo este coactivador afecta a cada una de las vías anteriores.

5.2.2.1. Señalización mediada por factores de crecimiento

Vía de señalización IGF/PI3K/AKT

Varios estudios han demostrado el papel clave que juegan los receptores tirosina quinasa en la formación y la progresión del cáncer. En particular, se ha visto que IGF-IR, receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1, que también reconoce IGF-II e insulina en menor medida, desempeña una función en la transformación maligna, en la progresión, en la protección frente a la apoptosis y en la metástasis (Samani et al., 2007).

La unión de IGF-I a su receptor tirosina quinasa (IGF-IR) da paso al inicio de la señalización a través de los sustratos del receptor de insulina, IRS1 e IRS2, que se asocian y activan varias quinasas intracelulares,

incluyendo a PI3K. La activación de PI3K resulta en la activación de las quinasas PDK-1 y AKT. Una vez activo, AKT induce la fosforilación, directa o indirecta, de un gran número de sustratos, entre los que se incluyen GSK3 β , mTOR, p70S6K, caspasa 9, BAD, etcétera. La señalización a través de esta vía controla diversos procesos biológicos, como el metabolismo, la supervivencia celular y la proliferación (Franke, 2008) (Fig. 6).

Modelos animales y estudios en tumores humanos y líneas celulares han demostrado que AIB1 está implicado en la regulación de la actividad de AKT. Existe una correlación entre AIB1 y los niveles de expresión de los componentes de la vía de señalización IGF/PI3K/AKT. Las glándulas mamarias de ratones transgénicos para AIB1 muestran altos niveles de IGF-IR y AKT fosforilados, indicando que esta vía es más activa en estos animales (Torres-Arzayus et al., 2004). Como ya se describió anteriormente, la elevada actividad es debida a un aumento en los niveles de IGF-I circulantes. Cabe destacar que el tratamiento de ratones transgénicos para AIB1 con el inhibidor de mTOR RAD001 revierte el fenotipo premaligno y su combinación con tamoxifeno (antagonista de ER) mejora el resultado terapéutico de varios cánceres de mama ER-positivos que sobreexpresan AIB1 (Torres-Arzayus et al., 2006). Estos datos proporcionan apoyo para el desarrollo clínico de RAD001, y sugieren que AIB1 podría utilizarse como factor predictivo en la respuesta a este tratamiento. Por otra parte, la delección de AIB1 en ratones resulta en un retardo del crecimiento y una reducción de los niveles totales de IGF-I (Xu et al., 2000). El estudio con ratones MMTV/*v-H-ras* AIB1^{+/+}, AIB1^{+/-} y AIB1^{-/-} también ha proporcionado evidencias de la oncogénesis mediada por AIB1 a través de IGF-I (Kuang et al., 2004). En estos animales, la deficiencia de AIB1 causa una cierta resistencia a este factor de crecimiento debido a una reducción significativa de los sustratos del receptor de insulina IRS-1 e IRS-

2. La impedida señalización por IGF-I es responsable en parte de la supresión de la tumorigénesis mamaria y la metástasis en estos ratones.

En biopsias de cánceres de próstata humanos la fuerte expresión de AIB1 correlaciona con una mayor proliferación y niveles elevados de AKT fosforilado (Zhou et al., 2005). Es interesante citar que los tumores de próstata humanos y las líneas celulares derivadas de éstos resultan en un inesperado aumento de la proliferación cuando son tratados con bortezomib. El bortezomib (PS-341; velcade) es un inhibidor del proteasoma con actividad en varias líneas celulares de cáncer, incluyendo cáncer de próstata (Ikezoe et al., 2004), y en varios tumores sólidos y hematológicos (Ludwig et al., 2005). Como se explicará más adelante, AIB1 es diana del sistema proteasoma, por tanto, al bloquear su degradación se consiguen mayores niveles de este coactivador, mayores niveles de AKT y una mayor proliferación celular. Terapias duales que inhibieran tanto la actividad del proteasoma como la activación de AKT podrían mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer de próstata (Ayala et al., 2008).

Los resultados con líneas celulares también están de acuerdo con los obtenidos en biopsias y modelos animales. La sobreexpresión de AIB1 produce un aumento en los niveles de componentes de la vía IGF/PI3K/AKT, mientras que su silenciamiento resulta en una disminución de estas proteínas (Yan et al., 2006). Un estudio en células MCF-7 encontró una disminución de la formación de colonias sobre agar inducida por IGF-I después del silenciamiento de la expresión de AIB1 (Oh et al., 2004). En estas células, los niveles de expresión de ciclina D1, Bcl-2, ERK2, IGF-IR e IRS1 estaban también reducidos incluso en presencia de antiestrogénicos, sugiriendo que la actividad de AIB1 era requerida para mantener la señalización por AKT de manera independiente de la señalización mediada por ER. En líneas celulares derivadas de cánceres de próstata como LNCaP y PC3, la sobreexpresión de AIB1 también promueve el crecimiento celular al aumentar los niveles de AKT activo (Zhou et al.,

2003). Sin embargo, no se observa un mayor aumento de esta quinasa activa cuando las células son tratadas con andrógenos, indicando de nuevo que AIB1 regula la actividad de AKT de manera independiente de la señalización mediada por esteroides.

Estas observaciones demuestran que AIB1 es requerido para la proliferación y supervivencia celular mediada por IGF-I. Se abre así un nuevo mecanismo para promover el crecimiento celular independientemente de hormonas esteroideas que podría explicar la resistencia desarrollada en ciertas terapias endocrinas. Este hecho es importante porque revela nuevas plataformas para la terapia en cáncer.

Vía de señalización ERBB/HER

La familia de receptores tirosina quinasa ERBB o HER también tiene su importancia en oncología. Esta familia está compuesta por 4 miembros principales, conocidos con el nombre de EGFR/HER1/ERBB1, HER2/neu/ERBB2, HER3/ERBB3 y HER4/ERBB4. La unión de estos receptores a factores de crecimiento epidérmico (EGF) inicia una cascada de activación de diversas quinasas que finaliza en la expresión de numerosos genes que median procesos celulares, como la proliferación, la diferenciación, la migración y la apoptosis (Holbro et al., 2003) (Fig. 6).

Se ha observado una correlación entre la sobreexpresión de AIB1 y la presencia de HER2/neu en tumores de mama (Bouras et al., 2001; Thorat et al., 2008). Hay que destacar que AIB1 es diana de quinasas activadas por EGFR/HER, tales como ERK1,2 y la quinasa c-Abl (Amazit et al., 2007; Font de Mora and Brown, 2000; Oh et al., 2008). La fosforilación de AIB1 por estas quinasas promueve su localización nuclear y estimula la transactivación de ER α al aumentar la interacción con CBP/p300 (Fig. 6). Por otra parte, se ha establecido recientemente un papel para AIB1 en la regulación de la señalización por HER2/neu, de manera que tanto AIB1 como la isoforma AIB1- Δ 3 pueden potenciarla, aumentando los niveles de

fosforilación de este receptor (Fereshteh et al., 2008; Lahusen et al., 2007; Reiter et al., 2001). Se crea así una retroalimentación positiva en la que AIB1 aumenta la señalización por HER2/neu y, a su vez, HER2/neu estimula la función coactivadora de AIB1. Este hecho es importante porque la sobreexpresión de AIB1 podría favorecer la resistencia a inhibidores de la actividad HER2/neu como el trastuzumab (herceptina). En algunos casos, esta resistencia se ha atribuido a la señalización por IGF-IR (Nahta et al., 2005). Debido a que AIB1 estimula la señalización por IGF-I, la sobreexpresión de este coactivador en tumores que sobreexpresan HER2/neu podría contribuir a la resistencia al trastuzumab a través de la activación de IGF-IR.

La capacidad de AIB1 para estimular diversas vías de señalización, como las mediadas por IGF-IR y HER2/neu apoya la posibilidad de utilizar este coactivador como diana y marcador predictivo en terapia.

5.2.2.2. Señalización mediada por citoquinas

Vía de señalización NF- κ B

El factor nuclear- κ B (NF- κ B) comprende una familia de factores de transcripción que están implicados en la expresión de genes que controlan la respuesta inmune, la inflamación, el ciclo celular y la apoptosis (Perkins, 2007). Los factores NF- κ B consisten en dímeros de proteínas con el dominio de dimerización de homología Rel. Cuando está inactivo, NF- κ B se encuentra secuestrado en el citosol por proteínas inhibitoras conocidas como I κ Bs. La exposición de la célula a citoquinas, como la interleuquina-1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), lleva a la activación del complejo quinasa I κ B (complejo IKK) que fosforila a I κ B, promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación. Una vez liberado del complejo inhibitor, NF- κ B es translocado al núcleo donde transactivará la expresión de numerosos genes (Fig. 6).

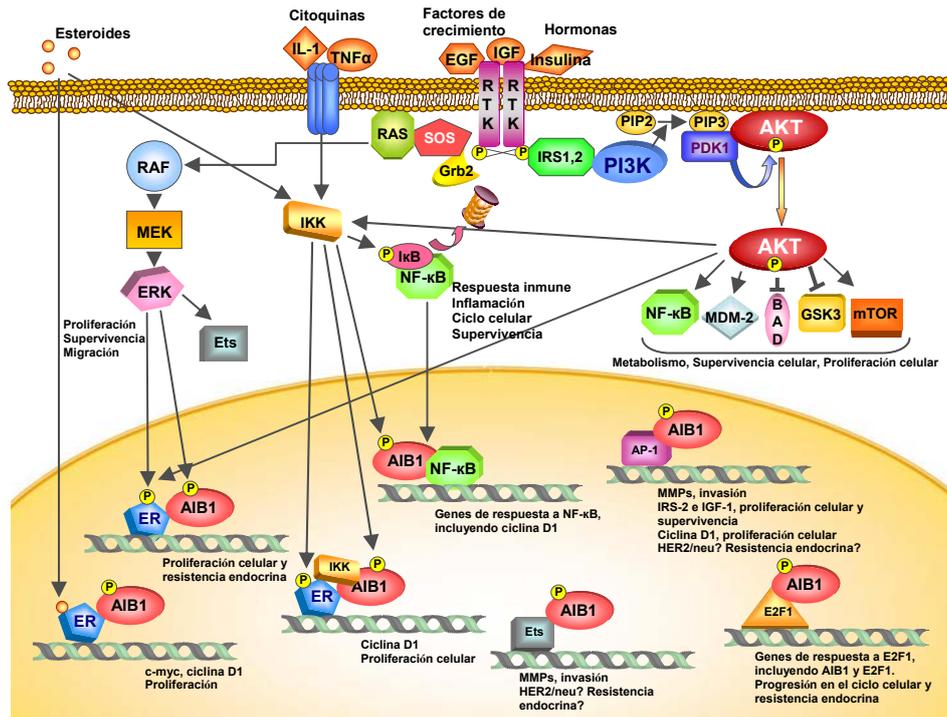


Figura 6: Resumen de las diversas vías de señalización que convergen en AIB1. Mecanismos de proliferación celular y resistencia endocrina. Aunque no está representado en la figura, AIB1 puede estimular la señalización por PI3K/AKT, aumentando la expresión de varios componentes de esta vía y también potenciar la señalización por ERBB/HER, incrementando los niveles de fosforilación de EGFR. La fosforilación de AIB1 es necesaria para su actividad. Esteroides, citoquinas y factores de transcripción pueden inducir esta fosforilación. Una vez activado, AIB1 será capaz de interactuar y coactivar varios factores de transcripción. En respuesta a estrógenos, AIB1 es reclutado junto con ER a promotores de respuesta a estrógenos, como el de la ciclina D1, estimulando la progresión en ciclo celular. El tratamiento con estrógenos promueve la fosforilación de ER α y AIB1 por parte de IKK α y facilita la asociación de estos tres componentes en los promotores de respuesta a estrógenos. Alternativamente, la estimulación por factores de crecimiento desencadena la fosforilación de ER y/o AIB1, lo cual activa la proliferación mediada por ER de manera independiente de estrógenos, resultando en la resistencia a la terapia endocrina. La estimulación por citoquinas activa el complejo IKK y promueve la localización nuclear de AIB1, donde potenciará tanto la señalización por NF-kB como la señalización por receptores esteroideos. AIB1 también puede coactivar la función de AP-1 y Ets para estimular la expresión de MMPs y, por tanto, favorecer la invasión a otros tejidos. Puesto que el promotor de HER2/neu es diana de AP-1 y Ets, AIB1 podría aumentar su expresión, promoviendo proliferación y resistencia endocrina. Finalmente, AIB1 puede coactivar la expresión de genes de respuesta a E2F1, potenciando la progresión del ciclo celular.

Tanto AIB1 como SRC-1 pueden interaccionar y potenciar la transcripción mediada por NF- κ B (Na et al., 1998; Werbajh et al., 2000). Sin embargo, sólo AIB1 interacciona con el complejo IKK. En respuesta a TNF- α , el complejo IKK fosforila a AIB1 desencadenando su translocación al núcleo donde encuentra y coactiva a NF- κ B (Wu et al., 2002). El tratamiento con estrógenos también aumenta la fosforilación de AIB1 (Marquez et al., 2006; Wu et al., 2004; Zheng et al., 2005). Recientemente, se ha demostrado que IKK α media la fosforilación tanto de AIB1 como de ER α en respuesta a estrógenos para activar la expresión de ciclina D1 y promover el ciclo celular (Park et al., 2005) (Fig. 6). Sin embargo, el promotor de la ciclina D1 no está regulado únicamente por ER α , sino también por NF- κ B (Cao et al., 2001), de manera que sería probable que AIB1 pudiera activar la expresión de esta ciclina a través de diferentes vías. Cabe destacar que IKK también puede activarse por AKT, llegando hasta la activación de NF- κ B (Ozes et al., 1999; Romashkova and Makarov, 1999). Debido a que la sobreexpresión de AIB1 aumenta la actividad AKT, éste podría representar otro posible mecanismo por el cual AIB1 promovería la expresión de la ciclina D1 y la progresión en el ciclo celular (Fig. 6).

Todas estas observaciones indican que tanto la sobreexpresión de AIB1 como la exposición de las células tumorales a estrógenos y/o citoquinas promueven la actividad oncogénica de AIB1, aumentando su nivel de fosforilación en el núcleo y potenciando su capacidad de coactivación.

5.2.2.3. El ciclo celular y AIB1

El ciclo celular es un proceso altamente regulado por el cual las células duplican su material genético para repartirlo entre dos células hijas. Este proceso consta de 4 fases (G1, S, G2 y mitosis o fase M) e implica un complejo y dinámico programa transcripcional durante el cual se van expresando las ciclinas, quinasas dependientes de ciclina (Cdks),

reguladores de los puntos de control o “checkpoints” y proteínas de replicación y reparación del DNA. Según las señales extra e intracelulares la célula decide si va a dividirse o no. La vía Rb/E2F1 regula la transición G1/S y constituye el mecanismo regulador clave del ciclo celular (Fang and Han, 2006) (Fig. 7).

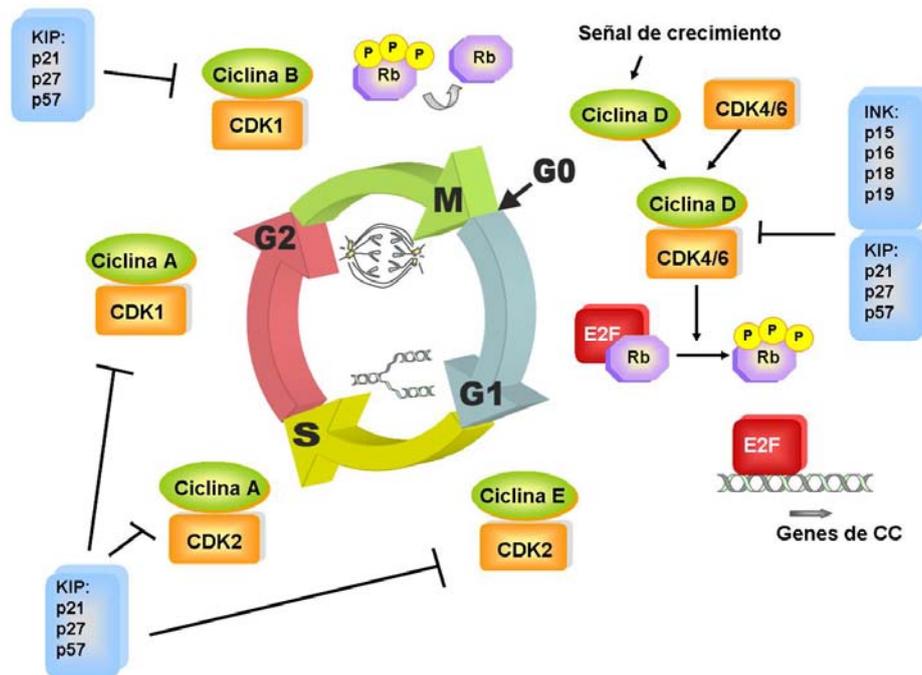


Figura 7: El ciclo celular. Señalización por Rb/E2F1. En un principio, E2F1 está asociado a la proteína supresora de tumores Rb (retinoblastoma). Tras la estimulación por factores mitogénicos se activa la expresión de la ciclina D1. A continuación, esta ciclina se asocia con Cdk y el complejo fosforila a Rb, inhibiendo su interacción con E2F1. Esta liberación permite a E2F1 iniciar la expresión de una serie de moléculas necesarias para la progresión en la fase de síntesis o fase S. Cada fase del ciclo está regulada por un complejo Cdk-ciclina y sus correspondientes inhibidores (familias CIP/KIP e INK). En general, la actividad Cdk termina cuando se degrada su ciclina correspondiente. Después de la mitosis, la proteína Rb es desfosforilada para poder secuestrar de nuevo al factor E2F1, entrando en fase de quiescencia o fase G0. El ciclo no comenzará hasta la llegada de una nueva señal mitogénica.

Debido a que tanto la ciclina D1 como E2F1 son dos iniciadores cruciales del ciclo, no es sorprendente encontrarlos frecuentemente alterados en cáncer (Gillett et al., 1994; Zhang et al., 2000).

Uno de los principales genes diana de ER es la ciclina D1 (Doisneau-Sixou et al., 2003). Se ha demostrado que la sobreexpresión de AIB1 puede promover la capacidad de ER para interactuar con el promotor de la ciclina D1 de manera dependiente de estrógenos (Park et al., 2005; Planas-Silva et al., 2001). Sin embargo, existen tumores ER-negativos que también sobreexpresan ciclina D1, lo que indica que su expresión podría estar regulada por varias vías. Apoyando esta idea, en ciertas líneas celulares derivadas de carcinomas mamarios, la expresión de ciclina D1 puede inducirse por suero de manera más potente que por estrógenos (Planas-Silva et al., 1999). Además, el promotor de la ciclina D1 puede ser regulado por diversos factores de transcripción, incluyendo ER, STATs, AP-1 y NF- κ B (Klein and Assoian, 2008). Por tanto, AIB1 también podría promover el ciclo celular actuando como coactivador de AP-1 (Yan et al., 2006) y de NF- κ B (Wu et al., 2002) (Fig. 6).

Parece claro que AIB1 juega un papel importante a la hora de coactivar la expresión de la ciclina D1. El estudio con animales y con líneas celulares confirma esta observación. La delección de AIB1 en ratones resulta en niveles más bajos de ciclina D1 en comparación con los animales silvestres (Fereshteh et al., 2008; Kuang et al., 2005). Y en líneas celulares, el silenciamiento de AIB1 también produce una disminución de los niveles de esta ciclina (Oh et al., 2004; Zou et al., 2006). Estos estudios sugieren que AIB1 puede conferir una ventaja en el crecimiento celular al aumentar la expresión de reguladores del ciclo como la ciclina D1. La sobreexpresión de ciclina D1 podría representar uno de los primeros pasos en la progresión del cáncer inducida por AIB1.

La función de AIB1 en el ciclo celular no se restringe simplemente al inicio de éste. Se ha observado que el silenciamiento de AIB1 en líneas

celulares disminuye la población de células en fase S con el simultáneo aumento de células en G0/G1 (Louie et al., 2006). Por el contrario, la sobreexpresión de AIB1 en líneas celulares de cáncer de mama ER-positivas aumenta la proliferación incluso en presencia de antiestrogénicos (Louie et al., 2004). Además, se ha visto que AIB1 es reclutado junto a E2F1 a los promotores diana de este factor de transcripción, incluyendo los promotores de ciclinas E y A, Cdk2, p107 y el mismo E2F1, y que este reclutamiento aumenta a medida que las células entran en fase S (Louie et al., 2006). Cabe destacar que el promotor de AIB1 también puede estar regulado por el complejo E2F1-AIB1 (Mussi et al., 2006). Los resultados anteriores indican que AIB1 también desempeña un papel en la progresión del ciclo a través de la coactivación de E2F1. Por este mecanismo su sobreexpresión podría promover proliferación y crecimiento tumoral de manera independiente de estrógenos.

5.2.3. MECANISMOS DE INVASIÓN

En la progresión tumoral las células cancerosas adquieren la capacidad de migrar, invadir los tejidos cercanos al tumor, alcanzar los vasos sanguíneos y/o linfáticos y colonizar tejidos distantes. Un evento importante en este proceso es la transición epitelio-mesénquima o EMT. Durante la EMT, las células epiteliales reprimen la expresión de E-cadherina, lo que les hace perder la adhesión que existe entre ellas y adquirir capacidad de migración. Se conocen varios factores de transcripción, como Twist y Snail, que reprimen la expresión de esta cadherina (Huber et al., 2005; Yang et al., 2004). Sin embargo, para que la migración y la invasión sean posibles, las células también deben adquirir la capacidad de destruir barreras biológicas, como la membrana basal. Este propósito puede alcanzarse gracias a la acción de metaloproteasas (MMPs) que degradan proteínas de la matriz extracelular (ECMs).

La primera observación que sugería un papel para AIB1 en la motilidad celular y la invasión fue hecha en *Drosophila* (Bai et al., 2000). Se demostró que mutaciones en Taiman, ortólogo de AIB1 en *Drosophila*, causaba defectos de migración de las células del borde del ovario. Un estudio complementario reveló que las células MCF-7 respondían al tratamiento con 17- β -estradiol extendiendo lamelipodios y que este comportamiento era bloqueado en presencia de antiestrógenos (DePasquale, 1999). Estas observaciones indicaban que los esteroides podían estimular el comportamiento invasivo de las células. En los últimos años, se han hecho grandes esfuerzos para determinar los mecanismos por los cuales los coactivadores de receptores esteroideos afectan estos procesos.

Estudios clínicos han demostrado que AIB1 no sólo está implicado en proliferación celular, sino que también es importante en la invasión y la metástasis (Henke et al., 2004; Hudelist et al., 2003; Liu et al., 2008; Wang et al., 2002; Xie et al., 2005). Un estudio reciente ha correlacionado a AIB1 con niveles elevados de Smad-2 (proteína efectora en la señalización por TGF- α) y los marcadores de EMT, β -catenina, Twist y vimentina (Kajiro et al., 2009). Por tanto, la sobreexpresión de AIB1 podría conferir una ventaja invasiva a través de la expresión de Twist. A diferencia de AIB1, SRC-1 no afecta ni a la iniciación ni al crecimiento tumoral, sin embargo, parece tener importancia en metástasis. De acuerdo con esto, su depleción en el modelo murino de metástasis a pulmón PyMT (SRC-1^{-/-}/PyMT) provoca una drástica disminución de la intravasación de las células tumorales y un bloqueo de las metástasis (Wang et al., 2009). Además, SRC-1 correlaciona de manera inversa con E-cadherina y potencia la expresión de Twist mediada por el factor de transcripción PEA3 (miembro de la familia de factores de transcripción Ets) (Qin et al., 2009). Estas observaciones indican que tanto SRC-1 como AIB1 pueden promover la EMT y la invasión.

En cuanto a la destrucción de barreras biológicas, se ha visto que la sobreexpresión de AIB1 incrementa la expresión de MMP-7, MMP-10, MMP-2 y MMP-13 en líneas celulares de cáncer de mama y de próstata a través de los factores de transcripción AP-1 y PEA3 (Li et al., 2008b; Yan et al., 2008). En especímenes de cáncer de mama se ha correlacionado de manera positiva la expresión de AIB1, PEA3, MMP-2 y MMP-9 (Qin et al., 2008). Por otro lado, en las líneas celulares derivadas de modelos murinos PyMT AIB1^{-/-} se han visto niveles más bajos de MMP-2 y MMP-9 que en las líneas derivadas de ratones AIB1^{+/+} (Qin et al., 2008). Recientemente, AIB1 también ha sido asociado a ER81 (otro miembro de la familia Ets). La interacción con este factor de transcripción promueve la expresión de MMP-1 (Goel and Janknecht, 2004). En este proceso está implicado el receptor HER2/neu que activa a ER81 y a sus coactivadores, AIB1 y p300, facilitando la transcripción mediada por este factor (Fig. 6). Cabe destacar que el promotor de HER2/neu tiene sitios de unión para Ets (Hurst, 2001). Puesto que AIB1 puede coactivar esta familia de factores, podría existir una implicación directa de la sobreexpresión de AIB1 en la sobreexpresión de HER2/neu y, por tanto, en el desarrollo de resistencia endocrina de ciertos tumores.

Parece que los elevados niveles de AIB1 juegan un papel en la invasión y en la metástasis, además de en la proliferación y el crecimiento tumoral. El bloqueo del eje PEA3/AIB1 o ER81/AIB1 en cáncer podría representar una buena aproximación para controlar la invasión y la progresión de esta enfermedad.

A modo de resumen, un gran número de resultados revelan la clara capacidad oncogénica de AIB1. La amplificación y/o sobreexpresión de este coactivador ocurre en una gran variedad de tumores. En animales, esta sobreexpresión es suficiente para iniciar la tumorigénesis y, por el

contrario, la deficiencia de este factor protege frente a la aparición de tumores. Los mecanismos por los cuales AIB1 promueve el inicio, la progresión del cáncer y la resistencia endocrina implican diversas vías de señalización, incluyendo la señalización por ER, la vía IGF/PI3K/AKT, la vía HER2, y la señalización por NF- κ B, E2F1 y Ets. Una posible secuencia en la evolución de un tumor de mama ER-positivo podría ser la siguiente: 1- durante el inicio del cáncer, AIB1 coactivaría la función de ER al interaccionar con este receptor unido a su ligando; 2- a medida que el tumor progresara, la amplificación y la sobreexpresión de AIB1 podría aumentar los niveles de componentes de la vía IGF/PI3K/AKT y activar la señalización por HER2/neu; 3- elevados niveles de AKT y de HER2/neu activos podrían estimular la fosforilación de ER y de AIB1, resultando en un aumento de la transcripción mediada por ER de manera independiente de hormona; 4- los altos niveles de AIB1 también podrían potenciar la función de E2F1, aumentando aún más los niveles de este coactivador y promoviendo la progresión en el ciclo celular; 5- la represión de E-cadherina empezaría a ser efectiva y comenzaría la EMT; 6- la expresión de MMPs mediada por PEA3 y ER81 favorecería la invasión y, finalmente, la expresión de genes como Twist mediaría la metástasis.

6. La sobreexpresión de AIB1 y HER2/neu correlaciona con resistencia a la terapia endocrina

Las terapias endocrinas actuales en cáncer de mama se basan principalmente en el bloqueo de la señalización por el receptor de estrógenos (ER). Se siguen diversas estrategias: 1- disminuir los niveles de estrógenos con inhibidores de aromatasa, como el letrozol o el astrozol; 2- antagonizar la función de ER mediante antiestrogénicos, como el tamoxifeno; o 3- con antiestrogénicos puros como el raloxifeno y el fulvestrant.

Desde el año 1970, el tamoxifeno ha sido la terapia estándar para mujeres con tumores de mama ER-positivos. El tamoxifeno es un modulador selectivo de ER (SERM) que inhibe de manera competitiva la unión de los estrógenos a este receptor. Este compuesto y otros SERMs influyen la función de ER sin interferir en la capacidad de dimerización y unión al DNA. Sin embargo, la conformación que adopta el ER cuando está acompañado con tamoxifeno hace que se una un grupo de moléculas reguladoras distinto al que une cuando se acompaña con estrógenos (Shang et al., 2000). Dependiendo del tejido o del gen, el tamoxifeno puede tener efectos agonistas o antagonistas, por ejemplo, es agonista en hueso y endometrio, mientras que es antagonista en glándula mamaria. El balance de la actividad agonista/antagonista de este modulador puede estar relacionado en parte con la cantidad de correpresores y coactivadores en la célula. De esta manera, la abundancia de coactivadores podría aumentar la actividad agonista, mientras que la abundancia de correpresores incrementaría la actividad antagonista (Smith et al., 1997).

El uso del tamoxifeno es probablemente una de las primeras razones por las que ha disminuido la mortalidad por cáncer de mama en la última década. Desafortunadamente, más de un 30% de los cánceres de mama no responden al tamoxifeno, a pesar de ser ER-positivos y, por otra parte, pacientes que inicialmente respondían acaban por desarrollar resistencia. Por suerte, los tumores resistentes a menudo responden a una segunda línea de terapia (Howell et al., 1995; Osborne et al., 2005).

Es importante destacar que el desarrollo de la resistencia a tamoxifeno está muy relacionado con la sobreexpresión de AIB1 y HER2/neu (Bouras et al., 2001; Kirkegaard et al., 2007; Osborne et al., 2003). Tanto ER como AIB1 pueden ser fosforilados y activados por las MAP quinasas ERK1,2; por tanto, altos niveles de AIB1 activo podrían reducir los efectos antagonistas del tamoxifeno, especialmente en tumores que sobreexpresaran HER2/neu (Fig. 8). Aunque los mecanismos exactos

de la resistencia no están del todo claros, se piensa que la activación de ER de manera independiente de ligando por MAPKs, que ha su vez han sido activadas por la señalización de HER2, contribuye en gran medida (Glaros et al., 2006; Osborne and Schiff, 2003). El posible fallo de la actividad antitumoral del tamoxifeno puede ser, por tanto, determinado a través de los niveles de AIB1 y HER2/neu (Schiff et al., 2003). Recientemente, SRC-1 también ha sido implicado en resistencia al tratamiento endocrino (Fleming et al., 2004; Redmond et al., 2009). Todavía no se ha estudiado si los niveles de AIB1 y HER2/neu afectan al éxito clínico del fulvestrant. Sin embargo, la resistencia a inhibidores de aromatasa comparte elementos comunes con la resistencia al tamoxifeno (Belosay et al., 2006; Shin et al., 2006).

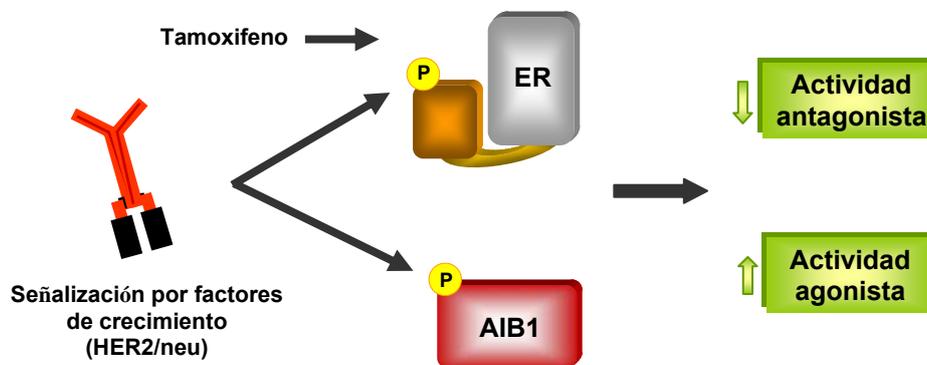


Figura 8: “Cross-talk” entre señalización por factores de crecimiento y señalización por ER. La señalización por factores de crecimiento puede aumentar la activación de ER y coactivadores como AIB1, resultando en un incremento de la actividad agonista del tamoxifeno. La combinación de terapias endocrinas con terapias que incluyan inhibidores específicos de la función de AIB1 y/o de quinasas implicadas en resistencia sería una aproximación prometedora en el tratamiento del cáncer.

Los mecanismos que desencadenan la resistencia endocrina son probablemente multifactoriales. Es necesario contrastar más información

para poder tener una visión general sobre cómo AIB1 está implicado en estos mecanismos, con el propósito de poder disponer de terapias para controlar el crecimiento y la extensión de un tumor sin que la resistencia suponga un obstáculo.

7. Regulación de los niveles y de la actividad de AIB1

7.1. Niveles celulares de AIB1

Debido a la capacidad oncogénica de AIB1, las células normales controlan cuidadosamente la concentración celular de este coactivador a través de un complejo sistema.

A nivel de RNA mensajero (mRNA), el promotor de AIB1 se encuentra regulado por los factores de transcripción E2F1 y Sp1 (Hsia et al., 2010; Louie et al., 2006; Mussi et al., 2006). Puesto que AIB1 es capaz de coactivar a E2F1, sería lógico adivinar que pudiera regularse a sí mismo. Esta predicción se confirma al encontrar a AIB1 reclutado a su propio promotor (Louie et al., 2006; Mussi et al., 2006). Estos resultados son importantes, ya que se crea una retroalimentación positiva entre altos niveles de AIB1 y una sobreactivada función de E2F1 que puede alterar la expresión de numerosos genes implicados en ciclo celular y, además, puede explicar la resistencia a la terapia endocrina que desarrollan algunos tumores.

Los estrógenos también pueden regular los niveles totales de mRNA de AIB1. En células MCF-7 se ha visto que el 17- β -estradiol bloquea la transcripción de AIB1 y que esta inhibición es revertida tras la adición de antiestrogénicos o de ácido retinoico (Lauritsen et al., 2002). Este efecto puede tener gran importancia para la progresión del cáncer y para explicar la resistencia endocrina al aumentar los niveles de AIB1 en presencia de antiestrogénicos.

Finalmente, la expresión de AIB1 puede ser controlada por microRNAs (miRNAs) endógenos. Los miRNAs son pequeñas moléculas de

RNA de simple cadena que bloquean la expresión de los RNAs para los que son complementarios. En particular, el microRNA Mir-17-5p tiene una gran complementariedad con AIB1 y puede, por tanto, reducir su expresión al inhibir su traducción. En este sentido, se han encontrado bajos niveles de expresión de Mir-17-5p en líneas de cáncer de mama. Este hallazgo tiene consecuencias patológicas, ya que al no controlarse la expresión de AIB1 no se puede bloquear el crecimiento celular (Hossain et al., 2006).

En cuanto a proteína, estudios previos han implicado al proteasoma en la regulación del recambio de AIB1 (Lonard et al., 2000). El proteasoma es un complejo proteico no lisosómico que se encarga de degradar proteínas dañadas, proteínas mal plegadas o proteínas cuya función ya no es necesaria para la célula eucariótica. El corazón catalítico del proteasoma (proteasoma 20S) consiste en una partícula cilíndrica formada por varias subunidades α y β . La activación de este complejo se consigue a través de la unión, en ambos extremos, de la partícula reguladora 19S (P700 o RC), que forma el proteasoma 26S, o del regulador 11S (REG o PA28). A diferencia del proteasoma REG, el proteasoma 26S reconoce y degrada proteínas poliubiquitinadas. Por su parte, la ubiquitinación es un proceso que consume ATP y requiere 3 actividades enzimáticas para conjugar de manera covalente moléculas de ubiquitina a las proteínas que van a ser degradadas por el proteasoma (Fig. 9). Debido a que las ubiquitina ligasas son las que aportan especificidad en este proceso, la regulación de estas enzimas juega un papel importante en la degradación proteica *in vivo*. Hasta la fecha, se conocen 3 ubiquitina ligasas para AIB1: E6AP, SCF^{Fbw7 α} y CHIP (Kajiro et al., 2009; Mani et al., 2006; Wu et al., 2007). Sin embargo, AIB1 también puede ser degradado por el proteasoma de manera independiente de ubiquitina y de ATP (Li et al., 2006).

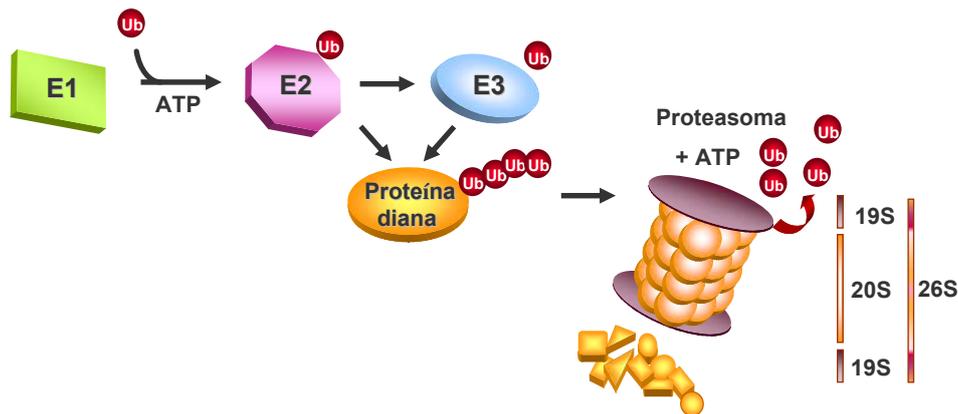


Figura 9: Sistema ubiquitina-proteasoma. Las moléculas de ubiquitina se van concatenando progresivamente a la proteína diana gracias a la acción de tres enzimas: E1, enzima activadora de ubiquitina; E2, enzima conjugadora de ubiquitina; E3, ubiquitina ligasa. Las proteínas poliubiquitinadas son reconocidas y degradadas por el proteasoma 26S. Las moléculas de ubiquitina son recicladas.

7.2. Modificaciones postraduccionales y actividad de AIB1

Los niveles de AIB1 no son los únicos determinantes en su función oncogénica, las modificaciones postraduccionales también son relevantes. Diversos estudios han demostrado que las vías de señalización activadas por hormonas, citoquinas y factores de crecimiento inducen múltiples modificaciones postraduccionales en AIB1, incluyendo acetilación, ubiquitinación, sumoilación, metilación y fosforilación. Estas modificaciones, a menudo reversibles, pueden afectar la función de AIB1 al regular interacciones proteína-proteína, la localización subcelular de este coactivador y/o su estabilidad.

En el apartado anterior ya se vió que AIB1 es diana de ubiquitina ligasas para ser marcado con ubiquitina y degradado por el proteasoma. A través de un proceso parecido a la ubiquitinación, este factor puede marcarse también con una modificación similar a la ubiquitina (SUMO). La sumoilación de AIB1, a diferencia de la sumoilación de SRC-1 o TIF2,

atenúa su función (Wu et al., 2006). De la misma manera, la acetilación también puede reprimir la función de AIB1. Se ha demostrado que CBP/p300 puede acetilar a AIB1, resultando en la disociación del complejo receptor nuclear-coactivador (Chen et al., 1999b). Por otra parte, la metilación impide la interacción con CBP y con CARM-1 además de aumentar la degradación y el recambio de AIB1 (Feng et al., 2006; Naeem et al., 2007). Tanto CBP como CARM-1 inician la transcripción por modificación de histonas. Estas observaciones indican que además estarían implicadas en la finalización de la transcripción al comprometer la actividad de AIB1. A diferencia de las modificaciones anteriores, la fosforilación generalmente activa la función de AIB1.

La fosforilación ha sido la modificación postraduccional más estudiada en AIB1. Hasta la fecha se han descrito 11 sitios de fosforilación: T24, S101, S102, S505, S509, S543, S601, S857, S860, S867 e Y1357 (T, treonina; S, serina; Y, tirosina) que pueden ser diana de una amplia variedad de quinasas, incluyendo MAPKs, IKK, glucógeno sintasa quinasa (GSK3), caseína quinasa 1δ (CK1δ), PKCζ y c-Abl (Fig. 10).

En respuesta a factores de crecimiento se activa la cascada RAS/MAPK que es responsable de la fosforilación de un gran número de sustratos, entre los que se encuentran AIB1 y ER. La fosforilación de estos factores aumenta su interacción y el reclutamiento de CBP/p300, lo que potencia la transcripción mediada por el receptor esteroideo (Font de Mora and Brown, 2000). ERK1,2 fosforilan las serinas S857 y S860 para enviar a AIB1 al núcleo y facilitar la interacción con ER (Amazit et al., 2007). El TNF-α induce la fosforilación de AIB1 a través del complejo IKK. Esta fosforilación también aumenta la translocación al núcleo, donde AIB1 interacciona y media la expresión de genes dependientes de NF-κB (Wu et al., 2002). En cuanto a la señalización por hormonas, el estradiol induce la fosforilación de la mayoría de los sitios diana, potenciando también la acción coactivadora de AIB1 (Wu et al., 2004).

En algunos casos, la fosforilación no sólo regula la interacción de AIB1 con otros factores y su función coactivadora, sino también su estabilidad. Por ejemplo, la fosforilación en S505 por GSK3 está acoplada a monoubicuitinación y posterior poliubiquitinación de AIB1. La monoubicuitinación de los residuos K723 y K786 de AIB1 promueve la actividad transcripcional de ER, y la posterior poliubiquitinación de estos mismos residuos facilita el reconocimiento de AIB1 por el proteasoma (Wu et al., 2007). La fosforilación mediada por p38MAPK en respuesta a ácido retinoico desencadena una respuesta bifásica similar. Por un lado, regula positivamente la transcripción a través del control de la interacción entre AIB1 y el receptor de ácido retinoico α (RAR α). Por otro lado, la fosforilación en S860 restringe esta actividad al promover la degradación específica de AIB1 por el proteasoma (Gianni et al., 2006). Recientemente, se han descrito dos fosforilaciones en S101 y S102 que también son requeridas para la actividad de AIB1. La desfosforilación de estos residuos por la proteína fosfatasa 1 (PP1) inhibe la actividad de este coactivador y lo estabiliza (Li et al., 2008a). Sin embargo, la fosforilación también puede tener el efecto contrario e inhibir la degradación. Las quinasas PKC ζ y CK1 δ fosforilan a AIB1 potenciando su función coactivadora e impidiendo su degradación por el proteasoma (Giamas et al., 2009; Yi et al., 2008).

Finalmente, se ha encontrado una fosforilación en Y1357 que puede ser inducida por estrógenos, EGF e IGF a través de la quinasa Abl (Oh et al., 2008). Resulta de interés que esta fosforilación ha sido detectada en tumores de mama de ratones transgénicos HER2/neu y también en tumores humanos, sugiriendo que la activación de AIB1 por esta quinasa puede tener un papel crucial en oncogénesis. Esta observación es importante, ya que la fosforilación en Y1357 podría ser utilizada como marcador para predecir la posible respuesta a la terapia con inhibidores de Abl, como el imatinib (Gleevec), en cáncer de mama.

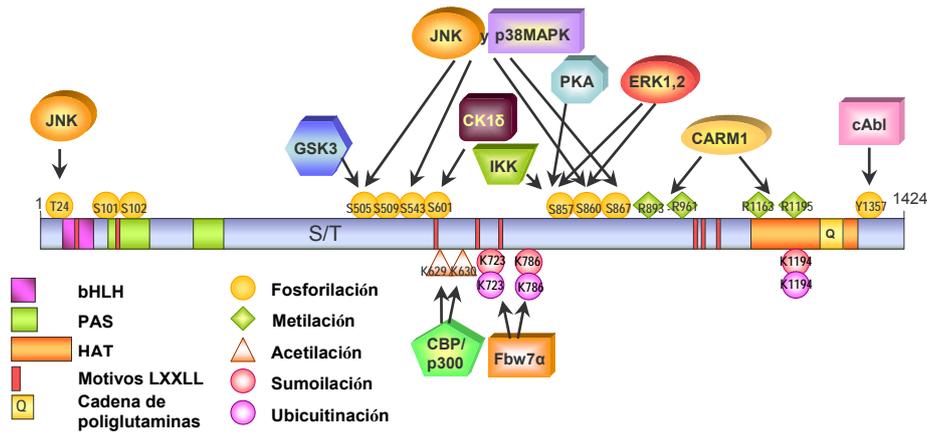


Figura 10: Modificaciones postraduccionales en AIB1 y enzimas responsables en la literatura.

8. Factores pronóstico: inhibición de AIB1 en terapia tumoral

Desde el descubrimiento y la caracterización de AIB1 en 1997 se han realizado numerosos estudios para correlacionar este coactivador con la progresión del cáncer y con la respuesta a las terapias endocrinas. Como factor pronóstico, los pacientes con tumores que sobreexpresan AIB1 presentan tiempos más cortos de supervivencia y libres de enfermedad tras la extirpación del tumor (Harigopal et al., 2008; Zhao et al., 2003). La baja expresión de reguladores negativos de ER α , como el correpresor NCOR1 (Girault et al., 2003) o los factores SAFB1 y SAFB2 (Hammerich-Hille et al., 2009), también predice pronóstico pobre en pacientes con cáncer de mama. En cuanto a la resistencia endocrina, la respuesta a tamoxifeno ha sido asociada con la expresión de AIB1 en las células tumorales y varía dependiendo de la coexpresión con otras moléculas, como HER2/neu, ER α y el factor de transcripción PAX2 (Hurtado et al., 2008; Iwase, 2006; Schiff et al., 2003). Se ha demostrado que la reducción de los niveles de AIB1 restablece los efectos antitumorales del tamoxifeno al eliminar la

interferencia o “cross-talk” entre ER y HER2/neu (Su et al., 2008; Zhao et al., 2009).

El estudio con ratones *Neu* o *v-ras* cruzados con knockouts de AIB1 demuestra una clara protección frente a la aparición de tumores cuando falta este coactivador (Fereshteh et al., 2008; Kuang et al., 2004). Por tanto, AIB1 es necesario para la actividad oncogénica de HER2/neu y RAS. Es razonable pensar que la disminución de los niveles y/o la actividad de este coactivador podrían mejorar el éxito de las terapias dirigidas a bloquear la señalización mediada por HER2/neu y RAS en cáncer.

Varias aproximaciones preliminares han sido desarrolladas para inhibir la acción de AIB1. Alternativamente al bloqueo de la función estrogénica con antagonistas de ER α , se están buscando moléculas que compitan directamente con el sitio de unión a SRCs (Gunther et al., 2009). Con este propósito se ha diseñado un sistema de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (TR-FRET) para monitorizar la interacción de ER con AIB1 y con su ligando, y descubrir las moléculas que pueden romper esta unión. Los péptidos LXXLL podrían representar una nueva clase de inhibidores de ERs (Shao et al., 2004a). Estas moléculas se unen a la superficie de los ERs impidiendo que se unan las proteínas SRC y, por tanto, bloquean la señalización estrogénica. También se está valorando la posibilidad del uso de inhibidores de la unión de ER al DNA, como la disulfido benzamida (DIBA). Este compuesto bloquea la transactivación mediada por ER α , tanto dependiente como independiente de ligando, y bloquea el crecimiento celular de tumores resistentes a tamoxifeno (Wang et al., 2006). Estas moléculas podrían, por tanto, proporcionar una alternativa a la terapia endocrina convencional. Finalmente, las terapias basadas en los microRNAs (pequeñas moléculas de simple cadena parcialmente complementarias a una o a más moléculas de mRNA) podrían representar un nuevo horizonte en la lucha contra el cáncer (Blenkiron and Miska, 2007). Como se describió anteriormente, el microRNA Mir-17-5p

puede reprimir la traducción de AIB1 y, por tanto, bloquear el crecimiento celular (Hossain et al., 2006). Se podrían desarrollar estrategias encaminadas a inducir la expresión de estos microRNAs en tumores o diseñar sistemas de entrega de microRNAs sintéticos para disminuir la concentración celular de AIB1.

Estos últimos avances apuntan con mucha probabilidad a que durante la próxima década se desvelarán nuevas claves sobre la biología de AIB1 que ayudarán al desarrollo de nuevas aplicaciones con potencial clínico.

— OBJETIVOS —

La hipótesis planteada es que las vías de señalización que regulan la expresión, la localización subcelular, la degradación y las modificaciones postraduccionales de AIB1 pueden constituir los mecanismos que regulan la estabilidad y actividad de este coactivador y, por tanto, pueden dar lugar a su sobreexpresión, aumentando de esta manera su capacidad oncogénica. En base a esta hipótesis los objetivos principales de esta tesis son:

- Estudiar la degradación de AIB1 y, en concreto, el sistema proteolítico implicado, lugar de la degradación y factores y vías de señalización que afectan la estabilidad de este coactivador.
- Caracterizar una nueva modificación postraduccionaI de AIB1 específica de mitosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Métodos microbiológicos

1.1. Crecimiento y conservación de cepas bacterianas

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y BL21DE3 fueron crecidas a 37°C con agitación en medio rico Luria Bertani (LB Broth Lennox) o en placa con LB agar (Lennox) de Pronadisa. En los casos necesarios se incluyó ampicilina (100 μ g/ml) o kanamicina (50 μ g/ml) en los medios de cultivo, ambos antibióticos obtenidos de Sigma.

Las cepas bacterianas se conservaron a largo plazo a -80°C en medio de crecimiento con glicerol al 20% (Sigma).

1.2. Transformación bacteriana

Las transformaciones de células competentes de *E. coli* se llevaron a cabo con 100 μ l de células y, aproximadamente, 100 ng de DNA plasmídico en tubos de poliestireno de 13 ml (Starstedt). Tras 15 minutos en hielo, se dio un choque térmico a 37°C durante 45 segundos en un baño termostatzado para favorecer la introducción del DNA exógeno al interior de las bacterias. Posteriormente, se añadió 1 ml de medio LB sin ningún tipo de selección, y las células se incubaron durante 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente, las bacterias se sembraron en agar selectivo, y las colonias se dejaron crecer durante un mínimo de 16 horas a 37°C.

2. Cultivos de líneas celulares eucariotas

2.1. Crecimiento de líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para la experimentación están descritas en la tabla 2.

La manipulación de las células eucariotas se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar tipo 2A de Telstar. Los medios y reactivos de cultivo provienen de Gibco (Invitrogen) y las placas de cultivo y pipetas de plástico estériles de Corning. Las líneas celulares fueron mantenidas en una estufa de 37°C con una atmósfera

saturada de humedad compuesta por un 5% de CO₂ y un 95% de humedad relativa (Thermo Electron Corporation). Todas las líneas fueron crecidas en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS), previamente inactivado durante 30 minutos a 55°C en un baño termostatzado de agua, penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM.

Tabla 2: Líneas celulares utilizadas en el estudio.

LÍNEA	ESPECIE	TEJIDO	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de mama	Sobreexpresan AIB1	ATCC
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de cérvix	Contienen secuencias del virus del papiloma humano 18	ATCC
HeLa 6xHis-Ubiquitina	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de cérvix	Expresan ubiquitina marcada con cola de histidinas	Laboratorio de M. Rodríguez CIC-Biogune
NCI-H1299	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma de pulmón no microcítico	No expresan p53	ATCC
A549	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma de pulmón	Sobreexpresan AIB1	ATCC
COS-1	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Riñón	Sistema de expresión de proteínas recombinantes	ATCC
E36-ts20	<i>Cricetulus griseus</i>	Ovario	Mutación termosensible para E1	Laboratorio de M. Piechaczyk IGMM
E36-ts20 + E1	<i>Cricetulus griseus</i>	Ovario	Contienen actividad E1	Laboratorio de M. Piechaczyk IGMM
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Ovario de la pupa	Expresión de proteínas mediante infección con baculovirus	ATCC

Las células se subcultivaron regularmente para mantener un crecimiento exponencial. Para ello, se disoció la monocapa celular de cultivos al 80% de confluencia con tripsina-EDTA durante 1 minuto a 37°C. A continuación, se resuspendieron las células en medio de cultivo y se dividieron a una ratio de 1:5. Todos los experimentos fueron realizados con cultivos de no más de 20 pases.

El mantenimiento de líneas celulares a largo plazo se realizó por criopreservación. El precipitado de células obtenido de un cultivo en crecimiento exponencial se resuspendió en FBS con un 12% de DMSO (Sigma) y se guardó en criotubos estériles (Corning) en un contenedor de poliestireno de Nalgene a -80°C.

Para contar células se utilizaron la cámara de Neubauer o hemocitómetro y un microscopio óptico invertido (Leica DMIL). La cantidad requerida de células se sembró en placas de 6 cm de diámetro o en placas de 6 pocillos, según cada experimento.

La restricción de suero de las líneas celulares se llevó a cabo cultivándolas en medio DMEM sin FBS durante 24 horas. Los cultivos en ausencia de estrógenos se realizaron durante 10 días en medio DMEM sin rojo fenol (Gibco) suplementado con un 10% (v/v) de FBS tratado con carbón activado y con dextrano (Hyclone) para eliminar los estrógenos y los glucocorticoides.

Los tratamientos de los cultivos con inhibidores, hormonas y moduladores específicos del receptor de estrógenos están detallados en la tabla 3.

La línea celular termosensible E36-ts20 fue crecida a 32°C. El choque térmico se realizó durante 30 minutos a 42°C y, seguidamente, el cultivo se mantuvo a 39°C durante toda la noche.

Tabla 3: Principales reactivos utilizados en el estudio.

REACTIVO	DESCRIPCIÓN DE SU USO	CONC. FINAL	CASA COMERCIAL
Cicloheximida	Inhibición síntesis de proteínas	10 µg/ml	Sigma-Aldrich
17-β-Estradiol	Inducción de la transcripción mediada por ER	10 nM o 50 nM	Sigma-Aldrich
4-hidroxi-tamoxifeno	Represión de la transcripción mediada por ER	10 µM	Sigma-Aldrich
ICI182780	Represión de la transcripción mediada por ER	1 µM	AstraZeneca Pharmaceuticals
Leptomomicina B	Inhibición de la exportación nuclear	10 ng/ml	Biomol
MG132	Inhibición de la degradación por proteasoma	20 µM	Biomol
Epoxomicina	Inhibición de la degradación por proteasoma	100 nM	Biomol
LY294002	Inhibidor específico de PI3K	50 µM	Cell Signaling
Triciribina Akt I V	Inhibidor específico de AKT	40 µM	Calbiochem
Cloroquina	Inhibición de la degradación lisosomal	100 µM	Sigma-Aldrich
PD98059	Inhibición de la vía MEK	20 µM	Sigma-Aldrich
Purvalanol A	Inhibidor específico de Cdk	10 µM	Calbiochem
Ácido Okadaico	Inhibidor de proteína fosfatasas	0,2-1 µM	Biomol
Caliculina A	Inhibidor de PP2A y PP1	20 nM	Calbiochem

2.2. Transfección de DNA

Las transfecciones transitorias de DNA se realizaron con células a una confluencia superior al 60% mediante uno de los siguientes métodos:

- Lipofectamina LTX (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante y a una ratio DNA:Lipofectamina de 1:3. La mezcla se realizó en medio OptiMEM (Gibco). Se utilizó para transfectar células MCF-7 y HeLa.

- FuGene 6 (Roche), según las instrucciones del fabricante y a una ratio DNA:FuGene de 1:3. La mezcla se realizó en medio sin FBS. Se utilizó para células COS-1.

A modo general, se tranfectaron de 2-3 µg de DNA en placas de 6 cm y entre 5-8 µg en las placas de 10 cm de diámetro. La expresión de los plásmidos se examinó pasadas las 48 horas de la transfección.

Las líneas celulares estables se crecieron en presencia del antibiótico de selección G418 200-400 ng/ml (Sigma).

3. Análisis del ciclo celular

3.1. Sincronización de células humanas transformadas

La sincronización celular es requerida para definir los mecanismos reguladores que operan durante fases específicas del ciclo celular. La sincronización de células se realizó utilizando diversos inhibidores (Tabla 4). Los cultivos se sincronizaron en G0 mediante la sustitución del medio de cultivo a otro sin FBS durante 24 horas. Posteriormente, se permitió la progresión en ciclo reemplazando el medio de cultivo a medio completo en presencia del inhibidor adecuado para cada fase. Todo el proceso se realizó incubando las células a 37°C.

En algunos experimentos, tras el bloqueo en mitosis con nocodazol, las células se lavaron y se incubaron durante un máximo de 5 horas en DMEM completo sin inhibidor para promover su progresión a G1.

La monitorización de la sincronización se llevó a cabo mediante el estudio de la expresión de diversas ciclinas por “western blot” y analizando el ciclo celular en un citómetro de flujo.

Tabla 4: Inhibidores del ciclo celular.

INHIBIDOR	INHIBE	BLOQUEO	CONC. Y TIEMPO	CASA COMERCIAL
Ciclosporina A	PP2B o calcineurina	G0-G1	5 μ m, 16h	Sigma-Aldrich
Wortmanina	PI3K	Final de G1	100 nM, 24 h	Sigma-Aldrich
L-mimosina	Replicación del DNA	G1-S	400 μ M, 24 h	Sigma-Aldrich
Hidroxiurea	Ribonucleósido reductasa	S	5 mM, 48 h	Sigma-Aldrich
Etopósido	Topoisomerasa II	G2-M	10 μ M, 24 h	Sigma-Aldrich
Nocodazol	Polimerización de microtúbulos	M	150 ng/ml, 17h	Sigma-Aldrich

3.2. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

El análisis del ciclo celular se realizó por determinación del contenido de DNA de las células mediante tinción con yoduro de propidio, un fluorocromo que se intercala en el DNA y RNA de doble cadena.

Tras la sincronización, la liberación en ciclo y/o el tratamiento requerido según cada experimento, las células se lavaron dos veces con PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,44 g/L, H₂PO₄ 0,24 g/L pH 7,4) y, en el caso de estar adheridas, se tripsinizaron con tripsina "Tryple Express" de Gibco. Seguidamente, las células se resuspendieron en PBS y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en etanol al 70%, y la muestra se guardó a -20°C para permitir la fijación y la permeabilización de las células. Unas 16 horas después, se eliminó el etanol mediante dos lavados con PBS, y las células se tiñeron con yoduro de propidio 5 μ g/ml (Sigma) a 4°C durante 16 horas en ligera agitación y en oscuridad. La tinción se acompañó de RNasa A 200 μ g/ml (Roche) para eliminar el RNA. Una vez teñidas, las células se analizaron en un citómetro Cytomics FC500 (Beckam Coulter) que midió la fluorescencia roja asociada al yoduro de propidio. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa WinMDI 2.8.

4. Técnicas de DNA

4.1. Purificación de DNA plasmídico

El DNA plasmídico empleado en los experimentos se obtuvo a partir de cultivos de *E. coli*. La purificación se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico, utilizando el sistema “Mini QIAprep Spin Miniprep” de Qiagen para la obtención de DNA a pequeña escala, o el sistema “JETstar Plasmid Purification MAXI” de Genomed para la purificación a gran escala. El DNA plasmídico obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

4.2. Electroforesis en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA mediante electroforesis fue realizada a una concentración de agarosa que variaba entre el 0.8 y el 2% en función del tamaño del fragmento a analizar. El tampón empleado para la electroforesis fue TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 30 mM y EDTA 1 mM, pH 7,6) y el tampón de carga “Blue/Orange 6X Loading Dye” de Promega. Los geles de agarosa se prepararon con TAE conteniendo bromuro de etidio 0,5 µg/ml (Invitrogen). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron Lambda DNA/Hind III (Invitrogen) y phiX174/Hae III (Promega). El DNA resuelto en el gel de agarosa se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio-Rad).

4.3. Amplificación por PCR

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar DNA se realizaron con la GoTaq DNA polimerasa de Promega o con la Pwo DNA polimerasa de Roche y con dNTP's de Roche en un termociclador de Eppendorf.

Los fragmentos resultantes se purificaron por los sistemas “QIAEX II Gel Extraction” o “QIAquick PCR Purification”, ambos de Qiagen.

4.4. Generación de plásmidos de DNA recombinante

Las construcciones de DNA utilizadas están descritas en la tabla 5. Los distintos insertos se generaron a partir de PCR o por fragmentación de genes clonados en otros plásmidos con enzimas de restricción. Los insertos de interés fueron purificados por gel (Qiagen). Las digestiones de DNA se realizaron con enzimas de restricción de New England Biolabs y se purificaron en columnas de Qiagen. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la enzima T4 ligasa (New England Biolabs) con un contenido de DNA total no superior a 150 ng. La proporción molar utilizada fue de 1:3 (plásmido:inserto), excepto cuando los tamaños del plásmido y del inserto eran similares, en cuyo caso fue de 1:6 (plásmido:inserto). Las construcciones así obtenidas se transformaron en bacterias competentes, y se seleccionaron colonias con el antibiótico adecuado.

4.5. Mutagénesis dirigida

La inserción de mutaciones puntuales en construcciones de DNA plasmídico se realizó con el sistema “QuikChange Site-Directed Mutagenesis”, siguiendo las indicaciones de Stratagene. Para ello, se utilizó un plásmido de doble cadena y oligonucleótidos sintéticos (Sigma) complementarios para cada una de las cadenas que contenían la mutación deseada (Tabla 6). Tras una reacción de PCR mediante la polimerasa Pfu Turbo, se obtuvieron los plásmidos mutantes. La eliminación del DNA parental se llevó a cabo mediante tratamiento con DpnI (New England Biolabs) durante 2 horas a 37°C. Los plásmidos se amplificaron en bacterias DH5 α en presencia del antibiótico adecuado. Las mutaciones se verificaron por secuenciación en el servicio de secuenciación del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

Tabla 5: Construcciones de DNA recombinante utilizadas.

PLÁSMIDO	INSERTO	SITIOS DE RESTRICCIÓN	PROCEDENCIA
pCMX-Gal4-DBD	AIB1 (RAC3)	NheI	construcción propia a partir de pCMX RAC3, D. Chen
pCMX-Gal4-DBD	AIB1 556-1424	SspI/NheI	construcción propia
pCMX-Gal4-DBD	AIB1 673-1424	BamHI/NheI	construcción propia por PCR de pcDNA 3.1+AIB1, P. Meltzer
pCMX-Gal4-DBD	AIB1 578-1131	BglII/NheI	construcción propia
pCMX-Gal4-DBD	AIB1 980-1424	Sall/NheI	construcción propia por PCR de RAC3
pCMX-Gal4-DBD	AIB1 1133-1424	EcoRI/BamHI	construcción propia
pCMX-Gal4-DBD	AIB1 1210-1424	EcoRI/BamHI	construcción propia
pCMX-Gal4-DBD	VP-16	--	P. Puigserver
pCEFL-AU5	AIB1	BglII/EcoRI; BglII/MfeI	construcción propia por PCR de pcDNA 3.1+AIB1, P. Meltzer
pCEFL-AU5	<i>hZNF2</i>	BglII/EcoRI	construcción propia por PCR de FCIV ZNF2, J. Milbrandt
pFASTBac HTa	AIB1	EcoRI/Sall; MfeI/Sall	construcción propia por PCR de pcDNA 3.1+AIB1, P. Meltzer
pSSK-HA	Ubiquitina	--	--
pCMV-HA	Akt(E40K)	--	P.K. Vogt (Scripps Research Institute)
pBABE	<i>hERα</i>	--	--
5xUAS-Luciferase	Luciferasa	--	--
ERE2-tk-Luciferase	Luciferasa	--	--
tk-LacZ	β -galactosidasa	--	--

Tabla 6: Mutaciones dirigidas generadas.

CONSTRUCCIÓN	MUTACIÓN	OLIGONUCLEÓTIDOS
pCMX-Gal4-DBD-AIB1	R1027L	5'CTCATGGCACTCAAAATCTGCCT CTTCTTAGGAATT3'
pCMX-Gal4-DBD-AIB1	R1188L	5'GTTTTTGAATCAGAGCCTACAGG CACTTGAATTGA3'
pCMX-Gal4-DBD-AIB1	K723R	5'GGGACGGAAATGTTGTCAGGCA GGAGCAGCTAAGTCC3'
pCMX-Gal4-DBD-AIB1	K786R	5'GAGAAAGACCCTAAAATTAGGA CAGAGACAAGTGAAGAG3'
pCMX-Gal4-DBD-AIB1	K1194R	5'GCCGACAGGCCTTGAATTGAG AATGGAAAACCCTACTGCTGG3'
pCEFL-AU5-AIB1 y pGEX4T-3-AIB1 (693- 933)	S728A	5'GTCAAGCAGGAGCAGCTAGCTC CTAAGAAGAAGGAGAAT3'
pCEFL-AU5-AIB1	S728E	5'GTCAAGCAGGAGCAGCTAGAAC CTAAGAAGAAGGAGAAT3'
pGEX4T-3-AIB1 (693- 933)	R739A/L741A	5'GAGAATAATGCACCTTCTTGATA CCTGCTGGACAGGGAT3' 5'TGCACCTTCTGCATACGCGCTG GACAGGGATGATC3'
pGEX4T-3-AIB1 (693- 933) y pCMX-Gal4- DBD-AIB1	S860A	5'AGCAGTGTCTCTGGATGCCCT GTTTCTGTTGGC3'
pGEX4T-3-AIB1 (693- 933)	S867A	5'GCCCTGTTTCTGTTGGCTCAGC TCCTCCAGTAAAAAATATC3'

5. Técnicas de RNA

5.1. Extracción y purificación de RNA

Cada placa de cultivo de 6 cm se lavó dos veces con 2 ml de PBS, y el último lavado se recogió completamente. Sobre la superficie de la placa se añadieron 500 µl de TRIzol (Invitrogen). Tras homogenizar la muestra con la pipeta, se transfirió a tubo eppendorf, y se añadieron 100 µl de cloroformo (Merck). La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se dejó reposar 5 minutos antes de ser centrifugada a 4°C durante 15 minutos a máxima velocidad con objeto de separar la fase orgánica de la fase acuosa. El RNA se precipitó de la fase acuosa mediante la adición de 250 µl de isopropanol (Merck), dejándolo reposar 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugando durante 10 minutos a 14.000 rpm. El

precipitado se lavó con etanol al 70%, se resuspendió en tampón de DNasa y se trató con 20 unidades de DNasa I (Takara) durante 30 minutos a 37°C para eliminar trazas de DNA. Finalmente, el RNA se purificó con el sistema RNeasy de Qiagen, se cuantificó en un espectofotómetro nanodrop y se guardó a -80°C hasta su uso. Todo el material utilizado para la manipulación de RNA estaba libre de RNasas.

5.2. Transcripción inversa: RT-PCR semicuantitativa y RT-PCR en tiempo real

La transcripción inversa de los RNAs aislados se realizó mediante el sistema “SuperScript First-Strand Synthesis” de Invitrogen. Se preparó una mezcla con 1.5 µg de RNA total, 1µl de oligo(dT)₂₅, 1µl de dNTPs 10 mM y agua tratada DEPC (0,1% de pirocarbonatos de dietilo) de Ambion hasta 10 µl de volumen final. El RNA se desnaturalizó durante 5 minutos a 65°C e, inmediatamente después, se enfrió en hielo durante 1 minuto. A continuación, se añadieron 2µl de tampón de reacción 10X, 4 µl de MgCl₂, 2 µl de DTT y 1 µl de RNasa out, y la muestra se incubó 2 minutos a 42°C. Seguidamente, se adicionó la polimerasa SuperScript II y se incubó a 42°C durante 50 minutos más. Las reacciones se terminaron a 70°C durante 15 minutos. La muestra se trató con RNasa H a 37°C durante 20 minutos con objeto de eliminar cualquier resto de RNA. Todo el programa se realizó en un termociclador Eppendorf. Los cDNAs obtenidos se guardaron a -80°C hasta su utilización.

El análisis de la expresión de genes se realizó por PCR semicuantitativa a partir de los cDNAs mediante oligonucleótidos sintéticos específicos: AIB1 5'GGCCAGTGATTCACGAAAACG3' y 5'ACTTTCCTGCTCCCGTCTCC3'; y GAPDH 5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3' y 5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA3'. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado. Las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante el programa Quantity

One (Bio-Rad) y se normalizaron a los niveles de GAPDH como gen de control interno.

Para la PCR en tiempo real se utilizó "SYBR green supermix" de Bio-Rad. Cada muestra se analizó por triplicado con 20 ng de cDNA. La amplificación se realizó con oligonucleótidos específicos para los genes de interés: SIP 5'AGCCAGGAGGTGGTGGAGAC3' y 5'CTCGGCCTGTGCTCTTCTCA3'; e importina α 3 5'ATAAGGGGGATTTTGGCACTCA3' y 5'CTCCAGCCCTCCACATTCTTCT3'. Los oligonucleótidos para el control interno GAPDH fueron los mismos que para la PCR semicuantitativa. La amplificación se realizó en un termociclador Opticon de Bio-Rad, y la expresión relativa de cada gen se evaluó con el programa MJ Opticon Monitor.

6. Técnicas de proteínas

6.1. Obtención de extractos totales de proteínas

Las placas Petri de cultivos celulares se lavaron cuidadosamente con PBS frío y se mantuvieron sobre hielo recogiendo exhaustivamente el último lavado. Seguidamente, se añadió sobre la placa el tampón de lisis compuesto por: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, cloruro sódico 300 mM, fluoruro sódico 1 mM, Na₂EDTA 1mM, EGTA 1mM, β -glicerolfosfato 1mM, ortovanadato sódico 1mM, Tritón X-100 1%, AEBSF 1mM (Roche) y un cóctel de inhibidores de proteasas de Roche. Todos los reactivos anteriores fueron obtenidos de Sigma, a excepción de los especificados y del Tritón X-100 que provenía de Merck. Se raspó la superficie de la placa con una espátula (Corning) en presencia del tampón de lisis, y la mezcla se transfirió a un tubo eppendorf previamente enfriado en hielo. Los lisados se mantuvieron en hielo durante 15 minutos y se agitaron vigorosamente en vórtex (VWR International) durante 10 segundos a intervalos de 2-3 minutos. Finalmente, el extracto obtenido tras una centrifugación de 15 minutos a

4°C y a 14.000 rpm se cuantificó por el método Bradford (Bio-Rad) en un espectrofotómetro de la marca eppendorf, empleando como curva patrón controles de concentración conocida de albúmina del suero bovino (BSA; Sigma).

6.2. Extracción y purificación de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Para el estudio de poliubiquitinación se utilizaron condiciones desnaturalizantes durante la purificación de proteínas ubiquitinadas con el fin de impedir cualquier actividad desubiquitinasa presente en los extractos. El clon de células HeLa expresando de manera estable ubiquitina con una extensión de 6 histidinas (HeLa 6xHis-Ubiquitina) se recogió y lisó en tampón de lisis desnaturalizante compuesto por: Guanidinio-HCl 6 M, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-HCl 0,1 M, pH 8 (1 ml de tampón/placa de 10 cm de diámetro). Seguidamente, el extracto se sonicó durante 30 segundos a máxima amplitud (Microson Ultrasonic Cell Disruptor) y se centrifugó durante 15 minutos a máxima velocidad. Como control, un volumen de 50 µl del extracto se precipitó con ácido tricloroacético. El resto del volumen se diluyó 1:1 en PBS y se incubó con 25 µl de microesferas de Ni²⁺-NTA-Agarosa (Qiagen) en presencia de Imidazol 10 mM (Merck), AEBSF 1mM, MG132 20 µM, N-etilmaleimida 10 mM (Sigma) y ubiquitina-aldehído 5 nM (Santa Cruz Biotechnology) durante 2 horas a temperatura ambiente y en balanceo continuo. Transcurrido el tiempo de incubación, las microesferas se lavaron secuencialmente con diferentes tampones. Un lavado con tampón de lisis suplementado con Imidazol 10 mM; otro lavado con una solución compuesta por: Urea 8 M (Merck), Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0,1 M, Imidazol 10 mM y Tris-HCl 0,01 M, pH 8; dos lavados más con un tampón compuesto por: Urea 8 M, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0,1 M, Imidazol 10 mM y Tris-HCl 0,01 M, pH 6,3 suplementado con Tritón X-100 0.2%; y un último lavado con el mismo tampón anterior, pero sin Tritón. Finalmente, las

proteínas fueron eluidas añadiendo 80 µl de solución solubilizadora de Laemmli 1X [glicerol 10%, SDS 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, azul de bromofenol 0,0625% (Merck) y β-mercaptoetanol 2,5%]. Todos los reactivos utilizados para la elaboración de los tampones, excepto los especificados, fueron adquiridos de Sigma.

6.3. Fraccionamiento subcelular citosol/núcleo

Para los fraccionamientos subcelulares, las células se lavaron, se recogieron en PBS frío con la ayuda de una espátula y, seguidamente, se centrifugaron a 600 x g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se procedió a la obtención de las fracciones mediante el sistema “Nuclear/Cytosol Fractionation” de MBL, siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenidos, los extractos se cuantificaron por el método de Bradford.

6.4. Precipitación de proteína por TCA

Un volumen determinado de lisado proteico (50 µl) se precipitó con ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Para ello, se añadió 1 ml de TCA 5 % (Sigma) al lisado, y la muestra se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos a -20°C. Tras una centrifugación de 15 minutos a 14.000 rpm y a 4°C, el precipitado se lavó con 300 µl de acetona (Merck) y se volvió a centrifugar durante 15 minutos en las mismas condiciones anteriores. Finalmente, el precipitado se resuspendió en solución solubilizadora de Laemmli 1X y se hirvió 5 minutos a 95°C.

6.5. Separación de proteínas por SDS-PAGE

La separación de proteínas fue llevada a cabo por electroforesis en minigeles verticales de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico o SDS (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Estos geles verticales se componían de dos regiones: el gel empaquetador o de

apilamiento en la parte superior (Tris-HCl, 250 mM, SDS 7mM, 4% de acrilamida:bisacrilamida 29:1, pH 6,8) y el gel de resolución en la parte inferior (Tris-HCl 375 mM, SDS 3,5 mM, pH 8,8), cuyo tamaño de poro variaba según el tamaño de la proteína a analizar y el porcentaje de acrilamida añadido (entre 7,5 y 15%). Para polimerizarlos se utilizaron persulfato amónico y TEMED.

Antes de proceder a su separación, las muestras proteicas se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C en presencia de solución solubilizadora de Laemmli 1X (glicerol 10%, SDS 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, azul de bromofenol 0,0625% y β -mercaptoetanol 2,5%). Salvo en los casos indicados, se cargó un total de 30 μ g de proteína por calle.

La electroforesis se realizó a voltaje constante (100V) en tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,05%. Los tanques, sistemas de preparación de geles y fuentes de alimentación fueron obtenidos de Bio-Rad. Los reactivos para los tampones eran de Sigma, excepto la solución al 30% de acrilamida:bisacrilamida 29:1 de Bio-Rad y el azul de bromofenol y TEMED, ambos de Merck.

6.6. Tinción de geles

En algunas ocasiones los geles se tiñeron siguiendo diferentes metodologías.

Para la tinción Coomassie, el gel de poliacrilamida se incubó en una solución de Coomassie (azul Coomassie 2,5 g/l, metanol 33% y ácido acético 10%) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, el gel se destiñó en la misma solución sin azul Coomassie hasta la visualización de las bandas de interés. El coomassie fue obtenido de Sigma y el metanol y el ácido acético de Merck.

En determinados experimentos los geles se tiñeron con SYPRO, como colorante alternativo al coomassie, o con Pro-Q Diamond para teñir específicamente las fosfoproteínas. Estas tinciones fueron realizadas por el

servicio de proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (www.proteored.org).

6.7. Inmunotransferencia o “Western blot”

Para poder detectar proteínas específicas, los geles de poliacrilamida resueltos por SDS-PAGE fueron transferidos a membrana de fluoruro de polivinilideno (Millipore) en tampón de transferencia [Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v)] durante 1h a 100 V o toda la noche a 200 mA y a 4°C. Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante al menos 1 h en BSA al 5% (p/v) en el tampón de lavado T-TBS [Tris-HCl 25 mM, pH 8, NaCl 150 mM, KCl 2.5 mM y Tween-20 0,1% (v/v)] para bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 7) diluido en T-TBS y BSA al 3%. Las membranas se lavaron tres veces en T-TBS y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario apropiado (Tabla 8). Las proteínas se visualizaron con el sistema quimioluminiscente ECL de Santa Cruz o con el sistema más sensible ECL Plus de GE Healthcare. En algunos casos, se eliminaron los anticuerpos de las membranas con un tratamiento de glicina 200 mM, pH 2,5 y SDS al 0,4% (p/v) durante 30 min a temperatura ambiente y, a continuación, se bloquearon e incubaron de nuevo con otros anticuerpos.

6.8. Inmunofluorescencia

La detección y localización por inmunofluorescencia de la proteína de AIB1 se realizó en células crecidas sobre cubreobjetos previamente esterilizados con etanol o, alternativamente, crecidas en portaobjetos de 8 pocillos (Nalgene Nunc Internacional) diseñados específicamente para el cultivo celular. Tras los tratamientos específicos, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 10 minutos con formalina al 10% en PBS (Sigma).

Seguidamente, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,2% en PBS durante 20 minutos. Tras la permeabilización, las células se lavaron con PBS y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS conteniendo suero de caballo al 1% (v/v) y BSA al 3%. A continuación, se incubaron con anticuerpos primarios anti-AIB1 (monoclonal) o anti-AU5 diluidos 1:50 o 1:1000 respectivamente en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C.

Tabla 7: Anticuerpos primarios utilizados en la experimentación.

ANTÍGENO	PM (KDa)	ESPECIE	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
AIB1	160	monoclonal ratón	1:1000	BD Transduction Laboratories
AIB1	160	policlonal conejo	1:2000	producción propia
AKT	60	policlonal conejo	1:1000	producción propia
P-AKT (Ser473)	60	policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling
P-ERK (Tyr204)	42	monoclonal ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
ER α	67	monoclonal ratón	1:500	Affinity Bioreagents
p53	53	monoclonal ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Ubiquitina FK2	variable	monoclonal ratón	1:1000	Affinity Bioreagents
Skp1 p19	19	monoclonal ratón	1:300	--
Cdc2	34	policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling
P-Cdc2 (Tyr15)	34	policlonal conejo	1:1000	Cell Signaling
Ciclina D1	35	monoclonal ratón	1:750	Santa Cruz Biotechnology
Ciclina E	55	policlonal conejo	1:300	Santa Cruz Biotechnology

... Tabla 7 Continuación

Ciclina A	60	policlonal conejo	1:300	Santa Cruz Biotechnology
Ciclina B1	55	policlonal conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
PP1	38	policlonal conejo	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
P-PP1 (Thr320)	38	policlonal conejo	1:1000	Cell signaling
Gal4(DBD)	variable	monoclonal ratón	1:500	Santa Cruz Biotechnology
Gal4(DBD)	variable	policlonal conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
HA	variable	monoclonal ratón	1:1000	Covance
AU5	variable	monoclonal ratón	1:1000	Covance
Lamina A/C	67	monoclonal ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
β-Tubulina	55	monoclonal ratón	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
β-Actina	42	monoclonal ratón	1:20000	Sigma-Aldrich

Tabla 8: Anticuerpos secundarios utilizados en la experimentación.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Anti-ratón-HRP	1:5000	GE Healthcare
Anti-conejo-HRP	1:5000	GE Healthcare
Anti-ratón-Cy3	1:250	Jackson ImmunoResearch
Anti-ratón-FITC	1:250	Jackson ImmunoResearch
Anti-conejo-Cy3	1:250	Jackson ImmunoResearch

La incubación con el anticuerpo secundario específico (Tabla 8) se realizó, tras varios lavados con PBS, durante 1 hora. Posteriormente, los núcleos celulares se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1mg/ml diluido en PBS durante 5 minutos. Tras varios lavados con PBS y un último lavado con agua destilada para eliminar sales, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje de DakoCytomation. La localización

subcelular de los antígenos se analizó en un microscopio de fluorescencia de Leica (Leica CTR6000).

6.9. Inmunohistoquímica de células

Células exponencialmente creciendo se recogieron con tripsina-EDTA, se lavaron dos veces con PBS 1X y se fijaron en suspensión con formalina al 10% en PBS durante 10 minutos. Las células se centrifugaron a 18000 rpm durante 5 minutos para eliminar la formalina. A continuación, el precipitado celular se resuspendió y deshidrató mediante concentraciones crecientes de etanol 70, 80 y 96% durante 15 minutos, con etanol al 100% durante 5 minutos por triplicado y con xilol durante 5 minutos, también por triplicado. El proceso de parafinado se realizó a una temperatura de 60°C en tres pasos: primero en parafina I (46-48°C) durante 1 hora, segundo en parafina II (51-53°C) durante 2 horas y, por último, en parafina III (57-60°C) durante 3 horas. Los bloques de parafina se realizaron en parafina III y se procesaron y tiñeron en la unidad de patología molecular diagnóstica del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. Los alcoholes y la parafina se obtuvieron de Merck.

6.10. Determinación de la vida media de una proteína: experimentos de pulso y caza

Para estudiar la estabilidad de AIB1 en varias líneas celulares y bajo determinadas condiciones, se sembraron entre $1,5-2 \times 10^5$ células MCF-7, HeLa, A549 o H1299 en placas de 6 cm de diámetro. Al día siguiente se sustituyó el medio de cultivo por medio DMEM sin L-cisteína (Gibco) suplementado con 50 μ Ci de [35 S]-cisteína (GE Healthcare) y 10% de suero bovino fetal previamente dializado para eliminar los aminoácidos. Las células se incubaron en este medio durante 2 horas a 37°C. Seguidamente, éstas se lavaron dos veces con 10 ml de PBS atemperado, y se añadió medio regular de cultivo en ausencia o presencia, según el

experimento, de ciclosporina A 5 μ M, 17- β -estradiol 10 nM, tamoxifeno 10 μ M (Sigma) o ICI182780 1 μ M (AstraZeneta Pharmaceuticals). Las placas se fueron tomando y lisando a intervalos de 30 minutos. Los extractos se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-AIB1 policlonales, y los inmunocomplejos se resolvieron por SDS-PAGE. El gel resultante se secó sobre papel Whatman de 3 mm y se analizó con PhosphorImager (Molecular Dynamics). El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) se determinó a partir de la pendiente (λ) de la recta de regresión obtenida al representar el tiempo *versus* el logaritmo de la cantidad de radiactividad retenida en AIB1 $t_{1/2} = \ln 2/\lambda$.

6.11. Técnicas para revelar interacciones proteína-proteína

6.11.1. Inmunoprecipitación

Las inmunoprecipitaciones se realizaron con extractos conteniendo 0,5-1 mg de proteína total. Todas las muestras se llevaron al mismo volumen de tampón de lisis (un mínimo de 500 μ l) en cada experimento. Una vez ajustados los volúmenes, los lisados se incubaron en un agitador rotatorio durante toda la noche en presencia de 2 μ g del anticuerpo en cuestión por cada miligramo de lisado y, en el caso de AIB1, en presencia de 15 μ l del suero de conejo proveniente del segundo sangrado (previamente generado en nuestro laboratorio) o de 15 μ l de suero preinmune como control. Al día siguiente se añadieron 30 μ l de proteína A-sefarosa o proteína G-sefarosa (ambas de GH Healthcare) al 50% en PBS por cada miligramo de lisado. Tras 2 horas de incubación, las muestras se centrifugaron a 1.000 x g durante 1 minuto y el sobrenadante se descartó. Las microesferas se lavaron varias veces con tampón de lisis, y el precipitado se solubilizó hirviendo en solución solubilizadora de Laemmli 1X durante 5 min. El sobrenadante obtenido se resolvió por SDS-PAGE y se analizó por “western blot” con anticuerpos específicos.

6.10.2. “Cross-linking” *in vivo*

El entrecruzamiento de proteínas fue realizado según el procedimiento descrito por Vasilescu y colaboradores (Vasilescu et al., 2004). Cultivos al 70% de confluencia de células MCF-7 se incubaron con 0,1% o 0,3% de formaldehído en PBS (37% de Sigma) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. La reacción se paró mediante la adición de glicina 125 mM, que se incubó durante 5 minutos. Seguidamente, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón de lisis. Los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpos policlonales para AIB1. Para revertir los enlaces químicos formados por el formaldehído, se adicionaron 30 μ l de NaCl 0,3 M a los inmunocomplejos, y éstos se calentaron a 65°C durante 4 horas. Finalmente, se añadió solución solubilizadora de Laemmli, se hirvieron las muestras, se resolvieron por SDS-PAGE y se analizaron por “western blot”.

6.10.3. “Far Western Blot”

Para identificar proteínas que pudieran interaccionar con AIB1 se lisó un cultivo de células MCF-7 creciendo en condiciones normales y se resolvió en una electroforesis bidimensional. La separación de proteínas en dos dimensiones (isoelectroenfoque y SDS-PAGE) fue realizada por triplicado por el servicio de proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe, de acuerdo a los estándares de ProteoRed (www.proteored.org). Uno de los geles fue teñido con SYPRO y los otros dos fueron transferidos a membrana. Tras la transferencia, las membranas fueron incubadas con T-TBS en presencia de proteína de AIB1 recombinante (entre 20-30 μ g/ml) expresada en células Sf9 infectadas con un baculovirus para inducir la expresión esta proteína. Como control positivo, una de las membranas se incubó en presencia de 17- β -estradiol para favorecer la interacción de AIB1 con ER α . La incubación se realizó a 37°C durante 1 hora. A continuación, se lavaron las membranas varias veces con T-TBS y se incubaron con

anticuerpos monoclonales para AIB1 y para ER α (control positivo). Tras el revelado, se compararon los puntos revelados en la membrana y los teñidos con SYPRO en el gel. Hacer coincidir el gel con la membrana resultó ser más complicado de lo que se esperaba, entre otras cosas porque los tamaños del gel y de la membrana fueron variando tras los distintos tratamientos. Los puntos seleccionados se escindieron del gel y se analizaron mediante espectrometría de masas.

7. Espectrometría de masas

Las proteínas escindidas de los geles de poliacrilamida se identificaron mediante digestión con tripsina/quemotripsina y análisis por espectrometría de masas-masas acoplada a una nanoHPLC (LC Packings) en el servicio de proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe, de acuerdo a los estándares de ProteoRed (www.proteored.org). El espectrómetro de masas en tándem empleado fue del tipo triple cuadrupolo/tiempo de vuelo (Qq-TOF), modelo QSTAR-XL de Applied Biosystems.

8. Sistemas de expresión de proteínas

8.1. Sistema de expresión libre de células

Para sintetizar proteína de AIB1 marcada radiactivamente con ^{35}S se utilizó el sistema “TNT Coupled Reticulocyte Lysate” de Promega. Se tomó 1 μg de la construcción pCMX-Gal4-DBD-AIB1, 40 μl de la mezcla de reticulocitos, 2 μl de [^{35}S]-metionina (GE Healthcare) y agua DEPC hasta un volumen final de 50 μl . La reacción se incubó durante 1,5 horas a 30°C.

8.2. Sistema baculovirus-células de insecto

Las células Sf9 se crecieron a 27°C en medio SF-900 II (Gibco). Inicialmente, se transfectó el báculo en células Sf9 para producir baculovirus recombinantes. Tras dos amplificaciones, se tituló el virus con

el sistema BacPAK (Clontech). Para generar más virus, células exponencialmente creciendo se infectaron con virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 cuando el cultivo alcanzó una densidad de 2×10^6 células/ml. El virus se volvió a titular y se guardó a -80°C o, alternativamente, se utilizó de inmediato para conseguir los resultados más óptimos de expresión de proteína.

Se sembraron 3×10^5 células/ml en un matraz de 100 ml conteniendo 25 ml de medio de cultivo suplementado con Pluronic F68 (Gibco). El cultivo se creció a 27°C con agitación suave de 100 rpm hasta alcanzar $2-2,5 \times 10^6$ células/ml. Este cultivo sirvió para inocular un segundo cultivo de 50 ml a 3×10^5 células/ml en un matraz de 250 ml. Cuando el segundo cultivo alcanzó la densidad de $2-2,5 \times 10^6$ células/ml se empleó para inocular un tercer cultivo de 300 ml a 3×10^5 células/ml en un matraz de 1 litro de capacidad. Finalmente, cuando alcanzó la densidad de $2-2,5 \times 10^6$ células/ml se infectó a 3 MOI y 48 horas después se recogieron todas las células. Éstas se resuspendieron en 5 ml de PBS conteniendo MgCl_2 1,5 mM, EDTA 1 mM, KCl 10 mM, EGTA 1 mM, DTT 0,1 mM (Sigma), inhibidores de proteasas (Roche) y MG132 20 μM . Las células se lisaron en un homogenizador manual sumergido en hielo, y el lisado se pasó por una columna que contenía 600 μl (50% p/v) de microesferas de Ni^{2+} -NTA-Agarosa. La columna se lavó con 40 ml del mismo tampón conteniendo 25 mM de imidazol y, finalmente, se eluyó la proteína recombinante en 600 ml del mismo tampón conteniendo 500 mM de imidazol. La proteína se desalinizó en una columna de exclusión molecular de Amersham Bioscience (GE) apropiada para ello.

8.3. Sistema pGEX

El sistema de plásmidos pGEX (Amersham Biosciences, GE) permite la sobreexpresión y posterior purificación de proteínas mediante la introducción de la secuencia que se desea expresar en pauta con la

proteína GST (enzima glutatión-S-transferasa de *Schistosoma japonicum*), presente en el plásmido. La proteína GST (26 KDa) presenta gran afinidad por el glutatión, lo que permite su purificación de un extracto mediante cromatografía de afinidad utilizando glutatión inmovilizado a sefarosa. La construcción se encuentra bajo el control del promotor P_{tac} inducible por IPTG, lo que permite sobreexpresar en grandes cantidades la proteína deseada.

Mediante este sistema han sido obtenidas varias proteínas para la experimentación, como la enzima desubicitinasa USP2 y los diferentes fragmentos de AIB1. En la tabla 9 se describen las construcciones utilizadas. Los fragmentos comprendidos entre los aminoácidos 1-555, 693-933, 934-1031 y 1032-1424 fueron obtenidos aprovechando la existencia de un sitio SspI (AATATT) y 3 sitios EcoRI (GAATTC) en la secuencia de AIB1 en las posiciones 1665 (aminoácido 555), 2076 (aminoácido 692), 2799 (aminoácido 933) y 3093 (aminoácido 1031). El fragmento 556-693 se generó mediante PCR con oligonucleótidos sintéticos que contenían los sitios de restricción compatibles con el plásmido: 5'GCGCGAATTCATTACCCAACCAAGT3' y 5'GCGCGTCTCGACTCACCCATTCTGCAGCAA3'.

La cepa de *E. coli* BL21DE3 se transformó con las construcciones anteriores en presencia de ampicilina como antibiótico de selección. Se inoculó una colonia en 50 ml de LB ampicilina (100 µg/ml) y se dejó crecer a 37°C durante toda la noche en agitación. Pasado este tiempo, se diluyó el inóculo en 400 ml de medio LB + ampicilina y se dejó crecer a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8. En este punto, se indujo la expresión de la proteína de fusión añadiendo IPTG (Sigma) a 0,4 mM, y se dejó crecer a 30 °C durante 4 horas. El cultivo bacteriano resultante se centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en el tampón de resuspensión previamente enfriado y compuesto por PBS, AEBSF 1 mM y DTT 10 mM. La solución resuspendida

se sonicó 5 x 30 segundos a máxima amplitud y tras añadir Tritón X-100 al 1% y agitación enérgica, la muestra se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante, conteniendo la proteína de interés, se purificó con 150 µl de glutatión sefarosa al 50% en PBS (Amersham Pharmacia Biotechnology) durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación rotatoria. La resina se lavó varias veces con PBS y la proteína de fusión se eluyó dos veces consecutivas con 500 µl de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8 suplementado con glutatión reducido 10 mM (Sigma) durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación rotatoria y con pipeteo ocasional para dispersar las microesferas. Los sobrenadantes obtenidos se juntaron, se cuantificaron, y se conservaron alícuotas a -80°C hasta su utilización. Los ensayos *in vitro* se realizaron en presencia de la proteína GST. En el caso de los fragmentos de AIB1, las proteínas de fusión no fueron eluidas. Éstas se guardaron unidas a la sefarosa y resuspendidas al 50% en PBS suplementado con 0,01% (p/v) de azida sódica (Sigma) a 4°C.

Tabla 9: Construcciones pGEX utilizadas.

PLÁSMIDO	INSERTO	SITIOS DE RESTRICCIÓN	PROCEDENCIA
pGEX 4T-1	AIB1 1-555	EcoRI/Sspl	construcción propia
pGEX 4T-1	AIB1 556-693	EcoRI/Sall	construcción propia
pGEX 4T-3	AIB1 693-933	EcoRI/EcoRI	construcción propia
pGEX 4T-3	AIB1 934-1031	EcoRI/EcoRI	construcción propia
pGEX 4T-3	AIB1 1032-1424	EcoRI/Sall	construcción propia
pGEX	USP2	--	O. Crouse
pGEX	Rb (792-928)	--	--

9. Ensayos de actividad enzimática

9.1. Estudio de la degradación de AIB1 a partir de extractos de ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos de *Xenopus* son células que tienen 1mm de diámetro y, por tanto, se pueden manipular con facilidad. Estas células se almacenan en los lóbulos del ovario de la rana adulta y son clasificadas en varios estadios dependiendo del estado de maduración (desde el estadio I hasta el estadio VI). En su estadio final el ovocito se encuentra bloqueado en la profase de la primera meiosis. La exposición a la progesterona secretada por las células vecinas provoca la desfosforilación de los complejos Cdc2-ciclina B y la progresión en los dos ciclos meióticos sucesivos hasta alcanzar la metafase de la segunda mitosis (Duckworth et al., 2002). Durante este proceso ocurre la rotura de la vesícula seminal, y los ovocitos bloqueados en la segunda metafase pueden ser fácilmente diferenciados de aquellos bloqueados en primera profase por la presencia del clásico anillo blanquecino situado en el polo animal. El ovocito ahora se encuentra a la espera de ser fecundado. En el laboratorio, se aislaron ovocitos bloqueados en la primera profase (a los que nos referiremos por comodidad como ovocitos G2) y se indujo su maduración *in vitro*, tratándolos con progesterona (ovocitos M).

Los ovocitos fueron obtenidos de una hembra adulta de *Xenopus laevis*, siguiendo los protocolos de manipulación de animales.

Las ranas fueron inducidas a ovular mediante la inyección intraperitoneal de 100 unidades de gonadotropina coriónica humana (Calbiochem). Tres días después de la estimulación, se extrajeron quirúrgicamente varios fragmentos ováricos de la rana anestesiada mediante hipotermia. Tras la disección manual para aislar los ovocitos del ovario, se seleccionaron los ovocitos maduros en fase VI (1 mm de diámetro aproximadamente) que presentaban un aspecto saludable, visualizándolos en una lupa Leica MZ95 y en presencia de tampón de

disección (HEPES 5 mM, NaCl 96 mM, MgCl₂ 1mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, pH 7,8) suplementado con 10 µg/ml de penicilina y estreptomina (todos los reactivos eran de Sigma). Un grupo de los ovocitos se incubó con progesterona 15 µM (Sigma) para inducir la maduración meiótica. La meiosis se confirmó 6-8 horas después por la formación del característico halo en el polo animal, resultante de la rotura de la vesícula seminal. Los ovocitos en fase VI no tratados permanecieron bloqueados en la profase de la primera meiosis (G2), mientras que los inducidos a madurar quedaron bloqueados en la metafase de la segunda meiosis (M). Los ovocitos se recogieron en grupos de tres y se conservaron en seco a -80°C hasta el momento de su uso.

Para los ensayos de degradación se lisaron 3 ovocitos de cada tipo en 200 µl de tampón de lisis (sin inhibidores de proteasas). En el ensayo de inmunocomplejos precipitados con anticuerpos policlonales para AIB1, éstos se incubaron con 50 µl de lisado de ovocitos en G2 o en M en ausencia o presencia de MG132 20 µM durante 30 minutos o 1 hora a 25°C. Transcurridos estos tiempos, los inmunoprecipitados se lavaron y se hirvieron en presencia de solución solubilizadora de Laemmli para, finalmente, ser analizados por "western blot". En el experimento de AIB1 transcrita/traducida *in vitro* y marcada con ³⁵S, 15 µl de AIB1 se incubaron con 50 µl de lisado de ovocitos durante 1 hora a temperatura ambiente. La doble incubación G2+M consistió en la previa incubación de 15 µl de AIB1 con 50 µl de lisado de ovocitos en G2 durante una hora, y su posterior incubación durante una hora más con 50 µl de lisado de ovocitos bloqueados en M que se adicionaron a la mezcla anterior. Finalmente, se añadió solución solubilizadora de Laemmli, y las muestras se analizaron por SDS-PAGE y posterior "western blot". Estos ensayos se repitieron tres veces.

9.2. Ensayo de desubicultinación por USP2

Las células MCF-7 bloqueadas en mitosis con nocodazol fueron lisadas en poco volumen de tampón de lisis con la finalidad de conseguir una alta concentración de proteínas. Para el ensayo, 300 ng de GST-USP2 se incubaron con 30 µg de extracto proteico (relación 1:100) en tampón de desubicultinación (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, pH 7,5) en un volumen final de 50 µl durante 2 horas a 37°C. El control se incubó en ausencia de USP2. Las muestras se analizaron por “western blot”. El ensayo se repitió dos veces.

9.3. Ensayos fosfatasa

Células MCF-7 bloqueadas en mitosis con nocodazol fueron lisadas con poco volumen de tampón de lisis, de manera que la concentración de inhibidores de fosfatasa que contenía el tampón quedó diluida un mínimo de 5 veces durante el ensayo. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl en el tampón número 2 suministrado por New England Biolabs con 10 unidades de fosfatasa alcalina de origen bovino CIP (New England Biolabs) y 30 µg de extracto proteico. La incubación se realizó a 30°C durante 1,5 horas. El control negativo se incubó en ausencia de enzima.

Para la reacción con fosfatasa lambda (λ) el procedimiento fue similar: 30 µg de lisado concentrado procedente de células MCF-7 bloqueadas con nocodazol se incubaron a 30°C durante 1,5 horas con 200 unidades de fosfatasa λ (New England Biolabs) en un volumen final de 50 µl conteniendo el tampón específico para esta fosfatasa.

El ensayo de desfosforilación de AIB1 por la fosfatasa PP1 se realizó con la subunidad catalítica recombinante de la isoforma α de PP1 (New England Biolabs). Células HeLa se bloquearon en mitosis con nocodazol, y las células no adheridas a la placa de cultivo se lisaron en tampón de lisis. Del extracto obtenido se tomó el volumen equivalente a 30 µg y éste fue incubado con 1.25 unidades de enzima PP1 recombinante en

ausencia o presencia de 1 μM de ácido okadaico (Biomol) en un volumen final de 50 μl conteniendo el tampón de reacción de PP1. Las muestras fueron incubadas a 30°C durante 1 hora y, posteriormente, se analizaron por “western blot”. El ensayo se repitió tres veces.

9.4. Ensayo de fosforilación *in vitro*: p13^{suc1}

Células HeLa bloqueadas en mitosis con nocodazol fueron lisadas con tampón de lisis. Un volumen equivalente a 100 μg de lisado se incubó con proteína p13^{suc1} recombinante conjugada a agarosa (Upstate Biotech). Los complejos Cdk1 purificados por afinidad a p13^{suc1} se lavaron dos veces con tampón de lisis y otras dos con el tampón de reacción Cdc2-ciclina B (New England Biolabs). A continuación, estos complejos se incubaron con 25 μg de lisado de células HeLa asincrónicas en 50 μl (volumen final) de tampón de reacción de Cdc2-ciclina B en presencia o ausencia de 100 μM de ATP a 30°C durante 2 horas. La movilidad electroforética de AIB1 se analizó por “western blot” con anticuerpos para esta proteína. El ensayo se repitió dos veces.

9.5. Ensayo de fosforilación *in vitro*: complejos recombinantes Cdc2-ciclina B/A

La fosforilación por el complejo Cdc2-ciclina B1 (New England Biolabs) se realizó con proteína AIB1 entera expresada en células de insecto o con fragmentos de AIB1 fusionados a GST y expresados en bacteria. Para cada ensayo, se utilizaron 10 unidades de complejo recombinante Cdc2-ciclina B1. Las reacciones quinasa se realizaron a 30 °C durante 1 hora en ligera agitación en un volumen final de 30 μl con el tampón suministrado por la casa comercial. Cada reacción contenía ATP 200 μM , [γ -³²P]-ATP 5 μCi y 1 μg de proteína AIB1 entera o 15 μl de glutatión-sefarosa acomplejado a los distintos fragmentos de GST-AIB1 previamente lavados con el tampón de reacción. Como control positivo de

las reacciones de fosforilación se utilizó 1 µg de histona H1 o 1 µg de GST-retinoblastoma (792-928). Los ensayos se repitieron al menos tres veces.

La fosforilación de los fragmentos de AIB1 con el complejo Cdc2-ciclina A2 (Cell Signaling) se llevó a cabo con 100 ng de complejo en las mismas condiciones anteriores.

Una vez incubadas las muestras, la mitad del volumen de reacción se resolvió por SDS-PAGE. El gel resultante se secó sobre papel de Whatman 3 mm y se expuso a película autorradiográfica de 2 a 24 horas, dependiendo de la intensidad de la señal.

10. Medida de la actividad transcripcional con gen indicador de Luciferasa

Para medir la actividad transcripcional de AIB1 clonamos la secuencia completa de este coactivador, así como distintos fragmentos de AIB1 en el plásmido que contenía el dominio de unión a DNA del factor de transcripción Gal4 (pCMX-Gal4-DBD). Adicionalmente, empleamos un segundo plásmido que contenía el gen indicador de luciferasa bajo el control del elemento de respuesta a Gal4 (5xUAS). La actividad transcripcional de los distintos fragmentos se cuantificó midiendo la luz emitida en la reacción catalizada por la luciferasa con un luminómetro (Berthold Detection Systems).

El día previo a la transfección se sembraron 50.000 células COS-1, 200.000 células HeLa o 250.000 células MCF-7 en placas de 6 pocillos. El reactivo de transfección para células COS fue el FuGene 6, mientras que se usó Lipofectamina LTX para transfectar células HeLa y MCF-7. En cada pocillo se cotransfectaron 500 ng de 5xUAS luciferasa y cantidades equimoleculares de los plásmidos pCMX-Gal4-DBD: 25 ng de pCMX-Gal4-DBD, 46,5 ng de pCMX-Gal4-DBD-AIB1 y sus correspondientes formas mutantes, 38,05 ng del fragmento 556-1424, 36 ng del fragmento 673-1424, 31 ng del fragmento 980-1424, 33 ng del fragmento 578-1131, 29 ng del

fragmento 1133-1424 y 25,3 ng de pCMX-Gal4-DBD-VP16. Como control interno se transfectó un plásmido que contenía el gen LacZ bajo el control del promotor mínimo de la timidina quinasa. Los ensayos de luciferasa se realizaron pasadas las 48 horas desde la transfección. Para ello, las células se lisaron en 200 μ l de "Passive Lysis Buffer" (Promega) durante 5 minutos en agitación. Seguidamente, se transfirieron 50 μ l de cada lisado a tubos independientes para ser medidos en el luminómetro que inyectó 100 μ l por muestra del sustrato luciferina (Promega). Para el ensayo de β -galactosidasa (codificada por el gen LacZ) se utilizó el sistema Galacto-Star de Applied Biosystems. Un volumen de 200 μ l de tampón de reacción conteniendo el sustrato quimioluminiscente se incubó con 50 μ l de lisado a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 hora. Finalmente, la emisión de luz producida se cuantificó en el luminómetro. Los ensayos se repitieron al menos dos veces.

Para estudiar la actividad de AIB1 como coactivador, se cuantificó la actividad transcripcional dependiente del receptor de estrógenos α (ER α). En este caso, se utilizó como indicador el gen de la luciferasa bajo el control de dos elementos de respuesta a estrógenos en tándem seguidos del promotor mínimo de la timidina quinasa (ERE2-tk-luciferasa). Las células COS-1 se cotransfectaron con 500 ng de indicador, 25,7 ng de pBABE o 34,8 ng de pBABE-ER α y 25 ng de pCMX-Gal4-DBD o 46,5 ng de pCMX-Gal4-DBD-AIB1 o su forma mutante (S728A). Cinco horas antes del ensayo luciferasa, las células se trataron con 17- β -estradiol 50 nM (Sigma) para favorecer las interacciones entre ER α y AIB1.

11. Métodos estadísticos

En la realización del trabajo experimental se utilizó el programa SigmaPlot (versión 9) para calcular las medias y los errores estándar de todas las variables continuas. La comparación entre las variables se realizó mediante la distribución t de Student.

El programa Excel se utilizó para la construcción de las gráficas y el Adobe Photoshop para el procesamiento de todas las imágenes.

———— RESULTADOS

***1. ESTUDIO DE LOS FACTORES
IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN
DE LA ESTABILIDAD DE AIB1***

1.1. Diferencias en la distribución celular y en la estabilidad de AIB1 en varias líneas celulares

Con objeto de comparar la localización subcelular de AIB1 en líneas celulares de cánceres humanos, se realizó un estudio inmunohistoquímico en células HeLa y MCF7, derivadas de un carcinoma del cuello uterino o cérvix y de un adenocarcinoma de mama respectivamente. Los resultados revelaron diferencias significativas en la localización intracelular de AIB1, siendo preferentemente citosólica en células HeLa y mayoritariamente nuclear en MFC-7 (Fig. 11A).

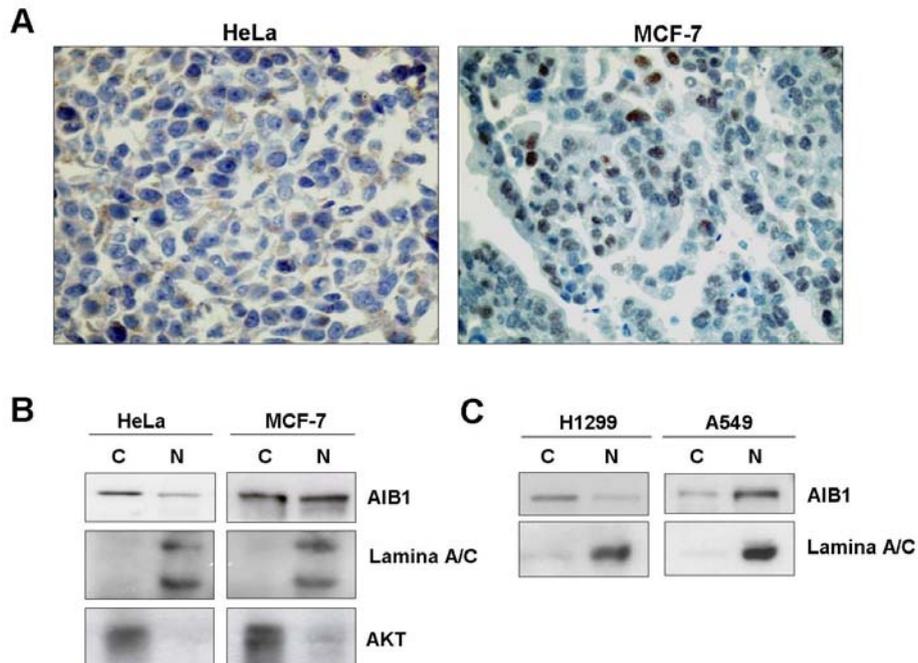


Figura 11: La distribución subcelular de AIB1 difiere entre líneas celulares de cáncer humano. A) Células en crecimiento exponencial (80% de confluencia) fueron recogidas e incluidas en parafina antes del análisis inmunohistoquímico con anticuerpos anti-AIB1. Posteriormente, las secciones se contrastaron con hematoxilina. **B)** En paralelo se lisaron y fraccionaron células para obtener los extractos citosólico (C) y nuclear (N) que fueron analizados por “western blot”. AKT y Lamina A/C fueron utilizados como marcadores de citosol y núcleo respectivamente. **C)** Fraccionamiento subcelular citosol/núcleo y “western blot” de células H1299 y A549.

Las diferencias en la distribución subcelular de AIB1 en células HeLa y MCF-7 fueron confirmadas mediante fraccionamiento subcelular y posterior análisis por “western blot” (Fig. 11B). Resultados similares se obtuvieron en las líneas celulares H1299 y A549, ambas derivadas de carcinomas de pulmón (Fig. 11C). AIB1 se localizaba preferentemente en el citosol de las células H1299, mientras que en A549 tenía una localización más nuclear. Por tanto, parecía que la acumulación nuclear de AIB1 podía representar una diferencia biológica entre líneas celulares y reflejar alteraciones entre el intercambio citosol-núcleo de esta proteína.

La distribución subcelular juega un papel importante en la regulación de la actividad y/o los niveles de una proteína. Dado que estudios recientes han mostrado resultados contradictorios respecto al lugar de degradación de AIB1, citosólico (Mani et al., 2006) o nuclear (Li et al., 2007a), quisimos resolver esta incongruencia en nuestros modelos biológicos. Debido a que el contenido citosólico de AIB1 es mayor en células HeLa, una degradación nuclear sería consistente con una mayor estabilidad para AIB1 en este tipo celular. De acuerdo con esta hipótesis, experimentos de pulso y caza con ^{35}S revelaron un mayor tiempo de vida media para AIB1 en células HeLa (aproximadamente 9 horas) que en células MCF-7 (poco más de 1 hora) (Fig. 12A). Resultados similares se obtuvieron utilizando las líneas celulares H1299 y A549. La vida media de AIB1 se prolongaba en las líneas celulares que mostraban mayor tinción citosólica para este coactivador (Fig. 12A).

Estos resultados apuntaban a una degradación nuclear de AIB1. Para confirmarla, se trataron células MCF-7 con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis *de novo* de proteínas. El fraccionamiento subcelular de estas células después de 4 horas en presencia de este inhibidor mostró que sólo el contenido nuclear de AIB1 disminuía (Fig. 13A). Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que en células no mitóticas AIB1 se localizaba en el citosol (Avivar et al., 2006), por tanto, en un experimento

complementario decidimos revertir la distribución subcelular de AIB1 en la línea MCF-7. Para ello, células MCF-7 se trataron con ciclosporina A, un inhibidor de la fosfatasa 2B o calcineurina. En estas condiciones, las células salen del ciclo celular a G0, hecho que pudimos constatar por la pérdida de la expresión de ciclina A (Fig. 13B, panel inferior). En las células así tratadas aumentó tanto el contenido de AIB1 en el citosol (Fig. 13B, panel superior) como su estabilidad (Fig. 13C). Todos estos resultados demuestran que la distribución subcelular es un determinante crítico en la estabilidad de AIB1. Además, estas diferencias de estabilidad junto con las diferencias de localización apoyan fuertemente que AIB1 se esté degradando en el núcleo.

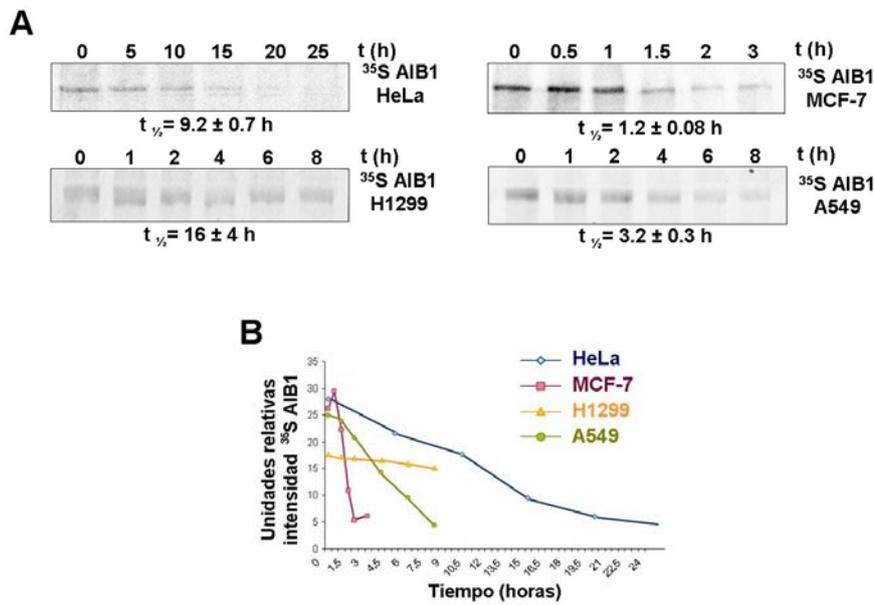


Figura 12: La localización citosólica de AIB1 correlaciona con su mayor estabilidad. **A)** Experimentos de pulso y caza realizados para determinar la vida media de AIB1. Cultivos celulares de HeLa, MCF-7, H1299 y A549 fueron incubados con [³⁵S]-cisteína. Las células se lisaron a los tiempos indicados, y los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-AIB1. Los inmunocomplejos precipitados para AIB1 fueron resueltos por SDS-PAGE, y se cuantificó la proteína de AIB1 marcada radiactivamente. **B)** Representación gráfica de la cuantificación de la marca radiactiva para AIB1.

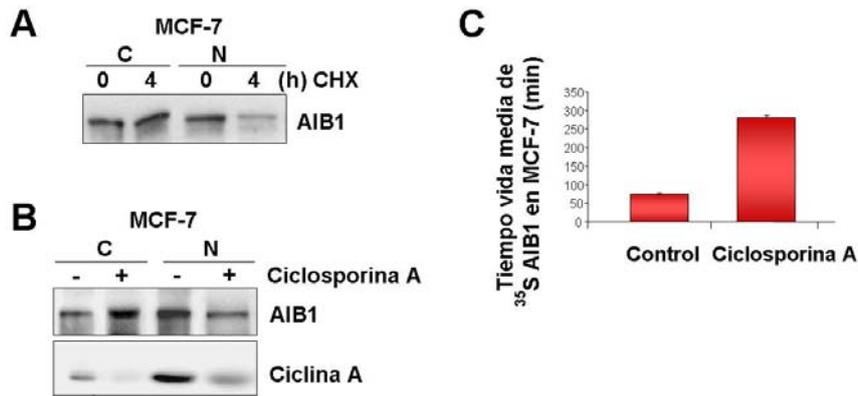


Figura 13: AIB1 se degrada en el núcleo. A) Fraccionamiento subcelular citosol (C)/núcleo (N) y “western blot” para AIB1 de células MCF-7 tratadas con 10 µg/ml de cicloheximida (CHX) durante 4 horas. **B)** Fraccionamiento subcelular citosol/núcleo de células MCF-7 tratadas con ciclosporina A 5 µM durante 16 horas y análisis de la expresión de AIB1 y ciclina A con anticuerpos específicos. La pérdida de la expresión de ciclina A confirmó el bloqueo en ciclo celular mediado por la ciclosporina A. **C)** Gráfica representativa de la vida media de ³⁵S-AIB1 de células MCF-7 tratadas durante 16 horas con ciclosporina A. Los datos se presentan como media ± SE de tres cuantificaciones independientes.

1.2. La actividad del receptor de estrógenos influye en la estabilidad de AIB1

Los niveles celulares de AIB1 están influenciados por la actividad del receptor de estrógenos, ya que el tratamiento de células MCF-7 con estradiol resultó en una vida media más corta para este coactivador. Por el contrario, la exposición a los antagonistas del receptor de estrógenos, tamoxifeno e ICI 182780, extendió la estabilidad de AIB1 (Fig. 14A). El fraccionamiento subcelular y posterior “western blot” reveló la acumulación de AIB1 en el citosol cuando se trataba con antagonistas del receptor de estrógenos, y la disminución cuando se estimulaba con estradiol (Fig. 14B). De nuevo, la localización citosólica de AIB1 incrementó su estabilidad.

Estos resultados sugieren que la actividad del receptor de estrógenos influye en la estabilidad de AIB1 al afectar a su localización subcelular.

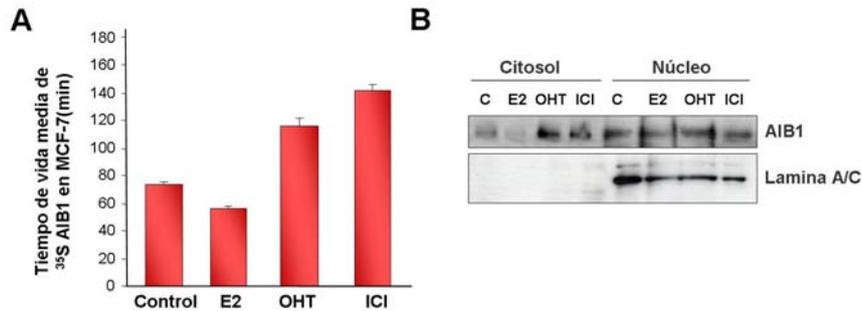


Figura 14: Regulación de la estabilidad de AIB1 por la actividad del receptor de estrógenos. **A)** Cultivos de células MCF-7 fueron tratados con 17- β -estradiol 10 nM (E2), tamoxifeno 10 μ M (OHT) e ICI182780 1 μ M (ICI) tras un pulso inicial de [³⁵S]-cisteína para después ser lisados e inmunoprecipitados con anticuerpos anti-AIB1 a intervalos de 30 min. En la gráfica se muestra la media \pm SE de tres cuantificaciones independientes. **B)** Análisis por "western blot" de los niveles de expresión de AIB1 tras el fraccionamiento subcelular citosol/núcleo de células MCF-7 tratadas con 17- β -estradiol 10 nM (E2), tamoxifeno 10 μ M (OHT) e ICI182780 1 μ M durante 4 horas. Anticuerpos anti-Lamina A/C se utilizaron como marcador nuclear para confirmar la ausencia de contaminación cruzada en las fracciones.

1.3. AIB1 es degradado en el núcleo por el proteasoma

Con objeto de utilizar otra aproximación para confirmar que la proteína AIB1 era degradada en el núcleo, se empleó leptomicina B, un inhibidor específico del factor de exportación nuclear CRM1. Los niveles de AIB1 en células MCF-7 disminuyeron considerablemente en presencia de este inhibidor tanto en medio completo como en ausencia de suero (Fig. 15A), resultados que apoyan la degradación nuclear. Por otra parte, se evaluó la actividad transcripcional intrínseca de este coactivador mediante ensayos de luciferasa. Como se esperaba, la actividad transcripcional de

AIB1 fue significativamente menor en presencia de leptomicina B (Fig. 15B), sugiriendo que parte de esta proteína se había degradado.

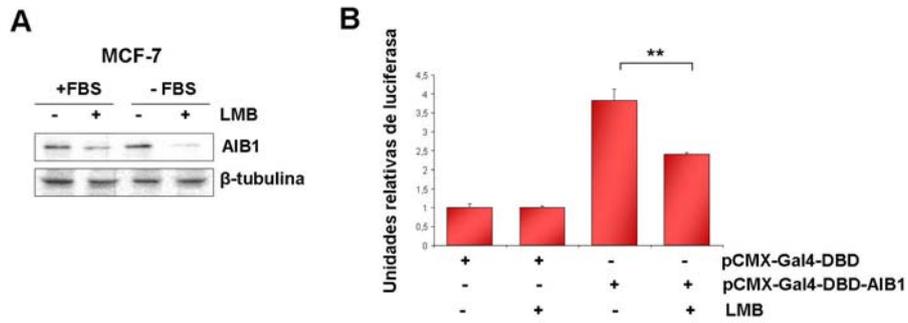


Figura 15: Disminución de los niveles de AIB1 en presencia de un inhibidor de la exportación nuclear. **A)** Células MCF-7 crecidas con suero (+FBS) o sin suero durante 24 horas (-FBS) fueron tratadas durante las últimas 26 horas con 10 ng/ml de leptomicina B (LMB). La expresión de β-tubulina sirvió como control de la carga. **B)** Células MCF-7 se cotransfectaron con la secuencia completa de AIB1 fusionada al dominio de unión a DNA de la proteína Gal4 (Gal4-DBD) y con el gen de la luciferasa bajo el control del elemento de respuesta a Gal4. Tras 30 horas desde la transfección, las células se trataron con 10 ng/ml de leptomicina B (LMB) durante 17 horas más. Los valores de los triplicados, normalizados a sus respectivos controles transfectados con plásmido vacío, se presentan en forma de media ± SE. (** p<0,01 en un test de Student).

También se analizó el efecto de la inhibición de la exportación nuclear con leptomicina B y/o la inhibición del proteasoma con MG132 en células HeLa y MCF-7. El tratamiento con leptomicina B causó un descenso en los niveles de AIB1 en ambas líneas celulares (Fig. 16A). El efecto fue más notable en células MCF-7, probablemente debido a que en estas células la vida media de AIB1 es menor. Los estudios con inmunofluorescencias apoyaron la mayor localización nuclear de AIB1 tras el tratamiento con leptomicina B (Fig. 16B). Como se esperaba, el tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132 resultó en un aumento de los niveles de AIB1, incluso en presencia de leptomicina B (Fig. 16A y

16B). Estos resultados sugieren que AIB1 se degrada en el núcleo por el proteasoma, y que la degradación en células HeLa es menor debido a una exportación nuclear de AIB1 mucho más activa.

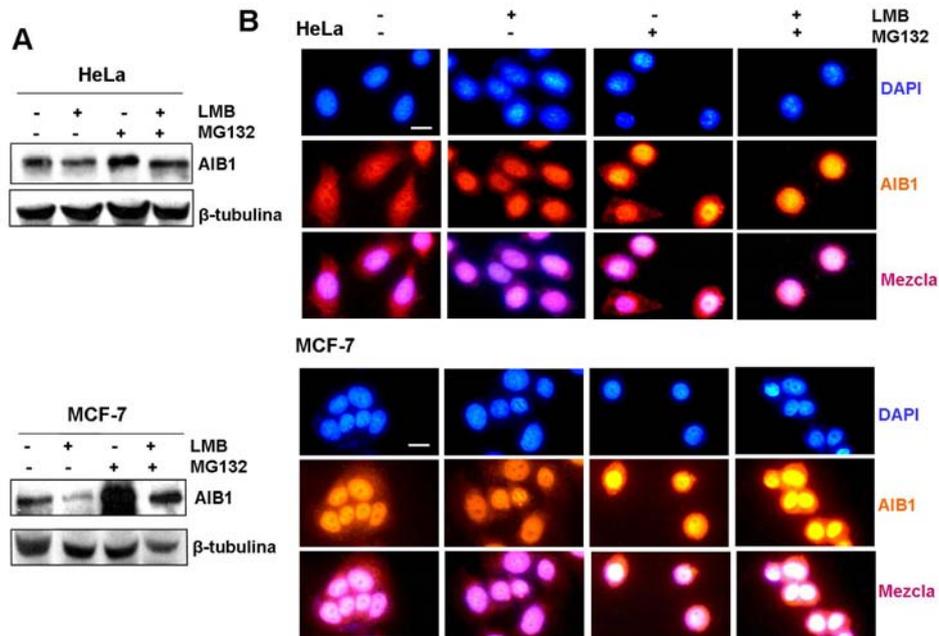


Figura 16: La degradación de AIB1 es mediada por el proteasoma en el núcleo. **A)** Cultivos celulares de HeLa y MCF-7 fueron tratados con 10 ng/ml de leptomicina B (LMB), 20 μ M de MG132 o los dos inhibidores conjuntamente durante 17 horas. Posteriormente, los lisados se analizaron por "western blot" con anticuerpos anti-AIB1. Anticuerpos anti- β -tubulina se utilizaron como control de la proteína cargada. **B)** Cultivos de células HeLa y MCF-7 tratados en las mismas condiciones que en A) fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en azul y con anticuerpos anti-AIB1 en rojo (Cy3). Línea, 10 μ m.

1.4. La degradación nuclear de AIB1 requiere su ubiquitinación

Durante el curso de nuestro estudio, se describió que parte de la degradación proteasomal de AIB1 ocurre de manera independiente de energía y ubiquitina (Li et al., 2006). Nosotros quisimos estudiar si la

ubiquitinación tenía algún papel en la degradación de este coactivador. Adicionalmente, quisimos ver si existían diferencias que pudieran explicar la distinta estabilidad de AIB1 en células HeLa y MCF-7. Para este propósito se realizaron transfecciones transitorias de ubiquitina fusionada al epítipo de hemaglutinina del germen de trigo (HA). Los inmunocomplejos precipitados con anticuerpos anti-HA revelaron una banda de mayor peso molecular que el esperado para AIB1 y de mayor intensidad cuando los cultivos se trataban con el inhibidor del proteasoma MG132 (Fig. 17, panel superior).

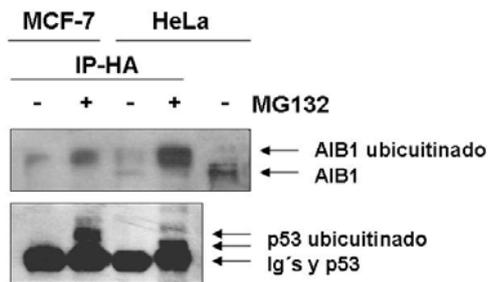


Figura 17: AIB1 se ubiquitina tanto en células HeLa como en MCF-7. Cultivos celulares de MCF-7 y HeLa fueron transfectados con HA-ubiquitina y tratados (+) o no (-) con MG132 20 μ M durante 17 horas. Los inmunocomplejos precipitados de HA-ubiquitina fueron resueltos por SDS-PAGE, y la proteína de AIB1 marcada con HA-ubiquitina fue analizada por "western blot" con anticuerpos policlonales anti-AIB1. Anticuerpos anti-p53 fueron utilizados como control positivo, debido a la conocida degradación de esta proteína por el sistema ubiquitina-proteasoma.

Los resultados anteriores sugieren que AIB1 está siendo ubiquitinado en ambas líneas celulares y, por tanto, que la mayor estabilidad de AIB1 en células HeLa no es debida a una disminución de la ubiquitinación en esta línea celular.

El estudio de la poliubiquitinación de una proteína es complicado y, en algunos casos se llega a conclusiones erróneas al no observar el típico bandeo de poliubiquitinas. El porcentaje de proteínas ubiquitinadas en el

interior celular es muy bajo debido a que éstas son rápidamente degradadas por el proteasoma y a la existencia de enzimas desubicitinasas (DUBs) con una fuerte actividad. La ubiquitinación es un proceso dinámico que es revertido por la acción de las enzimas desubicitinasas. La reversión de esta modificación es importante para reciclar ubiquitinas, para estabilizar proteínas, contrarrestando su poliubiquitinación, y para promover otras funciones de la modificación por ubiquitina diferentes a la proteólisis (Kaiser and Huang, 2005).

La línea celular HeLa 6xHis-ubiquitina corresponde a células HeLa que expresan de manera estable ubiquitina unida a una cola de 6 histidinas. Esta ubiquitina permite la purificación de proteínas ubiquitinadas en base a la afinidad de las histidinas por los iones de níquel (cromatografía de Ni²⁺). La purificación por níquel es compatible con condiciones desnaturizantes de lisis, lo que permite impedir la actividad desubicitinasa y enriquecer la muestra en proteínas ubiquitinadas. El estudio de la ubiquitinación de AIB1 en esta línea celular reveló la presencia de al menos tres bandas de mayor peso molecular del esperado, sugiriendo que este coactivador era poliubiquitinado (Fig. 18).

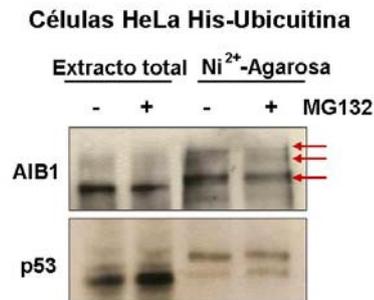


Figura 18: Poliubiquitinación de AIB1. Células HeLa expresando establemente 6xHis-ubiquitina se lisaron en condiciones desnaturizantes, y las proteínas ubiquitinadas se purificaron en una resina de níquel (Ni²⁺-Agarosa). Las muestras indicadas fueron previamente tratadas con MG132 20 μM durante 17 horas. El posterior análisis por "western blot" con anticuerpos anti-AIB1 y anti-p53, como control positivo del ensayo, mostró el típico bandeo de poliubiquitinas para ambas proteínas. Las flechas en rojo señalan posibles formas ubiquitinadas de AIB1.

Con objeto de estudiar la degradación de AIB1 dependiente de poliubiquitinación, decidimos utilizar la línea celular E36-ts20. Esta línea celular contiene una mutación termosensible en la enzima activante de ubiquitina E1 (ver Fig. 9 de la introducción). Cuando las células se crecen a temperatura no permisiva de 39°C, E1 no es funcional. A esta temperatura cualquier proteína que se degrada por el sistema ubiquitina-proteasoma se acumula. En concordancia con esto, al crecer las células E36-ts20 a 39°C se produjo la acumulación de AIB1, mientras que no se observó acumulación cuando estas células se crecían a la temperatura permisiva de 32°C (Fig. 19A). Además, en tinción de inmunofluorescencia se observó que AIB1 se acumulaba en el núcleo (Fig. 19C). Sin embargo, la misma línea celular expresando establemente una E1 funcional (E36-ts20 + E1) crecida a 39°C mostró niveles de AIB1 similares a los observados en las células crecidas a 32°C (Fig. 19A y 19C). Este último resultado constituye un importante control para afirmar que la acumulación de AIB1 observada a 39°C está directamente relacionada con el proceso de la ubiquitinación, y no es debida a ningún efecto indirecto de la temperatura en la línea termosensible. Por otra parte, el fraccionamiento subcelular y posterior "western blot" de las células termosensibles mostró que sólo la fracción nuclear de AIB1 estaba afectada por la deficiencia de E1 (Fig. 19B), apoyando nuevamente la hipótesis de la degradación nuclear de este coactivador. En conjunto, estos resultados indican que la degradación de AIB1 ocurre principalmente a través del sistema ubiquitina-proteasoma en el interior del núcleo.

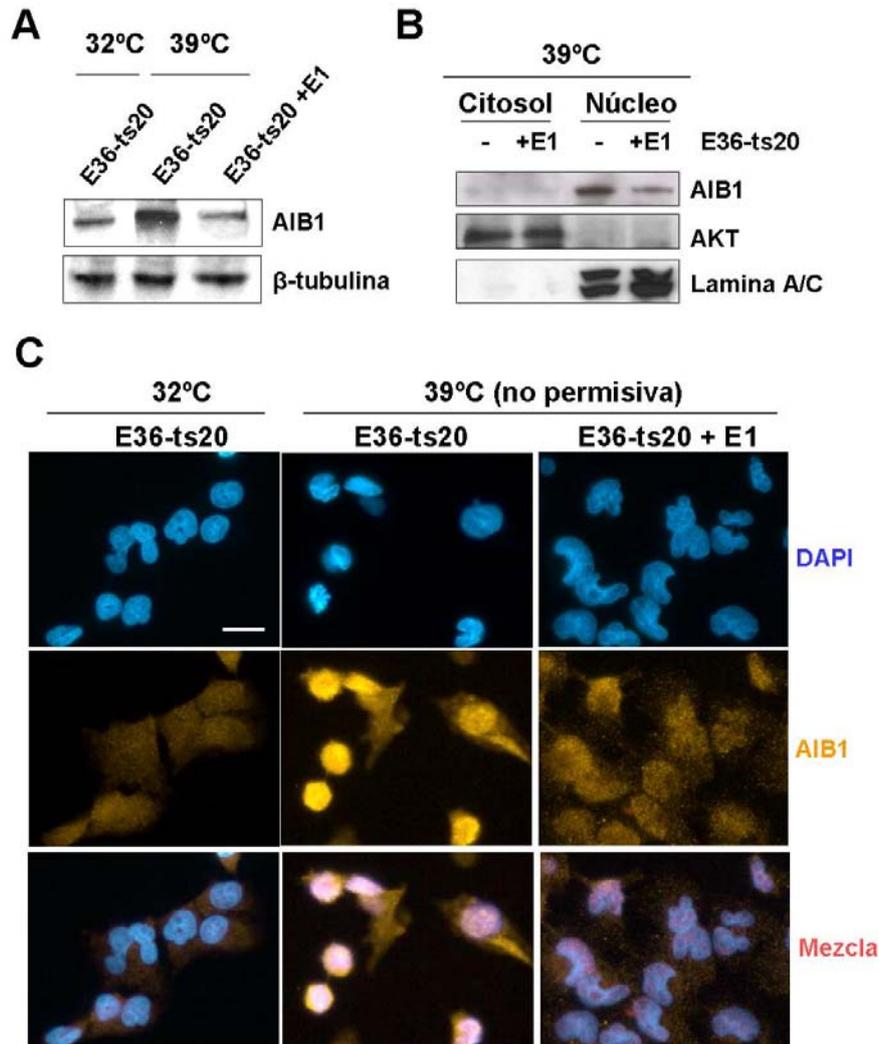


Figura 19: El sistema ubiquitina-proteasoma degrada a AIB1 en el núcleo de las células E36-ts20. A) La línea termosensible E36-ts20 fue criada tanto a 32°C (temperatura permisiva) como a 39°C (temperatura no permisiva). E36-ts20 + E1, células E36-ts20 expresando establemente la enzima activadora de ubiquitina E1 funcional. Los niveles de AIB1 se analizaron por “western blot”, utilizando anticuerpos anti-β-tubulina como control de carga. **B)** El fraccionamiento subcelular de células sin actividad E1 (-E1) o con E1 funcional (+E1) reveló la acumulación de AIB1 en el núcleo en ausencia de E1, y su degradación en presencia de E1. Anticuerpos contra Lamina A/C y AKT fueron utilizados para evaluar la contaminación cruzada de las fracciones. **C)** La inmunofluorescencia de células E36-ts20 con anticuerpos para AIB1 en rojo (Cy3) y DAPI en azul confirmó la acumulación de AIB1 en el núcleo de las células E36-ts20 crecidas a temperatura no permisiva (39°C). Línea, 10 μm.

1.5. En busca de la ubiquitina ligasa de AIB1

1.5.1. Los complejos SCF y APC

En inmunofluorescencias para AIB1 de células MCF-7 se observó que las células mitóticas mostraban una menor tinción para este coactivador (Fig. 20A). Una posible interpretación de este resultado es que AIB1 se estuviera degradando en mitosis. Para comprobarlo utilizamos ovocitos de *Xenopus laevis* bloqueados en las fases G2 y M del ciclo celular. Inmunocomplejos de AIB1 precipitados de lisados de células MCF-7 fueron incubados junto con lisados de ovocitos en G2, así como con lisados de ovocitos en M. Se observó que los niveles de AIB1 disminuían tras una hora de incubación con lisados de ovocitos M (Fig. 20C). Además, la presencia del inhibidor del proteasoma MG132 prevenía este descenso, sugiriendo que este coactivador estaba siendo degradado durante mitosis por el proteasoma.

Estos resultados iniciales nos hicieron considerar a los complejos SCF (proteínas Skp1, Cul1 y F-box) y el complejo promotor de la anafase (APC) o ciclosoma como posibles ubiquitina ligasas de AIB1, al ser los dos principales complejos encargados de regular la proteólisis de componentes de la maquinaria del ciclo celular. Mediante ensayos de coimmunoprecipitación, quisimos ver si AIB1 interaccionaba con Skp1. Sin embargo, los inmunocomplejos de AIB1 precipitados de células MCF-7 crecidas en condiciones normales, bloqueadas en G2 con etopósido y bloqueadas en mitosis con nocodazol revelaron que este coactivador no coimmunoprecipitaba con Skp1 en ninguno de los casos (Fig. 21). Aunque este resultado negativo no era prueba suficiente para afirmar que SCF no era la ubiquitina ligasa de AIB1, decidimos centrarnos en el complejo APC, implicado en la degradación de proteínas durante la mitosis. Más adelante se hablará sobre la naturaleza de la doble banda observada para AIB1 en mitosis (Fig. 21).

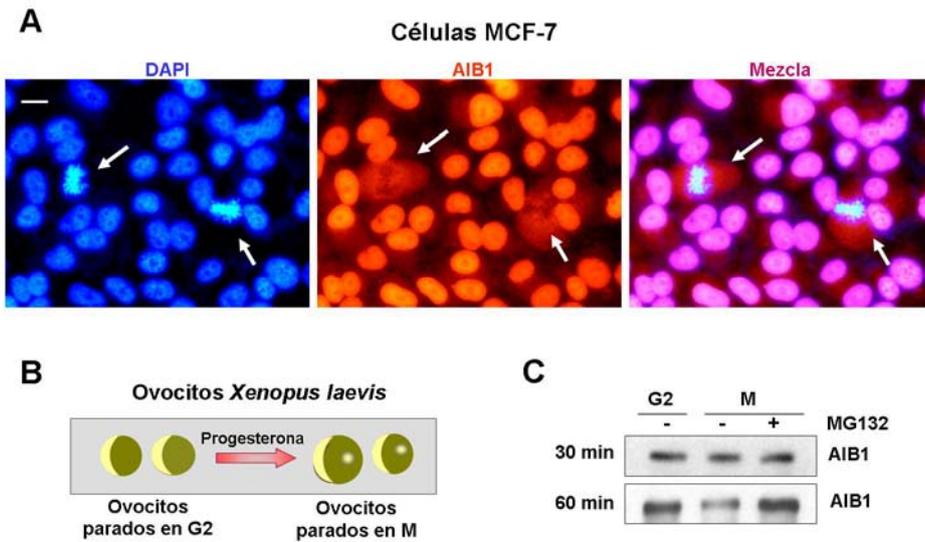


Figura 20: AIB1 y su posible degradación en Mitosis. **A)** Células MCF-7 crecidas en condiciones normales y teñidas con DAPI en azul y con anticuerpos anti-AIB1 en rojo (Cy3). Las flechas muestran células mitóticas. Línea, 10 μ m. **B)** Esquema representativo de la maduración inducida por progesterona desde la profase de la primera meiosis (G2) hasta la metafase de la segunda meiosis (M) en ovocitos de *Xenopus laevis* **C)** Proteína de AIB1 inmunoprecipitada de células MCF-7 e incubada durante los tiempos indicados con lisados de ovocitos G2 y M en presencia o ausencia del inhibidor del proteosoma MG132 20 μ M, y análisis de ésta por "western blot".

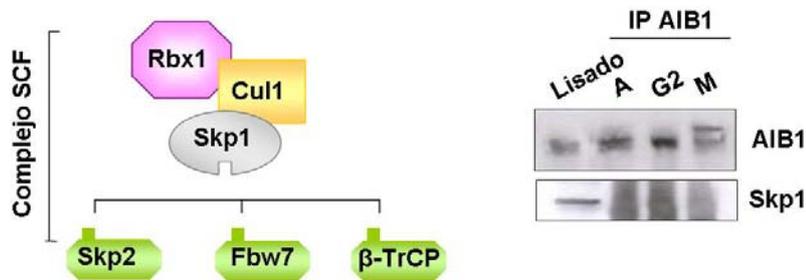


Figura 21: AIB1 no coimmunoprecipita con Skp1. Esquema representativo del complejo SCF y análisis por "western blot" de los inmunocomplejos de AIB1 inmunoprecipitados de células MCF-7 crecidas asincrónicamente, bloqueadas en G2 con etoposido 10 μ M durante 24 horas y bloqueadas en mitosis con nocodazol 150 ng/ml durante 17 horas. Anticuerpos anti-Skp1 sugieren que no existe interacción entre AIB1 y el complejo SCF en nuestras condiciones experimentales.

Una diferencia clave entre los complejos SCF y APC es el modo de reconocimiento del sustrato. En la mayoría de los casos, los complejos SCF reconocen sustratos fosforilados, mientras que APC reconoce motivos en la secuencia primaria de los sustratos, como por ejemplo la caja de destrucción D-box, la caja KEN, etcétera. La presencia de dos motivos consenso D-box, RXXLXXXXN/D/E (donde R=arginina, L=leucina, N=asparagina, D=ácido aspártico, E=ácido glutámico y X=cualquier aminoácido) en la secuencia de AIB1 (Fig. 22A) apoyaba la decisión de optar por APC como ubiquitina ligasa de AIB1. Para estudiar la implicación de APC en la ubiquitinación de AIB1 se mutaron estas cajas de destrucción. En concreto, se obtuvieron las mutaciones R1027L, R1188L y la doble mutación R1027L/R1188L. Ensayos luciferasa en células COS-1 transfectadas con estos mutantes mostraron un incremento de la actividad transcripcional intrínseca de AIB1 en presencia del inhibidor del proteasoma MG132 en todos los casos (Fig. 22B). De acuerdo con este resultado, la transfección transitoria de la doble mutación en células COS-1 reveló un incremento de los niveles de AIB1 cuando las células eran tratadas con MG132 (Fig. 22C), sugiriendo que AIB1 estaba siendo regulado por el proteasoma, a pesar de tener los supuestos sitios de reconocimiento por APC mutados. Estas observaciones parecían indicar que la ubiquitinación y degradación de AIB1 no estaba mediada por APC.

Las inmunofluorescencias revelaban una menor intensidad de AIB1 en células mitóticas y los resultados con los ovocitos indicaban que AIB1 se estaba degradando en mitosis. Sin embargo, la inmunofluorescencia no es considerada como un método cuantitativo y en los ensayos con ovocitos e inmunoprecipitados de AIB1 la coimmunoprecipitación de otras proteínas podría desencadenar en la degradación indirecta de este coactivador. Para confirmar la degradación de AIB1 en mitosis se utilizó, como aproximación experimental alternativa, el sistema de transcripción y traducción *in vitro* a partir de reticulocitos de conejo. Se sintetizó proteína AIB1 marcada con ³⁵S

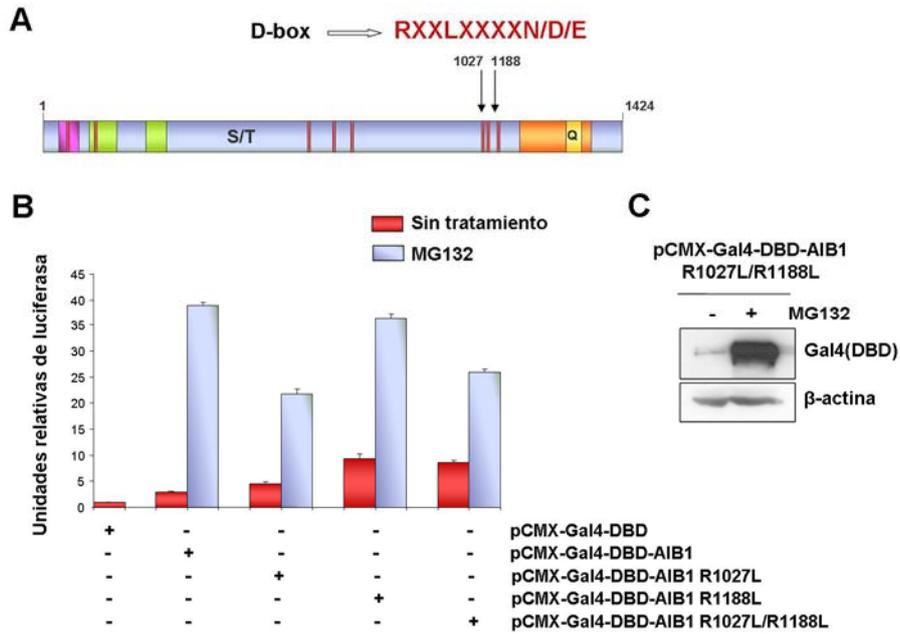


Figura 22: Mutaciones en los motivos D-box no influyen en la degradación de AIB1 por el proteasoma. **A)** Localización de los motivos de destrucción D-box en la secuencia de AIB1. **B)** Ensayos luciferasa en células COS-1 cotransfectadas con plásmidos que contienen el gen de AIB1 fusionado al dominio de unión a DNA de Gal4 (Gal4-DBD) y el gen de luciferasa bajo el control del elemento de respuesta a Gal4. 30 horas después de la transfección las células se trataron, en los casos indicados, con MG132 20 μ M durante 17 horas. Los datos se normalizaron al control transfectado con el plásmido vacío y se presentan como media \pm SE de triplicados. **C)** Análisis por “western blot” con anticuerpos anti-Gal4(DBD) de lisados de células COS-1 transfectadas con la construcción que contiene la doble mutación (pcmx-Gal4-DBD-AIB1 R1027L/R1188L). Las células se trataron durante las últimas 17 horas con MG132 20 μ M, según se indica.

y se incubó con lisados de ovocitos bloqueados en G2 o en M. Los resultados obtenidos mostraron que la proteína de AIB1 no era degradada durante mitosis (Fig. 23A). Una posible interpretación es que esta proteína necesitara ser marcada previamente al paso por mitosis para poder ser degradada. Para estudiar esta hipótesis, se preincubó la proteína sintetizada en lisados de ovocitos bloqueados en G2 y, después, se añadió

a la mezcla el lisado de ovocitos en M. En estas condiciones tampoco se observó una disminución de los niveles de ^{35}S -AIB1 (Fig. 23A). Estos resultados apoyan que AIB1 no se degrada en mitosis, confirmando los resultados negativos para APC como ubiquitina ligasa de AIB1.

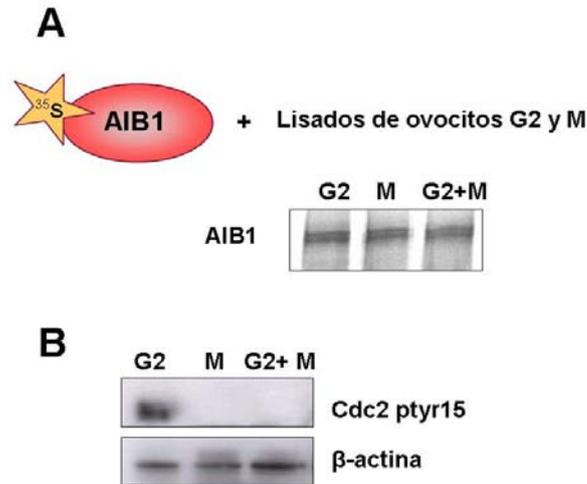


Figura 23: AIB1 no se degrada durante mitosis. A) Expresión de AIB1 a partir del sistema de traducción *in vitro* de reticulocitos de conejo en presencia de [^{35}S]-metionina. La proteína marcada radiactivamente se incubó con lisados de ovocitos bloqueados en la profase de la primera meiosis (G2), o bloqueados en la metafase de la segunda meiosis (M) durante 2 horas a temperatura ambiente. La incubación doble (G2 + M) consistió en una previa incubación de 1 hora en lisado de ovocitos G2 y una incubación de una hora más en presencia de lisado de ovocitos M. Las muestras se resolvieron por SDS-PAGE, y el gel se secó y se expuso a película autorradiográfica. **B)** Comprobación del bloqueo de los ovocitos en G2 y en M a partir de anticuerpos anti-Cdc2 fosfotirosina 15. La ausencia de esta fosforilación es indicativa de la activación de Cdc2.

1.5.2. La ubiquitina ligasa ZNRF

Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio del estudio de la expresión génica en ratones transgénicos para AIB1 revelaron la represión de la expresión de la ubiquitina ligasa ZNRF. Este resultado nos animó a

profundizar en su posible relación con AIB1. Para estudiarla, clonamos el gen de ZNRF etiquetado con el epítipo AU5 en el plásmido pCEFL. Se transfectaron transitoriamente células MCF-7 con el plásmido pCEFL-AU5-ZNRF y se trataron con el inhibidor MG132. Los inmunocomplejos precipitados de los lisados no mostraron interacción de AU5-ZNRF con AIB1 en nuestras condiciones (Fig. 24).

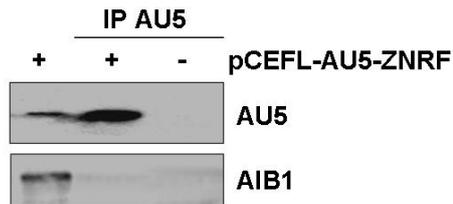


Figura 24: AIB1 no coimmunoprecipita con ZNRF. Análisis por “western blot” de los inmunocomplejos precipitados frente a AU5 de lisados de células MCF-7, previamente transfectadas con pCEFL-AU5-ZNRF y tratadas con el inhibidor del proteasoma MG132 20 μ M durante 17 horas.

1.5.3. Proteínas que interaccionan con AIB1: experimentos de “cross-linking” y “Far Western Blot”

Debido a la gran variedad de enzimas con actividad ubiquitina ligasa presente en las células (alrededor de 600), decidimos abordar nuestra búsqueda utilizando otras estrategias. El estudio de interacciones proteína-proteína mediante el uso de técnicas de inmunoafinidad con anticuerpos específicos está limitado a complejos estables. Las interacciones proteína-proteína débiles o transitorias generalmente escapan al análisis por estas técnicas. Sin embargo, este problema puede evitarse mediante el uso de “cross-linking” con formaldehído para fijar uniones entre proteínas a través de la formación de puentes de metileno entre grupos reactivos. Con el objetivo de estabilizar las interacciones entre AIB1 y otras proteínas, tales como ubiquitina ligasas, se intentó poner a punto esta técnica en el laboratorio. Para ello, se trataron células MCF-7 con formaldehído, se

purificaron los complejos AIB1 mediante inmunoprecipitación, y se revirtieron las uniones por calor. Sin embargo, en nuestras condiciones, no fuimos capaces de revertir estas uniones, como muestra el análisis por “western blot” (Fig. 25).

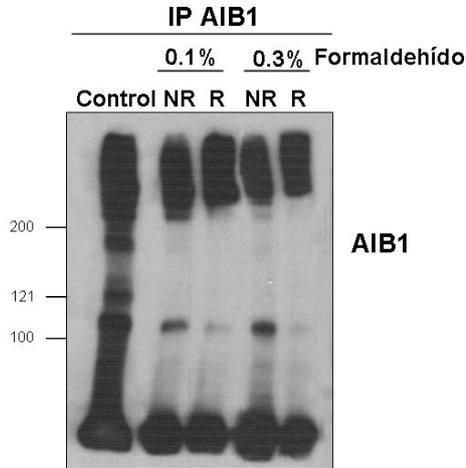


Figura 25: Técnicas de “cross-linking” *in vivo*. Cultivos de células MCF-7 se trataron durante 10 minutos con 0.1% o 0.3% de formaldehído en PBS para después ser lisados e inmunoprecipitados con anticuerpos anti-AIB1. Una vez inmunoprecipitados, los complejos se revirtieron por calor (65°C) en presencia de NaCl 0.3M durante 4 horas (R), o permanecieron sin revertir (NR). El posterior análisis por “western blot” mostró que la reversión no había funcionado con éxito en nuestras condiciones.

Otra técnica que también se llevó a cabo para el estudio de interacciones proteína-proteína fue el “Far Western Blot” (FWB). Las proteínas procedentes de células MCF-7 crecidas en condiciones normales se resolvieron en una electroforesis bidimensional y se transfirieron a membrana. La membrana se incubó con proteína de AIB1 expresada y purificada de células Sf9 previamente infectadas con baculovirus recombinantes para AIB1. El revelado de la membrana mostró una serie de puntos (Fig. 26B), de los que se identificaron diversas proteínas, la mayoría implicadas en metabolismo (Fig. 26C). Ninguna ubiquitina ligasa fue identificada. Como control positivo, otra membrana se incubó en presencia de 10 nM de 17- β -estradiol con objeto de favorecer la interacción con ER α . Desafortunadamente, ER α tampoco fue identificado, lo que nos hizo cuestionar la validez de las otras señales observadas.

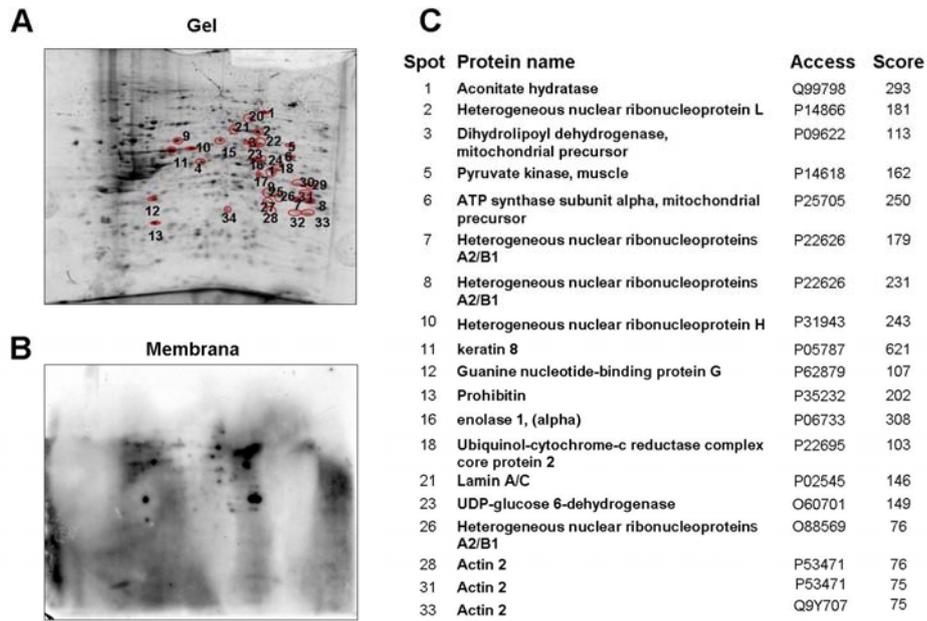


Figura 26: Búsqueda de proteínas de interacción con AIB1 por FWB. **A)** El lisado de un cultivo celular de MCF-7 fue resuelto por electroforesis bidimensional, y el gel se tiñó con SYPRO **B)** En paralelo se transfirió un gel bidimensional a membrana y ésta se incubó con una muestra de AIB1 purificada de células de insecto Sf9 infectadas con baculovirus. El análisis por “western blot” de la membrana reveló una serie de puntos. **C)** Los puntos de mejor coincidencia entre el gel y la membrana fueron escindidos del gel, procesados e identificados por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas en tándem (LC/MS/MS). Los números no mostrados dieron identificaciones negativas.

1.6. Diferencias en la localización subcelular de AIB1 en HeLa y MCF-7: niveles de SIP e importina $\alpha 3$

Las diferencias en la localización y estabilidad de AIB1 entre células HeLa y MCF-7 nos alentaron a estudiar los posibles mecanismos implicados en ellas. Un estudio reciente había demostrado que SIP (una nueva proteína que contiene el motivo ankirina de interacción proteína-

proteína) reclutaba y retenía en el citosol proteínas de la familia SRC, liberándolas de la interacción al fosforilarse por la Caseína quinasa II (Zhang et al., 2007). Estos datos nos sugerían que diferencias en la expresión de SIP podrían explicar las diferencias encontradas en la localización subcelular de AIB1. Sin embargo, el análisis por RT-PCR a tiempo real no detectó diferencias significativas en la expresión de esta proteína entre HeLa y MCF-7 (Fig. 27A).

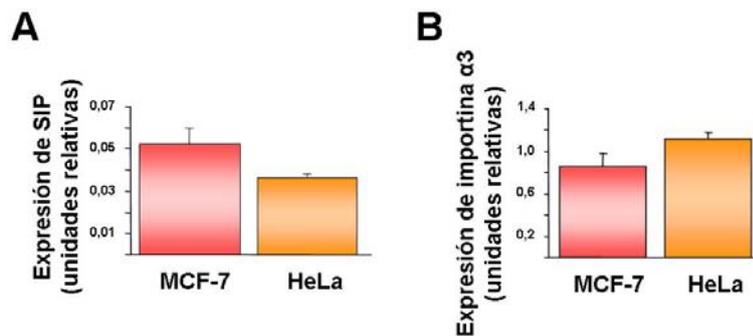


Figura 27: Análisis de la expresión de SIP e importina $\alpha 3$ en células MCF-7 y HeLa. El RNA purificado de cultivos celulares de MCF-7 y HeLa se utilizó para analizar la expresión de la proteína SIP **A**) y de importina $\alpha 3$ **B**) por RT-PCR en tiempo real. Las gráficas muestran medias y errores estándar de triplicados. La significatividad, analizada por el test de Student, fue mayor a 0,05 en ambos casos.

El transporte de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma a través del poro nuclear es un proceso esencial en las células eucariotas. Este proceso consume una cantidad considerable de energía y es mediado por importinas y exportinas (Weis, 2003). El heterodímero importina α/β constituye una vía importante en la importación de proteínas al núcleo, siendo la importina $\alpha 3$ la encargada del transporte de AIB1 (Yeung et al., 2006). Por tanto, variaciones en la expresión de importina $\alpha 3$ podrían dar lugar a cambios en la localización subcelular de AIB1. Para evaluar esta

hipótesis hemos medido los niveles de RNA mensajero de esta importina. Los resultados nos revelan que no hay diferencias significativas entre las dos líneas celulares estudiadas (Fig. 27B).

1.7. Señalización por AKT y estabilidad de AIB1

Se ha demostrado que AIB1 es fosforilado por el complejo IKK en respuesta al factor de necrosis tumoral α , resultando en una mayor actividad transcripcional (Wu et al., 2002). Dado que IKK es también una diana para AKT, podría ocurrir que alteraciones en la señalización por AKT fueran responsables de las diferencias en la estabilidad de AIB1 encontradas en HeLa y MCF-7. Como cabía esperar, la eliminación del suero en cultivos de células HeLa redujo los niveles de AKT fosforilado (Fig. 28A). Esta reducción coincidió con una disminución de los niveles de AIB1. Para nuestra sorpresa, la depleción del suero en MCF-7 no produjo el mismo efecto. En estas células, los niveles de AKT fosforilado seguían siendo significativamente elevados tras la eliminación del suero (Fig. 28A), sugiriendo que AKT era más activo en esta línea celular. Por otra parte, la depleción de los estrógenos en cultivos de células MCF-7 redujo la proliferación y la expresión de la ciclina A (Fig. 28B); pero incluso en estas condiciones tan restrictivas, los niveles de AKT fosforilado permanecían mucho más elevados que en las células HeLa no proliferantes (Fig. 28B). Es importante destacar que tanto los niveles de AKT total como los niveles de AKT fosforilado fueron mayores en células MCF-7 que en células HeLa, y que la expresión de AIB1 aumentó moderadamente tanto por la eliminación del suero como por la depleción de los estrógenos en células MCF-7 (Fig. 28A y 28B). Por el contrario, la eliminación del suero redujo los niveles de AIB1 en células HeLa, coincidiendo con la disminución de los niveles de AKT fosforilado y de marcadores de proliferación (Fig. 28A y 28B). Resultados similares se obtuvieron en las líneas celulares H1299 y A549 (Fig. 28C). Estas observaciones revelan importantes diferencias en la

expresión y señalización por AKT entre células HeLa y MCF-7, y sugieren que esta vía podría estar implicada en la estabilidad de AIB1.

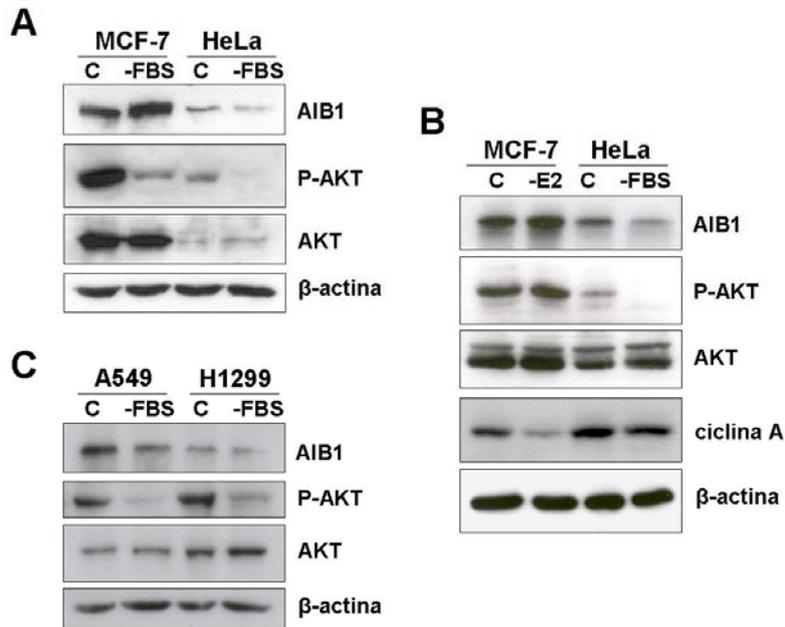


Figura 28: Diferencias en la señalización por AKT en MCF-7 y HeLa. A) Cultivos de células MCF-7 y HeLa fueron crecidos con suero (C) o sin suero durante 24 horas (-FBS). Lisados de estos cultivos fueron resueltos por SDS-PAGE y analizados por "western blot" con los anticuerpos indicados. **B)** Cultivos de células MCF-7 y HeLa crecidos en condiciones normales (C), crecidos durante una semana en ausencia de estrógenos (-E2) y crecidos sin suero durante 24 horas (-FBS). Las proteínas purificadas de estos cultivos fueron analizadas por "western blot" con los anticuerpos indicados. **C)** Análisis por "western blot" de la expresión de las proteínas indicadas en cultivos celulares de A549 y H1299 crecidos con suero (C) o sin suero (-FBS).

Para comprobar la hipótesis de que la señalización por AKT modulaba los niveles de AIB1 se utilizó LY294002, un potente y específico inhibidor de PI3K. El tratamiento de células MCF-7 con este inhibidor suprimió la fosforilación de AKT y produjo una disminución de los niveles de

AIB1 (Fig. 29A izquierda). El efecto era a nivel proteico, ya que los niveles de RNA de AIB1 permanecieron inalterados (Fig. 29B).

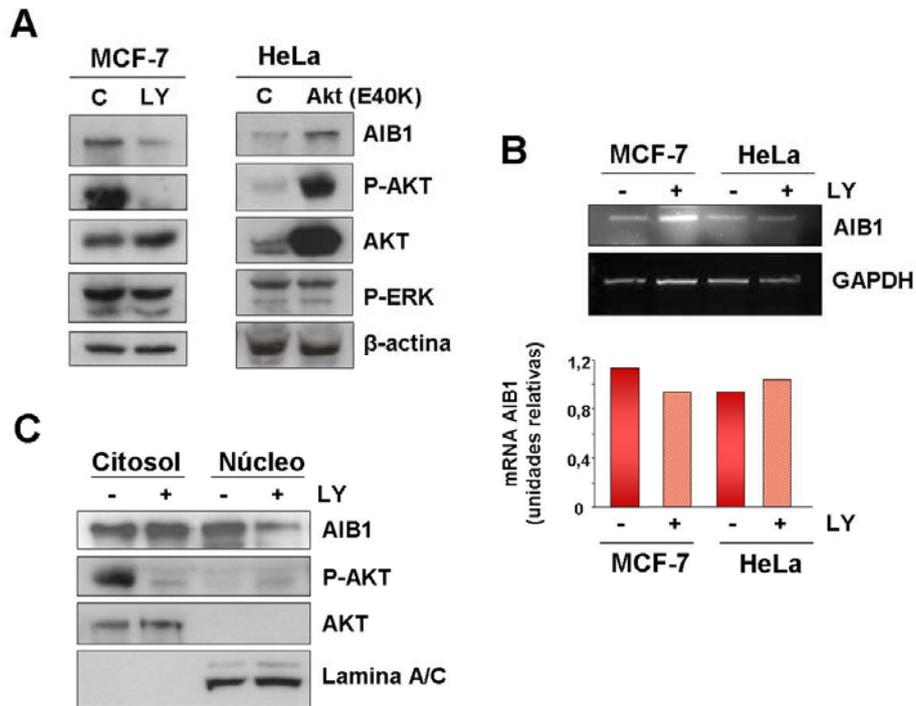


Figura 29: La señalización por PI3K/AKT modula los niveles de AIB1. A) Células proliferantes MCF-7 (izquierda) fueron tratadas con LY294002 50 μ M durante 6 horas (LY) o con el vehículo sólo (C). Los lisados celulares se analizaron por "western blot" utilizando los anticuerpos indicados. Células HeLa (derecha) se transfectaron con plásmido vacío (C) o con pCMV HA-Akt(E40K). Dos días después de la transfección, las células fueron lisadas y analizadas por "western blot" con los anticuerpos indicados. **B)** Análisis de la expresión de AIB1 endógeno por RT-PCR semicuantitativa en células MCF-7 y HeLa no tratadas o tratadas con LY294002 50 μ M durante 6 horas. La intensidad de las bandas fue cuantificada mediante el programa Quantity One (Bio-Rad) y normalizada a los niveles de GAPDH. **C)** "Western blot" de fracciones subcelulares de células MCF-7 tratadas con LY294002 50 μ M durante 6 horas (LY). Los niveles totales de AKT y Lamina A/C se utilizaron como control de carga, así como para demostrar la ausencia de contaminación cruzada entre fracciones.

El fraccionamiento subcelular de células MCF-7 reveló que el tratamiento con LY294002 reducía los niveles de AIB1 en el núcleo, pero no en el citosol (Fig. 29C). Por otra parte, la expresión ectópica de una forma soluble y constitutivamente activa de AKT (E40K) en células HeLa aumentó los niveles de AIB1 (Fig. 29A derecha). Estos resultados apoyan un papel para la señalización mediada por AKT en la estabilidad de AIB1. Debido al cruce de señales entre la vía PI3K/AKT y la vía RAS/MAPK (Moelling et al., 2002) y a que AIB1 es sustrato de la fosforilación por ERK (Font de Mora and Brown, 2000), también se analizaron los niveles de fosforilación de ERK. El tratamiento con LY294002 no modificó los niveles de fosforilación de esta quinasa (Fig. 29A), sugiriendo que los efectos de PI3K/AKT en la estabilidad de AIB1 eran independientes de la activación de ERK.

1.8. La actividad y la estabilidad de AIB1 se regulan de manera independiente de GSK3

Existen dos residuos en el extremo amino-terminal de AIB1, K16 y R18 (donde K=lisina y R=arginina) que son esenciales para la localización nuclear de este coactivador (Li et al., 2007a). Para evaluar el papel de AKT en la actividad de AIB1 independientemente de su transporte al núcleo, generamos fragmentos de AIB1 fusionados al dominio de unión a DNA de la proteína Gal4 que contiene su propia señal de localización nuclear (Silver et al., 1984). Una de las construcciones contenía la secuencia completa de AIB1 (aminoácidos del 1 al 1424) y la otra (aminoácidos del 556 al 1424) carecía del sitio de fosforilación por la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), quinasa cuya actividad es inhibida por AKT. Recientemente, se ha descrito que la activación y degradación de AIB1 puede ser regulada a través de fosforilación acoplada a ubiquitinación (Wu et al., 2007). La fosforilación por GSK3 en la serina 505 desencadena una respuesta bifásica en la que la monoubiquitinación de las lisinas 723 y 786 por SCF^{Fbw7} resulta en la

activación transcripcional de AIB1, y la subsiguiente poliubiquitinación de estos mismos residuos promueve la degradación de este coactivador. Puesto que una de las construcciones de AIB1 carecía de este sitio de fosforilación por GSK3, quisimos ver si podíamos reproducir estos resultados. El tratamiento con LY294002 inhibió, específicamente, la actividad transcripcional de AIB1 tanto en células HeLa como en MCF-7 (Fig. 30A). El fragmento no fosforilable por GSK3 también era regulado por PI3K/AKT (ver esquema y resultados en la Fig. 30A), sugiriendo la existencia de un mecanismo regulador diferente del descrito previamente para GSK3. Para correlacionar la actividad transcripcional con niveles proteicos de AIB1, se analizó la expresión del fragmento 556-1424 por “western blot”. Como se observa en la figura 30C, los niveles de este fragmento disminuían cuando las células eran tratadas con el inhibidor LY294002. Para demostrar si esta disminución era debida a un cambio en la estabilidad, se utilizó cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica. El análisis por “western blot” mostró que la estabilidad del fragmento se reducía significativamente tanto en HeLa como en MCF-7 cuando se inhibía PI3K/AKT (Fig. 30D). Una posible interpretación de estos resultados es que al tratarse de proteínas híbridas la regulación estuviera ocurriendo a través del dominio Gal4-DBD. Para salir de dudas, decidimos analizar la estabilidad del AIB1 endógeno en células MCF-7 y HeLa utilizando esta vez el inhibidor específico de AKT, triciribina (AKT I V). Nuevamente, obtuvimos resultados similares que demostraban la pérdida de estabilidad de la proteína AIB1 al bloquear la vía de señalización PI3K/AKT (Fig. 30E). Todas estas observaciones demuestran que la vía PI3K/AKT es importante para conferir estabilidad a AIB1 de manera independiente del mecanismo descrito para GSK3.

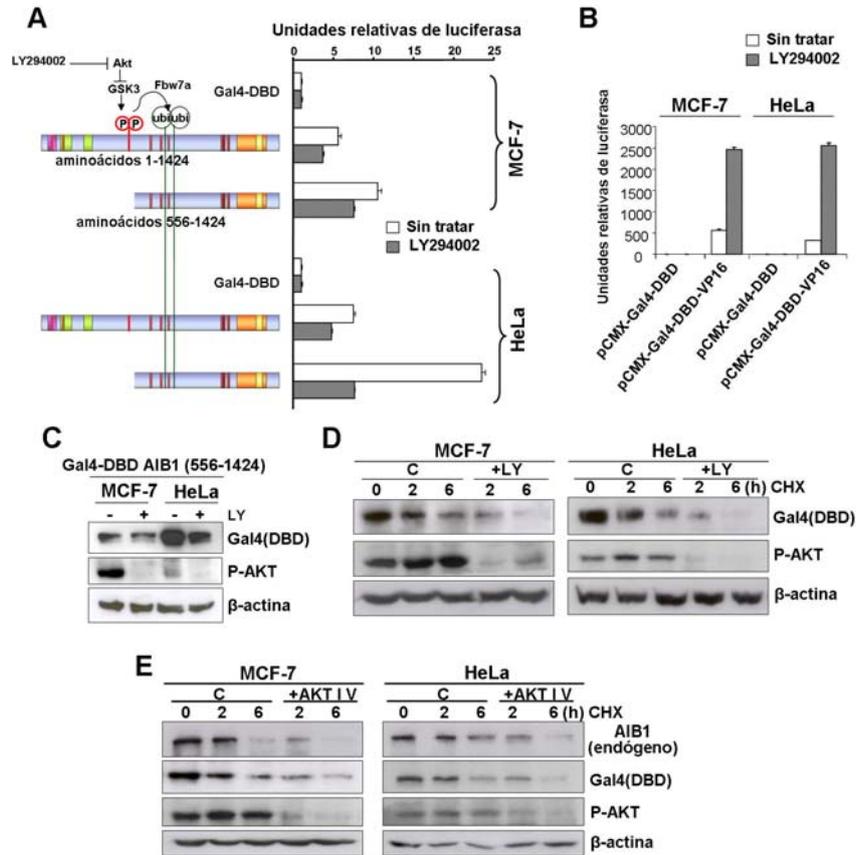


Figura 30: La señalización por PI3K/AKT estabiliza a AIB1 independientemente de GSK3. **A)** Células MCF-7 y HeLa se transfetaron con los fragmentos indicados fusionados a Gal4-DBD junto con el indicador de luciferasa y, dos días después, se trataron con LY294002 50 μ M durante 6 horas. Tras el tratamiento, las células se lisaron, y la actividad luciferasa se midió y se normalizó a los niveles obtenidos con el plásmido Gal4-DBD vacío. La gráfica muestra la media y los errores estándar de triplicados. **B)** Como control se utilizó el dominio de transactivación de VP-16 fusionado a Gal4-DBD. Los datos se representan en forma de media \pm SE de triplicados normalizados a los respectivos controles transfectados con plásmido vacío. A diferencia de los fragmentos de AIB1, la activación transcripcional de VP-16 aumentó con el tratamiento de LY294002, demostrando especificidad del efecto de LY294002 sobre AIB1. **C)** Análisis de la expresión de Gal4-DBD AIB1 (556-1424) por "western blot" en células MCF-7 y HeLa transfectadas con este plásmido. Dos días después de la transfección, las células se incubaron en ausencia o presencia de LY294002 50 μ M durante 6 horas. **D)** Células MCF-7 y HeLa fueron tratadas con 10 μ g/ml de cicloheximida (CHX). El tratamiento fue realizado durante los tiempos indicados en presencia (LY) o en ausencia (C) de LY294002 50 μ M. **E)** Células MCF-7 y HeLa se transfetaron y trataron en las mismas condiciones que en D), pero utilizando AKT I V triciribina 40 μ M.

1.9. Papel de AKT en la estabilización de AIB1

En la secuencia de AIB1 existen tres sitios consenso canónicos de sumoilación/ubiquitinación (\emptyset KXE: donde \emptyset =aminoácido hidrofóbico, K=lisina, X=cualquier aminoácido y E=ácido glutámico) en las posiciones K723, K786 y K1194. Para estudiar si la estabilización de AIB1 mediada por AKT estaba regulada por la vía ubiquitina-proteasoma, analizamos la conjugación de ubiquitina a diferentes fragmentos de AIB1 (ver Fig. 31). El tratamiento con el inhibidor de AKT triciribina resultó en una reducción considerable de los niveles de ubiquitinación de la mayoría de los fragmentos, a excepción del comprendido entre los aminoácidos 1133-1424 y del fragmento 1210-1424 que no fue ubiquitinado (Fig. 31A). Esta reducción de los niveles de ubiquitinación era debida a una mayor degradación de estos fragmentos, ya que la inhibición del proteasoma rescataba, al menos en parte, la ubiquitinación de éstos (Fig. 31A). Apoyando esta idea, el tratamiento con triciribina redujo también los niveles de los fragmentos, como puede observarse en los lisados celulares totales (Fig. 31B). Estos resultados sugieren que AKT está implicado en la regulación de la degradación de AIB1 por la vía ubiquitina-proteasoma. Contrariamente, se observó que no había variaciones en la estabilidad del fragmento 1133-1424 (Fig. 31A), indicando que la función de AKT en la estabilización de AIB1 se limitaba a los fragmentos que contenían la región central, pero no la región carboxi-terminal, también ubiquitinada. En la secuencia del fragmento carboxi-terminal se encuentra uno de los sitios consenso de ubiquitinación, K1194. Como se esperaba, la versión de este fragmento sin el sitio consenso (1210-1424) no fue ubiquitinada. No está claro si la ausencia del típico bandeo de ubiquitinas refleja una mayor susceptibilidad de los fragmentos a enzimas desubiquitinasas, en contraste con el AIB1 completo o, si por el contrario, la poliubiquitinación puede requerir información estructural que sólo está presente en la secuencia completa de la proteína.

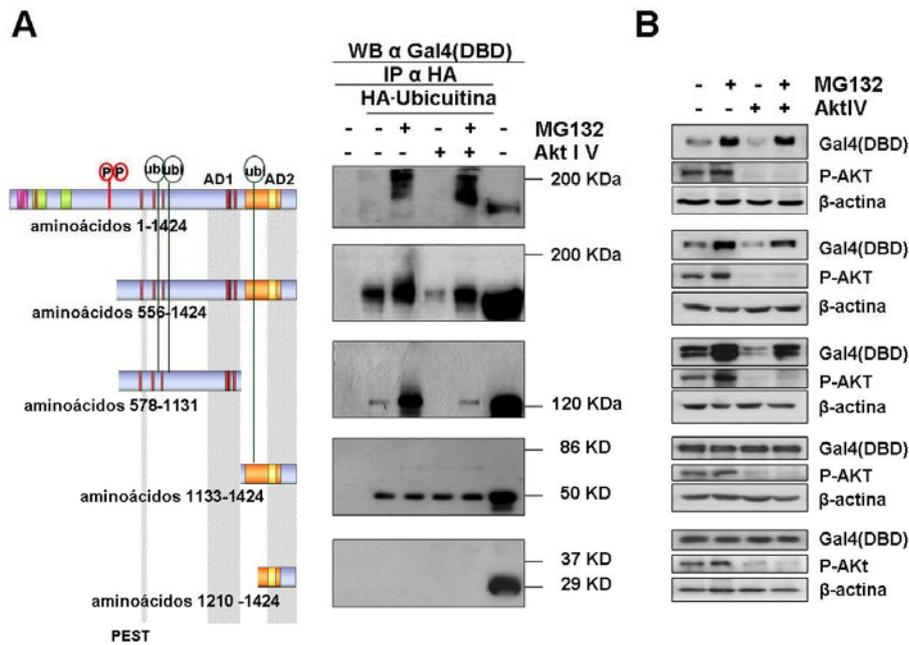
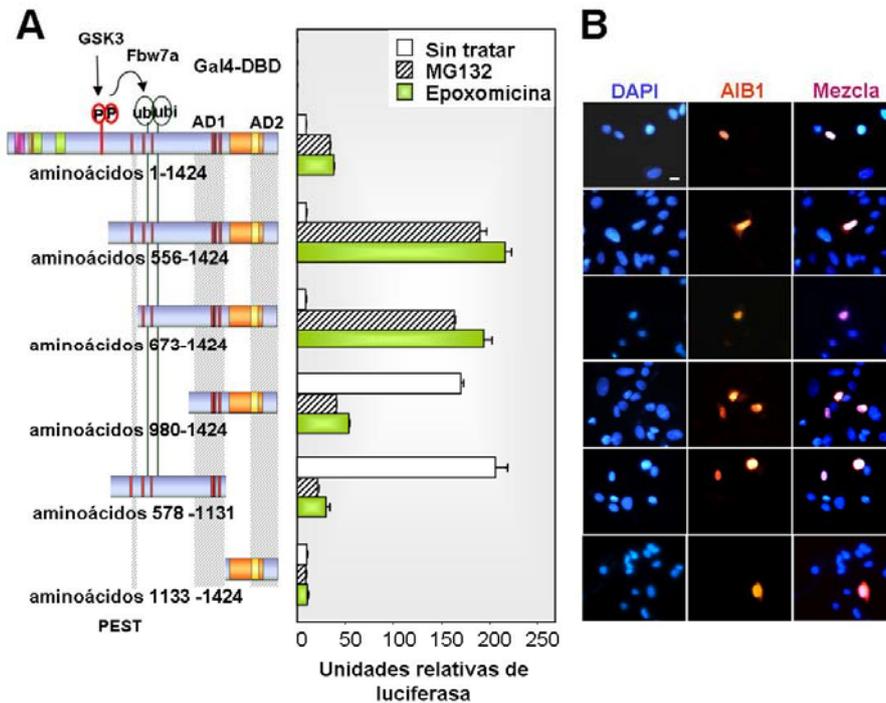


Figura 31: La región central de AIB1 es necesaria para la estabilización por AKT. A) Células COS-1 fueron cotransfectadas con ubiquitina fusionada a HA y los fragmentos Gal4-DBD indicados. Dos días después, las células se trataron con el inhibidor del proteasoma MG132 20 μ M y/o con triciribina 40 μ M durante 6 horas. Tras los tratamientos, los cultivos se lisaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA para, finalmente, ser analizados por “western blot” con anticuerpos anti-Gal4. La primera calle corresponde a un control negativo de la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA de células que sólo fueron transfectadas con los fragmentos Gal4-DBD correspondientes. La última calle es un control de la expresión de los fragmentos Gal4-DBD de células no transfectadas con HA-Ubiquitina y no inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-HA. **B)** Análisis por “western blot” de lisados totales de los cultivos descritos en el apartado A).

1.10. Además de SCF^{Fbw7}, debe existir otra u otras ubiquitina ligasas para AIB1

Puesto que la actividad transcripcional del fragmento no fosforilable por GSK3 era igualmente regulada por PI3K/AKT que el AIB1 completo, quisimos ver qué ocurría con su degradación. Para ello, los fragmentos de AIB1 1-1424 y 556-1424 fusionados al dominio de unión a DNA de Gal4

(Gal4-DBD) fueron cotransfectados en células COS-1 junto con el gen de la luciferasa bajo el control del elemento de respuesta a Gal4. El tratamiento con MG132 o con epoxomicina, un inhibidor del proteasoma con mayor especificidad, resultó en una potente actividad transcripcional para ambos fragmentos (ver Fig. 32A). Esta mayor actividad transcripcional podría ser el resultado de un aumento de los niveles de AIB1 tras el tratamiento con los inhibidores del proteasoma. En la figura 32C se demuestra cómo el fragmento 556-1424 es degradado en presencia de cicloheximida con el tiempo, y cómo es acumulado en presencia de MG132, a pesar de que éste no contiene las serinas S505 y S509 que participan en la ubiquitinación mediada por la vía GSK3/Fbw7 (Wu et al., 2007). Estos resultados sugieren que otra u otras ubiquitina ligasas podrían estar interviniendo en la ubiquitinación y degradación de AIB1.



continúa...

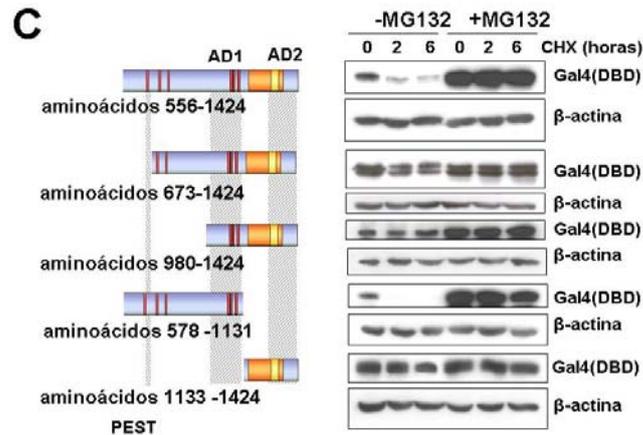


Figura 32: El recambio proteico no es necesario para la actividad transcripcional intrínseca de AIB1. A) Los fragmentos indicados fueron fusionados a Ga4-DBD y transfectados en células COS-1 junto con el indicador de luciferasa bajo el control del elemento de respuesta a Gal4. Las células se trataron, o no, con los inhibidores del proteasoma MG132 20 μ M o epoxomicina 100 nM durante 17 horas. AD, dominio de activación. La gráfica muestra la media \pm SE de triplicados normalizados al control transfectado con plásmido vacío. B) Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Gal4(DBD) en rojo (Cy3) y DAPI en azul de células COS-1 transfectadas con los fragmentos del apartado A. Línea, 10 μ m. C) Células COS-1 se transfectaron con los fragmentos indicados. Dos días después de la transfección, los cultivos se trataron con cicloheximida (CHX) en ausencia o presencia de MG132 20 μ M, y se lisaron a los tiempos indicados. El análisis de los niveles de las proteínas híbridas con anticuerpos anti-Gal4(DBD) reveló que el fragmento 556-1424 era regulado por el proteasoma, y que los fragmentos que no contenían el dominio PEST exhibían una mayor estabilidad.

1.11. La secuencia PEST es requerida para desestabilizar a AIB1

El análisis de la secuencia de AIB1 reveló un dominio PEST comprendido entre los aminoácidos 647 y 672 (<http://www.at.embnet.org/toolbox/pestfind/>). El dominio PEST es una secuencia rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina que ha sido implicada en degradación proteica. El estudio de la vida media de los diferentes fragmentos de AIB1 en presencia de cicloheximida reveló que las construcciones que contenían la secuencia PEST eran más inestables que

aquellas en las que no estaba presente (Fig. 32C). El tratamiento con MG132 indujo una potente acumulación de los fragmentos inestables (556-1424 y 578-1131), mientras que los estables apenas sufrieron cambios (Fig. 32C). Estos resultados sugerían un papel para el dominio PEST en la regulación de la degradación proteasomal de AIB1.

1.12. Actividad transcripcional intrínseca y degradación de AIB1

La activación transcripcional de diversos receptores nucleares viene acompañada del inicio de su degradación. Cuando esto ocurre, la inhibición del proteasoma previene la función transcripcional de estos receptores. La noción de que el sistema ubiquitina-proteasoma está implicada en la transcripción génica puede apoyarse en el hecho de que el proteasoma puede localizarse en el núcleo de las células eucariotas y en que se han encontrado enzimas de este sistema reclutadas a promotores de genes diana (Ferry et al., 2009). Con objeto de estudiar si el recambio proteico de AIB1 era importante para su actividad transcripcional intrínseca, realizamos ensayos luciferasa con varios fragmentos de este coactivador fusionados a Gal4-DBD. El tratamiento con los inhibidores del proteasoma, MG132 y epoxomicina, aumentó en gran medida la actividad transcripcional de aquellos fragmentos que contenían conjuntamente la región central y carboxi-terminal de AIB1 (Fig. 32A), sugiriendo que para éstos, la inhibición del recambio proteico no comprometía su actividad transcripcional. Una posible explicación para el aumento de actividad en presencia de inhibidores era el aumento de los niveles de AIB1 como resultado del tratamiento. Sin embargo, en el fragmento 673-1424, que adolece de la secuencia PEST y es mucho más estable (Fig. 32C), la inhibición de la función proteasomal también produjo un gran aumento de su actividad transcripcional intrínseca (Fig. 32A). Estos resultados revelan la existencia de dos dominios (673-979 y 1133-1424) que son necesarios

simultáneamente para una máxima sensibilidad transcripcional a inhibidores del proteasoma, y sugieren la existencia de un nuevo cofactor o cofactores que se asocian a ambos dominios de AIB1 ayudándole a coactivar la transcripción. Los dos dominios por separado (fragmentos 980-1424 y 578-1131) pierden actividad transcripcional en presencia de inhibidores del proteasoma, lo que indica que la función del proteasoma es requerida para la actividad transcripcional de ambos. Una posible interpretación de estos resultados es que algunas de estas proteínas de fusión no estuvieran localizadas en el núcleo. El hecho de que exhibieran actividad transcripcional ya era consistente con la localización nuclear, sin embargo, lo verificamos mediante inmunofluorescencia, como se demuestra en la figura 32B.

1.13. ¿Existen otros mecanismos para la degradación de AIB1?

De los tres sitios consenso canónicos de sumoilación/ubiquitinación presentes en la secuencia de AIB1, Wu y colaboradores observaron que los mutantes K723R y K786R (donde K=lisina y R=arginina) eran resistentes a la degradación, sugiriendo que la ubiquitinación en estos sitios era importante en la estabilidad de AIB1 (Wu et al., 2007). Nosotros también generamos mutaciones en estos sitios consenso y estudiamos tanto la actividad transcripcional intrínseca como la degradación de estos mutantes. Como se observa en la figura 33A, los mutantes K723R y K786R resultaron en un aumento significativo de la actividad transcripcional, al igual que el triple mutante, probablemente debido a la mayor estabilidad de estas proteínas (Wu et al., 2007). Por el contrario, el mutante K1194R disminuyó esta actividad significativamente, indicando que la ubiquitinación en este sitio podría ser importante para la actividad transcripcional de AIB1. En cuanto a la degradación, el tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132 resultó en un aumento de los niveles proteicos de todos los

mutantes, así como de la actividad transcripcional de éstos, a excepción del triple mutante (Fig. 33A y 33B). A pesar de que el triple mutante no es sensible transcripcionalmente al inhibidor MG132, sus niveles aumentan al bloquear el proteasoma, sugiriendo otros mecanismos de degradación de AIB1 distintos al sistema ubiquitina-proteasoma, como el REGγ-proteasoma de manera independiente de ubiquitina (Li et al., 2006) o catepsinas lisosomales que también pueden ser inhibidas con MG132 (Ito et al., 2009).

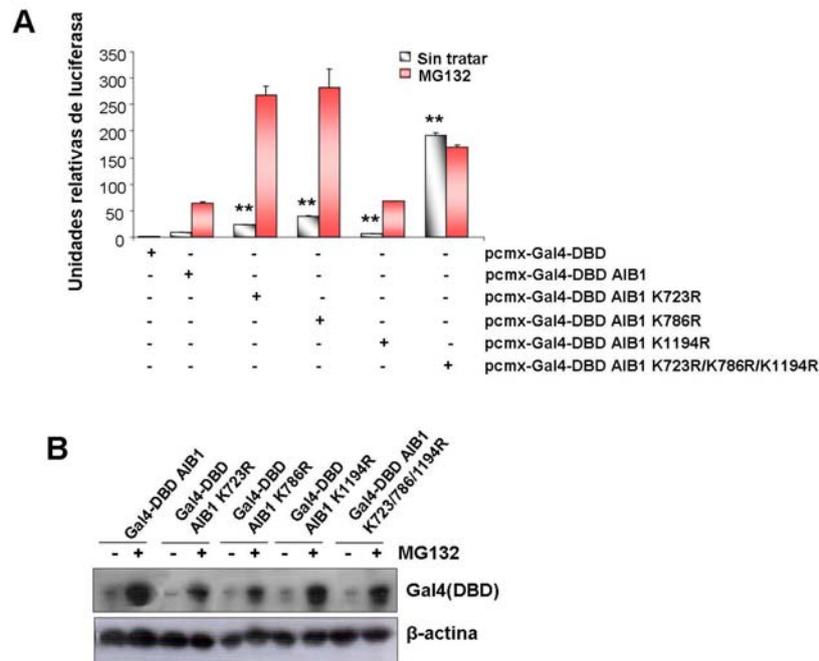


Figura 33: Mutación de los sitios consenso de ubiquitinación y degradación de AIB1. A) Ensayos luciferasa de células COS-1 cotransfectadas con las construcciones Gal4-DBD AIB1 indicadas y con el indicador luciferasa bajo el control del elemento de respuesta a Gal4. La gráfica muestra la media \pm SE de triplicados normalizados al control transfectado con plásmido vacío (** $p < 0,01$ frente a AIB1 no mutado en un test de Student). **B)** Células COS-1 fueron transfectadas transitoriamente con los fragmentos indicados. Las calles correspondientes se trataron durante 17 horas con MG132 20 μ M. El análisis por "western blot" con anticuerpos anti-Gal4(DBD) muestra un aumento de los niveles de las proteínas híbridas en todos los casos.

El tratamiento con cloroquina, un inhibidor de proteasas lisosomales, en células MCF-7 resultó en un incremento de los niveles de AIB1 (Fig. 34), confirmando la hipótesis de que este coactivador pudiera estar degradándose por otras vías, además de la proteasomal.

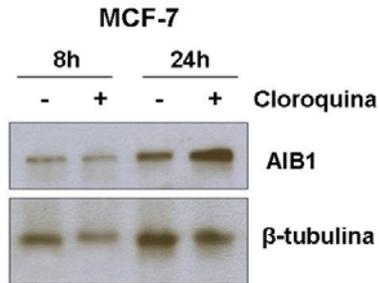


Figura 34: AIB1 también es degradado por la vía lisosomal. Cultivos de células MCF-7 exponencialmente creciendo fueron tratados con cloroquina 100 μ M o con su vehículo (PBS). En los tiempos indicados las células fueron lisadas, y los niveles de AIB1 se analizaron por "western blot". Anticuerpos anti- β -tubulina se utilizaron como control de carga.

***2. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN
POSTRADUCCIONAL DE AIB1 EN
MITOSIS***

2.1. Análisis de AIB1 a lo largo del ciclo celular: Una nueva forma mitótica

Estudios previos de la expresión de AIB1 a lo largo del ciclo celular mediante "western blot" mostraron una banda de menor migración electroforética para AIB1 en mitosis (Fig. 35A y ver Fig. 21). El nocodazol es un agente que interfiere en la polimerización de microtúbulos y ha sido muy utilizado para sincronizar células en G2/M. En condiciones normales se pueden observar algunas células en mitosis con la ayuda de un microscopio óptico invertido. Las células mitóticas se ponen en evidencia al soltarse de la placa de cultivo para poder dividirse (Fig. 35B izquierda). El tratamiento con nocodazol enriquece la población de células mitóticas (Fig. 35B derecha). Con el fin de estudiar el patrón de la modificación de AIB1 en mitosis, se analizó la expresión de este coactivador en células HeLa asincrónicas, células que permanecían adheridas tras el tratamiento con nocodazol y en las células que flotaban tras el bloqueo. Como se observa en la figura 35C, tras el tratamiento con nocodazol las células adheridas mostraban una doble banda para AIB1, mientras que las flotantes sólo exhibían la banda de menor migración. Para descartar que esta nueva banda de AIB1 fuera debida a un posible efecto secundario del tratamiento con nocodazol, se realizó el clásico procedimiento de agitación que permite la recuperación de las células mitóticas flotantes de una población celular asincrónica. Este procedimiento reprodujo los resultados obtenidos con el nocodazol (Fig. 35C), sugiriendo que AIB1 sufría alguna modificación postraduccional en la fase de mitosis.

2.2. Naturaleza del doblete de Mitosis

Debido a los indicios previos que apuntaban a la degradación de AIB1 en la fase de mitosis, que más tarde resultaron ser contradictorios, pensamos que la banda de menor migración podría corresponder a una

forma de AIB1 marcada con ubiquitina. Para estudiar esta hipótesis, inmunoprecipitamos AIB1 de células MCF-7 crecidas en diferentes condiciones y resolvimos los inmunocomplejos en un gel. Aunque el análisis por “western blot” con anticuerpos anti-ubiquitina reveló señal en todas la calles (Fig. 36A), la banda de menor migración electroforética no

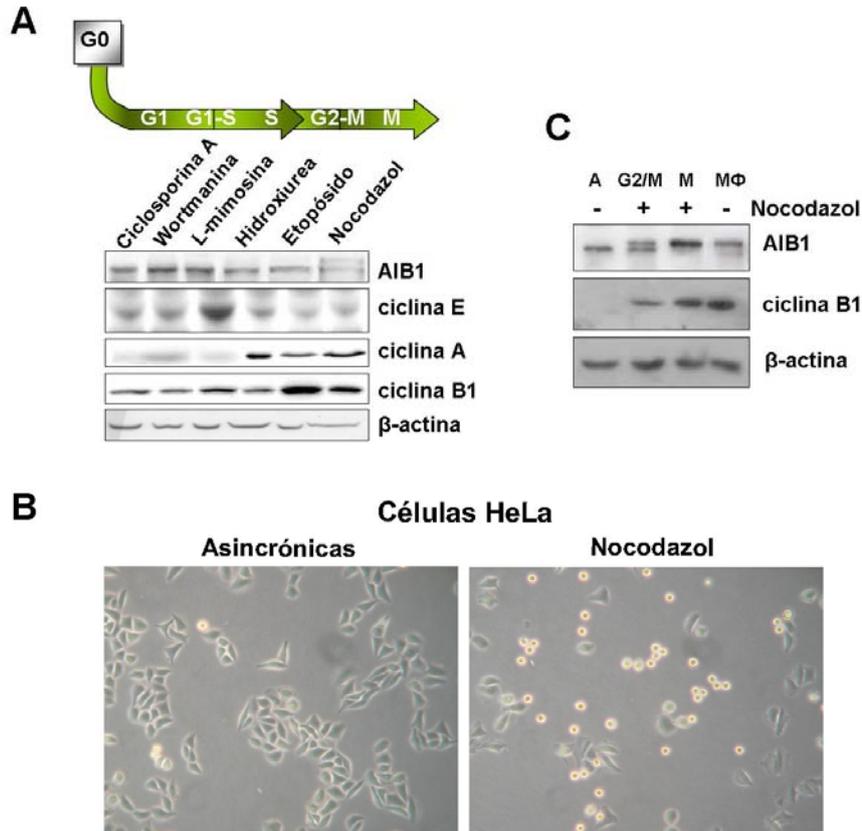


Figura 35: Extractos mitóticos revelan una banda de menor migración electroforética para AIB1. **A)** Células HeLa fueron sincronizadas en diferentes fases del ciclo celular utilizando los inhibidores indicados. La expresión de AIB1 se analizó por “western blot”, observándose una banda de menor movilidad en mitosis. Anticuerpos anti-ciclinas E, A y B1 se utilizaron para confirmar los bloqueos, y anticuerpos anti-β-actina sirvieron de control de carga. **B)** Cultivos de células HeLa asincrónicas (izquierda) y bloqueados con nocodazol (derecha) vistos al microscopio óptico. Las células flotantes (más refringentes) corresponden con las células mitóticas. **C)** Análisis de la expresión de AIB1 por “western blot” en células HeLa asincrónicas (A), adheridas tras nocodazol (G2/M), flotantes tras nocodazol (M) y flotantes recuperadas mediante agitación (MΦ).

fue detectada mediante estos anticuerpos, sugiriendo que ésta no era debida a ubiquitinación. Resultados similares se obtuvieron en células HeLa 6xHis-ubiquitina. El bloqueo de estas células en mitosis con nocodazol y el posterior “western blot” para AIB1 de las proteínas ubiquitinadas purificadas tampoco mostró el doble bandeo característico (Fig. 36B). En una tercera aproximación experimental, se expresó en bacteria y se purificó la enzima desubiquitinasa USP2. La incubación de extractos mitóticos de células MCF-7 bloqueadas con nocodazol con esta desubiquitinasa resultó en una disminución considerable de las proteínas ubiquitinadas, demostrando que la enzima era funcional. Sin embargo, el análisis por “western blot” para AIB1 dejó clara la presencia del doblete (Fig.36C). Todos estos resultados sugerían que la naturaleza de la banda de menor migración no era la ubiquitinación.

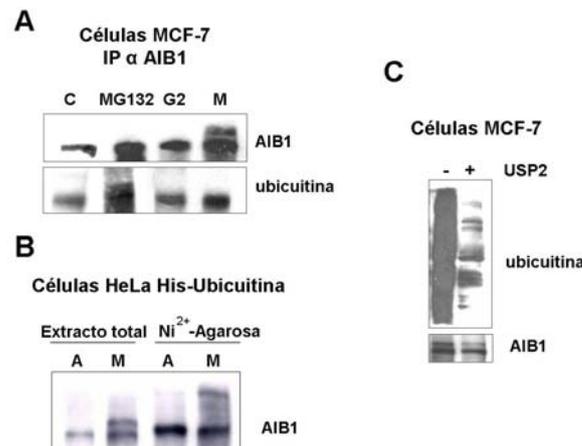


Figura 36: La banda de menor migración de AIB1 no está ubiquitinada. A) Cultivos de células MCF-7 crecidos en condiciones normales (C), tratados con MG132 20 μ M durante 17 horas (MG132), bloqueados en G2 con etopósido (G2) o bloqueados en mitosis con nocodazol (M) fueron inmunoprecipitados para AIB1 y después analizados por “western blot” con anticuerpos anti-ubiquitina y anti-AIB1. **B)** Células HeLa 6xHis-ubiquitina crecidas asincrónicamente (A) o bloqueadas en mitosis con nocodazol (M) fueron lisadas en condiciones desnaturalizantes, y las proteínas ubiquitinadas se purificaron mediante afinidad en una resina de níquel (Ni²⁺-Agarosa). **C)** “Western blot” con anticuerpos anti-ubiquitina y anti-AIB1 de extractos mitóticos de células MCF-7 bloqueadas con nocodazol y tratados (+) o no (-) con USP2 durante 1 hora a 37°C.

Descartada la ubiquitinación, se pensó que esta modificación se debía a fosforilación. La reducida movilidad es típica de proteínas fosforiladas, así que para examinar si la banda de menor movilidad correspondía a fosforilación, se trataron extractos mitóticos de células MCF-7 con la fosfatasa alcalina del intestino bovino (CIP). Como se observa en la figura 37A, el doblete seguía presente tras el tratamiento, sugiriendo que no se trataba de fosforilación. Sin embargo, al cambiar la fosfatasa por otra más eficaz eliminando grupos fosfato de serinas, treoninas y tirosinas, como es la fosfatasa lambda, se observó que la banda de menor movilidad desaparecía (Fig. 37B). Este resultado, demostró que la proteína de AIB1 estaba siendo fosforilada en mitosis.

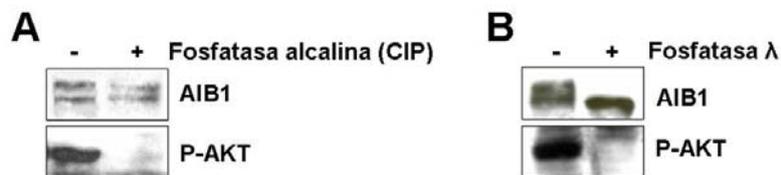


Figura 37: AIB1 se fosforila en Mitosis. “Western blot” de extractos proteicos de células MCF-7 bloqueadas en mitosis con nocodazol incubados en ausencia (-) o presencia (+) de fosfatasa alcalina del intestino bovino CIP **A**) o fosfatasa lambda **B**) durante 1 hora a 30°C. Los niveles de AKT fosforilado (P-AKT) fueron evaluados como control positivo del ensayo.

2.3. AIB1 se fosforila en Mitosis por el complejo Cdk1-ciclina

B

La quinasa dependiente de ciclina B Cdk1, también conocida como p34^{Cdc2} o Cdc2, es una de las quinasas más activas en la fase de mitosis. El análisis de la secuencia de AIB1 muestra en la posición 728 un motivo consenso de fosforilación para Cdk; (S/T)PX(R/K) (donde S=serina, T=treonina, P=prolina, X=cualquier aminoácido, R=arginina y K=lisina).

Esto nos llevó a postular que el complejo Cdk1-ciclina B podría ser el responsable de la fosforilación específica de mitosis de AIB1. Para comprobarlo, evaluamos la fosforilación de este coactivador en células vivas en presencia de inhibidores de Cdks. Células MCF-7 y HeLa bloqueadas en mitosis fueron tratadas con purvalanol A durante las últimas 3 horas del tratamiento con nocodazol. Los resultados mostraron que el tratamiento con purvalanol A inhibía la fosforilación mitótica de AIB1 (Fig. 38A), sugiriendo que AIB1 era fosforilado directa o indirectamente por Cdk1. Aunque en menor proporción, el purvalanol A también puede inhibir la acción de otras quinasas como ERK1,2 (Bain et al., 2003). Dado que AIB1 es sustrato de estas quinasas (Font de Mora and Brown, 2000), quisimos comprobar que el efecto observado para el purvalanol A era debido a la inhibición de Cdk1 y no de ERK1,2. Para ello, se boquearon células MCF-7 en mitosis y se trataron con el inhibidor de MEK1 PD98059. Como se observa en la figura 38B, este inhibidor no bloqueó la fosforilación de AIB1, indicando que ésta no era debida a la acción de ERK1,2. Por otra parte, quisimos ver si AIB1 interaccionaba con Cdk1. Para ello, se inmunoprecipitó AIB1 de células HeLa crecidas asincrónicamente y bloqueadas en mitosis con nocodazol. Los inmunocomplejos precipitados revelaron interacción con Cdk1 en ambos casos (Fig. 38C). Finalmente, se comprobó si AIB1 era fosforilado *in vitro*. Se purificó el complejo Cdk1-ciclina B de extractos mitóticos mediante la proteína recombinante p13^{suc1} conjugada a agarosa. Esta proteína, procedente de levadura, tiene alta afinidad por Cdk1/ciclina B y, por tanto, una de sus aplicaciones es purificar a este complejo quinasa. La incubación de los complejos precipitados con lisados procedentes de células HeLa asincrónicas en presencia de ATP y tampón de reacción específico de la quinasa no produjo ningún cambio en la movilidad de AIB1 (Fig. 38D). Una posible interpretación de este resultado es que los niveles de fosforilación fueran tan bajos que no se detectaran por esta técnica, a menos que se usara marca radiactiva.

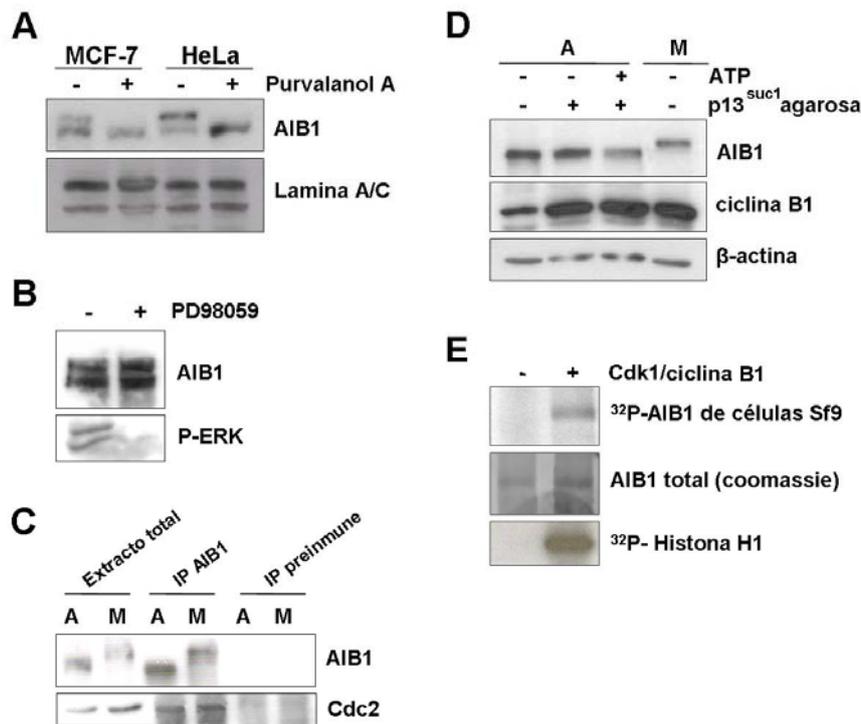
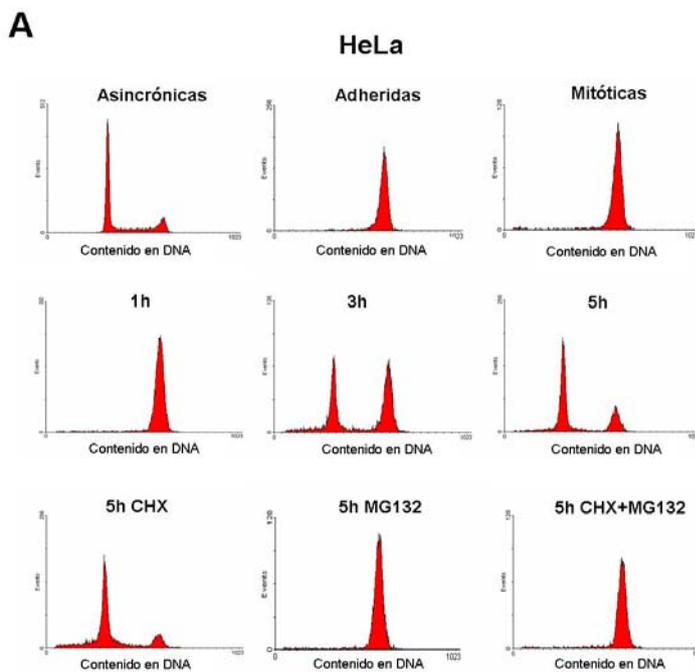


Figura 38: Cdk1-ciclina B1 fosforila a AIB1 en Mitosis. **A)** Células MCF-7 y HeLa fueron bloqueadas en mitosis con nocodazol 150 ng/ml durante 20 horas en presencia o ausencia del inhibidor de Cdk's purvalanol A 10 μ M durante las últimas 3 horas. Las células fueron lisadas y analizadas por "western blot" con anticuerpos para AIB1 y para Lamina A/C como control de la carga. **B)** En las mismas condiciones que en A), se bloquearon células MCF-7 en mitosis y durante las últimas 3 horas de tratamiento se añadió el inhibidor de MEK1 PD98059 20 μ M. Los extractos proteicos se analizaron por "western blot" con anticuerpos anti-AIB1 y anti-ERK fosforilado (P-ERK) como control de la inhibición. **C)** Análisis por "western blot" de inmunocomplejos de AIB1 procedentes de lisados de células HeLa crecidas asincrónicamente (A) o bloqueadas en mitosis (M) con nocodazol 150 ng/ml durante 17 horas. La inmunoprecipitación con suero preinmune demostró que la interacción entre AIB1 y Cdk1 (Cdc2) era específica. **D)** Lisados de células HeLa asincrónicas (A) fueron incubados con los complejos Cdk purificados con proteína p13^{suc1} recombinante conjugada a agarosa de células HeLa mitóticas en presencia (+) o ausencia (-) de ATP. La movilidad de AIB1 se analizó por "western blot" con anticuerpos para esta proteína. Anticuerpos anti-ciclina B1 se utilizaron para detectar la cantidad de complejo precipitado, y anticuerpos anti- β -actina sirvieron como control de carga. El extracto mitótico (calle M) corresponde al control de AIB1 fosforilado. **E)** Proteína de AIB1 purificada de células Sf9 fue incubada en presencia de [γ -³²P]ATP y en combinación (+) o no (-) del complejo recombinante Cdk1/ciclina B1 a 30°C durante 1 hora. La mitad del volumen del total de reacción se resolvió por SDS-PAGE. El gel se secó y se expuso a una película autorradigráfica. El panel para la histona 1 (H1) corresponde al control positivo de la reacción.

En otro ensayo, realizado en paralelo, se incubó proteína de AIB1 purificada de células Sf9 con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ en ausencia o presencia del complejo recombinante Cdk1-ciclina B1. En este caso, los resultados sí demostraron que AIB1 era fosforilada *in vitro* por Cdk1-ciclina B1 (Fig. 38D). Todas estas observaciones indicaban que Cdk1-ciclina B1 era la quinasa responsable de la fosforilación de AIB1 en mitosis.

2.4. AIB1 se desfosforila a la salida de mitosis

Para estudiar la posible función de la fosforilación de AIB1, se bloquearon células HeLa y MCF-7 en mitosis con nocodazol y luego se permitió su progresión hasta la fase G1, lavando las células y añadiendo medio fresco. La progresión a G1 fue monitorizada por citometría de flujo (Fig 39A y 39B). La mayoría de las células había alcanzado la fase G1 a las 5 horas desde la eliminación del nocodazol.



continúa...

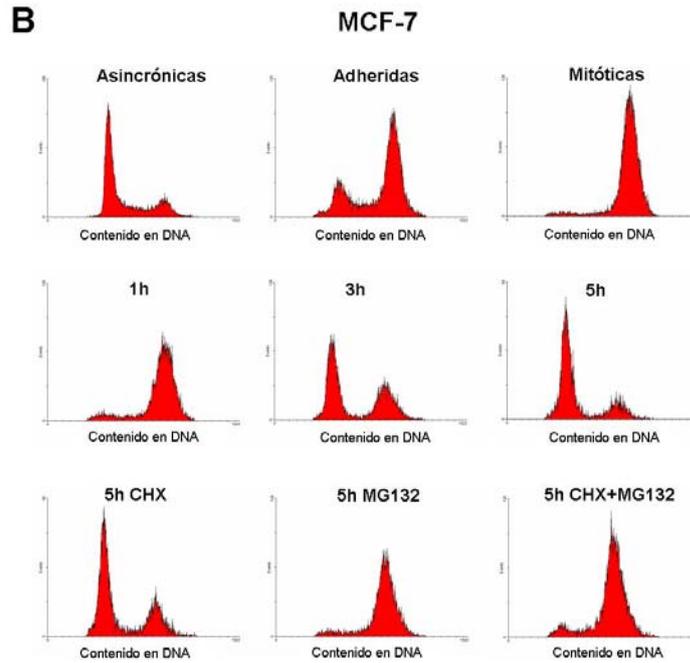


Figura 39: Análisis del ciclo celular en células HeLa y MCF-7. A) Células HeLa fueron crecidas asincrónicamente o bloqueadas en mitosis con nocodazol 150 ng/ml durante 17 horas. El ciclo celular de células asincrónicas, células adheridas tras el nocodazol (adheridas), células flotantes tras el bloqueo (mitóticas) y células inducidas a progresar en ciclo desde mitosis se analizó mediante citometría de flujo. Tras 1 hora de la liberación, las células están mayoritariamente en G2/M. A las 3 horas aparece una población en G1. A las 5 horas, prácticamente todas las células están en G1. En presencia de MG132 no existe progresión a G1, pero sí en presencia de cicloheximida (CHX). **B)** Análisis mediante citometría de flujo de células MCF-7 crecidas en las mismas condiciones que en A).

El análisis por “western blot” de células HeLa y MCF-7 inicialmente bloqueadas en mitosis y liberadas a progresar en ciclo reveló que AIB1 era desfosforilado con el tiempo, de manera que después de 5 horas de la liberación, sólo la banda de mayor movilidad electroforética estaba presente (Fig. 40A). Esta desfosforilación coincidía con la desaparición de la ciclina B. La ciclina B en asociación con $p34^{Cdc2}$, es necesaria para que las células

entren en mitosis, y su destrucción es requerida para la salida de esta fase (Minshull et al., 1989; Murray et al., 1989). La destrucción de la ciclina es mediada por ubiquitinación (Hershko, 1999), por tanto, la presencia del inhibidor del proteasoma MG132 impide la degradación de esta ciclina, así como la progresión a G1 (Fig. 39A, 39B y 40A). A diferencia de la ciclina B, AIB1 no se acumula en presencia de MG132 en ninguno de los casos (Fig. 40A), sugiriendo que la función de la fosforilación no es la degradación. Apoyando esta observación, la progresión a G1 en presencia de cicloheximida sigue promoviendo la desfosforilación de AIB1 y no la degradación, ya que en estas condiciones la banda de mayor movilidad probablemente no es resultado de la traducción *de novo* (Fig. 40A).

Una vez establecido que AIB1 era desfosforilado al salir de mitosis, quisimos averiguar qué fosfatasa era la responsable. Diversas evidencias sugieren que las serina/treonina proteína fosfatasas son cruciales en la proliferación celular. En particular, la proteína fosfatasa 1 (PP1), que está altamente conservada en todas las células eucariotas, juega un papel importante en el ciclo celular. Se ha demostrado que Cdk1 fosforila la subunidad catalítica de PP1 en la treonina 320 (T320), resultando en la inhibición de su función (Kwon et al., 1997). Con objeto de correlacionar la desfosforilación de AIB1 con este evento, se analizó la inactivación de PP1 por "western blot" mediante anticuerpos para la treonina fosforilada de PP1. Como cabía esperar, los resultados obtenidos mostraron una correlación entre la presencia de ciclina B, la inactivación de PP1 y la presencia de la banda fosforilada de AIB1 (Fig. 40A). Adicionalmente, la desfosforilación de AIB1 coincidía con la activación de PP1. Estas observaciones apoyan la candidatura de PP1 como fosfatasa de AIB1. El hecho de que a las 3 horas de la liberación en ciclo, AIB1 ya esté prácticamente desfosforilado y, sin embargo, todavía exista una gran cantidad de PP1 inactivada podría explicarse por el hecho de tener dos poblaciones celulares bien definidas. Como se muestra en las figuras 39A y 39B, a las 3 horas de progresión en

ciclo coexisten la población de células en G1, que contribuiría con la señal para la banda de mayor migración de AIB1, y la población de células mitóticas, que podría estar contribuyendo en la presencia de PP1 fosforilado. Para comprobar esta hipótesis, se liberaron en ciclo células HeLa bloqueadas en mitosis, y se lisaron por separado la población de células adheridas y la población de células flotantes. Los resultados confirmaron la correlación entre AIB1 fosforilado y presencia de PP1 inactivo sólo en las células mitóticas (Fig. 40B).

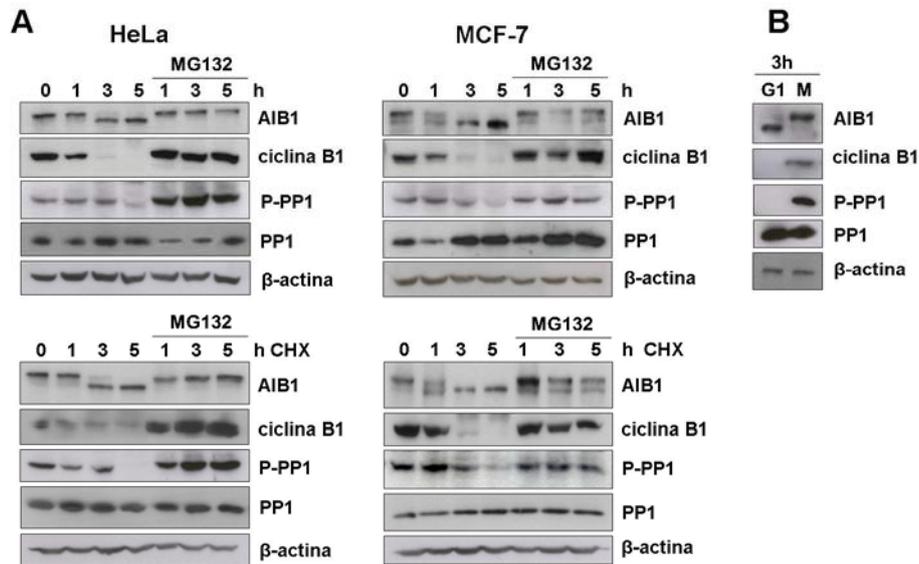


Figura 40: AIB1 es desfosforilado a la salida de mitosis. A) Análisis por “western blot” de células HeLa y MCF-7 bloqueadas en mitosis con nocodazol 150 ng/ml durante 17 horas y, más tarde, liberadas en presencia (paneles superiores) o ausencia (paneles inferiores) de 10 µg/ml de cicloheximida (CHX) y/o en presencia o ausencia de MG132 20 µM. Las células se lisaron a los tiempos indicados después de la liberación en ciclo. **B)** Células HeLa bloqueadas en mitosis en las mismas condiciones que en A) fueron inducidas a progresar en ciclo durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se lisaron por separado las células adheridas (G1) y las células flotantes (M). Las proteínas AIB1, ciclina B1, PP1, PP1 fosforilado (P-PP1) y β-actina como control de la carga fueron analizadas por “western blot” con anticuerpos específicos.

2.5. La desfosforilación de AIB1 a la salida de mitosis es sensible a inhibidores de fosfatasa

La fosforilación ha sido reconocida como uno de los eventos más importantes asociados a la regulación del ciclo celular. La mayoría del trabajo en este campo se ha centrado en el papel de las quinasas, como Cdk1, Aurora, etcétera. En células humanas, más de un millar de proteínas muestra una fosforilación incrementada durante mitosis; la mayoría de éstas son sustratos de Cdk1 (Dephoure et al., 2008). La función de las fosfatasa ha sido menos estudiada y, sin embargo, la reversión de estas fosforilaciones es un fenómeno igualmente importante. Existen 4 clases principales de fosfatasa que regulan los procesos implicados en el control del ciclo celular, éstas son: la proteína fosfatasa 1 (PP1), la proteína fosfatasa 2A (PP2A), CDC25 y Cdc14 (Trinkle-Mulcahy and Lamond, 2006). Puesto que la función de los homólogos de Cdc14 en células de mamífero (hCdc14A y hCdc14B) no está clara y la fosfatasa CDC25 regula los eventos del inicio de la mitosis, la atención se focalizó en las otras dos fosfatasa, PP1 y PP2A, como posibles enzimas que revertían la fosforilación de AIB1.

El ácido okadaico es un inhibidor específico de PP1 y PP2A. Sin embargo, la sensibilidad a este inhibidor es mucho mayor para PP2A que para PP1, de manera que estas dos fosfatasa pueden ser distinguidas. Teniendo en cuenta esta noción, se sincronizaron células HeLa y MCF-7 en mitosis y se liberaron en presencia o ausencia de ácido okadaico. El ácido okadaico previno de manera dependiente de concentración la desfosforilación de AIB1 (Fig. 41A). En contraste, la ciclosporina A, un inhibidor específico de PP2B o calcineurina, no impidió la desfosforilación de AIB1 (Fig. 41B). Estas observaciones sugerían que era PP1, más que PP2A, la fosfatasa de AIB1 a la salida de mitosis. Al igual que el ácido okadaico, la caliculina A es un inhibidor de PP1 y PP2A, pero más efectivo.

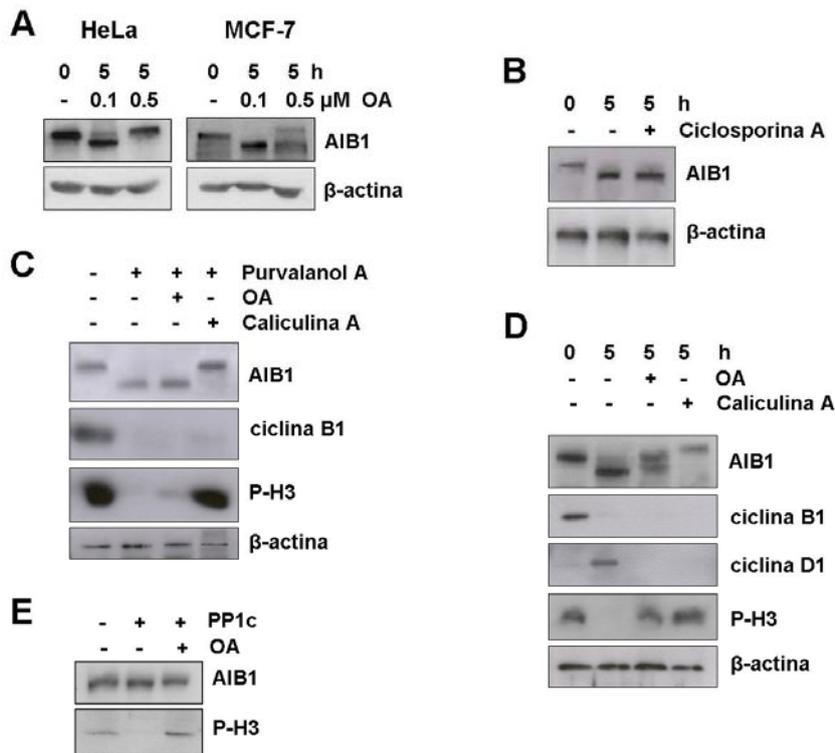


Figura 41: AIB1 se desfosforila por una fosfatasa sensible a ácido okadaico y caliculina A. **A)** Células HeLa y MCF-7 sincronizadas en mitosis con nocodazol 150 ng/ml durante 17 horas y, después, liberadas en ciclo en ausencia (-) o presencia de las concentraciones indicadas de ácido okadaico (OA). Tras 5 horas, las células se lisaron y se analizaron por “western blot” con anticuerpos para AIB1 y para β-actina como control de carga. **B)** Células HeLa sincronizadas en las mismas condiciones que en A) y liberadas en ciclo en ausencia (-) o presencia (+) de ciclosporina A 5 μM. **C)** Análisis por “western blot” del estado de fosforilación de AIB1 y de marcadores de mitosis en células HeLa bloqueadas con nocodazol durante 19 horas y tratadas durante las dos últimas con purvalanol A 10 μM en ausencia (-) o presencia (+) de ácido okadaico 0.5 μM o caliculina A 20 nM. **D)** “Western blot” de células HeLa bloqueadas en mitosis como en A) y liberadas en ciclo en ausencia (-) o presencia (+) de ácido okadaico 0.5 μM o caliculina A 20 nM durante 5 horas. **E)** Ensayo de desfosforilación *in vitro* con la subunidad catalítica de la isoforma α de PP1 (PP1c). 30 μg de lisado de células HeLa flotantes obtenidas como en A) se incubaron con 1.25 unidades de enzima PP1 recombinante en ausencia (-) o presencia (+) de 1 μM de ácido okadaico (OA). Todo el volumen del ensayo se resolvió por SDS-PAGE y se analizó por “western blot” con anticuerpos anti-AIB1 y anti-histona 3 fosforilada (P-H3) como control positivo de la reacción.

El tratamiento con ácido okadaico de células HeLa bloqueadas en mitosis y tratadas con purvalanol A no produjo ningún cambio en la desfosforilación de AIB1, mientras que el tratamiento con caliculina A la inhibió eficazmente (Fig. 41C). De igual modo, la caliculina A impidió la desfosforilación de la histona 3, sugiriendo que quizás el efecto sobre AIB1 era indirecto. Con objeto de analizar el efecto de la caliculina A en ausencia de purvalanol A, se bloquearon células HeLa en mitosis y se liberaron a progresar en ciclo en presencia de caliculina A. Como se observa en la figura 41D, la caliculina A previno, al igual que el ácido okadaico, la desfosforilación de AIB1. Para comprobar si AIB1 podía ser desfosforilado por PP1, realizamos un ensayo *in vitro* con la subunidad catalítica recombinante de PP1 α y lisados de células HeLa bloqueadas en mitosis. Sin embargo, la movilidad de AIB1 no cambió (Fig. 41E), indicando que PP1 α no desfosforilaba a AIB1 *in vitro*.

2.6. El mutante S728A de AIB1 se fosforila en mitosis

El análisis de la secuencia de AIB1 reveló la presencia de un total de 28 sitios de fosforilación (S/T)P (22 sitios SP y 6 sitios TP). Sin embargo, sólo uno de estos sitios (la serina 728; SPKK) correspondía al consenso canónico de fosforilación por Cdks [(S/T)PX(R/K)]. Para examinar si la fosforilación en esta posición era la responsable del cambio de movilidad de AIB1 en mitosis, se sustituyó la serina 728 a alanina mediante mutagénesis dirigida. La trasfección de este mutante en células COS-1 reveló que el doblete para AIB1 seguía presente en las células bloqueadas en mitosis con nocodazol (Fig. 42), sugiriendo, o bien que la fosforilación mitótica era independiente de este sitio conservado para Cdks, o bien que existían otros sitios de fosforilación que podrían estar compensando.

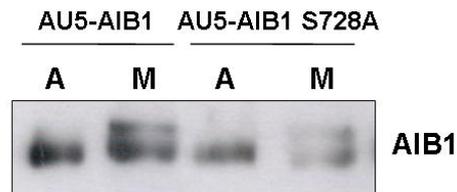


Figura 42: La banda de menor migración electroforética sigue presente en mitosis en el mutante S728A de AIB1. Los plásmidos pCEFL-AU5-AIB1 y el mutante S728A generado sobre éste (pCEFL-AU5-AIB1 S728A) se transfectaron individualmente en células COS-1. Las células transfectadas se crecieron asincrónicamente (A) o se bloquearon en mitosis (M) con nocodazol 150 ng/ml durante 17 horas. El análisis por “western blot” con anticuerpos anti-AU5 mostró la presencia del doblete de mitosis tanto para la proteína silvestre como para la proteína mutante.

Debido al gran número de sitios potenciales de fosforilación por Cdks (28 totales), decidimos intentar un abordaje más global mediante el análisis de proteómica. Para ello se inmunoprecipitó AIB1 de células HeLa asincrónicas o de células HeLa mitóticas, y los inmunocomplejos se resolvieron en un gel SDS-PAGE. La tinción específica para fosfoproteínas (Pro-Q Diamond) reveló una banda (aproximadamente de 200 KDa) de mayor intensidad presente tanto en las células asincrónicas como en las mitóticas, y una banda de menor intensidad, por debajo, sólo en las mitóticas (Fig. 43A). Estas bandas se escindieron gel, se digirieron con tripsina y se analizaron por espectrometría de masas. AIB1 fue identificada en la banda específica de mitosis (Fig. 43B), apoyando que este coactivador se fosforilaba en esta fase. Sin embargo, no se pudo identificar ningún sitio de fosforilación (Fig. 43B), probablemente por ser muestras poco purificadas y con una baja cantidad relativa de AIB1, debido a la reducida calidad de los anticuerpos utilizados para inmunoprecipitar a este coactivador.

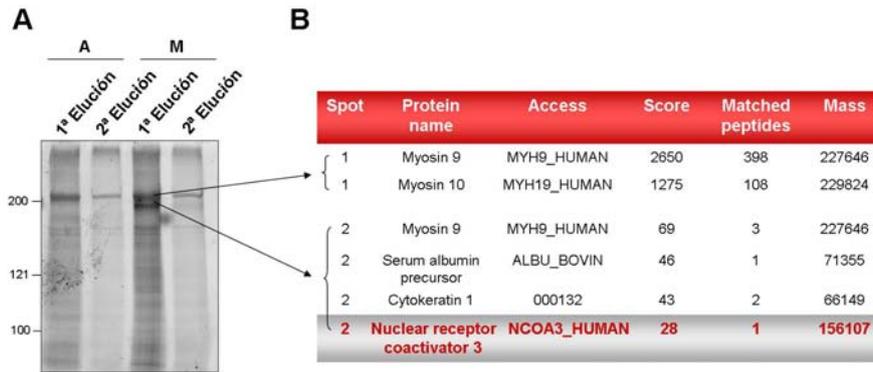


Figura 43: Análisis de los sitios de fosforilación de AIB1 por espectrometría de masas. **A)** 5 µg de proteína total de células HeLa asincrónicas (A) o mitóticas (M) fueron inmunoprecipitados con anticuerpos para AIB1. Una vez lavados, los inmunocomplejos se hirvieron en tampón de carga dos veces consecutivas (1ª elución y 2ª elución) y se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 7.5%. El gel fue, posteriormente, teñido con Pro-Q Diamond, una tinción específica para proteínas fosforiladas. **B)** Las bandas teñidas fueron escindidas del gel, digeridas con tripsina y analizadas por espectrometría de masas (LC/MS/MS). En la tabla se muestran dos de las identificaciones más relevantes para la banda 1 y las 4 proteínas identificadas en la banda 2. Ambas bandas corresponden a la primera elución de los inmunoprecipitados mitóticos.

2.7. El complejo Cdk1-ciclina A no fosforila a AIB1 *in vitro*

Con objeto de identificar los sitios de fosforilación de AIB1 por Cdks, quisimos abordar el problema mediante una nueva estrategia. La proteína de AIB1 se fragmentó y se expresó en bacteria como proteína de fusión a GST (Fig. 44A). La fosforilación *in vitro* de los fragmentos con el complejo Cdk1-ciclina B1 en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ mostró que únicamente el fragmento C (693-933) era fosforilado por este complejo (Fig. 44C). Casualmente, este fragmento contiene el sitio consenso canónico de fosforilación por Cdks (serina 728). Para estudiar si AIB1 también podía ser fosforilado por el complejo Cdk1-ciclina A, se repitió el ensayo en presencia de este complejo quinasa. Los resultados revelaron que ninguno de los fragmentos era fosforilado por el complejo Cdk1-ciclina A2 (Fig. 44D). Estos resultados sugieren que AIB1 se estaría fosforilando justo a la entrada de mitosis, cuando el complejo Cdk1-ciclina B1 se activa.

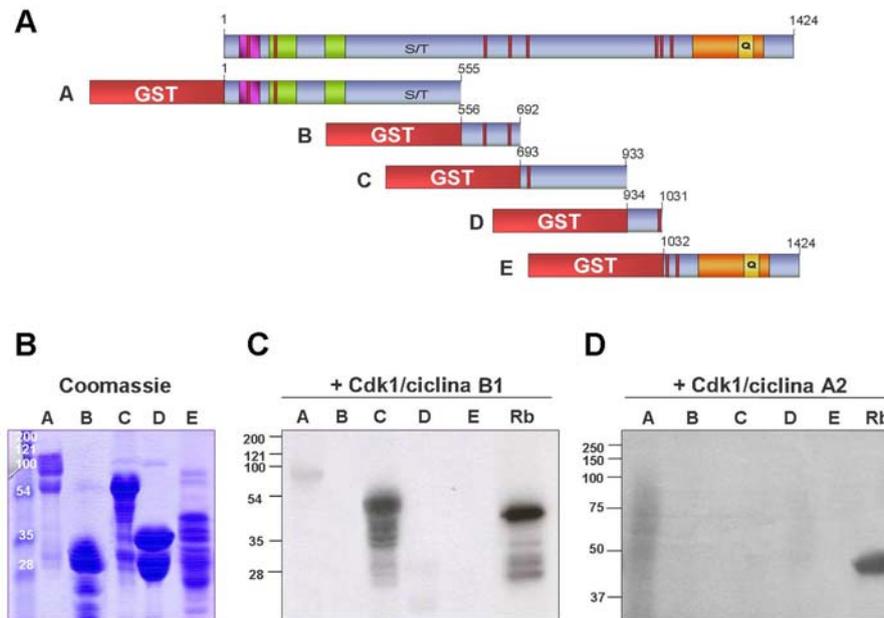


Figura 44: AIB1 es fosforilado *in vitro* por el complejo Cdk1-ciclina B, pero no por el complejo Cdk1-ciclina A. **A)** Esquema representativo de los fragmentos generados de AIB1 fusionados a GST. **B)** Tinción Coomassie de los diferentes fragmentos de AIB1 resueltos por SDS-PAGE. **C)** La misma cantidad que en B) de cada uno de los fragmentos purificados se incubó con el complejo Cdk1-ciclina B1 en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ durante 1 hora a 30°C. La mitad de la muestra se resolvió en un gel SDS-PAGE, el gel se secó y se expuso a una película autoradiográfica. Como control positivo de la reacción se utilizó el fragmento comprendido entre los aminoácidos 792 y 928 de la proteína del retinoblastoma fusionado a GST (Rb). **D)** En las mismas condiciones que en C), los fragmentos fueron incubados en presencia del complejo Cdk1-ciclina A2.

Una vez establecido que únicamente el fragmento C (693-933) era fosforilado por Cdk1, quisimos identificar los sitios mediante espectrometría de masas. La ventaja era que al tener el fragmento fusionado a GST, éste se podía obtener en cantidades aceptables mediante expresión en bacteria. Además, se evitaba la posible inespecificidad de los anticuerpos utilizados para inmunoprecipitar el AIB1 endógeno de las células. En la figura 45 se muestran los dos sitios, supuestamente fosforilados, encontrados en este

2.8. La fosforilación de AIB1 en mitosis es independiente del sitio consenso de unión a ciclina

El motivo de unión a ciclina se ha descrito en un amplio rango de sustratos de Cdks. Este motivo, conocido como motivo Cy o RXL, constituye, junto con el sitio consenso de fosforilación por Cdk [(S/T)PX(K/R)], una secuencia bipartita de reconocimiento para las quinasas dependientes de ciclina. La fosforilación óptima por Cdks se produce cuando este motivo está localizado a un mínimo de distancia del residuo fosforilable de entre 48 y 72 Å (Takeda et al., 2001). Cabe destacar que AIB1 contiene un motivo de este tipo localizado en la posición +11 de la serina 728 (Fig. 46A). Asumiendo la aproximación de 4 Å por residuo, la

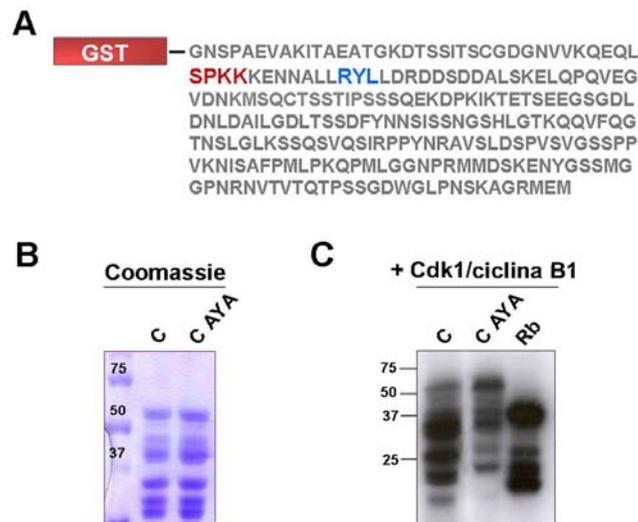


Figura 46: El mutante AYA es fosforilado *in vitro* por el complejo Cdk1-ciclina B1. **A)** Secuencia del fragmento C de AIB1 comprendido entre los aminoácidos 693 y 933. En rojo, sitio consenso de fosforilación por Cdk y en azul, motivo de reconocimiento por ciclinas. **B)** Tinción de Coomassie para las proteínas de fusión silvestre (C) y mutante (C AYA) de AIB1. **C)** Autorradiografía del gel SDS-PAGE en el que se resolvió la mitad del volumen de reacción de cada una de las proteínas híbridas incubadas con Cdk1-ciclina B1 en presencia de [γ - 32 P]ATP durante 1 hora a 30°C. La proteína del retinoblastoma fusionada a GST (Rb) fue utilizada como control positivo de la reacción.

distancia del sitio consenso corresponde a 44 Å, indicando que podría ser el motivo de reconocimiento por parte de la ciclina B. Para comprobarlo, la arginina y la leucina de este motivo (RYL) se sustituyeron por alaninas (AYA) en el fragmento C de AIB1 (693-933) fusionado a GST. Sin embargo, este mutante se siguió fosforilando *in vitro* por Cdk1-ciclina B1 (Fig. 46C), sugiriendo que la fosforilación de AIB1 por Cdk era independiente del sitio de reconocimiento de ciclinas.

2.9. La serina 728 es diana del complejo Cdk1-ciclina B

Con objeto de determinar si el complejo Cdk1-ciclina B podía fosforilar en el sitio consenso canónico de fosforilación por Cdks, se sustituyó la serina 728 por alanina en el fragmento C de AIB1 (693-933). Tanto la proteína híbrida no mutante como la proteína mutante fueron expresadas en bacteria y purificadas con glutatión sefarosa. Cantidades equivalentes de ambas proteínas, determinadas en un gel teñido con Coomassie (Fig. 47A), fueron sujetas a ensayo de fosforilación *in vitro* con Cdk1-ciclina B en presencia de [γ - 32 P]ATP. Los resultados revelaron que la intensidad de la marca radiactiva para el mutante era significativamente menor que para la proteína silvestre (Fig. 47B). Esta observación sugería que la serina 728 era fosforilada por el complejo Cdk1-ciclina B. Además, la presencia de señal radiactiva en el mutante indicaba la posible existencia de otros sitios de fosforilación por este complejo en el fragmento C. De hecho, ensayos con dobles mutantes demostraron que la serina 867 también era fosforilada por Cdk1-ciclina B (Fig. 47B).

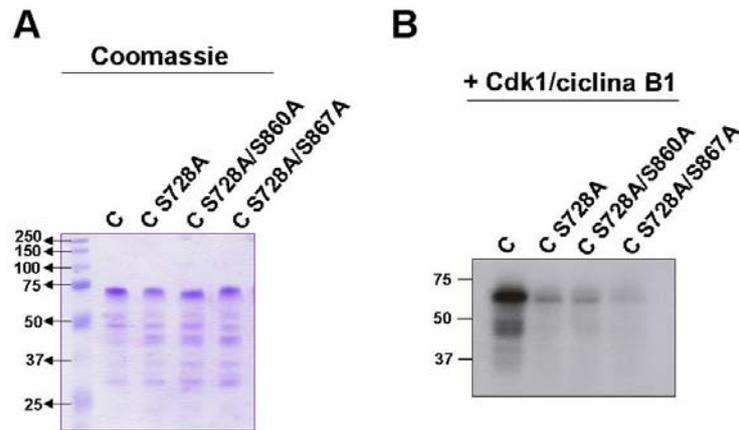


Figura 47: La mutación en la serina 728 de AIB1 causa un descenso en la fosforilación mediada por Cdk1-ciclina B. **A)** Tinción Coomassie mostrando cantidades equivalentes de las proteínas de fusión silvestre (C) y mutante (C S728A) de AIB1. **B)** Autorradiografía del gel en el que se resolvió la mitad de la reacción quinasa a la que se sometieron cada una de las proteínas híbridas con el complejo recombinante Cdk1-ciclina B1 en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ durante 1 hora a 30°C. El resultado es representativo de tres experimentos independientes.

2.10. Localización subcelular de la fosforilación de AIB1 en mitosis

Tinciones de inmunofluorescencia con anticuerpos para AIB1 en células MCF-7, así como en HeLa, A549 y H1299 (resultados no mostrados), revelaron que AIB1 estaba excluido de los cromosomas condensados en células mitóticas (Fig. 48). Esta observación podría ser interpretada como una posible función para la fosforilación de AIB1 en mitosis. Durante la interfase, las proteínas asociadas con la transcripción se distribuyen, generalmente, en el núcleo de las células. Sin embargo, durante la mitosis muchas de estas proteínas son excluidas de los cromosomas condensados y quedan dispersas por el interior de la célula. Como ejemplo más claro se puede citar el caso de la RNA polimerasa II

(Christova and Oelgeschlager, 2002). Dado que AIB1 es un coactivador de la transcripción, podría ocurrir que su fosforilación en mitosis tuviera relación con esta exclusión de la cromatina.

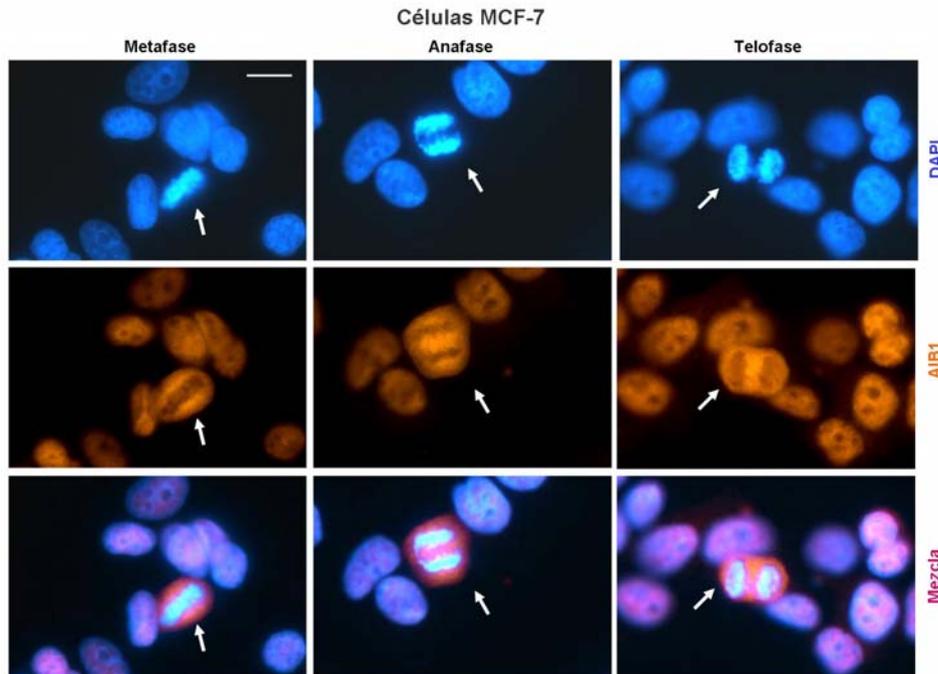


Figura 48: AIB1 está excluido de los cromosomas condensados en células mitóticas. Células MCF-7 crecidas en condiciones normales y teñidas con DAPI en azul y con anticuerpos anti-AIB1 en rojo (Cy3). Las flechas muestran células mitóticas con los cromosomas condensados. Línea, 10 μ m.

Con objeto de estudiar la localización de AIB1 en su estado fosforilado, se sincronizaron células MCF-7 y HeLa en mitosis con nocodazol. La detección simultánea de AIB1 no fosforilada y de AIB1 fosforilada fue posible, como se describió anteriormente, en las células que permanecían adheridas tras el tratamiento con nocodazol (ver figura 35C columna G2/M). El análisis por citometría de flujo demostró que más del

60% de estas células tenían un contenido 4N de DNA, es decir, estaban bloqueadas en G2/M (ver figuras 39A y 39B gráfica adheridas). Fraccionamientos subcelulares citosol/núcleo realizados en estas poblaciones celulares revelaron que la banda de menor migración, correspondiente a la forma fosforilada de AIB1, se localizaba en el citosol (Fig. 49). Estas observaciones sugerían que, quizás, la finalidad de la fosforilación de AIB1 en mitosis era excluir de la cromatina a este coactivador para, de algún modo, impedir su función transcripcional.

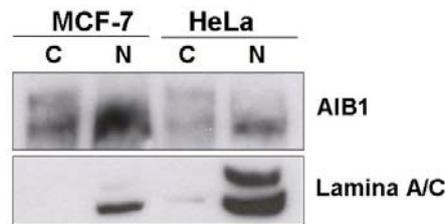


Figura 49: La forma fosforilada de AIB1 se localiza en el citosol de células bloqueadas en G2/M. Células MCF-7 y HeLa fueron bloqueadas en mitosis con nocodazol 150 ng/ml durante 17 horas. Las células que permanecían adheridas tras el tratamiento con el inhibidor fueron sujetas a fraccionamiento citosol (C)/núcleo (N). El análisis por “western blot” con anticuerpos para AIB1 reveló que la banda fosforilada de AIB1 se localizaba en el citosol en ambos casos. Anticuerpos anti-Lamina A/C se utilizaron para determinar la contaminación nuclear en el citosol.

Como se demostró en el apartado anterior, la serina 728 parecía ser un sitio importante de fosforilación, ya que su mutación suprimía en gran medida la fosforilación por Cdk1-ciclina B1. Con objeto de ver si los mutantes de esta serina a alanina para impedir la fosforilación en este sitio, o a ácido glutámico para mimetizarla, tenían una localización subcelular diferente a la de AIB1 silvestre, se transfectaron las construcciones plasmídicas en células COS-1. Las inmunofluorescencias revelaron que

tanto la proteína silvestre como las proteínas mutantes (AIB1 S728A y AIB1 S728E) estaban localizadas en el núcleo (Fig. 50). Si la finalidad de la fosforilación de AIB1 era enviar a este coactivador al citosol antes de la ruptura de la membrana nuclear, no quedaba reflejada en el mutante a ácido glutámico que debería haberse localizado en el citosol. Estos resultados indicaban que, o bien la función de la fosforilación de AIB1 no estaba relacionada con la regulación de su localización subcelular, o bien que la existencia de otros posibles sitios de fosforilación estaba compensando el efecto.

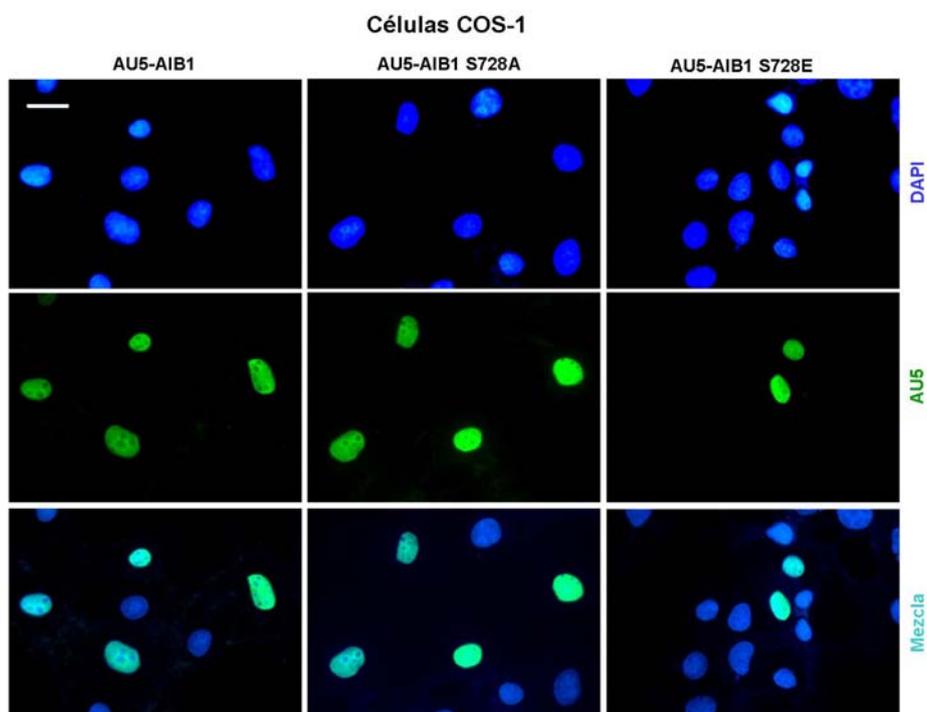


Figura 50: Los mutantes de AIB1 S728A y S728E se localizan en el núcleo de células COS-1. Células COS-1 fueron transfectadas con los plásmidos pCEFL-AU5-AIB1, pCEFL-AU5-AIB1 S728A y pCEFL-AU5-AIB1 S728E y, posteriormente, bloqueadas en mitosis con nocodazol. Dos días después de la transfección, las células se tiñeron con DAPI en azul y con anticuerpos anti-AU5 en verde (FITC). Línea, 10 μ m.

2.11. Actividad transcripcional de AIB1 en Mitosis

La entrada en mitosis en las células eucariotas va acompañada de una inhibición global de la transcripción, necesaria para la correcta división celular. Esta represión está regulada a diferentes niveles, entre los cuales la fosforilación de factores implicados en la transcripción es uno de los mecanismos más importantes (Gottesfeld and Forbes, 1997). Con objeto de examinar si la fosforilación de AIB1 en mitosis estaba relacionada con su actividad transcripcional, se realizaron experimentos de cotransfección de los plásmidos que contenían las proteínas AIB1 silvestre y AIB1 S728A fusionadas a Gal4-DBD junto con el indicador de luciferasa en células COS-1. Los resultados no revelaron diferencias significativas entre el silvestre y el mutante (Fig 51A), indicando que la actividad transcripcional intrínseca de AIB1 era independiente de la fosforilación en la serina 728.

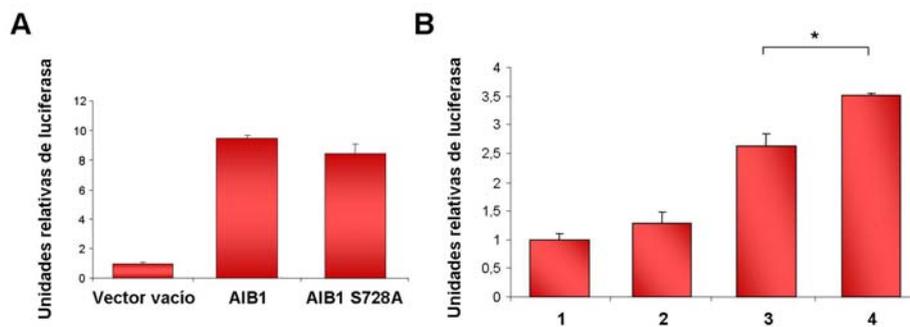


Figura 51: La fosforilación de AIB1 en S728 regula la coactivación de ER α . **A)** Células COS-1 se cotransfectaron con los plásmidos que contenían las proteínas AIB1 y AIB1 S728A fusionadas al dominio de unión al DNA de Gal4, conjuntamente con el indicador de luciferasa. 30 horas después de la transfección, las células se sincronizaron en mitosis con nocodazol 150 ng/ml durante 17 horas antes de cuantificar la actividad luciferasa. Los datos se presentan normalizados al control transfectado con plásmido vacío en forma de media \pm SE de triplicados. La significatividad ($p > 0,05$) se analizó mediante el test de Student. **B)** Células COS-1 se cotransfectaron con el plásmido EREtk-luciferasa y con los plásmidos pCMX-Gal4-DBD y pBABE vacíos (1); con los plásmidos pBABE-ER α y pCMX-Gal4-DBD (2) como control de la actividad del AIB1 endógeno; con los plásmidos pBABE-ER α y pCMX-Gal4-DBD-AIB1 (3); y con los plásmidos pBABE-ER α y pCMX-Gal4-DBD-AIB1 S728A (4). Las células se bloquearon en mitosis con nocodazol en las mismas condiciones que en A) y se trataron con estradiol 50 nM durante las últimas 5 horas del tratamiento con nocodazol. La gráfica muestra la media \pm SE de triplicados normalizados a (1) (* $p < 0,05$ en el test de Student).

También quisimos estudiar el impacto de la fosforilación en la función de AIB1 como coactivador. Para ello, se evaluó la transactivación mediada por el receptor de estrógenos α (ER α) utilizando un indicador de luciferasa bajo el control del elemento de respuesta a estrógenos (ERE2-tk-luciferasa). Células COS-1 fueron cotransfectadas con los plásmidos pBABE-ER α , pCMX-Gal4-DBD-AIB1 o pCMX-Gal4-DBD-AIB1 S728A y ERE-tk-luciferasa. El mutante S728 provocó un aumento significativo de la transcripción (Fig. 51B), indicando la posibilidad de que la forma fosforilada de AIB1 interaccionara y/o coactivara en menor medida al receptor de estrógenos. Todos los resultados anteriores sugieren que la fosforilación de AIB1 podría estar afectando a su función coactivadora, pero no a su actividad transcripcional intrínseca.

DISCUSIÓN

La señalización celular por receptores nucleares y otros factores de transcripción es un proceso complejo que implica la actuación de múltiples cofactores que regulan la actividad transcripcional. La expresión alterada o la modificación de estos cofactores puede resultar en cambios en la expresión génica, provocar alteraciones en el ciclo celular y dar lugar a patologías diversas, incluyendo el cáncer. Por eso, es muy importante que la cantidad y función de estos moduladores esté bien regulada.

AIB1 es un coactivador de receptores esteroideos, así como de otros factores de transcripción, que ha sido fuertemente implicado en cáncer. Un gran número de evidencias revela que AIB1 es un oncogén. La generación del modelo transgénico de ratón MMTV-AIB1 claramente indica que AIB1 es suficiente para iniciar la tumorigénesis (Torres-Arzayus et al., 2004). Además, la amplificación y sobreexpresión de este coactivador existe en una gran variedad de cánceres e integra varias vías de señalización, como las mediadas por receptores nucleares, HER2/neu, IGF/AKT, NF- κ B y el ciclo celular (Lahusen et al., 2009; Xu et al., 2009). La regulación de la proliferación, supervivencia y migración celulares a través de estas vías sugiere un papel central para AIB1 en la tumorigénesis. Por otra parte, la deficiencia de AIB1 en modelos murinos disminuye la incidencia tumoral y bloquea las metástasis, a pesar de la presencia de los oncogenes H-ras o Neu (Fereshteh et al., 2008; Kuang et al., 2004). Todas estas evidencias indican que AIB1 podría representar una diana muy atractiva en la terapia contra el cáncer.

Desde la identificación de AIB1, se han realizado diversos estudios para investigar su estructura molecular, sus funciones fisiológicas, los mecanismos intermoleculares que regula, y sus efectos patológicos. Sin embargo, aunque se ha progresado mucho en el entendimiento de la función de AIB1 y en cómo influencia la tumorigénesis integrando varios mecanismos moleculares, todavía quedan por aclarar cuestiones importantes referentes a cómo se consigue su sobreexpresión o exceso de

proteína. Los mecanismos moleculares responsables de la amplificación génica y la sobreexpresión de AIB1 todavía no están bien definidos. Un número limitado de estudios ha sugerido que el aumento de los niveles de AIB1 en cáncer se puede atribuir tanto a su activación transcripcional como a la estabilización postranscripcional de este coactivador (Mussi et al., 2006). No obstante, la regulación de la estabilidad proteica de AIB1 representa otro mecanismo importante para incrementar los niveles de esta molécula en cáncer.

En la presente tesis se han estudiado algunos de los factores implicados en la regulación de la estabilidad y degradación de la proteína de AIB1, así como la naturaleza y posible función de una nueva forma mitótica encontrada para este coactivador y producida por modificación postraduccional.

1. ESTUDIO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE AIB1

1.1. Diferencias en la distribución celular y en la estabilidad de AIB1 en varias líneas celulares

En el presente estudio se ha visto que el contenido nuclear de AIB1 varía entre líneas celulares de cáncer. AIB1 es principalmente citosólico en las líneas celulares HeLa y H1299, mientras que es mayoritariamente nuclear en MCF-7 y A549. La diferente localización subcelular de AIB1, dependiendo del tipo celular y del estado de diferenciación y/o proliferación, ya ha sido demostrada anteriormente (Qutob et al., 2002). En un trabajo realizado en nuestro laboratorio se ha observado una correlación entre la incorporación de bromodeoxiuridina y la localización nuclear para AIB1 en células epiteliales de la glándula mamaria murina (Avivar et al., 2006).

Parece, por tanto, que la localización de AIB1 tiene una regulación dinámica con el ciclo celular.

Basándonos en las diferencias encontradas en la localización de AIB1 en diversas líneas celulares, quisimos estudiar una posible relación entre la localización y estabilidad de este coactivador. Existen estudios controvertidos acerca de si AIB1 se degrada en el citosol (Mani et al., 2006) o en el núcleo (Li et al., 2007a). Utilizando células HeLa, MCF-7, H1299 y A549 como modelos biológicos, nosotros hemos observado que la localización nuclear de esta molécula oncogénica correlaciona con una menor vida media, y a la inversa. Ensayos con ciclosporina A, que produce una mayor localización citosólica de AIB1 al bloquear las células en G₀, apoyan la mayor estabilidad del AIB1 citosólico. Por otra parte, el bloqueo de la síntesis proteica y posterior fraccionamiento subcelular demuestra que sólo el contenido nuclear de AIB1 disminuye. Todas estas evidencias indican que la distribución subcelular es un factor importante en la estabilidad de AIB1 y apoyan que esta molécula podría estar degradándose en el núcleo.

La actividad del receptor de estrógenos ha sido otro de los factores que hemos tenido en cuenta a la hora de estudiar la estabilidad de AIB1. Se conoce que el 17- β -estradiol reprime la transcripción y expresión de AIB1 en las células de cáncer de mama MCF-7 y que este efecto es revertido por la adición de antiestrogénicos o ácido retinoico (Lauritsen et al., 2002). Nuestros resultados demuestran que en presencia de 17- β -estradiol la estabilidad de AIB1 disminuye, mientras que aumenta en presencia de moduladores selectivos del receptor de estrógenos o SERMs (tamoxifeno e ICI182780). En presencia de estos antiestrogénicos, los niveles de AIB1 aumentan en el citosol, sugiriendo que la actividad del receptor de estrógenos podría estar modulando la estabilidad de AIB1, al afectar su localización subcelular. Curiosamente, la línea celular MCF-7 contiene mayores niveles de receptor de estrógenos que HeLa. Por tanto,

las diferencias de estabilidad de AIB1 en estas líneas celulares podrían atribuirse a diferencias en el contenido y actividad de este receptor nuclear.

1.2. AIB1 se degrada en el núcleo por el sistema ubiquitina-proteasoma

La degradación nuclear de AIB1 ha sido corroborada mediante el uso del antibiótico leptomicina B, que inhibe la exportación nuclear por CRM1. La presencia de este inhibidor produce una disminución de la actividad transcripcional intrínseca de AIB1, así como de sus niveles en células MCF-7 tanto en presencia como en ausencia de suero en el medio de cultivo. Además, este descenso es rescatado por el inhibidor del proteasoma MG132, indicando que la degradación de AIB1 en el núcleo está mediada por el proteasoma. Una interpretación para el hecho de que la recuperación de los niveles de AIB1 no sea completa tras el tratamiento con los dos inhibidores, leptomicina B y MG132, es que el descenso de AIB1 causado por la leptomicina B pueda ser independiente de la degradación mediada por el proteasoma. Sin embargo, si esto fuera cierto, el tratamiento con leptomicina B y el tratamiento con ambos inhibidores habrían producido el mismo resultado. Otra explicación más plausible es que la leptomicina B reduzca los niveles de AIB1 por dos mecanismos distintos: por la inhibición de la exportación nuclear de RNAs mensajeros y por impedir que AIB1 salga al citosol.

Por otra parte, la observación de que la leptomicina B causa una acumulación nuclear de AIB1 en células HeLa, donde este coactivador es principalmente citosólico, sugiere que el transporte de AIB1 entre el núcleo y el citosol es dinámico, y que la mayor estabilidad en células HeLa podría deberse a una mayor exportación nuclear de AIB1 en esta línea celular. No hemos encontrado diferencias significativas en células HeLa y MCF-7 en la expresión de SIP e importina $\alpha 3$, dos moléculas implicadas en el transporte

al núcleo de AIB1 (Yeung et al., 2006; Zhang et al., 2007). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que existan diferencias celulares específicas que regulen el nivel de activación de estas proteínas.

La mayor estabilidad de AIB1 en células HeLa podría deberse, por tanto, a un menor contenido y actividad del receptor de estrógenos y a una mayor exportación de AIB1 al citosol, pero ¿existen diferencias en cuanto a la ubiquitinación de AIB1 en células HeLa y MCF-7? En las células eucariotas, el sistema ubiquitina-proteasoma media la degradación de numerosas proteínas, como factores de transcripción, receptores nucleares, proteínas reguladoras del ciclo celular, etcétera. Los coactivadores de receptores nucleares son diana de este sistema de degradación (Yan et al., 2003). Además, AIB1 puede degradarse de manera independiente de ATP y ubiquitina por el proteasoma REGγ (Li et al., 2006). Los experimentos de coimmunoprecipitación en células transfectadas con HA-ubiquitina demuestran que AIB1 es ubiquitinado en nuestros modelos celulares. Sin embargo, no se observan diferencias entre células HeLa y MCF-7, sugiriendo que la elevada estabilidad de AIB1 en HeLa no es debida a defectos en la ubiquitinación en esta línea celular.

Para estudiar la poliubiquitinación de AIB1 se han utilizado dos modelos celulares bien establecidos: la línea HeLa 6xHis-ubiquitina y la línea termosensible E36-ts20. Gracias a la compatibilidad de la purificación de proteínas marcadas con His-ubiquitina con condiciones desnaturizantes y, por tanto, a la posibilidad de eliminar cualquier actividad desubiquitinasa, la línea celular HeLa 6xHis-ubiquitina ha permitido poner de manifiesto el típico bandeo de poliubiquitinas de AIB1. Por su parte, la línea E36-ts20, que contiene una mutación termosensible en la enzima activadora de ubiquitinas E1, ha sido útil para corroborar la degradación nuclear de AIB1 por el sistema ubiquitina-proteasoma. Hemos demostrado que a la temperatura no permisiva, en la cual E1 no es activa, se suprime la degradación de AIB1 mediada por ubiquitinación, ya que los

niveles de este coactivador son más elevados en comparación con las células crecidas a temperatura permisiva, donde la vía es activa. Adicionalmente, la acumulación de AIB1 en el núcleo de las células crecidas a temperatura no permisiva es revertida en presencia de una E1 funcional. Estos resultados demuestran que AIB1 es diana del sistema ubiquitina-proteasoma y que se degrada en el compartimento nuclear.

1.3. En busca de la ubiquitina ligasa de AIB1

La conjugación de ubiquitina a las proteínas diana implica tres pasos consecutivos mediados por la actividad de un sola enzima activadora de ubiquitinas (E1), varias enzimas conjugadoras de ubiquitinas (E2) y múltiples enzimas ligasa de ubiquitinas (E3). En humanos, alrededor de 600 ubiquitina ligasas aseguran la especificidad de sustrato. Encontrar la ubiquitina ligasa de AIB1 y ver si existían posibles alteraciones a este nivel que favorecieran el exceso de AIB1 en las células era un objetivo bastante tentador. Al inicio de este trabajo, no se conocía la ubiquitina ligasa de AIB1.

Un grupo emergente de proteínas que interaccionan con receptores nucleares está constituido por proteínas previamente identificadas como componentes del sistema de degradación ubiquitina-proteasoma. Como ejemplos se pueden citar a SUG-1 (Ferry et al., 2009), UBC9 (Poukka et al., 1999) y E6-AP (Nawaz et al., 1999). E6-AP es una ubiquitina ligasa que media la interacción de la proteína E6 del virus del papiloma humano tipo 16 y 18 con el supresor de tumores p53, induciendo su degradación por la vía ubiquitina-proteasoma (Cooper et al., 2003). En 1999 Nawaz y colaboradores demostraron una nueva función para E6-AP como coactivador de receptores nucleares (Nawaz et al., 1999). Además, se ha visto que esta ubiquitina ligasa puede promover la degradación de ER α (Gao et al., 2005). Estas dos evidencias propusieron a E6-AP como candidata para mediar la degradación de AIB1, al formar parte del mismo complejo coactivador. De manera similar, se ha observado que la ubiquitina

ligasa MDM-2 potencia la función de ER α en células de cáncer de mama (Saji et al., 2001), y media la degradación de los receptores de glucocorticoides y de andrógenos (Gaughan et al., 2005; Kinyamu and Archer, 2003). Sin embargo, estudios previos en el laboratorio demostraron que el silenciamiento individual de estas dos ubiquitina ligasas producía un descenso en los niveles de AIB1 en células MCF-7, HeLa, A549 y H1299, sugiriendo que E6-AP y MDM-2 no promovían la degradación de AIB1, sino que más bien lo estabilizaban. Más tarde, Mani y colaboradores observaron que E6-AP inducía la ubiquitinación y degradación de AIB1 en células COLO 357 PL, derivadas de un carcinoma pancreático humano, y en células ME-180, derivadas de un carcinoma cervical humano (Mani et al., 2006). No descartamos la posibilidad de que estos resultados contradictorios sean debidos a diferencias celulares específicas.

En un principio, se observó una menor intensidad de la fluorescencia para AIB1 en células mitóticas, sugiriendo que este coactivador podría estar degradándose en mitosis. Ensayos con inmunoprecipitados de AIB1 de células MCF-7 y lisados de ovocitos de *Xenopus laevis* bloqueados en mitosis confirmaron esta hipótesis, ya que el análisis por "western blot" mostraba una disminución de los niveles de AIB1. Estos resultados preliminares nos llevaron a considerar los complejos SCF (proteínas Skp1, Cul1 y F-box) y el complejo promotor de la anafase (APC) o ciclosoma como posibles ubiquitina ligasas de AIB1, por ser éstos importantes reguladores de la degradación de componentes del ciclo celular (Yamasaki and Pagano, 2004). En nuestras condiciones, no observamos interacción entre AIB1 y Skp1. Sin embargo, a diferencia de nuestras observaciones, recientemente se publicó que SCF^{Fbw7} ubiquitinaba y promovía la degradación de AIB1 (Wu et al., 2007). La presencia de dos motivos de destrucción D-box en la secuencia de AIB1, encontrados en numerosas proteínas mitóticas ubiquitinadas por APC (Zachariae and Nasmyth, 1999), sugería una implicación de este motivo en la degradación

de este coactivador. No obstante, la mutación dirigida de estas cajas de destrucción no impidió la degradación de AIB1, indicando que la regulación de los niveles de esta molécula oncogénica por el proteasoma podría ser independiente de estos motivos D-box. El análisis de la expresión de AIB1 en las distintas fases del ciclo celular por “western blot”, que será discutido más tarde, junto con los resultados obtenidos en ensayos de incubación de $^{35}\text{S}_{\text{Met}}\text{-AIB1}$ con lisados de ovocitos de *Xenopus* apoyaron que, a diferencia de lo que se había observado previamente, AIB1 no estaba degradándose en mitosis. Puesto que el complejo APC se activa al ser fosforilado por Cdk1-ciclina B en mitosis (Kraft et al., 2003), era probable que esta ubiquitina ligasa no estuviera mediando la degradación de AIB1.

El análisis comparativo de la expresión de genes entre ratones transgénicos para AIB1 y ratones silvestres, realizados anteriormente en nuestro laboratorio, reveló que la ubiquitina ligasa ZNRF era reprimida cuando se sobreexpresaba AIB1. ZNRF está altamente expresada en el sistema nervioso durante el desarrollo, y su actividad ubiquitina ligasa está implicada en el mantenimiento de la plasticidad y transmisión neuronal (Araki and Milbrandt, 2003). Los resultados negativos obtenidos en ensayos de coinmunoprecipitación apuntaban a que esta proteína tampoco promovía la degradación de AIB1.

Aunque tampoco fuimos capaces de identificar posibles ubiquitina ligasas mediante técnicas como el “cross-linking” con formaldehído o el “Far Western Blot”, actualmente se conocen tres ubiquitina ligasas para AIB1: E6-AP (Mani et al., 2006), SCF^{Fbw7} (Wu et al., 2007) y CHIP (Kajiro et al., 2009). Estudios recientes han revelado que las ubiquitina ligasas juegan importantes papeles en la carcinogénesis de la glándula mamaria. De hecho es frecuente encontrar deleciones, amplificaciones, mutaciones o expresión aberrante de E3s en cáncer de mama (Chen et al., 2006). En concreto, Kajiro y colaboradores han observado una correlación inversa entre el estadio tumoral y los niveles de CHIP, y han demostrado que CHIP suprime

el potencial metastático de células de cáncer de mama a través de la degradación de AIB1 (Kajiro et al., 2009). En este caso, la reducida actividad de la maquinaria de ubiquitinación puede llevar al aumento de proteínas oncogénicas en las células tumorales. Además, CHIP puede ubiquitinar otras proteínas oncogénicas como HER2/neu (Xu et al., 2002), con lo que no se pueden descartar los efectos de otras proteínas en la progresión tumoral. Sin embargo, tanto CHIP como AIB1 podrían ser consideradas como excelentes candidatas a dianas antitumorales.

1.4. La secuencia PEST es requerida para desestabilizar a AIB1

El reconocimiento del sustrato que va ser degradado se realiza a menudo a través de ubiquitina ligasas. Numerosas proteínas sustrato contienen elementos, conocidos con el nombre de degrones, que promueven la ubiquitinación. Algunos de estos degrones han sido caracterizados, como la caja de destrucción D-box. Los llamados motivos PEST son secuencias hidrofílicas ricas en prolina, ácido glutámico, serina y treonina que están flanqueadas con frecuencia por aminoácidos cargados positivamente. Los motivos PEST se encuentran en numerosas proteínas eucariotas inestables y sirven de señal proteolítica o degrón (Rechsteiner and Rogers, 1996). El análisis de la secuencia proteica de AIB1 con el programa PESTfind identificó una secuencia potencial de este tipo entre los aminoácidos 647-672. Nuestros resultados muestran que cuando se deletiona la secuencia PEST (en el fragmento de AIB1 comprendido entre los aminoácidos 673-1424), AIB1 es más estable, sugiriendo un papel en la degradación de este coactivador. Sería interesante deletionar sólo el motivo PEST en la secuencia completa de AIB1 para ver si se reproducen los resultados y confirmar que las diferencias de estabilidad observadas

entre los fragmentos 556-1424 y 673-1424 (sin PEST) se deben exclusivamente a la pérdida de esta secuencia.

La modificación por ubiquitina sirve como elemento de reconocimiento por el proteasoma, pero a veces no es suficiente para la degradación de proteínas plegadas. Algunas proteínas requieren una región sin estructura que sea hidrolizada en primer lugar para acelerar la degradación por el proteasoma (Prakash et al., 2004). Las secuencias PEST a menudo representan secuencias sin estructura en las proteínas (Singh et al., 2006). Debido a la relativa cercanía de la secuencia PEST con los sitios de ubiquitinación K723 y K786, que median la degradación de AIB1 (Wu et al., 2007), podría pensarse un proceso similar en la degradación de esta molécula oncogénica. El fragmento 673-1424 podría ser ubiquitinado, pero su degradación sería más lenta, al haber perdido la secuencia PEST (Fig. 32C).

En algunos factores de transcripción, degradados por el proteasoma 26S, los elementos de destrucción y los dominios de activación han evolucionado en estrecha relación para acoplar los mecanismos de activación transcripcional y degradación (Salghetti et al., 2000). Debido a que la secuencia PEST se encuentra en el dominio de interacción con receptores nucleares, esencial para la transactivación mediada por éstos, es posible que un mecanismo similar haya evolucionado también en AIB1.

1.5. Señalización por AKT y estabilidad de AIB1

Un resultado interesante de este trabajo es la estabilidad de AKT activo o P-AKT en las células MCF-7 en comparación con HeLa. La depleción del suero es menos efectiva a la hora de reducir los niveles de P-AKT en células MCF-7. Además, la ausencia prolongada de los estrógenos puede causar un bloqueo del crecimiento de las células MCF-7 sin producir una disminución significativa de los niveles de P-AKT. Esta sostenida activación de AKT es probablemente debida a una mayor expresión de AKT

en células MCF-7. La sobreexpresión de AIB1 en esta línea celular podría jugar un papel en los mayores niveles de AKT. De hecho, como se explicaba en la introducción (apartado 5.2.2.1), existe una correlación entre AIB1 y los niveles de expresión de componentes de la vía de señalización IGF/PI3K/AKT (Yan et al., 2006). Por ejemplo, la delección de AIB1 con RNA de interferencia en células MCF-7 reduce la expresión de IGF-IR y proteínas IRS que a su vez disminuyen la activación de AKT tras la estimulación con IGF (Oh et al., 2004). Sin embargo, deben existir otros mecanismos específicos de células MCF-7 para explicar la mayor activación de AKT, ya que en células A549, que también sobreexpresan AIB1, la actividad de AKT es comparativamente normal. Por otra parte, la ausencia de suero o estrógenos en la línea celular MCF-7 causa un ligero incremento en los niveles de AIB1. Esta acumulación difiere de lo que ocurre en células HeLa, A549 o H1299, donde los niveles permanecen constantes o incluso disminuyen en ausencia de suero. Estos resultados contradicen a lo publicado anteriormente, ya que se ha observado que la ausencia de suero en MCF-7 causa la ubiquitinación y degradación de AIB1 (Mani et al., 2006). Parece que los mayores niveles de AKT activo en la línea celular MCF-7 en condiciones restrictivas de crecimiento son suficientes para estabilizar los niveles de AIB1. No descartamos la posibilidad de que la ausencia de suero o de estrógenos impida la fosforilación y/o translocación de AIB1 al núcleo, donde supuestamente se degradaría.

Nuestros datos muestran que la vía PI3K/AKT confiere estabilidad a AIB1. Hemos observado que sólo los fragmentos de AIB1 que contienen la región central son estabilizados por AKT. Una posible explicación es que AKT inhiba la ubiquitinación de estos fragmentos. La inhibición de la ubiquitinación por AKT ha sido descrita previamente en otras moléculas, tales como MDM2 y XIAP (Dan et al., 2004; Feng et al., 2004). La estabilización de AIB1 por la vía AKT está de acuerdo con los resultados

publicados en la literatura. Se ha observado que AIB1 puede ser fosforilado por la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) en la serina 505 en células MCF-7, resultando en su activación transcripcional y posterior degradación por el proteasoma (Wu et al., 2007). GSK3 es una serina/treonina quinasa por debajo de AKT y es inhibida por fosforilación mediada por esta quinasa (Jope and Johnson, 2004), de manera que AKT podría estar estabilizando a AIB1 a través de este mecanismo. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que debe existir un mecanismo regulador de la degradación de AIB1 alternativo al mediado por la quinasa GSK3 y la E3 Fbw7, ya que el fragmento de AIB1 que no posee el sitio de fosforilación por GSK3 sigue siendo ubiquitinado y degradado por el proteasoma, además de ser estabilizado por la vía PI3K/AKT. A diferencia de la fosforilación por GSK3, que causa la degradación de AIB1, la fosforilación por PKC atípica en un degrón del extremo carboxi-terminal de AIB1 impide su interacción con la subunidad C8 del proteasoma y lo protege de la degradación de manera dependiente de ER (Yi et al., 2008). PKC es un conocido sustrato para la vía de señalización PI3K/PDK1 (Le Good et al., 1998). Nuestros resultados son diferentes pero complementarios a esta publicación, ya que proporcionan un mecanismo alternativo para estabilizar a AIB1 mediado por AKT, otro efector de la quinasa PDK1.

Los resultados anteriores podrían ser relevantes en la resistencia a la terapia endocrina. Ha sido descrito que altos niveles de AIB1 y HER2/neu exhiben una clara y severa resistencia a la terapia con moduladores selectivos del receptor de estrógenos (Osborne et al., 2003). Se han propuesto diversos mecanismos independientes para explicar el desarrollo de esta resistencia y, curiosamente, AIB1 está implicado en todos ellos. Uno de estos mecanismos explica la resistencia a través de la actividad agonista del tamoxifeno. Debido a que HER2/neu activa a MAPK, y esta quinasa a su vez fosforila a ER y activa a AIB1 (Font de Mora and Brown, 2000), la sobreexpresión de HER2/neu y AIB1 aumentan significativamente

la actividad agonista del tamoxifeno y, por tanto, reducen su actividad antitumoral en pacientes con cáncer de mama (Smith et al., 1997). Otro de los mecanismos implica al represor de la transcripción de HER2/neu mediada por ER, PAX2. Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en células MCF-7 han permitido la identificación de un sitio de unión a ER en un intrón de la región genómica de HER2/neu. El tratamiento con tamoxifeno o con estrógenos induce el reclutamiento de PAX2 a este sitio de unión. No obstante, el exceso de AIB1 compite con PAX2 por el sitio de unión, resultando en una mayor expresión de HER2/neu y en el desarrollo de la resistencia endocrina (Hurtado et al., 2008). La amplificación del gen de AIB1 en el locus 20q12 es una de las razones por las que se produce la sobreexpresión de AIB1 (Anzick et al., 1997). Sin embargo, esta amplificación ocurre sólo en el 10% de los tumores, mientras que AIB1 se encuentra sobreexpresado en un 60% aproximadamente. Por tanto, deben existir otros mecanismos alterados en cáncer que participen en el incremento de los niveles de AIB1. Uno de estos mecanismos podría hacer referencia precisamente a la vía PI3K/AKT (frecuentemente alterada en cáncer) que estabilizaría la proteína de AIB1 inhibiendo su ubiquitinación y su degradación por el proteasoma. No sabemos si esta estabilización es directa, a través de la fosforilación de AIB1 por AKT, o indirecta. En tumores que sobreexpresan el oncogén HER2/neu, la activación de la vía PI3K/AKT podría estabilizar los niveles de AIB1 y, por tanto, su capacidad oncogénica (Fig. 52).

1.6. Actividad transcripcional intrínseca y degradación de AIB1

La importancia del sistema ubiquitina-proteasoma en células eucariotas ha sido reconocida en la regulación del ciclo celular, en transducción de la señal y en la diferenciación celular. Sin embargo, recientemente, se ha asociado a la transcripción génica mediada por

receptores nucleares. La inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma suprime las actividades transcripcionales de los receptores de estrógenos,

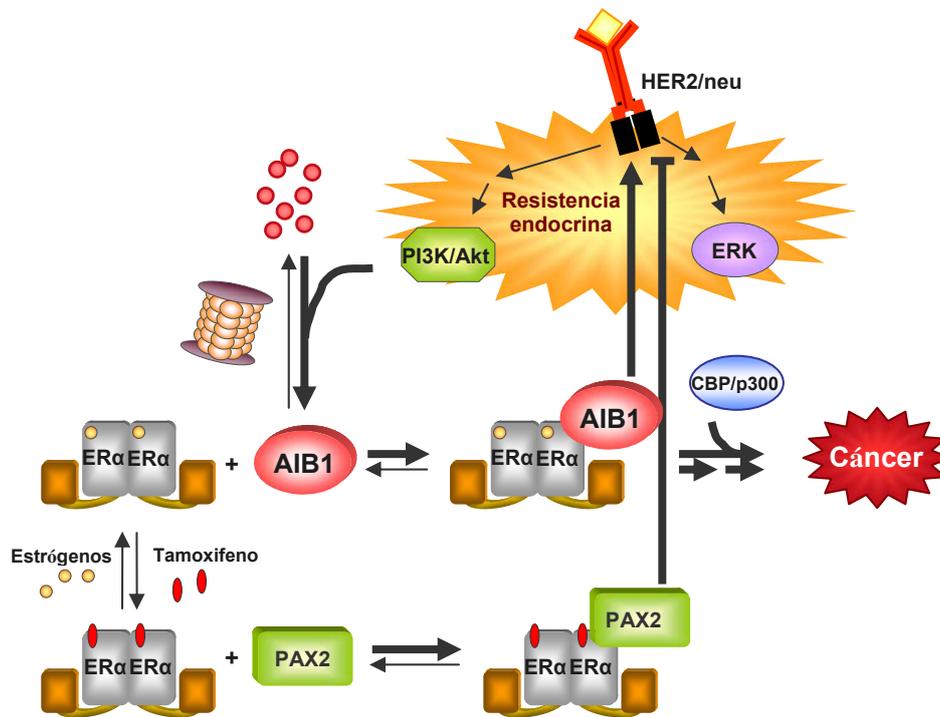


Figura 52: Mecanismos de resistencia a tamoxifeno. Se han postulado varios mecanismos para explicar la resistencia a la terapia endocrina. ER unido a tamoxifeno recluta a PAX2 y reprime la transcripción de HER2/neu. Pacientes con tumores PAX2 negativos desarrollan resistencia y tienen pobre pronóstico. El exceso de AIB1 compite con PAX2 e induce la transcripción de HER2/neu. La activación de la vía de señalización PI3K/AKT previene la degradación proteasomal de AIB1, resultando en su sobreexpresión y suprimiendo el efecto antiestrogénico del tamoxifeno. Finalmente, la fosforilación y activación de AIB1 por ERK1,2 permite el reclutamiento de CBP/p300, lo que induce la activación de la transcripción.

progesterona y hormona tiroidea, a pesar de que sus niveles proteicos aumentan, sugiriendo que el recambio de estos receptores es importante en la transcripción mediada por éstos (Lonard et al., 2000). Por el contrario,

nosotros hemos observado que este efecto no ocurre en la actividad transcripcional intrínseca de AIB1. La capacidad de AIB1 para estimular la transcripción aumenta en presencia de los inhibidores del proteasoma MG132 y epoxomicina, siempre y cuando los dominios 673-979 y 1133-1424 estén presentes simultáneamente en la molécula. Resultados similares se observan para el resto de miembros de la familia SRC y también para la histona acetiltransferasa CBP (Lonard et al., 2000). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que las conformaciones estructurales de las proteínas de fusión a Gal4 o del complejo coactivador formado en torno al elemento de respuesta a Gal4 en el promotor del gen indicador de luciferasa no sean las propicias para observar el mismo efecto que en ciertos receptores nucleares, como ER α .

Se ha descrito que componentes del proteasoma son reclutados a los promotores de genes diana para mediar tanto la degradación como la eficiente elongación de la transcripción mediada por determinados factores, como p53 y VP16 (Zhu et al., 2007; Zhu et al., 2004). Por ejemplo, Sug-1 y S1, componentes de la subunidad 19S del proteasoma, son reclutados a la región promotora de p21^{waf1} en un patrón cinético similar al reclutamiento de p53, sugiriendo una regulación del proteasoma en la transcripción mediada por este factor de transcripción (Zhu et al., 2007). Además, la ocupación de Sug-1 y S1 en el promotor de p21^{waf1} es más pronunciada tras el tratamiento con MG132. Debido a que la inhibición del proteasoma causa una acumulación de las formas ubiquitinadas de las proteínas y que la partícula reguladora 19S es necesaria para el reconocimiento de sustratos ubiquitinados, podría ocurrir que el reclutamiento del proteasoma a regiones promotoras de genes diana fuera a través de cadenas de ubiquitina unidas a las proteínas reguladoras. Varias subunidades del proteasoma 19S tienen funciones diferentes a la proteólisis. Estudios genéticos en levadura han sugerido un papel para la ATPasa Sug-1 en la activación de la transcripción (Ferdous et al., 2001). Estos mismos autores

han demostrado que el proteasoma 19S es capaz de activar potentemente la elongación transcripcional *in vivo* e *in vitro* por un mecanismo independiente de la proteólisis. Se ha visto que la subunidad Sug-1 interacciona con el factor de transcripción TFIID y, en consecuencia, se piensa que potencia de manera directa la actividad de la RNA polimerasa II (Weeda et al., 1997). Curiosamente, Sug-1 interacciona con AIB1 y contribuye a la transcripción de los genes diana del receptor de ácido retinoico (Ferry et al., 2009). A partir de estas líneas de evidencias, sería razonable pensar que el aumento de la activación transcripcional por parte de AIB1 en presencia de los inhibidores del proteasoma fuera debido no sólo a un incremento en los niveles de este coactivador, sino también a un mayor reclutamiento de la partícula 19S u otros cofactores al promotor de la luciferasa. De esta manera, se explicaría el aumento de la actividad transcripcional intrínseca producida por la inhibición del proteasoma en el fragmento 673-1424 que es más estable y apenas aumenta tras el tratamiento con MG132. Por último, ¿qué explicación tendría el hecho de que se suprima el aumento de actividad transcripcional tras la inhibición del proteasoma en los fragmentos 578-1131, 980-1424 y 1133-1424 de AIB1? Una posible interpretación sería que fuera necesaria la presencia de los tres sitios de ubiquitinación contenidos en la secuencia de AIB1. De hecho, los resultados con el triple mutante de AIB1 K723R/K786R/K1194R no muestran una mayor actividad transcripcional intrínseca cuando se inhibe el proteasoma (Fig. 33B). La presencia de los tres sitios de ubiquitinación, por tanto, podría ser crucial para el reclutamiento de componentes del proteasoma y la correcta activación transcripcional dependiente de éste.

1.7. ¿Existen otros mecanismos para la degradación de AIB1?

Ha sido demostrado que la ubiquitinación en las lisinas K723 y K786 es importante para la degradación de AIB1, a diferencia de la ubiquitinación en K1194 (Wu et al., 2007). Nuestros resultados están de acuerdo con

estas observaciones. Los mutantes K723R y K786R y el triple mutante K723R/K786R/K1194R parecen ser más estables, como se deduce de su mayor actividad transcripcional intrínseca. Contrariamente, el mutante K1194 conduce a un descenso significativo de la actividad transcripcional, sugiriendo que la ubiquitinación en esta lisina podría servir para la actividad transcripcional en lugar de la degradación. Desde su descubrimiento en los años 70, la ubiquitina ha sido asociada a la eliminación de proteínas dañadas. Sin embargo, se han descrito recientemente nuevas funciones biológicas para esta pequeña proteína, incluyendo regulación del tráfico intracelular, interacciones proteína-proteína y regulación de la transcripción (Aguilar and Wendland, 2003; Conaway et al., 2002). Se ha propuesto que según la longitud y los residuos que intervienen en la formación de las cadenas de ubiquitinas, la ubiquitinación desempeña diferentes funciones. Por ejemplo, la monoubiquitinación está relacionada con endocitosis (Hicke, 2001), mientras que se requiere un mínimo de 4 unidades de ubiquitina unidas entre sí a través de la lisina 48 para la degradación proteasomal (Pickart, 2000). En el caso de AIB1, la monoubiquitinación en los residuos K723 y K786 promueve la interacción dependiente de ligando con ER α y la activación transcripcional mediada por este receptor (Wu et al., 2007). La ubiquitinación en K1194 podría promover de manera similar la activación transcripcional por un mecanismo aún desconocido.

El proceso de la degradación proteica es necesario para la supervivencia celular. El recambio de proteínas asegura la eliminación de proteínas dañadas y le permite a la célula disponer, en el momento adecuado, de una concentración propicia de determinadas proteínas para llevar a cabo diversas funciones. En las células eucariotas existen numerosos sistemas de degradación, siendo los más importantes los lisosomas, el sistema ubiquitina-proteasoma y las enzimas llamadas calpaínas.

La degradación de AIB1 por el sistema ubiquitina-proteasoma ha sido demostrada en este trabajo y anteriormente (Lonard et al., 2000; Yan et al., 2003). Se conocen diversas E3 que marcan a AIB1 con ubiquitina para, posteriormente, ser reconocida y degradada por el proteasoma (Kajiro et al., 2009; Mani et al., 2006; Wu et al., 2007) y, seguramente, algunas más se identificarán en un futuro. Sin embargo, AIB1 también puede degradarse por el proteasoma REGγ-20S sin necesidad de ser marcada con ubiquitina (Li et al., 2007b). La degradación proteasomal tanto por procesos dependientes de poliubiquitinación como por procesos independientes de ubiquitina también ha sido descrita para otras proteínas, como p53 y p73 (Asher et al., 2005). La proteína p53 además es sustrato de calpaínas (Pariat et al., 1997). Parece, por tanto, que la degradación de una proteína no depende exclusivamente de un sistema de proteólisis, pudiendo existir diferentes vías según diversas condiciones. En el caso de AIB1, los ensayos con el triple mutante K723R/K786R/K1194R apuntan a algo similar. Al tener los tres sitios de ubiquitinación mutados se espera que este coactivador no sea degradado por el proteasoma. Los ensayos con luciferasa sugieren que realmente este fragmento podría ser más estable, debido a la potente actividad transcripcional exhibida con respecto a la proteína silvestre y el resto de mutaciones individuales. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor MG132 sigue produciendo un aumento de los niveles de este mutante, indicando que podría estar siendo ubiquitinado en otros sitios consenso no canónicos y degradado por el sistema ubiquitina-proteasoma, o bien estar siendo degradado por el proteasoma REGγ de manera independiente de ubiquitina. Resultados preliminares de coimmunoprecipitación con HA-ubiquitina realizados con este mutante en nuestro laboratorio no muestran señal en el "western blot" para Gal4(DBD), sugiriendo que posiblemente este fragmento no se esté ubiquitinando en otras posiciones. Por tanto, el aumento provocado por el inhibidor MG132 en los niveles de este mutante podría ser atribuido a la degradación por el

proteasoma REGy. No obstante, ha sido descrito que el aldehído peptídico MG132 puede inhibir las actividades de las enzimas calpaínas, proteasas citosólicas, y de las catepsinas, proteasas lisosomales (Ito et al., 2009; Tsubuki et al., 1996). En el caso de las catepsinas, se ha observado que el MG132 puede inhibir las isoformas B y L con una IC50 o concentración requerida para un 50% de inhibición de 88 nM y 163 nM respectivamente (Ito et al., 2009). Puesto que en los ensayos realizados hemos utilizado una concentración bastante superior (20 µM), sería razonable pensar que estas proteasas estarían siendo inhibidas en nuestras condiciones, con lo que no se descartaría que parte de la degradación de AIB1 se realizara a través de este mecanismo. Por el contrario, la concentración necesaria para inhibir las calpaínas intracelulares en eritrocitos de conejo es de 100 µM (Tsubuki et al., 1996). Es, por tanto, poco probable que AIB1 se degrade a partir de estas enzimas, aunque no podemos descartar diferencias entre líneas celulares. Sería pues interesante utilizar inhibidores específicos para estas proteasas y determinar si AIB1 pudiera ser degradado por mecanismos alternativos a la vía proteasomal.

La degradación por proteasas lisosómicas es posible debido al bajo pH que existe en estos orgánulos. Un inhibidor de la acidificación endosomal/lisosomal, como es la cloroquina, impediría la degradación a través de lisosomas. Nuestros resultados iniciales muestran que AIB1 se estaría degradando también en estos orgánulos. Se abren así nuevas líneas de investigación para el entendimiento de la degradación de AIB1. Sería interesante determinar la contribución relativa de la degradación de AIB1 por los diferentes sistemas proteolíticos y estudiar posibles alteraciones en cada una de las vías que pudieran estar contribuyendo al aumento de los niveles de esta molécula oncogénica y al cáncer.

2. ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL DE AIB1 EN MITOSIS

AIB1 es una fosfoproteína que integra numerosas vías de señalización. La función y la concentración subcelular de AIB1 están reguladas por quinasas y fosfatasas. Hasta la fecha se han identificado 11 sitios de fosforilación en las posiciones T24, S101, S102, S505, S509, S543, S601, S857, S860, S867 e Y1357 (T, treonina; S, serina; Y, tirosina) que son diana de diversas quinasas, como MAPKs, IKK, glucógeno sintasa quinasa (GSK3), caseína quinasa 1δ (CK1δ), PKCζ y c-Abl (Amazit et al., 2007; Font de Mora and Brown, 2000; Giamas et al., 2009; Gianni et al., 2006; Oh et al., 2008; Wu et al., 2007; Wu et al., 2002; Wu et al., 2004; Yi et al., 2008). La fosforilación/desfosforilación de AIB1 tiene múltiples consecuencias. En ocasiones, la fosforilación es necesaria para activar la función coactivadora de AIB1, mediando interacciones entre esta molécula con factores de transcripción o con CBP/p300 (Amazit et al., 2007; Font de Mora and Brown, 2000; Oh et al., 2008; Wu et al., 2002; Wu et al., 2004). La fosforilación también puede regular la concentración de este coactivador, promoviendo su degradación proteasomal (Gianni et al., 2006; Wu et al., 2007) o, por el contrario, estabilizando sus niveles (Giamas et al., 2009; Yi et al., 2008). En cuanto a las fosfatasas, la desfosforilación de AIB1 por la fosfatasa piridoxal (PDXP) y por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) provoca la inhibición de la interacción con el ERα y la reducción de su actividad como coactivador (Li et al., 2008a). La proteína fosfatasa PP1 desfosforila las serinas fosforiladas S101 y S102, resultando en una disminución de la actividad transcripcional de AIB1 y en un aumento de su estabilidad (Li et al., 2008a).

En este trabajo hemos identificado un nuevo sitio de fosforilación en la posición S728 de la secuencia de AIB1. Esta serina es fosforilada

específicamente en mitosis por el complejo Cdk1-ciclina B y, aunque todavía no hemos definido claramente su función, pensamos que estaría relacionada con la inhibición de la actividad de AIB1 como coactivador transcripcional.

2.1. Una nueva forma mitótica de AIB1

El análisis de la expresión de AIB1 a lo largo del ciclo celular mediante “western blot” revela que los niveles de este coactivador aumentan durante la transición de G1 a S. Este hecho apoyaría los resultados publicados previamente en los que se observa un mayor reclutamiento de E2F1 y AIB1 al promotor de este coactivador a medida que las células entran en fase S (Louie et al., 2006). Durante la mitosis, los niveles de AIB1 no parecen disminuir, confirmando que AIB1 no se estaría degradando en esta fase del ciclo celular. Sin embargo, durante el bloqueo mitótico inducido por el nocodazol aparece una banda de menor migración electroforética, sugiriendo que algún tipo de modificación está ocurriendo sobre AIB1 en la fase de mitosis. Esta modificación postraduccional no se debe a un efecto secundario del nocodazol, ya que el enriquecimiento de células mitóticas por el clásico método de la agitación de cultivos celulares asincrónicos en ausencia de inhibidor también exhibe la banda de menor migración. Hemos analizado la posibilidad de que el cambio de movilidad electroforética dependa de ubiquitinación o fosforilación mediante diversas aproximaciones.

El tratamiento de lisados mitóticos con la enzima desubcuitinasa USP2 indica que la banda de menor movilidad no es debida a ubiquitinación. Las enzimas desubcuitinasas son capaces de revertir la ubiquitinación y se piensa que intervienen en el reciclaje de las ubiquitinas, en la estabilización de proteínas y en la promoción de funciones de la ubiquitinación distintas a la proteólisis (Kaiser and Huang, 2005). En humanos existen 79 tipos de enzimas desubcuitinasas que se pueden

agrupar en 5 familias, entre las que se encuentra la familia de proteasas específicas de ubiquitinas o USP. Se sabe que las enzimas desubcuitinasas muestran especificidad de sustrato y, en concreto, de tipología de cadena de ubiquitinas (Komander et al., 2009). Podría ocurrir que USP2 no estuviera reconociendo la ubiquitinación de AIB1. Sin embargo, los ensayos con inmunoprecipitados de AIB1 en mitosis y posterior identificación de ubiquitinación por “western blot”, así como la identificación de proteínas ubiquitinadas de células HeLa 6xHis-ubiquitina bloqueadas en mitosis con nocodazol confirman la ausencia de ubiquitinación en la banda de menor migración electroforética.

Estudios *in vitro* con fosfatasa lambda en lisados mitóticos demuestran que la modificación de AIB1 en mitosis es debida a fosforilación. Cuestiones acerca de la quinasa responsable de esta modificación, el compartamiento celular dónde se encuentra la forma fosforilada de AIB1, el residuo o residuos fosforilados y la posible función de esta modificación serán discutidas a continuación.

2.2. AIB1 se fosforila en Mitosis por el complejo Cdk1-ciclina B

La progresión en el ciclo celular requiere la activación espacio-temporal de una serie de quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) que se unen a sus correspondientes ciclinas para fosforilar y regular numerosos sustratos. La entrada en mitosis está regulada por la actividad del complejo quinasa Cdk1-ciclina B, cuya actividad oscila a lo largo del ciclo celular. La regulación de este complejo en el tiempo se produce por acción coordinada de activadores y represores. Durante la interfase y una vez la ciclina B ha empezado a sintetizarse, los complejos Cdk1-ciclina B formados se mantienen inactivos gracias a la fosforilación de la treonina 14 y la tirosina 15 de Cdk1. En la transición G2/M la actividad de la fosfatasa de especificidad dual Cdc25 conduce a la desfosforilación de estos residuos,

primero en los centrosomas y después en el núcleo, resultando en la activación del complejo Cdk1-ciclina B y en la entrada en mitosis (Perry and Kornbluth, 2007).

Debido a que el complejo Cdk1-ciclina B es el regulador clave de la mitosis y que AIB1 posee en su secuencia un motivo consenso de fosforilación por Cdks [(S/T)PX(R/K)], pensamos que la fosforilación específica de mitosis de AIB1 podría estar catalizada por este complejo. Varias evidencias han apoyado esta hipótesis. La primera es que la fosforilación de AIB1 en ensayos *in vivo* es sensible al inhibidor de Cdks purvalanol A. Varias quinasas dependientes de ciclina, incluyendo Cdk1-ciclina B y Cdk2-ciclinas A o E, son sensibles al purvalanol A. Sin embargo, la principal diana del purvalanol A en células mitóticas bloqueadas con nocodazol es Cdk1-ciclina B, ya que Cdk2-ciclina E y Cdk2-ciclina A sólo están activas durante la transición G1/S o en la fase S respectivamente. Otra evidencia es que AIB1 coimmunoprecipita con Cdk1. Finalmente, el complejo recombinante Cdk1-ciclina B1 es capaz de fosforilar *in vitro* a AIB1 purificado de células de Sf9 previamente infectadas con baculovirus, y también a la proteína de fusión a GST que contiene el fragmento de AIB1 comprendido entre los aminoácidos 693-933. Por tanto, parece que la fosforilación de AIB1 podría ser atribuida a Cdk1, aunque no se descarta la contribución de otras quinasas no contempladas en el estudio.

2.3. AIB1 se desfosforila a la salida de mitosis

La fosforilación es uno de los mecanismos más importantes que controlan los eventos asociados con el inicio y la progresión en mitosis, como la condensación de los cromosomas, la rotura de la membrana nuclear, el desensamblaje de la lamina, el ensamblaje y la elongación del huso mitótico, etcétera. Estos cambios son atribuidos, en su mayoría, al factor promotor de la mitosis (MPF), también conocido como Cdc2 o Cdk1 (Nigg, 2001). La entrada en la anafase y la salida de mitosis requiere la

inactivación de Cdk1 y otros reguladores mitóticos (Sullivan and Morgan, 2007). La inactivación se produce principalmente por degradación dependiente de proteasoma de las proteínas marcadas con ubiquitina por el complejo promotor de la anafase (APC) (Vodermaier, 2004). Además de la proteólisis, la mayoría de las fosforilaciones mitóticas son revertidas a la salida de mitosis. Nuestros resultados revelan que la degradación no es el caso para AIB1, ya que esta molécula permanece detectable y es desfosforilada progresivamente a medida que las células entran en fase G1. Esta observación apoya de nuevo que APC no es la E3 de AIB1 y que este coactivador no es degradado durante la progresión en mitosis.

Los mecanismos que conducen a la desfosforilación de las fosfoproteínas mitóticas no están bien establecidos. En levadura, la desfosforilación a la salida de mitosis es catalizada por la fosfatasa Cdc14 (Amon, 2008), sin embargo, los homólogos en vertebrados parecen tener una función diferente. En células humanas ha sido descrito el requerimiento de fosfatasas sensibles a ácido okadaico para desfosforilar los sustratos de Cdk1 (Skoufias et al., 2007), mientras que la calcineurina es necesaria para que los ovocitos de *Xenopus* salgan del bloqueo en la metafase de la segunda meiosis tras la fertilización (Mochida and Hunt, 2007). Nosotros hemos comprobado que la desfosforilación de AIB1 a medida que las células entran en G1 es sensible a ácido okadaico y a caliculina A (ambos inhibidores específicos de las proteína fosfatasas PP1 y PP2A), pero no a la ciclosporina A, que inhibe la calcineurina o proteína fosfatasa 2B (PP2B). El hecho de que la desfosforilación de AIB1 sea sensible a una concentración de ácido okadaico superior a 0,1 μM es consistente con la desfosforilación por PP1, ya que esta concentración es suficiente para inhibir PP2A, pero no a PP1 (Favre et al., 1997). En este mismo trabajo se describe que en células MCF-7 la tautomicina afecta a PP1 y el ácido okadaico inhibe selectivamente a PP2A. Esta observación podría explicar la menor sensibilidad a 0,5 μM de ácido okadaico en células MCF-7 (Fig. 41A).

Por otra parte, la desfosforilación de AIB1 a la salida de mitosis correlaciona con la degradación de la ciclina B1 y con la desaparición de la fosforilación inhibitoria de la proteína fosfatasa 1 (PP1). La actividad de PP1 es inhibida por la fosforilación en la treonina 320 mediada por Cdk1 (Kwon et al., 1997). Esta fosforilación llega a su máximo nivel en metafase y vuelve a niveles basales en telofase. Se especula si tanto la inhibición de PP1 como la activación de Cdk1 contribuyen conjuntamente en el mantenimiento de los altos niveles de fosforilación de proteínas necesarios para la correcta progresión en mitosis. Cuando la ciclina B es destruida, la caída en la actividad de Cdk1 permite la desfosforilación y activación de PP1, coincidiendo con la desfosforilación de AIB1. Estos resultados indican que PP1 podría mediar la desfosforilación de AIB1 a la salida de mitosis.

Se ha descrito que el uso de inhibidores de Cdks en células mitóticas bloqueadas con nocodazol induce la degradación de la ciclina B y otros aspectos típicos de la salida de mitosis como la formación de la membrana nuclear, pero impide la segregación de las cromátidas, resultando en una acumulación de la cromatina en la parte central de la célula (Lu et al., 1996; Potapova et al., 2006). En estas condiciones, si se inhibe la proteólisis o la actividad de las fosfatasas se mantiene el estado mitótico, indicando que para la salida de mitosis no sólo es necesaria la degradación de la ciclina B sino también la desfosforilación de sustratos tras la inactivación de Cdk1 (Skoufias et al., 2007). También hemos realizado este tipo de ensayos para estudiar la desfosforilación de AIB1. La desfosforilación de este coactivador es sensible a caliculina A, pero no a ácido okadaico. Este resultado es consistente con la sensibilidad de la desfosforilación de AIB1 a inhibidores de fosfatasas y vuelve a indicar que el proceso sería mediado por PP1 más que por PP2A. No sabemos porqué los niveles y la migración electroforética de AIB1 son menores en el tratamiento con caliculina A (Fig. 41D). Barajamos la posibilidad de que

estos efectos sean debidos a una mayor fosforilación de AIB1 a través de quinasas reguladas por PP1 o PP2A.

PP1 es una holoenzima compuesta por varias subunidades que pertenece a la familia de serina/treonina fosfatasas. La subunidad catalítica PP1c puede unirse a un amplio espectro de subunidades que regulan la localización y la actividad de esta enzima. Existen 3 isoformas para PP1: PP1 α , PP1 δ/β y PP1 γ . A pesar de compartir un 90% de identidad de secuencia, estas isoformas muestran diferentes localizaciones a lo largo del ciclo celular y, por tanto, diferentes especificidades (Andreassen et al., 1998). Los resultados *in vitro* con la subunidad catalítica recombinante de la isoforma α de PP1 muestran que la fosforilación de AIB1 no es revertida y sugieren que esta isoforma no regula la desfosforilación de AIB1. Por tanto, la desfosforilación de AIB1 a la salida de mitosis podría estar mediada por otras isoformas de PP1, o incluso por otra u otras fosfatasas que no hemos contemplado en este estudio. No excluimos la posibilidad de que AIB1 se fosforile en varios residuos y que PP1 α no sea capaz de desfosforilar a este coactivador *in vitro*, porque la desfosforilación previa de otros residuos por otra u otras fosfatasas sea requerida en primer lugar.

2.4. ¿Qué residuo o residuos de AIB1 se fosforilan en mitosis?

El análisis de la secuencia de AIB1 muestra un sitio consenso de fosforilación por Cdk1 en la posición S728. Sin embargo, el mutante a alanina de esta serina sigue exhibiendo la banda de menor migración electroforética de AIB1. Este resultado sugiere que la fosforilación de AIB1 en mitosis es independiente de la serina 728, o que existen otros sitios de fosforilación que podrían estar compensando el efecto. Los ensayos de fosforilación *in vitro* con el complejo Cdk1-ciclina B1 revelan que únicamente la proteína de fusión a GST que comprende los aminoácidos 673-933 de AIB1 es fosforilada por este complejo. Casualmente, este fragmento contiene la serina 728 y parece que esta posición corresponde a

un sitio de fosforilación por Cdk1, como demuestran los ensayos de fosforilación *in vitro* con la proteína de GST-AIB1 693-933 S728A.

La emergente espectrometría de masas como herramienta para el análisis biológico y la mejora de técnicas para enriquecer y detectar fosfopéptidos hacen posible la identificación de múltiples sitios fosforilados en muestras individuales (Olsen et al., 2006). Nosotros hemos intentado identificar los sitios de fosforilación de AIB1 en mitosis mediante espectrometría de masas, pero sólo hemos podido identificar a AIB1 en una de las bandas teñidas con Pro-Q Diamond (tinción específica de fosfoproteínas) de un gel SDS-PAGE. Estos resultados apoyan que AIB1 está fosforilado en mitosis, pero no ofrecen nuevas pistas sobre los sitios de fosforilación. Además, tampoco se han obtenido resultados satisfactorios con el fragmento GST-AIB1 693-933 previamente fosforilado *in vitro* con el complejo Cdk1-ciclina B1, posiblemente debido a que el porcentaje de fosforilación es muy bajo y sólo detectable con ensayos muy sensibles como el de radiactividad. La identificación mediante espectrometría de masas y el programa "Protein Pilot Assay Biosystem" muestra que la serina 767 y la treonina 770 podrían estar modificadas por fosforilación en este fragmento. El hecho de que ninguno de estos residuos esté seguido de prolina, requisito para la fosforilación por Cdks (Nigg, 1993), apunta a que posiblemente estos sitios no sean dianas reales de Cdk1. Una posible explicación es que estos residuos se hayan fosforilado en la bacteria donde han sido expresados los fragmentos. Aunque en un principio se pensaba que las fosforilaciones en proteínas procariotas se realizaban sobre histidinas, argininas o lisinas, ahora está bien establecida la fosforilación en serinas, treoninas y tirosinas, al igual que ocurre en eucariotas (Deutscher and Saier, 2005).

La fosforilación en la serina 728 ha sido demostrada anteriormente en un estudio de identificación masiva de sustratos fosforilados en mitosis mediante espectrometría de masas (Dephoure et al., 2008). Dephoure y

colaboradores han identificado miles de sustratos modificados por fosforilación procedentes de células bloqueadas en G1 y células bloqueadas en mitosis. Entre otros, se ha visto a AIB1 fosforilado en las serinas 214, 551, 728, 857, 867 y 1330. En nuestras condiciones, sólo hemos visto fosforilación *in vitro* por Cdk1-ciclina B1 en el fragmento 693-933, que incluye las serinas 728, 857 y 867. La serina 857 es poco probable que se fosforile por Cdk, puesto que no va seguida de prolina. Recientemente, hemos mutado la posición S867, comprobando que también es diana de Cdk1-ciclina B1 (Fig. 47B). En cuanto a los restantes sitios de fosforilación (también seguidos de prolina) podría ocurrir que se estuvieran modificando por la acción de otras quinasas, o que no observáramos su fosforilación *in vitro* por Cdk1 por pérdida de estructura de los fragmentos y falta de orientación de los residuos diana.

La fosforilación *in vitro* con el complejo Cdk1-ciclina A2 no muestra modificación en ninguno de los fragmentos. La ciclina A empieza a expresarse durante la fase S y se destruye durante la prometafase, mientras que los niveles de la ciclina B comienzan a aumentar durante la fase G2 y esta ciclina se destruye durante la metafase (Sullivan and Morgan, 2007). Nuestros resultados sugieren que AIB1 podría estar fosforilándose justo a la entrada de mitosis cuando el complejo Cdk1-ciclina B está activo.

El sitio consenso de fosforilación (S/T)PX(R/K) es aplicable a la gran mayoría de los sustratos de todas las Cdk. Las células deben haber inventado estrategias para conferir especificidad para los complejos Cdk-ciclina durante su ventana de actuación en el ciclo celular. Ha sido establecido que el motivo RXL, también conocido como motivo Cy, es requerido para la asociación con los complejos Cdk-ciclina en diversos sustratos, como el inhibidor de Cdk p21 (Chen et al., 1996), la proteína reguladora de la replicación Cdc6 (Petersen et al., 1999) y la quinasa de Cdk1 Myt1 (Liu et al., 1999). El motivo Cy junto con el motivo consenso de

fosforilación corresponden, por tanto, a una secuencia bipartita de reconocimiento por los complejos Cdk-ciclina. Se ha demostrado que para la eficiente fosforilación, este motivo Cy debe estar distanciado entre 48-72 Å (12-18 aminoácidos) del residuo fosforilable (Takeda et al., 2001). Sin embargo, la doble mutación a alanina AXA en el motivo Cy de AIB1 revela que este coactivador puede fosforilarse *in vitro* por el complejo Cdk1-ciclina B1 independientemente del motivo RXL. Aunque el uso de motivos Cy para dirigir proteínas a los complejos Cdk-ciclina está bien establecido, poco se conoce sobre la naturaleza de este motivo. Estudios mutacionales en el motivo Cy de p21 han demostrado que la secuencia RXL no es suficiente para ser motivo Cy, sino que más bien es necesario un cluster de residuos hidrofóbicos, cuyo contexto permite adoptar la conformación apropiada para interactuar con la superficie hidrofóbica de la ciclina (Wohlschlegel et al., 2001). Además, estos autores han observado que, según las mutaciones generadas en los residuos hidrofóbicos adyacentes a RXL, la afinidad por la ciclina A o la ciclina E cambia, sugiriendo que diferentes motivos Cy pueden asociarse con determinados complejos Cdk-ciclina y, por tanto, ser sujetos a fosforilación específica por estos complejos. El motivo Cy encontrado en la secuencia de AIB1 posee varios residuos hidrofóbicos adyacentes. Es posible que mutaciones en estos aminoácidos puedan inhibir la interacción de AIB1 con la ciclina B y la fosforilación por Cdk1-ciclina B1.

2.5. Función de la fosforilación de AIB1 en Mitosis

Las proteínas celulares se encuentran en un constante estado de flujo. Su actividad, localización subcelular, interacciones moleculares y estabilidad son modificadas continuamente en respuesta a señales externas, por ejemplo la estimulación por factores de crecimiento, o a señales internas, como daño en el DNA. La mayoría de estos procesos

están regulados por modificaciones postraduccionales, siendo la fosforilación/desfosforilación la modificación más común en las células.

En las células eucariotas, la mitosis está asociada con una inhibición global de la transcripción. Experimentos llevados a cabo en los años 60, demostraron que la incorporación de los precursores de RNA cesaba al final de la profase y se reestablecía durante la telofase, cuando las células salían de mitosis (Prescott and Bender, 1962). Se han propuesto varios mecanismos para inhibir la transcripción, y estos incluyen un efecto directo de las quinasas mitóticas en la maquinaria de la transcripción y en la cromatina (Gottesfeld and Forbes, 1997). La condensación de la cromatina durante la mitosis limita la accesibilidad de los factores de transcripción y la RNA polimerasa II al DNA, siendo aceptada como uno de los eventos más importantes para silenciar la transcripción durante esta fase del ciclo celular (Christova and Oelgeschlager, 2002). Al inicio de la mitosis numerosos factores de transcripción son fosforilados y excluidos de los cromosomas condensados (Martinez-Balbas et al., 1995; Muchardt et al., 1996; Segil et al., 1991). Resulta interesante que AIB1 también se encuentra excluido de los cromosomas mitóticos. El fraccionamiento subcelular citosol/núcleo en células G2/M revela que la forma fosforilada de AIB1 se encuentra localizada en el citosol. No se descarta la posibilidad de que esta forma fosforilada proceda de células mitóticas que siguen adheridas a la placa de cultivo y que también están siendo fraccionadas. Todavía falta por demostrar si la fosforilación de AIB1 sirve para controlar el tiempo que permanece excluida de los cromosomas, o si esta modificación constituye una especie de reservorio, de manera que una vez la célula saliera de mitosis dispusiera de cantidad suficiente de coactivador para progresar de nuevo en el ciclo celular. Se conoce que las proteínas 14-3-3 regulan la localización subcelular de las proteínas con las que interaccionan, afectando procesos, como la división celular, la apoptosis y la señalización (Muslin and Xing, 2000). Un ejemplo lo constituye la proteína HMGN1,

perteneciente a la familia de proteínas de unión a nucleosomas, cuya fosforilación en mitosis promueve su unión a proteínas 14-3-3, impidiendo su localización nuclear durante la telofase (Prymakowska-Bosak et al., 2002). Sería interesante examinar si la fosforilación de AIB1 también sirve para secuestrar a este coactivador durante la mitosis, evitando su función coactivadora de la transcripción.

Está descrito que el complejo Cdk1-ciclina B1 puede activarse tanto en el citosol como en el núcleo (Jackman et al., 2003), pero no sabemos en que compartimento se fosforila AIB1 por este complejo. No obstante, postulamos la posibilidad de que AIB1 se estaría fosforilando en el núcleo, ya que se trata de una proteína mayoritariamente nuclear y porque en este compartimento el complejo Cdk1-ciclina B1 está completamente activo (Toyoshima-Morimoto et al., 2002). Nuestros resultados revelan que AIB1 fosforilado se acumula en el citosol. Una explicación es que la fosforilación de AIB1 en el núcleo promoviera su rápida translocación al citosol antes de la ruptura de la membrana nuclear para quedar así excluido de la cromatina. La fosforilación en la serina 728 representa un sitio importante de fosforilación por Cdk1-ciclina B1. Sin embargo, el mutante AU5-AIB1 S728E se localiza en el núcleo, al igual que la proteína silvestre y el mutante S728A, indicando que la fosforilación de AIB1 en mitosis no estaría mediando el transporte al citosol. Alternativamente, podría ocurrir que otros posibles sitios fosforilados estuvieran enmascarando el efecto. El transporte núcleo/citosol es un proceso que depende del reconocimiento, por parte de la maquinaria de importación y exportación nuclear, de secuencias de localización nuclear (NLS) y secuencias de exportación nuclear (NES) presentes en las moléculas cargo (Weis, 2003). La fosforilación/desfosforilación puede regular el acceso de las exportinas o importinas a estas secuencias NES y NLS (Whitmarsh and Davis, 2000). AIB1 contiene 4 secuencias NES potenciales en las posiciones 55, 869, 954 y 1069 (NES Finder 0.2: <http://research.nki.nl/fornerodlab/NES->

Finder.htm) del mismo tipo que las que posee la proteína Rev del VIH, donde se identificaron originalmente (Fischer et al., 1995). Una de estas secuencias NES se encuentra cerca de las serinas 857 y 867, dos de los sitios de fosforilación de AIB1 identificados en mitosis [(Dephoure et al., 2008) y Fig. 47B]. Podría ocurrir que la fosforilación en estos residuos permitiera el reconocimiento de esta secuencia NES y la translocación de AIB1 al citosol.

Por último, otra de las posibles funciones de la fosforilación haría referencia a la regulación de la función de AIB1 como coactivador. La fosforilación puede regular la interacción entre factores de transcripción y coactivadores o correpresores, así como la actividad de estas moléculas. Mientras que el mutante S728A no afecta la actividad transcripcional intrínseca de AIB1 en ensayos luciferasa, la coactivación de ER α aumenta significativamente con respecto a la proteína no mutada. Cabe destacar que la serina 728 está localizada entre dos motivos LXXLL o cajas de interacción con receptores nucleares (L685 y L738). La fosforilación en esta posición podría impedir la interacción con ER α , bloqueando su coactivación. Además, el hecho que el potencial motivo Cy de AIB1 corresponda con un motivo LXXLL (LRYLL) podría reflejar posible competitividad en la unión de receptores nucleares o del complejo Cdk1-ciclina B a AIB1 durante la fase de mitosis. Debido a que las mutaciones a ácido glutámico o aspártico son capaces de mimetizar la fosforilación, ensayos con el mutante S728E serían de especial interés a la hora de estudiar la función coactivadora de AIB1.

A modo de resumen, nuestros resultados sugieren que el potencial oncogénico de AIB1 está probablemente regulado por varias vías que modulan su localización subcelular y, por tanto, su susceptibilidad a la degradación proteasomal. Identificar mutaciones en la secuencia de AIB1

que insensibilicen su degradación sería un trabajo interesante. Múltiples estudios han demostrado que la sobreexpresión de AIB1 proporciona una ventaja en el crecimiento de las células en cáncer. Ciertas señales genéticas y/o ambientales son requeridas para desencadenar la sobreexpresión de AIB1. Uno de los mecanismos implicados en esta sobreexpresión hace referencia a su amplificación génica, sin embargo, ésta sólo se ha observado en un 10% de los tumores que sobreexpresan AIB1. Por tanto, otros mecanismos deben modular los niveles de AIB1. En este estudio hemos visto que la distribución subcelular, la actividad del receptor de estrógenos, la secuencia PEST y la vía de señalización PI3K/AKT pueden regular los niveles de AIB1. Cuando elevados niveles de AIB1 coinciden con otras anomalías moleculares que promueven su actividad y/o estabilidad, este coactivador puede funcionar como un potente oncogén, promoviendo la proliferación celular y el desarrollo tumoral.

Por otra parte, hemos identificado una nueva fosforilación de AIB1 específica de mitosis. Cdk1-ciclina B1 fosforila a AIB1 en las serinas 728 y 867, y estas fosforilaciones probablemente son revertidas durante la progresión a G1 por alguna fosfatasa sensible a ácido okadaico y a caliculina A. La fosforilación mitótica de AIB1 parece no mediar su proteólisis, sino más bien modifica la localización subcelular y la actividad coactivadora de esta molécula (Fig. 53).

Los datos presentados en este trabajo representan un punto de apoyo para la comprensión de aspectos relacionados con los niveles y actividad del oncogén AIB1. No obstante, es necesaria más investigación en este campo para determinar los mecanismos exactos por los que AIB1 promueve tumorigénesis y para poder establecer a este coactivador como marcador tumoral y como diana terapéutica en la lucha contra el cáncer.

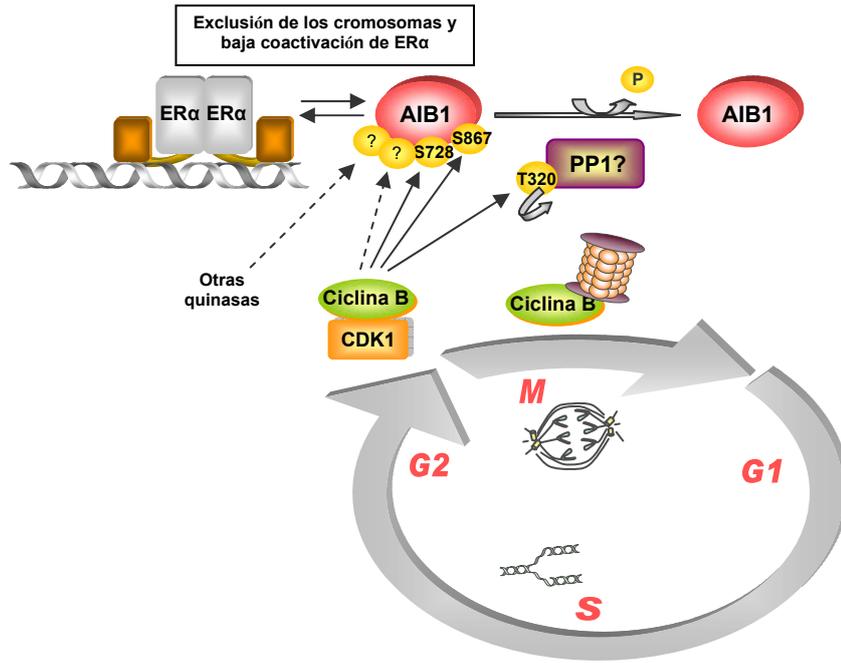


Figura 53: Modelo propuesto para la fosforilación mitótica de AIB1.

— CONCLUSIONES —

ESTUDIO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE AIB1

1. La distribución subcelular de AIB1 determina su vida media y varía dependiendo del tipo celular. La localización nuclear de AIB1 se correlaciona con una menor estabilidad. La actividad del receptor de estrógenos también influye en la estabilidad de AIB1, afectando su localización subcelular.
2. AIB1 se degrada en el núcleo por el sistema ubiquitina-proteasoma.
3. AIB1 no se degrada durante mitosis y APC, probablemente no es su ubiquitina ligasa.
4. La vía PI3K/AKT es más activa en células MCF-7 que en HeLa, y los mayores niveles de AKT activo en condiciones restrictivas son suficientes para estabilizar a AIB1 en esta línea celular.
5. La señalización por PI3K/AKT estabiliza a AIB1 independientemente de GSK3. La estabilización requiere la presencia de la región central de AIB1.
6. AIB1 tiene en su región central un dominio PEST que le confiere inestabilidad.
7. Dos dominios en la secuencia de AIB1 son requeridos simultáneamente para su máxima sensibilidad transcripcional a inhibidores del proteasoma.
8. Además del sistema ubiquitina-proteasoma, la vía lisosomal también está implicada en la degradación de AIB1.

ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL DE AIB1 EN MITOSIS

1. AIB1 se fosforila a la entrada de mitosis por el complejo Cdk1-ciclina B, pero no por el complejo Cdk1-ciclina A.
2. AIB1 se desfosforila a medida que las células entran en G1 por una fosfatasa sensible a ácido okadaico y caliculina A.
3. El complejo Cdk1-ciclina B1 fosforila *in vitro* a AIB1 en las serinas 728 y 867.
4. La fosforilación en mitosis de AIB1 por Cdk es independiente del sitio de reconocimiento de ciclina o motivo Cy.
5. AIB1 está excluido de los cromosomas condensados de células mitóticas, y su forma fosforilada se localiza en el citosol de células bloqueadas en G2/M.
6. La fosforilación en mitosis no sirve para degradar a AIB1, sino más bien afecta su función coactivadora.

— REFERENCIAS —

- Aguilar, R.C. and Wendland, B. (2003) Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 184-190.
- Amazit, L., Pasini, L., Szafran, A.T., Berno, V., Wu, R.C., Mielke, M., Jones, E.D., Mancini, M.G., Hinojos, C.A., O'Malley, B.W. and Mancini, M.A. (2007) Regulation of SRC-3 intercompartmental dynamics by estrogen receptor and phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **27**, 6913-6932.
- Amon, A. (2008) A decade of Cdc14--a personal perspective. Delivered on 9 July 2007 at the 32nd FEBS Congress in Vienna, Austria. *Febs J*, **275**, 5774-5784.
- Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Villa-Moruzzi, E. and Margolis, R.L. (1998) Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol*, **141**, 1207-1215.
- Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M. and Meltzer, P.S. (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, **277**, 965-968.
- Araki, T. and Milbrandt, J. (2003) ZNRF proteins constitute a family of presynaptic E3 ubiquitin ligases. *J Neurosci*, **23**, 9385-9394.
- Asher, G., Tsvetkov, P., Kahana, C. and Shaul, Y. (2005) A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev*, **19**, 316-321.
- Avivar, A., Garcia-Macias, M.C., Ascaso, E., Herrera, G., O'Connor, J.E. and de Mora, J.F. (2006) Moderate overexpression of AIB1 triggers pre-neoplastic changes in mammary epithelium. *FEBS Lett*, **580**, 5222-5226.
- Ayala, G., Yan, J., Li, R., Ding, Y., Thompson, T.C., Mims, M.P., Hayes, T.G., MacDonnell, V., Lynch, R.G., Frolov, A., Miles, B.J., Wheeler, T.M., Harper, J.W., Tsai, M.J., Ittmann, M.M. and Kadmon, D. (2008) Bortezomib-mediated inhibition of steroid receptor coactivator-3 degradation leads to activated Akt. *Clin Cancer Res*, **14**, 7511-7518.
- Azorsa, D.O., Cunliffe, H.E. and Meltzer, P.S. (2001) Association of steroid receptor coactivator AIB1 with estrogen receptor-alpha in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, **70**, 89-101.
- Bai, J., Uehara, Y. and Montell, D.J. (2000) Regulation of invasive cell behavior by taiman, a Drosophila protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. *Cell*, **103**, 1047-1058.
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. and Cohen, P. (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J*, **371**, 199-204.

- Balmer, N.N., Richer, J.K., Spoelstra, N.S., Torkko, K.C., Lyle, P.L. and Singh, M. (2006) Steroid receptor coactivator AIB1 in endometrial carcinoma, hyperplasia and normal endometrium: Correlation with clinicopathologic parameters and biomarkers. *Mod Pathol*, **19**, 1593-1605.
- Bautista, S., Valles, H., Walker, R.L., Anzick, S., Zeillinger, R., Meltzer, P. and Theillet, C. (1998) In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clin Cancer Res*, **4**, 2925-2929.
- Belandia, B. and Parker, M.G. (2000) Functional interaction between the p160 coactivator proteins and the transcriptional enhancer factor family of transcription factors. *J Biol Chem*, **275**, 30801-30805.
- Belosay, A., Brodie, A.M. and Njar, V.C. (2006) Effects of novel retinoic acid metabolism blocking agent (VN/14-1) on letrozole-insensitive breast cancer cells. *Cancer Res*, **66**, 11485-11493.
- Blenkiron, C. and Miska, E.A. (2007) miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet*, **16 Spec No 1**, R106-113.
- Bouras, T., Southey, M.C. and Venter, D.J. (2001) Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res*, **61**, 903-907.
- Brown, K., Chen, Y., Underhill, T.M., Mymryk, J.S. and Torchia, J. (2003) The coactivator p/CIP/SRC-3 facilitates retinoic acid receptor signaling via recruitment of GCN5. *J Biol Chem*, **278**, 39402-39412.
- Cao, Y., Bonizzi, G., Seagroves, T.N., Greten, F.R., Johnson, R., Schmidt, E.V. and Karin, M. (2001) IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell*, **107**, 763-775.
- Carapeti, M., Aguiar, R.C., Chase, A., Goldman, J.M. and Cross, N.C. (1998) Assignment of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene to human chromosome band 2p23. *Genomics*, **52**, 242-244.
- Conaway, R.C., Brower, C.S. and Conaway, J.W. (2002) Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science*, **296**, 1254-1258.
- Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P. and De Mayo, F.J. (2001) Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol*, **179**, 97-103.
- Cooper, B., Schneider, S., Bohl, J., Jiang, Y., Beaudet, A. and Vande Pol, S. (2003) Requirement of E6AP and the features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53. *Virology*, **306**, 87-99.
- Cory, S., Huang, D.C. and Adams, J.M. (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, **22**, 8590-8607.

- Coste, A., Antal, M.C., Chan, S., Kastner, P., Mark, M., O'Malley, B.W. and Auwerx, J. (2006) Absence of the steroid receptor coactivator-3 induces B-cell lymphoma. *Embo J*, **25**, 2453-2464.
- Coste, A., Louet, J.F., Lagouge, M., Lerin, C., Antal, M.C., Meziane, H., Schoonjans, K., Puigserver, P., O'Malley, B.W. and Auwerx, J. (2008) The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1{alpha}. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 17187-17192.
- Chen, C., Seth, A.K. and Aplin, A.E. (2006) Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer. *Mol Cancer Res*, **4**, 695-707.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W. and Stallcup, M.R. (1999a) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, **284**, 2174-2177.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y. and Evans, R.M. (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, **90**, 569-580.
- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D. and Evans, R.M. (1999b) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell*, **98**, 675-686.
- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B.D. and Dutta, A. (1996) Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol Cell Biol*, **16**, 4673-4682.
- Chen, S.L., Dowhan, D.H., Hosking, B.M. and Muscat, G.E. (2000) The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev*, **14**, 1209-1228.
- Chen, Y.H., Kim, J.H. and Stallcup, M.R. (2005) GAC63, a GRIP1-dependent nuclear receptor coactivator. *Mol Cell Biol*, **25**, 5965-5972.
- Chida, Y., Hamer, M., Wardle, J. and Steptoe, A. (2008) Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nat Clin Pract Oncol*, **5**, 466-475.
- Christova, R. and Oelgeschlager, T. (2002) Association of human TFIIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo. *Nat Cell Biol*, **4**, 79-82.
- Chung, A.C., Zhou, S., Liao, L., Tien, J.C., Greenberg, N.M. and Xu, J. (2007) Genetic ablation of the amplified-in-breast cancer 1 inhibits spontaneous prostate cancer progression in mice. *Cancer Res*, **67**, 5965-5975.
- Dan, H.C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Wang, H.G., Tsang, B.K. and Cheng, J.Q. (2004) Akt phosphorylation and

- stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem*, **279**, 5405-5412.
- Demarest, S.J., Deechongkit, S., Dyson, H.J., Evans, R.M. and Wright, P.E. (2004) Packing, specificity, and mutability at the binding interface between the p160 coactivator and CREB-binding protein. *Protein Sci*, **13**, 203-210.
- DePasquale, J.A. (1999) Rearrangement of the F-actin cytoskeleton in estradiol-treated MCF-7 breast carcinoma cells. *Histochem Cell Biol*, **112**, 341-350.
- Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J. and Gygi, S.P. (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 10762-10767.
- Deutscher, J. and Saier, M.H., Jr. (2005) Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in bacteria - for long time neglected, now well established. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **9**, 125-131.
- Ding, X.F., Anderson, C.M., Ma, H., Hong, H., Uht, R.M., Kushner, P.J. and Stallcup, M.R. (1998) Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol Endocrinol*, **12**, 302-313.
- Doisneau-Sixou, S.F., Sergio, C.M., Carroll, J.S., Hui, R., Musgrove, E.A. and Sutherland, R.L. (2003) Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*, **10**, 179-186.
- Duckworth, B.C., Weaver, J.S. and Ruderman, J.V. (2002) G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16794-16799.
- Fang, Z.H. and Han, Z.C. (2006) The transcription factor E2F: a crucial switch in the control of homeostasis and tumorigenesis. *Histol Histopathol*, **21**, 403-413.
- Favre, B., Turowski, P. and Hemmings, B.A. (1997) Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J Biol Chem*, **272**, 13856-13863.
- Feng, J., Tamaskovic, R., Yang, Z., Brazil, D.P., Merlo, A., Hess, D. and Hemmings, B.A. (2004) Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*, **279**, 35510-35517.
- Feng, Q., Yi, P., Wong, J. and O'Malley, B.W. (2006) Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol Cell Biol*, **26**, 7846-7857.
- Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T. and Johnston, S.A. (2001) The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*, **7**, 981-991.

- Fereshteh, M.P., Tilli, M.T., Kim, S.E., Xu, J., O'Malley, B.W., Wellstein, A., Furth, P.A. and Riegel, A.T. (2008) The nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer-1 is required for Neu (ErbB2/HER2) activation, signaling, and mammary tumorigenesis in mice. *Cancer Res*, **68**, 3697-3706.
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M. and Boyle, P. (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*, **18**, 581-592.
- Ferry, C., Gianni, M., Lalevee, S., Bruck, N., Plassat, J.L., Raska, I., Jr., Garattini, E. and Rochette-Egly, C. (2009) Sug-1 plays proteolytic and non-proteolytic roles in the control of RA-target genes via its interaction with SRC-3. *J Biol Chem*.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W. and Luhrmann, R. (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, **82**, 475-483.
- Fleming, F.J., Myers, E., Kelly, G., Crotty, T.B., McDermott, E.W., O'Higgins, N.J., Hill, A.D. and Young, L.S. (2004) Expression of SRC-1, AIB1, and PEA3 in HER2 mediated endocrine resistant breast cancer; a predictive role for SRC-1. *J Clin Pathol*, **57**, 1069-1074.
- Fodde, R. (2002) The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, **38**, 867-871.
- Font de Mora, J. and Brown, M. (2000) AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol*, **20**, 5041-5047.
- Franke, T.F. (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene*, **27**, 6473-6488.
- Gao, X., Mohsin, S.K., Gatalica, Z., Fu, G., Sharma, P. and Nawaz, Z. (2005) Decreased expression of e6-associated protein in breast and prostate carcinomas. *Endocrinology*, **146**, 1707-1712.
- Gaughan, L., Logan, I.R., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2005) Regulation of androgen receptor and histone deacetylase 1 by Mdm2-mediated ubiquitylation. *Nucleic Acids Res*, **33**, 13-26.
- Gehin, M., Mark, M., Dennefeld, C., Dierich, A., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (2002) The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. *Mol Cell Biol*, **22**, 5923-5937.
- Ghadimi, B.M., Schrock, E., Walker, R.L., Wangsa, D., Jauho, A., Meltzer, P.S. and Ried, T. (1999) Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol*, **154**, 525-536.
- Giamas, G., Castellano, L., Feng, Q., Knippschild, U., Jacob, J., Thomas, R.S., Coombes, R.C., Smith, C.L., Jiao, L.R. and Stebbing, J. (2009) CK1{delta} modulates the transcriptional activity of ER{alpha} via

- AIB1 in an estrogen-dependent manner and regulates ER{alpha}-AIB1 interactions. *Nucleic Acids Res.*
- Gianni, M., Parrella, E., Raska, I., Jr., Gaillard, E., Nigro, E.A., Gaudon, C., Garattini, E. and Rochette-Egly, C. (2006) P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RARalpha-mediated transcription. *Embo J*, **25**, 739-751.
- Gillett, C., Fantl, V., Smith, R., Fisher, C., Bartek, J., Dickson, C., Barnes, D. and Peters, G. (1994) Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res*, **54**, 1812-1817.
- Giraud, S., Bienvenu, F., Avril, S., Gascan, H., Heery, D.M. and Coqueret, O. (2002) Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J Biol Chem*, **277**, 8004-8011.
- Girault, I., Lerebours, F., Amarir, S., Tozlu, S., Tubiana-Hulin, M., Lidereau, R. and Bieche, I. (2003) Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin Cancer Res*, **9**, 1259-1266.
- Glaeser, M., Floetotto, T., Hanstein, B., Beckmann, M.W. and Niederacher, D. (2001) Gene amplification and expression of the steroid receptor coactivator SRC3 (AIB1) in sporadic breast and endometrial carcinomas. *Horm Metab Res*, **33**, 121-126.
- Glaros, S., Atanaskova, N., Zhao, C., Skafar, D.F. and Reddy, K.B. (2006) Activation function-1 domain of estrogen receptor regulates the agonistic and antagonistic actions of tamoxifen. *Mol Endocrinol*, **20**, 996-1008.
- Goel, A. and Janknecht, R. (2004) Concerted activation of ETS protein ER81 by p160 coactivators, the acetyltransferase p300 and the receptor tyrosine kinase HER2/Neu. *J Biol Chem*, **279**, 14909-14916.
- Gottesfeld, J.M. and Forbes, D.J. (1997) Mitotic repression of the transcriptional machinery. *Trends Biochem Sci*, **22**, 197-202.
- Grivas, P.D., Tzelepi, V., Sotiropoulou-Bonikou, G., Kefalopoulou, Z., Papavassiliou, A.G. and Kalofonos, H. (2009) Estrogen receptor alpha/beta, AIB1, and TIF2 in colorectal carcinogenesis: do coregulators have prognostic significance? *Int J Colorectal Dis*.
- Guan, X.Y., Meltzer, P.S., Dalton, W.S. and Trent, J.M. (1994) Identification of cryptic sites of DNA sequence amplification in human breast cancer by chromosome microdissection. *Nat Genet*, **8**, 155-161.
- Guan, X.Y., Xu, J., Anzick, S.L., Zhang, H., Trent, J.M. and Meltzer, P.S. (1996) Hybrid selection of transcribed sequences from microdissected DNA: isolation of genes within amplified region at 20q11-q13.2 in breast cancer. *Cancer Res*, **56**, 3446-3450.
- Gunther, J.R., Du, Y., Rhoden, E., Lewis, I., Revennaugh, B., Moore, T.W., Kim, S.H., Dingleline, R., Fu, H. and Katzenellenbogen, J.A. (2009) A set of time-resolved fluorescence resonance energy transfer

- assays for the discovery of inhibitors of estrogen receptor-coactivator binding. *J Biomol Screen*, **14**, 181-193.
- Haiman, C.A., Hankinson, S.E., Spiegelman, D., Colditz, G.A., Willett, W.C., Speizer, F.E., Brown, M. and Hunter, D.J. (2000) Polymorphic repeat in AIB1 does not alter breast cancer risk. *Breast Cancer Res*, **2**, 378-385.
- Hammerich-Hille, S., Bardout, V.J., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K. and Oesterreich, S. (2009) Low SAFB levels are associated with worse outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*.
- Han, X.Y., Zhang, X.M., Chen, Y., Yang, K.X. and Qie, M.R. (2007) [Expression of AIB1 protein in gynecological tumors]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, **38**, 246-249.
- Harigopal, M., Heymann, J., Ghosh, S., Anagnostou, V., Camp, R.L. and Rimm, D.L. (2008) Estrogen receptor co-activator (AIB1) protein expression by automated quantitative analysis (AQUA) in a breast cancer tissue microarray and association with patient outcome. *Breast Cancer Res Treat*.
- He, L.R., Zhao, H.Y., Li, B.K., Zhang, L.J., Liu, M.Z., Kung, H.F., Guan, X.Y., Bian, X.W., Zeng, Y.X. and Xie, D. (2010) Overexpression of AIB1 negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, **387**, 733-736.
- Henke, R.T., Haddad, B.R., Kim, S.E., Rone, J.D., Mani, A., Jessup, J.M., Wellstein, A., Maitra, A. and Riegel, A.T. (2004) Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB1 (SRC-3) during progression of pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, **10**, 6134-6142.
- Hermanson, O., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2002) Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab*, **13**, 55-60.
- Hershko, A. (1999) Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 1571-1575; discussion 1575-1576.
- Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 195-201.
- Hirai, Y., Utsugi, K., Takeshima, N., Kawamata, Y., Furuta, R., Kitagawa, T., Kawaguchi, T., Hasumi, K. and Noda, T. (2004) Putative gene loci associated with carcinogenesis and metastasis of endocervical adenocarcinomas of uterus determined by conventional and array-based CGH. *Am J Obstet Gynecol*, **191**, 1173-1182.
- Holbro, T., Civenni, G. and Hynes, N.E. (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*, **284**, 99-110.
- Hong, H., Kohli, K., Garabedian, M.J. and Stallcup, M.R. (1997) GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of

- steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol*, **17**, 2735-2744.
- Hossain, A., Kuo, M.T. and Saunders, G.F. (2006) Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol*, **26**, 8191-8201.
- Howell, A., DeFriend, D., Robertson, J., Blamey, R. and Walton, P. (1995) Response to a specific antioestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer. *Lancet*, **345**, 29-30.
- Hsia, E.Y., Kalashnikova, E.V., Revenko, A.S., Zou, J.X., Borowsky, A.D. and Chen, H.W. (2010) Dereglated E2F and the AAA+ Coregulator ANCCA Drive Proto-Oncogene ACTR/AIB1 Overexpression in Breast Cancer. *Mol Cancer Res*.
- Huang, Z.J., Edery, I. and Rosbash, M. (1993) PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. *Nature*, **364**, 259-262.
- Huber, M.A., Kraut, N. and Beug, H. (2005) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 548-558.
- Hudelist, G., Czerwenka, K., Kubista, E., Marton, E., Pischinger, K. and Singer, C.F. (2003) Expression of sex steroid receptors and their co-factors in normal and malignant breast tissue: AIB1 is a carcinoma-specific co-activator. *Breast Cancer Res Treat*, **78**, 193-204.
- Hurst, H.C. (2001) Update on HER-2 as a target for cancer therapy: the ERBB2 promoter and its exploitation for cancer treatment. *Breast Cancer Res*, **3**, 395-398.
- Hurtado, A., Holmes, K.A., Geistlinger, T.R., Hutcheson, I.R., Nicholson, R.I., Brown, M., Jiang, J., Howat, W.J., Ali, S. and Carroll, J.S. (2008) Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature*, **456**, 663-666.
- Ikezoe, T., Yang, Y., Saito, T., Koeffler, H.P. and Taguchi, H. (2004) Proteasome inhibitor PS-341 down-regulates prostate-specific antigen (PSA) and induces growth arrest and apoptosis of androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Sci*, **95**, 271-275.
- Iordanidou, P., Aggelidou, E., Demetriades, C. and Hadzopoulou-Cladaras, M. (2005) Distinct amino acid residues may be involved in coactivator and ligand interactions in hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J Biol Chem*, **280**, 21810-21819.
- Ito, H., Watanabe, M., Kim, Y.T. and Takahashi, K. (2009) Inhibition of rat liver cathepsins B and L by the peptide aldehyde benzyloxycarbonyl-leucyl-leucyl-leucinal and its analogues. *J Enzyme Inhib Med Chem*, **24**, 279-286.
- Iwase, H. (2006) [Predictive factors of hormonal therapy in breast cancer]. *Nippon Rinsho*, **64**, 555-560.

- Iwase, H., Omoto, Y., Toyama, T., Yamashita, H., Hara, Y., Sugiura, H. and Zhang, Z. (2003) Clinical significance of AIB1 expression in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **80**, 339-345.
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E.A. and Pines, J. (2003) Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol*, **5**, 143-148.
- Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H. and Grunert, S. (2002) Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol*, **156**, 299-313.
- Joep, R.S. and Johnson, G.V. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*, **29**, 95-102.
- Kaiser, P. and Huang, L. (2005) Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol*, **6**, 233.
- Kajiro, M., Hirota, R., Nakajima, Y., Kawanowa, K., So-Ma, K., Ito, I., Yamaguchi, Y., Ohie, S.H., Kobayashi, Y., Seino, Y., Kawano, M., Kawabe, Y.I., Takei, H., Hayashi, S.I., Kurosumi, M., Murayama, A., Kimura, K. and Yanagisawa, J. (2009) The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways. *Nat Cell Biol*.
- Kalkhoven, E., Valentine, J.E., Heery, D.M. and Parker, M.G. (1998) Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *Embo J*, **17**, 232-243.
- Kim, J.H., Li, H. and Stallcup, M.R. (2003) CoCoA, a nuclear receptor coactivator which acts through an N-terminal activation domain of p160 coactivators. *Mol Cell*, **12**, 1537-1549.
- Kinyamu, H.K. and Archer, T.K. (2003) Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Mol Cell Biol*, **23**, 5867-5881.
- Kirkegaard, T., McGlynn, L.M., Campbell, F.M., Muller, S., Tovey, S.M., Dunne, B., Nielsen, K.V., Cooke, T.G. and Bartlett, J.M. (2007) Amplified in breast cancer 1 in human epidermal growth factor receptor - positive tumors of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, **13**, 1405-1411.
- Kishimoto, M., Fujiki, R., Takezawa, S., Sasaki, Y., Nakamura, T., Yamaoka, K., Kitagawa, H. and Kato, S. (2006) Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications. *Endocr J*, **53**, 157-172.
- Klein, E.A. and Assoian, R.K. (2008) Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci*, **121**, 3853-3857.
- Komander, D., Clague, M.J. and Urbe, S. (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 550-563.

- Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J. and Peters, J.M. (2003) Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *Embo J*, **22**, 6598-6609.
- Kranenburg, O., Gebbink, M.F. and Voest, E.E. (2004) Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1654**, 23-37.
- Kuang, S.Q., Liao, L., Wang, S., Medina, D., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2005) Mice lacking the amplified in breast cancer 1/steroid receptor coactivator-3 are resistant to chemical carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res*, **65**, 7993-8002.
- Kuang, S.Q., Liao, L., Zhang, H., Lee, A.V., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2004) AIB1/SRC-3 deficiency affects insulin-like growth factor I signaling pathway and suppresses v-Ha-ras-induced breast cancer initiation and progression in mice. *Cancer Res*, **64**, 1875-1885.
- Kumar, R. and Thompson, E.B. (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*, **64**, 310-319.
- Kurebayashi, J., Otsuki, T., Kunisue, H., Tanaka, K., Yamamoto, S. and Sonoo, H. (2000) Expression levels of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta, coactivators, and corepressors in breast cancer. *Clin Cancer Res*, **6**, 512-518.
- Kwon, Y.G., Lee, S.Y., Choi, Y., Greengard, P. and Nairn, A.C. (1997) Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2168-2173.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lahusen, T., Fereshteh, M., Oh, A., Wellstein, A. and Riegel, A.T. (2007) Epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation and signaling controlled by a nuclear receptor coactivator, amplified in breast cancer 1. *Cancer Res*, **67**, 7256-7265.
- Lahusen, T., Henke, R.T., Kagan, B.L., Wellstein, A. and Riegel, A.T. (2009) The role and regulation of the nuclear receptor co-activator AIB1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **116**, 225-237.
- Lassmann, S., Weis, R., Makowiec, F., Roth, J., Danciu, M., Hopt, U. and Werner, M. (2007) Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and tumor suppressor genes in chromosomal- and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas. *J Mol Med*, **85**, 293-304.
- Lauritsen, K.J., List, H.J., Reiter, R., Wellstein, A. and Riegel, A.T. (2002) A role for TGF-beta in estrogen and retinoid mediated regulation of the nuclear receptor coactivator AIB1 in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene*, **21**, 7147-7155.
- Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P. and Parker, P.J. (1998) Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*, **281**, 2042-2045.

- Lee, S.K., Kim, H.J., Kim, J.W. and Lee, J.W. (1999) Steroid receptor coactivator-1 and its family members differentially regulate transactivation by the tumor suppressor protein p53. *Mol Endocrinol*, **13**, 1924-1933.
- Lee, S.K., Kim, H.J., Na, S.Y., Kim, T.S., Choi, H.S., Im, S.Y. and Lee, J.W. (1998) Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem*, **273**, 16651-16654.
- Lee, Y.H., Campbell, H.D. and Stallcup, M.R. (2004) Developmentally essential protein flightless I is a nuclear receptor coactivator with actin binding activity. *Mol Cell Biol*, **24**, 2103-2117.
- Leo, C., Li, H. and Chen, J.D. (2000) Differential mechanisms of nuclear receptor regulation by receptor-associated coactivator 3. *J Biol Chem*, **275**, 5976-5982.
- Li, A.J., Lerner, D.L., Gapuzan, M.E. and Karlan, B.Y. (2005) AIB1 polymorphisms predict aggressive ovarian cancer phenotype. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14**, 2919-2922.
- Li, C., Liang, Y.Y., Feng, X.H., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2008a) Essential phosphatases and a phospho-degron are critical for regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function and turnover. *Mol Cell*, **31**, 835-849.
- Li, C., Wu, R.C., Amazit, L., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2007a) Specific amino acid residues in the basic helix-loop-helix domain of SRC-3 are essential for its nuclear localization and proteasome-dependent turnover. *Mol Cell Biol*, **27**, 1296-1308.
- Li, H. and Chen, J.D. (1998) The receptor-associated coactivator 3 activates transcription through CREB-binding protein recruitment and autoregulation. *J Biol Chem*, **273**, 5948-5954.
- Li, H., Gomes, P.J. and Chen, J.D. (1997) RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8479-8484.
- Li, L.B., Louie, M.C., Chen, H.W. and Zou, J.X. (2008b) Proto-oncogene ACTR/AIB1 promotes cancer cell invasion by up-regulating specific matrix metalloproteinase expression. *Cancer Lett*, **261**, 64-73.
- Li, X., Amazit, L., Long, W., Lonard, D.M., Monaco, J.J. and O'Malley, B.W. (2007b) Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway. *Mol Cell*, **26**, 831-842.
- Li, X., Lonard, D.M., Jung, S.Y., Malovannaya, A., Feng, Q., Qin, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2006) The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome. *Cell*, **124**, 381-392.
- List, H.J., Lauritsen, K.J., Reiter, R., Powers, C., Wellstein, A. and Riegel, A.T. (2001a) Ribozyme targeting demonstrates that the nuclear receptor coactivator AIB1 is a rate-limiting factor for estrogen-

- dependent growth of human MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem*, **276**, 23763-23768.
- List, H.J., Reiter, R., Singh, B., Wellstein, A. and Riegel, A.T. (2001b) Expression of the nuclear coactivator AIB1 in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*, **68**, 21-28.
- Litterst, C.M., Kliem, S., Marilley, D. and Pfitzner, E. (2003) NCoA-1/SRC-1 is an essential coactivator of STAT5 that binds to the FDL motif in the alpha-helical region of the STAT5 transactivation domain. *J Biol Chem*, **278**, 45340-45351.
- Litterst, C.M. and Pfitzner, E. (2002) An LXXLL motif in the transactivation domain of STAT6 mediates recruitment of NCoA-1/SRC-1. *J Biol Chem*, **277**, 36052-36060.
- Liu, F., Rothblum-Oviatt, C., Ryan, C.E. and Piwnica-Worms, H. (1999) Overproduction of human Myt1 kinase induces a G2 cell cycle delay by interfering with the intracellular trafficking of Cdc2-cyclin B1 complexes. *Mol Cell Biol*, **19**, 5113-5123.
- Liu, M.Z., Xie, D., Mai, S.J., Tong, Z.T., Shao, J.Y., Fu, Y.S., Xia, W.J., Kung, H.F., Guan, X.Y. and Zeng, Y.X. (2008) Overexpression of AIB1 in nasopharyngeal carcinomas correlates closely with advanced tumor stage. *Am J Clin Pathol*, **129**, 728-734.
- Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L. and O'Malley, B.W. (2000) The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell*, **5**, 939-948.
- Lonard, D.M. and O'Malley, B.W. (2006) The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell*, **125**, 411-414.
- Louet, J.F., Coste, A., Amazit, L., Tannour-Louet, M., Wu, R.C., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Auwerx, J. and O'Malley, B.W. (2006) Oncogenic steroid receptor coactivator-3 is a key regulator of the white adipogenic program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 17868-17873.
- Louie, M.C., Revenko, A.S., Zou, J.X., Yao, J. and Chen, H.W. (2006) Direct control of cell cycle gene expression by proto-oncogene product ACTR, and its autoregulation underlies its transforming activity. *Mol Cell Biol*, **26**, 3810-3823.
- Louie, M.C., Zou, J.X., Rabinovich, A. and Chen, H.W. (2004) ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol*, **24**, 5157-5171.
- Lu, Y.Y., Lam, C.Y. and Yung, B.Y. (1996) Decreased accumulation and dephosphorylation of the mitosis-specific form of nucleophosmin/B23 in staurosporine-induced chromosome decondensation. *Biochem J*, **317 (Pt 1)**, 321-327.
- Ludwig, H., Khayat, D., Giaccone, G. and Facon, T. (2005) Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer*, **104**, 1794-1807.

- Luo, J.H., Xie, D., Liu, M.Z., Chen, W., Liu, Y.D., Wu, G.Q., Kung, H.F., Zeng, Y.X. and Guan, X.Y. (2008) Protein expression and amplification of AIB1 in human urothelial carcinoma of the bladder and overexpression of AIB1 is a new independent prognostic marker of patient survival. *Int J Cancer*, **122**, 2554-2561.
- Maehama, T. (2007) PTEN: its deregulation and tumorigenesis. *Biol Pharm Bull*, **30**, 1624-1627.
- Mani, A., Oh, A.S., Bowden, E.T., Lahusen, T., Lorick, K.L., Weissman, A.M., Schlegel, R., Wellstein, A. and Riegel, A.T. (2006) E6AP mediates regulated proteasomal degradation of the nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer 1 in immortalized cells. *Cancer Res*, **66**, 8680-8686.
- Marquez, D.C., Chen, H.W., Curran, E.M., Welshons, W.V. and Pietras, R.J. (2006) Estrogen receptors in membrane lipid rafts and signal transduction in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, **246**, 91-100.
- Martinez-Balbas, M.A., Dey, A., Rabindran, S.K., Ozato, K. and Wu, C. (1995) Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin. *Cell*, **83**, 29-38.
- McInerney, E.M., Rose, D.W., Flynn, S.E., Westin, S., Mullen, T.M., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R.T., Assa-Munt, N., Milburn, M.V., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1998) Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev*, **12**, 3357-3368.
- Minshull, J., Blow, J.J. and Hunt, T. (1989) Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated xenopus eggs to enter mitosis. *Cell*, **56**, 947-956.
- Mochida, S. and Hunt, T. (2007) Calcineurin is required to release Xenopus egg extracts from meiotic M phase. *Nature*, **449**, 336-340.
- Moelling, K., Schad, K., Bosse, M., Zimmermann, S. and Schweneker, M. (2002) Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem*, **277**, 31099-31106.
- Muchardt, C., Reyes, J.C., Bourachot, B., Leguoy, E. and Yaniv, M. (1996) The hbrm and BRG-1 proteins, components of the human SNF/SWI complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis. *Embo J*, **15**, 3394-3402.
- Mukherjee, A., Amato, P., Craig-Allred, D., DeMayo, F.J., O'Malley, B.W. and Lydon, J.P. (2007) Steroid receptor coactivator 2: an essential coregulator of progestin-induced uterine and mammary morphogenesis. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 55-76.
- Murphy, L.C., Simon, S.L., Parkes, A., Leygue, E., Dotzlaw, H., Snell, L., Troup, S., Adeyinka, A. and Watson, P.H. (2000) Altered expression of estrogen receptor coregulators during human breast tumorigenesis. *Cancer Res*, **60**, 6266-6271.

- Murray, A.W., Solomon, M.J. and Kirschner, M.W. (1989) The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature*, **339**, 280-286.
- Muslin, A.J. and Xing, H. (2000) 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal*, **12**, 703-709.
- Mussi, P., Yu, C., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2006) Stimulation of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) gene overexpression by a positive regulatory loop of E2F1 and SRC-3. *Mol Endocrinol*, **20**, 3105-3119.
- Myers, E., Hill, A.D., Kelly, G., McDermott, E.W., O'Higgins, N.J., Buggy, Y. and Young, L.S. (2005) Associations and interactions between Ets-1 and Ets-2 and coregulatory proteins, SRC-1, AIB1, and NCoR in breast cancer. *Clin Cancer Res*, **11**, 2111-2122.
- Na, S.Y., Lee, S.K., Han, S.J., Choi, H.S., Im, S.Y. and Lee, J.W. (1998) Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem*, **273**, 10831-10834.
- Naeem, H., Cheng, D., Zhao, Q., Underhill, C., Tini, M., Bedford, M.T. and Torchia, J. (2007) The activity and stability of the transcriptional coactivator p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-dependent methylation. *Mol Cell Biol*, **27**, 120-134.
- Nahta, R., Yuan, L.X., Zhang, B., Kobayashi, R. and Esteva, F.J. (2005) Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res*, **65**, 11118-11128.
- Nawaz, Z., Lonard, D.M., Smith, C.L., Lev-Lehman, E., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1999) The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol*, **19**, 1182-1189.
- Nessler-Menardi, C., Jotova, I., Culig, Z., Eder, I.E., Putz, T., Bartsch, G. and Klocker, H. (2000) Expression of androgen receptor coregulatory proteins in prostate cancer and stromal-cell culture models. *Prostate*, **45**, 124-131.
- Nigg, E.A. (1993) Cellular substrates of p34(cdc2) and its companion cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol*, **3**, 296-301.
- Nigg, E.A. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 21-32.
- Oh, A., List, H.J., Reiter, R., Mani, A., Zhang, Y., Gehan, E., Wellstein, A. and Riegel, A.T. (2004) The nuclear receptor coactivator AIB1 mediates insulin-like growth factor I-induced phenotypic changes in human breast cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 8299-8308.
- Oh, A.S., Lahusen, J.T., Chien, C.D., Fereshteh, M.P., Zhang, X., Dakshanamurthy, S., Xu, J., Kagan, B.L., Wellstein, A. and Riegel, A.T. (2008) Tyrosine phosphorylation of the nuclear receptor coactivator AIB1/SRC-3 is enhanced by Abl kinase and is required for its activity in cancer cells. *Mol Cell Biol*, **28**, 6580-6593.

- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. and Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, **127**, 635-648.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, **270**, 1354-1357.
- Osborne, C.K., Bardou, V., Hopp, T.A., Chamness, G.C., Hilsenbeck, S.G., Fuqua, S.A., Wong, J., Allred, D.C., Clark, G.M. and Schiff, R. (2003) Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **95**, 353-361.
- Osborne, C.K. and Schiff, R. (2003) Growth factor receptor cross-talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast*, **12**, 362-367.
- Osborne, C.K., Shou, J., Massarweh, S. and Schiff, R. (2005) Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res*, **11**, 865s-870s.
- Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M. and Donner, D.B. (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, **401**, 82-85.
- Pan, S.Y. and DesMeules, M. (2009) Energy intake, physical activity, energy balance, and cancer: epidemiologic evidence. *Methods Mol Biol*, **472**, 191-215.
- Pariat, M., Carillo, S., Molinari, M., Salvat, C., Debussche, L., Bracco, L., Milner, J. and Piechaczyk, M. (1997) Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol Cell Biol*, **17**, 2806-2815.
- Park, K.J., Krishnan, V., O'Malley, B.W., Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. (2005) Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell*, **18**, 71-82.
- Perkins, N.D. (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 49-62.
- Perry, J.A. and Kornbluth, S. (2007) Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div*, **2**, 12.
- Petersen, B.O., Lukas, J., Sorensen, C.S., Bartek, J. and Helin, K. (1999) Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *Embo J*, **18**, 396-410.
- Picard, F., Gehin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M.F., O'Malley, B.W., Chambon, P. and Auwerx, J. (2002) SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell*, **111**, 931-941.
- Pickart, C.M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*, **25**, 544-548.

- Pischon, T., Nothlings, U. and Boeing, H. (2008) Obesity and cancer. *Proc Nutr Soc*, **67**, 128-145.
- Planas-Silva, M.D., Donaher, J.L. and Weinberg, R.A. (1999) Functional activity of ectopically expressed estrogen receptor is not sufficient for estrogen-mediated cyclin D1 expression. *Cancer Res*, **59**, 4788-4792.
- Planas-Silva, M.D., Shang, Y., Donaher, J.L., Brown, M. and Weinberg, R.A. (2001) AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Res*, **61**, 3858-3862.
- Potapova, T.A., Daum, J.R., Pittman, B.D., Hudson, J.R., Jones, T.N., Satinover, D.L., Stukenberg, P.T. and Gorbsky, G.J. (2006) The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells. *Nature*, **440**, 954-958.
- Poukka, H., Aarnisalo, P., Karvonen, U., Palvimo, J.J. and Janne, O.A. (1999) Ubc9 interacts with the androgen receptor and activates receptor-dependent transcription. *J Biol Chem*, **274**, 19441-19446.
- Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K.S., Lehotzky, R.E. and Matouschek, A. (2004) An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 830-837.
- Prescott, D.M. and Bender, M.A. (1962) Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells. *Exp Cell Res*, **26**, 260-268.
- Press, M.F., Sauter, G., Bernstein, L., Villalobos, I.E., Mirlacher, M., Zhou, J.Y., Wardeh, R., Li, Y.T., Guzman, R., Ma, Y., Sullivan-Halley, J., Santiago, A., Park, J.M., Riva, A. and Slamon, D.J. (2005) Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res*, **11**, 6598-6607.
- Prymakowska-Bosak, M., Hock, R., Catez, F., Lim, J.H., Birger, Y., Shirakawa, H., Lee, K. and Bustin, M. (2002) Mitotic phosphorylation of chromosomal protein HMGN1 inhibits nuclear import and promotes interaction with 14.3.3 proteins. *Mol Cell Biol*, **22**, 6809-6819.
- Qin, L., Liao, L., Redmond, A., Young, L., Yuan, Y., Chen, H., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2008) The AIB1 oncogene promotes breast cancer metastasis by activation of PEA3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression. *Mol Cell Biol*, **28**, 5937-5950.
- Qin, L., Liu, Z., Chen, H. and Xu, J. (2009) The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer Res*, **69**, 3819-3827.
- Qutob, M.S., Bhattacharjee, R.N., Pollari, E., Yee, S.P. and Torchia, J. (2002) Microtubule-dependent subcellular redistribution of the transcriptional coactivator p/CIP. *Mol Cell Biol*, **22**, 6611-6626.
- Radice, P. (2002) Mutations of BRCA genes in hereditary breast and ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, **21**, 9-12.

- Rangel, J., Torabian, S., Shaikh, L., Nosrati, M., Baehner, F.L., Haqq, C., Leong, S.P., Miller, J.R., 3rd, Sagebiel, R.W. and Kashani-Sabet, M. (2006) Prognostic significance of nuclear receptor coactivator-3 overexpression in primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*, **24**, 4565-4569.
- Razeto, A., Ramakrishnan, V., Litterst, C.M., Giller, K., Griesinger, C., Carlomagno, T., Lakomek, N., Heimbürg, T., Lodrini, M., Pfitzner, E. and Becker, S. (2004) Structure of the NCoA-1/SRC-1 PAS-B domain bound to the LXXLL motif of the STAT6 transactivation domain. *J Mol Biol*, **336**, 319-329.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S.W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, **21**, 267-271.
- Redmond, A.M., Bane, F.T., Stafford, A.T., McIlroy, M., Dillon, M.F., Crotty, T.B., Hill, A.D. and Young, L.S. (2009) Coassociation of estrogen receptor and p160 proteins predicts resistance to endocrine treatment; SRC-1 is an independent predictor of breast cancer recurrence. *Clin Cancer Res*, **15**, 2098-2106.
- Reiter, R., Oh, A.S., Wellstein, A. and Riegel, A.T. (2004) Impact of the nuclear receptor coactivator AIB1 isoform AIB1-Delta3 on estrogenic ligands with different intrinsic activity. *Oncogene*, **23**, 403-409.
- Reiter, R., Wellstein, A. and Riegel, A.T. (2001) An isoform of the coactivator AIB1 that increases hormone and growth factor sensitivity is overexpressed in breast cancer. *J Biol Chem*, **276**, 39736-39741.
- Rey, J.M., Pujol, P., Callier, P., Cavailles, V., Freiss, G., Maudelonde, T. and Brouillet, J.P. (2000) Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to evaluate the expression patterns of genes involved in the oestrogen pathway. *J Mol Endocrinol*, **24**, 433-440.
- Romashkova, J.A. and Makarov, S.S. (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, **401**, 86-90.
- Saji, S., Okumura, N., Eguchi, H., Nakashima, S., Suzuki, A., Toi, M., Nozawa, Y., Saji, S. and Hayashi, S. (2001) MDM2 enhances the function of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 259-265.
- Sakaguchi, H., Fujimoto, J., Sun, W.S. and Tamaya, T. (2007) Clinical implications of steroid receptor coactivator (SRC)-3 in uterine endometrial cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **104**, 237-240.
- Sakakura, C., Hagiwara, A., Yasuoka, R., Fujita, Y., Nakanishi, M., Masuda, K., Kimura, A., Nakamura, Y., Inazawa, J., Abe, T. and Yamagishi, H. (2000) Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer*, **89**, 217-223.
- Salghetti, S.E., Muratani, M., Wijnen, H., Futcher, B. and Tansey, W.P. (2000) Functional overlap of sequences that activate transcription

- and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3118-3123.
- Samani, A.A., Yakar, S., LeRoith, D. and Brodt, P. (2007) The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev*, **28**, 20-47.
- Satyanarayana, A., Manns, M.P. and Rudolph, K.L. (2004) Telomeres, telomerase and cancer: an endless search to target the ends. *Cell Cycle*, **3**, 1138-1150.
- Savkur, R.S. and Burris, T.P. (2004) The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res*, **63**, 207-212.
- Scharovsky, O.G., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I. and Matar, P. (2000) Inhibition of ras oncogene: a novel approach to antineoplastic therapy. *J Biomed Sci*, **7**, 292-298.
- Schiff, R., Massarweh, S., Shou, J. and Osborne, C.K. (2003) Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res*, **9**, 447S-454S.
- Segil, N., Roberts, S.B. and Heintz, N. (1991) Mitotic phosphorylation of the Oct-1 homeodomain and regulation of Oct-1 DNA binding activity. *Science*, **254**, 1814-1816.
- Sellers, W.R. and Kaelin, W.G., Jr. (1997) Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*, **15**, 3301-3312.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A. and Brown, M. (2000) Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*, **103**, 843-852.
- Shao, D., Berrodin, T.J., Manas, E., Hauze, D., Powers, R., Bapat, A., Gonder, D., Winneker, R.C. and Frail, D.E. (2004a) Identification of novel estrogen receptor alpha antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **88**, 351-360.
- Shao, W., Keeton, E.K., McDonnell, D.P. and Brown, M. (2004b) Coactivator AIB1 links estrogen receptor transcriptional activity and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11599-11604.
- Shen, Y. and White, E. (2001) p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res*, **82**, 55-84.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A. and Greene, G.L. (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, **95**, 927-937.
- Shibata, A., Hayashi, Y., Imai, T., Funahashi, H., Nakao, A. and Seo, H. (2001) Somatic gene alteration of AIB1 gene in patients with breast cancer. *Endocr J*, **48**, 199-204.
- Shin, I., Miller, T. and Arteaga, C.L. (2006) ErbB receptor signaling and therapeutic resistance to aromatase inhibitors. *Clin Cancer Res*, **12**, 1008s-1012s.

- Silver, P.A., Keegan, L.P. and Ptashne, M. (1984) Amino terminus of the yeast GAL4 gene product is sufficient for nuclear localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 5951-5955.
- Singh, G.P., Ganapathi, M., Sandhu, K.S. and Dash, D. (2006) Intrinsic unstructuredness and abundance of PEST motifs in eukaryotic proteomes. *Proteins*, **62**, 309-315.
- Skoufias, D.A., Indorato, R.L., Lacroix, F., Panopoulos, A. and Margolis, R.L. (2007) Mitosis persists in the absence of Cdk1 activity when proteolysis or protein phosphatase activity is suppressed. *J Cell Biol*, **179**, 671-685.
- Smith, C.L., Nawaz, Z. and O'Malley, B.W. (1997) Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol*, **11**, 657-666.
- Soutoglou, E., Papafotiou, G., Katrakili, N. and Talianidis, I. (2000) Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-1 requires synergism between multiple coactivator proteins. *J Biol Chem*, **275**, 12515-12520.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, **389**, 194-198.
- Spurdle, A.B., Antoniou, A.C., Kelemen, L., Holland, H., Peock, S., Cook, M.R., Smith, P.L., Greene, M.H., Simard, J., Plourde, M., Southey, M.C., Godwin, A.K., Beck, J., Miron, A., Daly, M.B., Santella, R.M., Hopper, J.L., John, E.M., Andrulis, I.L., Durocher, F., Struewing, J.P., Easton, D.F. and Chenevix-Trench, G. (2006) The AIB1 polyglutamine repeat does not modify breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **15**, 76-79.
- Su, Q., Hu, S., Gao, H., Ma, R., Yang, Q., Pan, Z., Wang, T. and Li, F. (2008) Role of AIB1 for tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Oncology*, **75**, 159-168.
- Suen, C.S., Berrodin, T.J., Mastroeni, R., Cheskis, B.J., Lyttle, C.R. and Frail, D.E. (1998) A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J Biol Chem*, **273**, 27645-27653.
- Sullivan, M. and Morgan, D.O. (2007) Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 894-903.
- Takeda, D.Y., Wohlschlegel, J.A. and Dutta, A. (2001) A bipartite substrate recognition motif for cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*, **276**, 1993-1997.
- Takeshita, A., Cardona, G.R., Koibuchi, N., Suen, C.S. and Chin, W.W. (1997) TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem*, **272**, 27629-27634.

- Tanner, M.M., Grenman, S., Koul, A., Johannsson, O., Meltzer, P., Pejovic, T., Borg, A. and Isola, J.J. (2000) Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, **6**, 1833-1839.
- Thorat, M.A., Turbin, D., Morimiya, A., Leung, S., Zhang, Q., Jeng, M.H., Huntsman, D.G., Nakshatri, H. and Badve, S. (2008) Amplified in breast cancer 1 expression in breast cancer. *Histopathology*, **53**, 634-641.
- Tikkanen, M.K., Carter, D.J., Harris, A.M., Le, H.M., Azorsa, D.O., Meltzer, P.S. and Murdoch, F.E. (2000) Endogenously expressed estrogen receptor and coactivator AIB1 interact in MCF-7 human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12536-12540.
- Tilli, M.T., Reiter, R., Oh, A.S., Henke, R.T., McDonnell, K., Gallicano, G.I., Furth, P.A. and Riegel, A.T. (2005) Overexpression of an N-terminally truncated isoform of the nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer 1 leads to altered proliferation of mammary epithelial cells in transgenic mice. *Mol Endocrinol*, **19**, 644-656.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1997) The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, **387**, 677-684.
- Torres-Arzayus, M.I., Font de Mora, J., Yuan, J., Vazquez, F., Bronson, R., Rue, M., Sellers, W.R. and Brown, M. (2004) High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell*, **6**, 263-274.
- Torres-Arzayus, M.I., Yuan, J., DellaGatta, J.L., Lane, H., Kung, A.L. and Brown, M. (2006) Targeting the AIB1 oncogene through mammalian target of rapamycin inhibition in the mammary gland. *Cancer Res*, **66**, 11381-11388.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. and Nishida, E. (2002) Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep*, **3**, 341-348.
- Trinkle-Mulcahy, L. and Lamond, A.I. (2006) Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 623-631.
- Tsubuki, S., Saito, Y., Tomioka, M., Ito, H. and Kawashima, S. (1996) Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem*, **119**, 572-576.
- Vasilescu, J., Guo, X. and Kast, J. (2004) Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics*, **4**, 3845-3854.
- Vodermaier, H.C. (2004) APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol*, **14**, R787-796.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1998) The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-

- binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *Embo J*, **17**, 507-519.
- Wallace-Brodeur, R.R. and Lowe, S.W. (1999) Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 64-75.
- Wang, L.H., Yang, X.Y., Zhang, X., An, P., Kim, H.J., Huang, J., Clarke, R., Osborne, C.K., Inman, J.K., Appella, E. and Farrar, W.L. (2006) Disruption of estrogen receptor DNA-binding domain and related intramolecular communication restores tamoxifen sensitivity in resistant breast cancer. *Cancer Cell*, **10**, 487-499.
- Wang, S., Yuan, Y., Liao, L., Kuang, S.Q., Tien, J.C., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2009) Disruption of the SRC-1 gene in mice suppresses breast cancer metastasis without affecting primary tumor formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 151-156.
- Wang, Y., Wu, M.C., Sham, J.S., Zhang, W., Wu, W.Q. and Guan, X.Y. (2002) Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray. *Cancer*, **95**, 2346-2352.
- Wang, Z., Rose, D.W., Hermanson, O., Liu, F., Herman, T., Wu, W., Szeto, D., Gleiberman, A., Kronos, A., Pratt, K., Rosenfeld, R., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2000) Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13549-13554.
- Weeda, G., Rossignol, M., Fraser, R.A., Winkler, G.S., Vermeulen, W., van 't Veer, L.J., Ma, L., Hoeijmakers, J.H. and Egly, J.M. (1997) The XPB subunit of repair/transcription factor TFIIH directly interacts with SUG1, a subunit of the 26S proteasome and putative transcription factor. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2274-2283.
- Weis, K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, **112**, 441-451.
- Werbajh, S., Nojek, I., Lanz, R. and Costas, M.A. (2000) RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. *FEBS Lett*, **485**, 195-199.
- Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J. (2000) Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 1172-1183.
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Takeda, D.Y. and Dutta, A. (2001) Mutational analysis of the Cy motif from p21 reveals sequence degeneracy and specificity for different cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*, **21**, 4868-4874.
- Wu, H., Sun, L., Zhang, Y., Chen, Y., Shi, B., Li, R., Wang, Y., Liang, J., Fan, D., Wu, G., Wang, D., Li, S. and Shang, Y. (2006) Coordinated regulation of AIB1 transcriptional activity by sumoylation and phosphorylation. *J Biol Chem*, **281**, 21848-21856.
- Wu, R.C., Feng, Q., Lonard, D.M. and O'Malley, B.W. (2007) SRC-3 coactivator functional lifetime is regulated by a phospho-dependent ubiquitin time clock. *Cell*, **129**, 1125-1140.
- Wu, R.C., Qin, J., Hashimoto, Y., Wong, J., Xu, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2002) Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-

- 1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol*, **22**, 3549-3561.
- Wu, R.C., Qin, J., Yi, P., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2004) Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell*, **15**, 937-949.
- Xie, D., Sham, J.S., Zeng, W.F., Lin, H.L., Bi, J., Che, L.H., Hu, L., Zeng, Y.X. and Guan, X.Y. (2005) Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma. *Hum Pathol*, **36**, 777-783.
- Xu, F.P., Liu, Y.H., Zhuang, H.G., Li, L., Luo, X.L. and Wen, J.M. (2008) [Role of AIB1 gene in development of esophageal squamous cell carcinoma and its clinicopathologic significance]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, **37**, 250-254.
- Xu, F.P., Xie, D., Wen, J.M., Wu, H.X., Liu, Y.D., Bi, J., Lv, Z.L., Zeng, Y.X. and Guan, X.Y. (2007) SRC-3/AIB1 protein and gene amplification levels in human esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Lett*, **245**, 69-74.
- Xu, J., Liao, L., Ning, G., Yoshida-Komiya, H., Deng, C. and O'Malley, B.W. (2000) The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6379-6384.
- Xu, J., Wu, R.C. and O'Malley, B.W. (2009) Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat Rev Cancer*, **9**, 615-630.
- Xu, W., Marcu, M., Yuan, X., Mimnaugh, E., Patterson, C. and Neckers, L. (2002) Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12847-12852.
- Yamasaki, L. and Pagano, M. (2004) Cell cycle, proteolysis and cancer. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 623-628.
- Yan, F., Gao, X., Lonard, D.M. and Nawaz, Z. (2003) Specific ubiquitin-conjugating enzymes promote degradation of specific nuclear receptor coactivators. *Mol Endocrinol*, **17**, 1315-1331.
- Yan, J., Erdem, H., Li, R., Cai, Y., Ayala, G., Ittmann, M., Yu-Lee, L.Y., Tsai, S.Y. and Tsai, M.J. (2008) Steroid receptor coactivator-3/AIB1 promotes cell migration and invasiveness through focal adhesion turnover and matrix metalloproteinase expression. *Cancer Res*, **68**, 5460-5468.
- Yan, J., Yu, C.T., Ozen, M., Ittmann, M., Tsai, S.Y. and Tsai, M.J. (2006) Steroid receptor coactivator-3 and activator protein-1 coordinately regulate the transcription of components of the insulin-like growth factor/AKT signaling pathway. *Cancer Res*, **66**, 11039-11046.

- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. and Weinberg, R.A. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, **117**, 927-939.
- Yeung, P.L., Zhang, A. and Chen, J.D. (2006) Nuclear localization of coactivator RAC3 is mediated by a bipartite NLS and importin alpha3. *Biochem Biophys Res Commun*, **348**, 13-24.
- Yi, P., Feng, Q., Amazit, L., Lonard, D.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2008) Atypical protein kinase C regulates dual pathways for degradation of the oncogenic coactivator SRC-3/AIB1. *Mol Cell*, **29**, 465-476.
- Ying, H., Willingham, M.C. and Cheng, S.Y. (2008) The steroid receptor coactivator-3 is a tumor promoter in a mouse model of thyroid cancer. *Oncogene*, **27**, 823-830.
- Yu, C., York, B., Wang, S., Feng, Q., Xu, J. and O'Malley, B.W. (2007) An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response. *Mol Cell*, **25**, 765-778.
- Yuan, Y., Liao, L., Tulis, D.A. and Xu, J. (2002) Steroid receptor coactivator-3 is required for inhibition of neointima formation by estrogen. *Circulation*, **105**, 2653-2659.
- Zachariae, W. and Nasmyth, K. (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*, **13**, 2039-2058.
- Zeng, S.D., Xie, D., Lin, F., Wang, C.X., Tao, Y. and Zhang, M. (2005) [Expression and amplification of steroid receptor coactivator-3 gene in colorectal carcinoma and its clinicopathological significance]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, **8**, 67-70.
- Zhang, A., Yeung, P.L., Li, C.W., Tsai, S.C., Dinh, G.K., Wu, X., Li, H. and Chen, J.D. (2004) Identification of a novel family of ankyrin repeats containing cofactors for p160 nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem*, **279**, 33799-33805.
- Zhang, S.Y., Liu, S.C., Al-Saleem, L.F., Holloran, D., Babb, J., Guo, X. and Klein-Szanto, A.J. (2000) E2F-1: a proliferative marker of breast neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 395-401.
- Zhang, Y., Zhang, H., Liang, J., Yu, W. and Shang, Y. (2007) SIP, a novel ankyrin repeat containing protein, sequesters steroid receptor coactivators in the cytoplasm. *Embo J*, **26**, 2645-2657.
- Zhao, C., Yasui, K., Lee, C.J., Kurioka, H., Hosokawa, Y., Oka, T. and Inazawa, J. (2003) Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis. *Cancer*, **98**, 18-23.
- Zhao, W., Zhang, Q., Kang, X., Jin, S. and Lou, C. (2009) AIB1 is required for the acquisition of epithelial growth factor receptor-mediated

- tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **380**, 699-704.
- Zheng, F.F., Wu, R.C., Smith, C.L. and O'Malley, B.W. (2005) Rapid estrogen-induced phosphorylation of the SRC-3 coactivator occurs in an extranuclear complex containing estrogen receptor. *Mol Cell Biol*, **25**, 8273-8284.
- Zhou, G., Hashimoto, Y., Kwak, I., Tsai, S.Y. and Tsai, M.J. (2003) Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth. *Mol Cell Biol*, **23**, 7742-7755.
- Zhou, H.J., Yan, J., Luo, W., Ayala, G., Lin, S.H., Erdem, H., Ittmann, M., Tsai, S.Y. and Tsai, M.J. (2005) SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res*, **65**, 7976-7983.
- Zhou, X.E., Suino-Powell, K.M., Li, J., He, A., Mackeigan, J.P., Melcher, K., Yong, E.L. and Xu, H.E. (2010) Identification of SRC3/AIB1 as A Preferred Coactivator for Hormone-Activated Androgen Receptor. *J Biol Chem*.
- Zhu, Q., Wani, G., Yao, J., Patnaik, S., Wang, Q.E., El-Mahdy, M.A., Praetorius-Ibba, M. and Wani, A.A. (2007) The ubiquitin-proteasome system regulates p53-mediated transcription at p21waf1 promoter. *Oncogene*, **26**, 4199-4208.
- Zhu, Q., Yao, J., Wani, G., Chen, J., Wang, Q.E. and Wani, A.A. (2004) The ubiquitin-proteasome pathway is required for the function of the viral VP16 transcriptional activation domain. *FEBS Lett*, **556**, 19-25.
- Ziegler, J.L. and Buonaguro, F.M. (2009) Infectious agents and human malignancies. *Front Biosci*, **14**, 3455-3464.
- Zou, J.X., Zhong, Z., Shi, X.B., Tepper, C.G., deVere White, R.W., Kung, H.J. and Chen, H. (2006) ACTR/AIB1/SRC-3 and androgen receptor control prostate cancer cell proliferation and tumor growth through direct control of cell cycle genes. *Prostate*, **66**, 1474-1486.

— ABREVIATURAS —

AEBSF: 4-(2-aminoetil) bencenosulfonil fluoruro
AIB1: del inglés “Amplified in Breast Cancer 1”
ATP: adenosina trifosfato
Å: angstrom
BSA: seroalbúmina bovina
BrdU: 5'-bromo-2'-deoxiuridina
C: citosol
cdNA: ácido desoxirribonucleico complementario
°C: grado centígrado
CHX: cicloheximida
cm: centímetro
conc.: concentración
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM: del inglés “Dulbecco’s modified Eagle’s Medium”
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
DTT: ditioneitol
E1, E2 y E3: enzima activadora de ubiquitina, enzima conjugadora de ubiquitina y enzima ligasa de ubiquitinas
E2: 17-β-estradiol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGTA: ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil)
ER: receptor de estrógenos
FBS: suero bovino fetal
FBW: del inglés “Far Western Blot”
g: gramo
Gal4-DBD: dominio de unión a DNA de Gal4
GST: Glutación-S-Transferasa
h: hora
HA: hemaglutinina
HPLC: cromatografía líquida de alta presión
Ig: inmunoglobulina
IP: inmunoprecipitación
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
KDa: kilodalton
L: litro
LB: medio Luria Bertani
LMB: leptomicina B
M: molar

mA: miliamperio
mg: miligramo
min: minuto
ml: mililitro
mM: milimolar
mRNA: RNA mensajero
N: núcleo
ng: nanogramo
nM: nanomolar
OA: ácido okadaico
OHT: 4-hidroxi-tamoxifeno
PBS: tampón fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
Rb: proteína del retinoblastoma
RNA: ácido ribonucleico
rpm: revoluciones por minuto
RT-PCR: reacción retrotranscriptasa seguida de PCR
s: segundo
SDS: dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SE: error estándar
SERM: modulador selectivo del receptor de estrógenos
TCA: ácido tricloroacético
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
 $t_{1/2}$: tiempo vida media
ub: ubiquitina
V: voltio
v/v: relación volumen/volumen
p/v: relación peso/volumen
x g: veces la fuerza de la gravedad
 μCi : microcurio
 μg : microgramo
 μl : microlitro
 μM : micromolar
 μm : micra

Abreviaturas de aminoácidos

A	Ala	alanina
D	Asp	ácido aspártico
F	Phe	fenilalanina
H	His	histidina
K	Lys	lisina

M	Met	metionina
P	Pro	prolina
R	Arg	arginina
T	Thr	treonina
W	Trp	triptófano
C	Cys	cisteína
E	Glu	ácido glutámico
G	Gly	glicina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
N	Asn	asparagina
Q	Gln	glutamina
S	Ser	serina
V	Val	valina
Y	Tyr	tirosina
X	cualquier aminoácido	
Ø	aminoácido hidrofóbico	

Abreviaturas de bases nitrogenadas

A	adenina
U	uracilo
T	timidina
C	citosina
G	guanina

— AGRADECIMIENTOS —

Desde la algarabía y ruido del macrocosmos en el que se desenvuelve nuestra vida, doy gracias a la ciencia por brindarme la oportunidad de transportarme al mundo de lo pequeño, infinitesimal y microscópico para poder aportar mi pequeño granito de arena. Pequeña aportación que es el conjunto del trabajo de un gran equipo. Grande, no por el número de individuos, sino por la riqueza que me han aportado cada uno de sus miembros: Vanesa, Leo, Joan, Álvaro, Emma, Sabrina, mis niñas y Jaime.

Gracias a Jaime por sus enseñanzas, las oportunidades, la paciencia y el tiempo dedicado en todo momento, las ideas aportadas, las facilidades para llevarlas a cabo y por creer en mi cuando se me iluminaban las bombillitas.

Gracias a Robert por la revisión de este trabajo y por su gran ayuda en la recta final.

Gracias a Vanesa por sus horas de escucha activa en mis días grises y marrones y por su dedicación desinteresada a los logros del equipo. Gracias a M^a Jesús y a Lorena por enriquecer estos años con el ingenio y la chispa que les caracteriza. Chicas, sois como hermanas para mí!

Gracias a todos los compañeros y compañeras del centro por los momentos divertidos, por estar siempre ahí y por hacerme partícipe de la gran familia que todos juntos formamos, aprendiendo los unos de los otros en la gran labor de investigar.

Y cómo no, desde el mundo de lo microscópico e invisible a los ojos, doy gracias a mis celulitas por permitirme tratar con ellas y ayudarme a comprender, aunque a veces con dificultades, la naturaleza de su esencia.