



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Doctorado en Bioquímica y Biomedicina

CARACTERIZACIÓN DEL SUPRESOR TUMORAL DRO1

Y SU REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR AIB1

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Juan Ferragud Montrull

Dirigida por: Dr Jaime Font de Mora Saínz

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
1- El cáncer	13
1.1- Señales de proliferación.....	16
1.2- Señales inhibitoras de proliferación.....	18
1.3- Apoptosis	20
1.4- Capacidad replicativa.....	25
1.5- Angiogénesis.....	27
1.6- Invasión de tejidos y metástasis	28
2- DRO1	30
2.1- Secuencia y estructura de DRO1	31
2.1.1- Estructura y función del dominio P-DUDES	34
2.2- Expresión de DRO1	36
2.2.1- Tejidos en los que DRO1 se expresa	36
2.2.2- Regulación de la expresión de DRO1	37
2.3- Funciones biológicas de DRO1	39
2.3.1- DRO1 como supresor tumoral	39
2.3.2- Papel de DRO1 en diferenciación celular y desarrollo	41
2.3.3- Papel de DRO1 en metabolismo	45
3- AIB1	47
3.1- La familia p60 de coactivadores transcripcionales	47

3.1.1- Introducción y clasificación de las proteínas SRC.....	47
3.1.2- Mecanismo molecular de la activación transcripcional por SRC	51
3.1.3- Estructura y dominios de las proteínas SRC.....	52
3.2- Funciones fisiológicas y patológicas de AIB1	56
3.2.1- Papel de AIB1 en el desarrollo	57
3.2.2- Papel de AIB1 en reproducción	57
3.2.3- Papel de AIB1 en metabolismo.....	58
3.2.4- Otras funciones fisiológicas de AIB1	59
3.2.5- Función de AIB1 en cáncer.....	60
3.3- Modificaciones postraduccionales de AIB1	61
3.4- Mecanismos moleculares de la oncogénesis mediada por AIB1	64
3.4.1- Vía de transducción dependiente de hormona	64
3.4.2- Vías de transducción independientes de hormona	65
3.4.2.1- Vía de señalización E2F1.....	66
3.4.2.2- Vía de señalización IGF-I/PI3K/AKT	67
3.4.2.3- Vía de señalización NFκB.....	70
3.4.2.4- Vía de señalización HER2/neu/MAPK.....	71
3.4.2.5- Vía de señalización PAK/FAK	73
3.5- Papel de AIB1 en proliferación celular y apoptosis y su implicación en cáncer.....	76

MATERIALES Y MÉTODOS	81
1- Cultivos celulares y reactivos utilizados.....	83
2- Cultivo y transformación de bacterias	88
3- Sobreexpresión y silenciamiento de genes	90
3.1- Transfecciones transitorias y estables	90
3.2- Infecciones adenovíricas	91
3.3- Silenciamiento mediante siRNA.....	92
4- Técnicas de biología molecular	93
4.1- Técnicas con DNA.....	93
4.1.1- Extracción de DNA.....	93
4.1.2- Clonaciones.....	93
4.1.3- Mutagénesis dirigida.....	96
4.1.4- Visualización del DNA y secuenciación.....	96
4.2- Técnicas con RNA	97
4.2.1- Extracción de RNA.....	97
4.2.2- RT-PCR y qRT-PCR.....	98
4.2.3- <i>GeneChip</i> [®]	99
4.3- Técnicas con proteínas.....	100
4.3.1- Extracción de proteínas.....	100
4.3.2- Fraccionamiento subcelular	101
4.3.3- Inmunotransferencia de proteínas	103
4.3.4- Inmunofluorescencia.....	104

4.3.5- Coinmunoprecipitación de complejos.....	106
4.3.6- Transcripción/traducción de proteínas <i>in vitro</i>	106
4.3.7- Síntesis de proteínas fusionadas a GST	107
4.3.8- Ensayos de interacción proteica (ensayos <i>pull-down</i>) ...	108
4.3.9- Estudios de secreción de proteínas.....	109
4.3.10- Anticuerpos empleados.....	110
5- Determinación de apoptosis y del ciclo celular	111
5.1- Citometría de flujo	111
5.2- Ensayo TUNEL.....	112
5.3- Ensayo de proliferación celular (XTT).....	113
6- Medida de la actividad transcripcional: Ensayo de luciferasa	114
7- Estudio de la migración transendotelial.....	114
RESULTADOS.....	117
1- DRO1 está reprimido por AIB1	119
2- DRO1 está reprimido por otros oncogenes y por estrógenos.....	123
3- AIB1 reprime a DRO1 a nivel de promotor.....	125
4- Obtención de un sistema biológico para el estudio de DRO1.....	129
5- Efecto de la expresión de DRO1 en cultivos celulares	131
6- Efecto de DRO1 en la expresión de genes implicados en diferentes procesos celulares.....	133
7- DRO1 está localizado en el aparato de Golgi y en la membrana citoplasmática.....	136

8- DRO1 es una proteína de secreción.....	139
9- Papel de DRO1 en apoptosis	144
10- Efecto de DRO1 en proliferación	148
11- Efecto de DRO1 sobre proteínas de adhesión celular y su implicación en migración transendotelial	151
12- La fosforilación de AIB1 en S728 favorece la interacción con ER α y TFIIIE α	155
13- La fosforilación de AIB1 en S728 excluye a AIB1 de la cromatina durante la mitosis	157
DISCUSIÓN	161
1- Regulación de la expresión de DRO1	163
1.1- DRO1 está reprimido por AIB1	163
1.2- DRO1 está reprimido por otros oncogenes y por estrógenos	164
1.3- AIB1 reprime a DRO1 a nivel de promotor.....	165
2- DRO1 es un supresor tumoral que induce apoptosis y reduce la migración de células cancerosas.....	166
2.1- Papel de DRO1 en apoptosis.....	166
2.2- Papel de DRO1 en migración transendotelial	170
2.3- Papel de DRO1 en proliferación celular	172
3- DRO1 y metabolismo	174
4- La fosforilación de AIB1 en S728 lo excluye de la cromatina pero favorece la interacción con ER α y TFIIIE α	178
CONCLUSIONES	181

ABREVIATURAS	183
BIBLIOGRAFÍA	185

No me lo pensé dos veces cuando me surgió la posibilidad de investigar sobre una enfermedad tan cruel como el cáncer que se llevó gran parte de mi vida. Entonces emprendí un camino nada fácil para dedicarme a la investigación. Un camino con muchas trabas puesto que a pesar de la preparación que requiere ni está bien pagado ni te ofrece algunos derechos básicos de cualquier otro empleo. Además, no siempre este camino te lleva a algún sitio. Pero lo importante es que puedes construir nuevas vías que guíen futuras investigaciones y eso es lo realmente gratificante de la investigación. Adoquín tras adoquín conseguiremos nuestras metas.

Por ello quiero dar las gracias a todas las personas que me apoyaron y ayudaron a emprender este camino, así como a todas las que me han guiado a lo largo de él. También quiero agradecer la lucha que muchos mantuvieron cuando trataron de cortar el camino que todos juntos estábamos construyendo. A ellos les digo que pueden habernos detenido, pero no lograrán impedir que reemprendamos nuestra marcha.

Finalmente quisiera ser un poco más crítico para dirigir todos mis “desagradecimientos” a esos políticos que intentaron cortar nuestros caminos y también a esos adoquines sueltos que te vas encontrando a lo largo de ellos.

“La reflexión es el camino hacia la inmortalidad; la falta de reflexión, el camino hacia la muerte.” (Siddhartha Gautama, Buda).

INTRODUCCIÓN

1- El cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. En 2008 murieron por cáncer 7.6 millones personas en todo el mundo, lo que representa aproximadamente el 13% del total de defunciones a nivel mundial (GLOBOCAN 2008). Para el año 2012 se estima que unas 200.000 personas pueden sufrir cáncer en España, de las que alrededor de 100.000 morirán (Sánchez et al. 2010). Además, la incidencia del cáncer está en aumento y se considera que a lo largo del siglo XXI el cáncer puede convertirse en la principal causa de muerte en los países desarrollados. Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad es la edad. De hecho, más del 60% de los cánceres detectados y más del 70% de las muertes por cáncer proceden de personas con más de 65 años (Fulop et al., 2011). Por lo tanto, el aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados y el envejecimiento de su población constituyen un importante factor que explica el aumento de la incidencia de cáncer. El segundo factor de riesgo es el estilo de vida. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2012), “aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. Sin embargo, en la aparición del cáncer también se encuentran implicados otros factores además de la

edad y el estilo de vida. Factores como la predisposición genética o la presencia de enfermedades como la obesidad o ciertos virus pueden influir en el desarrollo del cáncer (Zhang et al., 2011; Roberts et al. 2010; Rubin 2011).

La transformación de una célula normal en una célula maligna (tumorogénesis) es un proceso que requiere de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas que confieren a las células ventajas proliferativas (Nowell 1976). Este modelo de la progresión tumoral presupone que el tumor está formado por una población celular heterogénea que tiende a mantenerse en una proporción de equilibrio estocástico entre las distintas subpoblaciones (Gupta et al. 2011). Los cambios genéticos sufridos por las células cancerosas pueden ser debidos a cambios epigenéticos, mutaciones puntuales y translocación, amplificación o delección de genes (Roa et al. 2000; Boerma et al. 2009; Wong et al. 2006; Ruitter et al. 2011). Hay genes cuyas mutaciones son más susceptibles de dar lugar a cáncer debido a que regulan procesos esenciales como la estabilidad cromosómica y reparación del DNA, la señalización celular, crecimiento y diferenciación celular, pero tras su expresión anormal son capaces de inducir transformación tumorogénica (Pappou & Ahuja 2010). Estos cambios genéticos pueden dar lugar a la ganancia o pérdida de función de los genes afectados. Los genes con ganancia de función en cáncer se conocen como oncogenes, denominándose protooncogenes cuando se encuentran en su estado normal o silvestre. La acumulación

progresiva de anomalías genéticas y epigenéticas conduce a la activación de oncogenes o inactivación de supresores tumorales (Weinstein 2000; Greenman et al. 2007). Ejemplos de protooncogenes son Ras, ciclinas, RAR α y c-Myc (Pylayeva-Gupta et al. 2011; Sanchez et al. 2008; Zelent et al. 2001; Albiñ et al. 2010). Los genes con pérdida de función en cáncer se conocen como supresores tumorales. Un gen supresor tumoral es un gen capaz de evitar la transformación de una célula normal en una célula cancerígena mediante mecanismos involucrados en la regulación de la estabilidad cromosómica, la proliferación celular y la apoptosis. La inactivación de un supresor tumoral altera el equilibrio normal de estos procesos, favoreciendo la transformación maligna de la célula. Ejemplos de supresores tumorales son APC, PTEN, BRCA1, BRCA2, etc. (Chung et al. 2007; Hollander et al. 2011; Roy et al. 2011).

Fundamentalmente, las alteraciones fisiológicas que les confieren a las células cancerosas la capacidad de sufrir una transformación maligna son: autosuficiencia en señales de proliferación, insensibilidad a señales inhibitorias de la proliferación, evasión de la apoptosis, capacidad replicativa ilimitada, angiogénesis y capacidad de invadir tejidos (metástasis). En los siguientes apartados desarrollaremos cada una de las alteraciones fisiológicas mencionadas a partir del estudio realizado por Hanahan & Weinberg en el año 2011.

1.1- Señales de proliferación

Las células requieren de señales de crecimiento mitogénicas para pasar del estado quiescente al proliferativo. Estas señales pueden ser factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular o moléculas de interacción/adhesión célula-célula que se unen a receptores transmembrana, los cuales activan vías de señalización que culminan en la expresión de genes implicados en la proliferación (Hanahan & Weinberg 2000). Las células normales dependen de estas señales para proliferar. Sin embargo, las células cancerosas pueden sobreexpresar especies moleculares que dan lugar a la sobreactivación de rutas de señales proliferativas. La sobreexpresión de factores de crecimiento es un evento muy frecuente en células cancerosas, actuando de forma auto- y paracrina para promover la proliferación celular y su propio crecimiento (Zhang et al. 2012; Minjgee et al. 2011). Además del propio estímulo con señales proliferativas, las células cancerosas desarrollan otras estrategias para obtener autonomía de crecimiento, como la sobreexpresión de receptores hormonales y de factores de crecimiento, aumentando la sensibilidad de la célula al estímulo proliferativo (Schrevel et al. 2011; Selvaggi et al. 2004). Las células cancerosas también pueden presentar alteraciones en la expresión de receptores de la matriz extracelular (integrinas), favoreciendo la transmisión de señales de crecimiento (Lukashev & Werb 1998).

Otros mecanismos más complejos que confieren autonomía en señales de crecimiento son la alteración de los circuitos intracelulares activados por estas señales. Un ejemplo clásico es la vía de SOS-RAS-RAF-MAPK, donde RAS es una proteína frecuentemente mutada (mayoritariamente KRAS) en cánceres de colon y páncreas (Rogosnitzky & Danks 2010) que permite la activación de señales mitogénicas sin necesidad de que se produzca la activación previa de los receptores celulares (Agbunag & Bar-Sagi 2004). De igual modo, se han encontrado mutaciones activantes de la quinasa citosólica BRAF, por lo que nuevos y prometedores inhibidores específicos están siendo actualmente utilizados en la clínica (Bottos et al. 2012).

Finalmente, otro mecanismo por el que las células cancerosas consiguen una alta capacidad proliferativa se basa en bloquear los sistemas de retroalimentación negativa que atenúan las señales proliferativas. Un ejemplo es la fosfatasa PTEN, que contrarresta los efectos de PI3K defosforilando su producto (PIP3). Mutaciones inactivantes en PTEN, o deleciones o cambios epigenéticos que le hacen perder su expresión, provocan un aumento de la señalización por PI3K promoviendo la tumorigénesis, tal y como se demuestra en una amplia variedad de modelos experimentales de cáncer (Jiang & Liu 2009).

1.2- Señales inhibitoras de proliferación

En el tejido normal hay señales antiproliferativas que regulan la homeostasis tisular manteniendo las células en estado quiescente. Estas señales pueden ser inhibidores del crecimiento, solubles o inmovilizados en la matriz extracelular y/o en la superficie de células vecinas (Hanahan & Weinberg 2000). La proliferación se puede bloquear por dos vías: por una desactivación transitoria que fuerza a las células a entrar en fase quiescente (G0), o por una desactivación permanente que introduce a la célula en estados postmitóticos como la diferenciación celular. La mayoría de los programas que regulan negativamente la proliferación celular dependen de la acción de los genes supresores tumorales como por ejemplo RB y TP53 (Hanahan & Weinberg 2011).

Las células cancerosas son capaces de evadir las señales antiproliferativas. Un claro ejemplo de insensibilización a señales de crecimiento es la desregulación de la vía de la proteína del retinoblastoma (RB). En estado hipofosforilado, RB bloquea la proliferación al interactuar con los factores de transcripción E2F, inactivándolos e impidiendo la expresión de numerosos genes implicados en la progresión de la fase G1 a S del ciclo celular (Seville et al. 2005; Gordon & Du 2011). Por lo tanto, las células cancerosas con defectos en la vía RB sufren una pérdida del control de la progresión en el ciclo celular permitiendo una proliferación persistente. Otro caso frecuente

de evasión de las señales inhibitoras de la proliferación involucra al factor de transcripción TP53. TP53 es el guardián del genoma porque en él converge la maquinaria de reparación del DNA con el control de genes antiproliferativos y también apoptóticos que llevan al suicidio de la célula cuando la reparación del DNA no es factible. Es por ello que es muy frecuente encontrar mutado a TP53 en células cancerosas (Goh et al. 2011). Por ello se han diseñado diversas estrategias terapéuticas anticancerosas para reactivar la vía de TP53 (Brown et al. 2009).

La proliferación celular también se detiene cuando se produce la diferenciación terminal de una célula. Sin embargo, la fisiología de la célula cancerosa es capaz de inhibir la diferenciación terminal, permitiendo así que pueda seguir proliferando. Una estrategia para evitar la diferenciación terminal involucra directamente al factor de transcripción c-Myc que promueve la proliferación celular y ayuda a mantener la pluripotencialidad de las células progenitoras manteniéndolas indiferenciadas (Takahashi et al. 2007; Cartwright et al. 2005). c-Myc se encuentra sobreexpresado en diversos tipos de cánceres y está asociado con tumores agresivos y poco diferenciados, siendo su sobreexpresión un evento oncogénico temprano dentro de la evolución progresiva del tumor (Vita & Henriksson 2006).

1.3- Apoptosis

La muerte celular programada es un proceso celular esencial para el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos. Su misión, además de la implicada en el desarrollo embrionario, es eliminar las células dañadas, infectadas o transformadas. Numerosos estudios han establecido que la muerte celular programada por apoptosis sirve como barrera natural contra el desarrollo del cáncer (Adams & Cory 2007; Lowe et al. 2004), por este motivo, la evasión de la apoptosis es un evento frecuente en células cancerosas.

Las células que sufren apoptosis muestran unos cambios morfológicos característicos como contracción celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de vesículas en la membrana plasmática, aunque siguen manteniendo la integridad de la membrana plasmática para ser rápidamente internalizadas por otras células (He et al. 2009). Las señales que desencadenan la apoptosis son de distinta índole e incluyen el daño celular causado por radiaciones ionizantes, la infección vírica o las señales extracelulares (Ghardi et al. 2012; Wan & Chen 2010; Andera 2009).

La apoptosis está señalizada por dos clases de proteasas especializadas: las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Las caspasas son cisteína proteasas que se expresan como zimógenos inactivos y se procesan al estado activo por proteólisis. La actividad de las caspasas conduce a la

degradación de proteínas específicas, dando lugar a los siguientes procesos (Cascales 2003):

- cortar los contactos con células vecinas,
- reorganizar el citoesqueleto,
- activar las endonucleasas para fragmentar el DNA,
- dismantelar las laminas nucleares (condensación de la cromatina),
- expresar señales de fagocitosis (fosfatidilserina), y
- activar proteínas específicas que preparan a la célula para el cese de las funciones metabólicas.

Se han descrito dos vías que desencadenan la apoptosis: la vía extrínseca que tiene lugar a través de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. Ambas vías no son totalmente independientes y existe una señalización recíproca y cruzada entre intermediarios de ambas rutas (Igney & Krammer 2002). Finalmente, ambas vías culminan en la activación de proteasas que se encuentran normalmente latentes (caspasas 8 y 9 respectivamente), las cuales inician la cascada proteolítica llevada a cabo por las caspasas efectoras responsables de la ejecución de la fase de apoptosis (Hanahan & Weinberg 2011).

La vía intrínseca se activa por estrés celular y requiere la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas tales como citocromo c y Smac/DIABLO (“Second mitochondria-derived activator of caspases / Direct Inhibitor of

Apoptosis-Binding protein with a LOw isoelectric point”). El citocromo c funciona uniéndose a APAF-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) para inducir la activación de caspasa-9 y la consecuente activación de la cascada de caspasas (Adams & Cory 2007; Garrido et al. 2006). Por otro lado, Smac/DIABLO se une y neutraliza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP), que inhibe a las caspasas, antagonizando su inhibición y permitiendo así la activación de caspasas (Garrido et al. 2006). La permeabilización de la membrana mitocondrial para la liberación de citocromo c y Smac/DIABLO está regulada por las proteínas de la familia BCL-2. La familia BCL-2 está formada por una red de proteínas caracterizadas por contener hasta 4 dominios distintos de hélice- α con homología a BCL-2 (BH). Esta familia se encuentra a su vez dividida en 3 clases: las proteínas BCL-2 antiapoptóticas (p.e. BCL-2, BCL-xL, BCL-w, A1 y MCL-1), los efectores BCL-2 proapoptóticos (p.e. BAK y BAX) y las proteínas proapoptóticas “BH3-only” (p.e. BID, BIM, BAD, BMF, HRK, Noxa y PUMA) (Petros et al. 2004). Las proteínas BCL-2 antiapoptóticas se encargan de mantener la integridad de la membrana mitocondrial externa (MME). Dicha acción la ejercen uniéndose directamente a las proteínas BCL-2 proapoptóticas e impidiendo su acción. Sin embargo, tras el estímulo apoptótico o por estrés acumulado, las proteínas BCL-2 antiapoptóticas son funcionalmente inhibidas, liberándose las proteínas BCL-2 proapoptóticas que permeabilizan la MME y

permiten la liberación de citocromo c y de Smac/DIABLO al citosol (Elkholi et al. 2011.).

La vía intrínseca de apoptosis está inducida por diferentes estados de estrés celular que regulan transcripcional y posttranscripcionalmente las proteínas BCL-2 (Chipuk et al. 2010). Las proteínas BCL-2 están localizadas en la mitocondria, retículo endoplasmático (RE) y citosol, donde regulan la apoptosis frente a diferentes situaciones de estrés (Elkholi et al. 2011). El estrés en el RE está causado por la perturbación de cualquiera de sus tres funciones homeostáticas: 1) el plegamiento, modificación y secreción de proteínas; 2) el almacenamiento de Ca^{2+} y 3) la síntesis de ácidos grasos, esteroides y fosfolípidos. Cualquiera de estas perturbaciones lleva a la acumulación de proteínas no plegadas en el lumen del RE causante del estrés y conocida como UPR (“Unfolded Protein Response” o respuesta a proteínas no plegadas) (Schröder 2007). Finalmente, BAK y BAX se unen a la proteína quinasa transmembrana del retículo endoplasmático IRE1 α (enzima dependiente de inositol 1 α), regulando así su señalización y proporcionando una unión física entre los miembros del núcleo apoptótico con los de UPR (Hetz et al. 2006).

Por otra parte, la vía extrínseca se inicia por unión de un ligando con su receptor transmembrana (FAS, TNFR, TRAIL, etc.) para activar a las caspasas iniciadoras (caspasa-8 y -10), que a su vez activan por proteólisis a las caspasas efectoras

(caspasa-3 y -7) tal y como ocurre en la vía intrínseca (Adams & Cory 2007). Esta vía puede ser regulada por diferentes factores, entre ellos el inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP), que afecta tanto a caspasas iniciadoras como a efectoras.

La resistencia a apoptosis en células cancerosas puede ser adquirida mediante diferentes estrategias. La forma más frecuente de resistencia a la apoptosis afecta a mutaciones en el supresor tumoral TP53, que induce apoptosis aumentando la expresión de NOXA y PUMA (Junttila & Evan 2009). Otra vía que suele estar activada es la de PI3K/AKT, implicada en la transmisión permanente de señales de supervivencia y antiapoptóticas en muchos tumores. La fosforilación de BAD por AKT promueve su disociación de BCL-XL y la subsiguiente interacción con 14-3-3, permitiendo la supervivencia celular (Zha et al. 1996; del Peso et al. 1997). Esta vía se activa por señales extracelulares como IGF-I, IL-3, IL-4, insulina y EGF entre otros (Evan & Littlewood 1998; Tang et al. 2006; Hunker et al. 2006; Jang & Lee 2006), por señales intracelulares a partir de RAS (Larizza et al 2009), o por pérdida del supresor tumoral PTEN, una fosfolípido fosfatasa que atenúa las señales de supervivencia de AKT (Cantley & Neel 1999; Tang et al. 2006;). En el programa de muerte celular interviene la transcripción y traducción de genes por factores de transcripción específicos. Un ejemplo es FOXO3, un factor de transcripción que transcribe genes proapoptóticos y que actúa como supresor tumoral (Arden 2007; Paik et al. 2007). Se ha observado en

células cancerosas que la actividad transcripcional de FOXO3 está disminuida por su exclusión del núcleo o por su degradación (Weidinger et al. 2011; Tsai et al. 2010). Por otro lado NFκB transcribe genes antiapoptóticos y su sobreactivación es esencial en el desarrollo de muchos cánceres humanos (Ramos et al. 2011). De hecho, la terapia con Bortezomib del mieloma múltiple, linfoma de células del manto y neuroblastomas de alto riesgo, se basa en impedir la activación de NFκB (Ramos et al. 2011).

1.4- Capacidad replicativa

Las células de mamíferos poseen un programa de autonomía celular que limita su capacidad replicativa de forma independiente a las vías de señalización explicadas anteriormente. Esta limitación ha sido asociada básicamente a dos barreras de la proliferación: 1) senescencia, que consiste en la entrada irreversible a un estado no proliferativo pero viable, y 2) crisis, la cual conlleva a la muerte (Hanahan & Weinberg 2011). Este proceso se encuentra regulado por la longitud de los telómeros o zonas terminales de los cromosomas. Los telómeros están compuestos por múltiples repeticiones de hexanucleótidos (TTAGGG) que protegen las terminaciones de los cromosomas frente a la degradación del DNA (Donate & Blasco 2011). La enzima encargada de añadir las repeticiones de hexanucleótidos en los telómeros es la telomerasa. La telomerasa se expresa en

mayor medida en las células madre y durante las primeras fases de desarrollo embrionario. La actividad telomerasa también está presente en las células madre de adultos, pero su actividad no es suficiente para prevenir el constante acortamiento de los telómeros tras cada división celular (Blasco 2005). Los telómeros se van acortando progresivamente, llegando a perder su capacidad de proteger las terminaciones de los cromosomas. Esta inestabilidad produce fusiones entre las terminaciones de diferentes cromosomas y genera cromosomas dicéntricos inestables que conducen a la inviabilidad celular (Hanahan & Weinberg 2011). Las células en cultivo tienen una capacidad limitada de divisiones, conocida como límite de Hayflick (Hayflick & Moorhead 1961), pasado el cual el cultivo deja de dividirse. De manera eventual se pueden activar los mecanismos celulares que conducen a su reprogramación e inmortalización y que están vinculados a la progresión tumoral. Esta inmortalización ha sido atribuida a la capacidad de dichas células para mantener las longitudes teloméricas del DNA suficientes y evitar la entrada en senescencia y muerte celular (Hanahan & Weinberg 2011). Muchas células cancerosas son capaces de reactivar la telomerasa para mantener la longitud de los telómeros y seguir proliferando (Artandi & DePinho 2009). Sin embargo, también hay casos en los que es importante una disminución transitoria de la actividad telomerasa para facilitar la progresión maligna. Se ha observado en lesiones preneoplásicas que los telómeros son frecuentemente más cortos

que en el tejido normal y que en carcinomas mamarios avanzados los telómeros pueden llegar a ser tanto largos como muy cortos (Raynaud et al. 2010). Por otra parte, aunque de manera menos frecuente, la inmortalización de una célula puede ocurrir por una vía alternativa basada en la recombinación permitiendo el mantenimiento de los telómeros (Hanahan & Weinberg 2011). La recombinación de los telómeros es la elongación del telómero a partir de la combinación con otro telómero. Esto se produce debido a que las terminaciones de los cromosomas son muy repetitivas e idénticas en todos los telómeros. Esto permite que la terminación 3' de un cromosoma pueda invadir a un segundo cromosoma y usar su secuencia como plantilla para la elongación del telómero por la DNA polimerasa (Nabetani & Ishikawa 2011).

1.5- Angiogénesis

El aporte de nutrientes y de oxígeno a las células es esencial para su buen funcionamiento y su supervivencia. Con el fin de asegurarse este suministro, los tumores alteran el balance entre inductores e inhibidores de la angiogénesis, aumentando la misma y permitiendo el crecimiento del tumor y la posterior metástasis a tejidos distantes (Hanahan & Folkman 1996). Mientras que los inhibidores de la angiogénesis actúan como barrera frente al crecimiento de los tumores, los inductores de la angiogénesis lo favorecen. Uno de los principales inductores de

la angiogénesis es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el cual se encuentra sobreexpresado tanto por hipoxia como por la señalización de oncogenes (Ferrara 2009; Mac Gabhann & Popel 2008; Carmeliet 2005). Además, VEGF puede ser secuestrado en la matriz extracelular para ser activado por proteasas como MMP-9 (Kessenbrock et al. 2010).

1.6- Invasión de tejidos y metástasis

En la progresión tumoral, la capacidad adquirida de un tumor para invadir otros tejidos le permite colonizar nuevos nichos y poder encontrar mayor disponibilidad de nutrientes. Para que una célula pueda invadir tejidos colindantes debe sufrir una serie de cambios en los acoplamientos físicos con las células de alrededor, activándose proteasas extracelulares que degradan la matriz extracelular y permiten la migración celular. Las proteínas afectadas por estos cambios son las moléculas de adhesión célula-célula (CAMs) como inmunoglobulinas y cadherinas; y las integrinas, que unen las células a la matriz extracelular (Okegawa et al. 2004).

El acoplamiento entre dos células adyacentes con uniones por E-cadherina da lugar a señales que inhiben el crecimiento. Además, E-cadherina forma un complejo proteico con β -catenina, actuando de reservorio del contenido celular de β -catenina. La liberación de β -catenina al citosol conlleva su

fosforilación y ubiquitilación por el complejo GSK-3 β , anexina y APC, enviándola a su degradación por el proteasoma. Sin embargo, la activación clásica de Wnt inhibe esta degradación y permite la nuclearización de β -catenina, donde se une y activa al factor de transcripción LEF/TCF (Tian et al. 2011). La función de E-cadherina se pierde en la mayoría de cánceres epiteliales debido a mutaciones que inactivan o reprimen transcripcionalmente a E-cadherina, favoreciendo la transición epitelio-mesénquima, una característica de la progresión tumoral en tumores de origen epitelial (Schmalhofer et al. 2009). Adicionalmente, mutaciones que impiden la degradación de β -catenina, como mutaciones inactivantes de APC, promueven la sobreactivación de TCF y la transcripción de genes proliferativos que favorecen la agresividad del tumor (Sanchez-Tilló et al. 2011).

2- DRO1

DRO1, también conocido como CCDC80 o por sus homólogos SSG1 (rata), URB (ratón), equarina (pollo) y CL2 (rata), fue inicialmente descrito como un gen regulado por estrógenos asociado a carcinogénesis de glándula mamaria en ratas (Marcantonio et al. 2001a) y por andrógenos en próstata (Marcantonio et al. 2001b). DRO1 se encuentra sobreexpresado en el tejido adiposo marrón de ratones deficientes en el receptor de Bombesina 3 (Aoki et al. 2002). Estudios posteriores revelaron que su expresión es abundante en grasa, pero está disminuida en obesidad (Okada et al. 2008). Además, DRO1 tiene un papel importante en la regulación de la adipogénesis a través de la inhibición de la vía de señalización Wnt/ β -catenina y de la inducción de C/EBP α y PPAR γ (Tremblay et al. 2009). DRO1 está también expresado en células de la papila dérmica (Cha et al. 2005) y participa en la formación del ojo (Mu et al. 2003). Su expresión también está confinada a células del estroma de médula ósea humana, sugiriendo un papel en esqueletogénesis (Liu et al. 2004). Es interesante destacar que DRO1 sensibiliza a las células frente a estímulos apoptóticos, siendo su expresión muy reducida en cánceres de colon y páncreas (Bommer et al. 2005), apoyando su papel como supresor tumoral.

2.1- Secuencia y estructura de DRO1

La secuencia de DRO1 se encuentra muy conservada en las diferentes especies de vertebrados analizadas, manteniendo una homología próxima al 90% (Marcantonio et al. 2001a; Aoki et al. 2002; Liu et al. 2004; Visconti et al. 2003; y Bommer et al. 2005). Marcantonio y colaboradores (2001a) fueron los primeros en clonar el DRO1 ortólogo de rata (SSG1), constituido por 3719 pb con una pauta abierta de lectura de 1158 pb, lo que da lugar a una proteína de 385 aminoácidos de 41.8 KDa de peso molecular. Sin embargo, los demás ortólogos de DRO1 descritos poseen una pauta abierta de lectura mucho más grande, dando lugar a una proteína de 949 (Urb), 950 (DRO1) y 958 (Equarina-L) aminoácidos en ratón, humano y pollo respectivamente (Aoki et al. 2002; Liu et al. 2004). Esta discrepancia en el número de aminoácidos se debe a pequeñas diferencias en la secuencia de DNA que cambian la pauta de lectura. Visconti y colaboradores encontraron en rata otro cDNA mayor (CL2), con un tamaño más similar al de estos últimos (949 aminoácidos y unos 108 KDa), sugiriendo que la primera secuencia descrita para DRO1 en rata mostraba errores en su secuenciación o era una variante de empalme alternativo del mRNA.

Como podemos observar en la Figura 1, la secuencia de aminoácidos de DRO1 contiene tres repeticiones o dominios que guardan una similitud del 30% con el quinto dominio de la

proteína SRPX/DRS/ETX (“Sushi Repeat-containing Protein, X chromosome / Down Regulated by Src”) (Aoki et al. 2002). SRPX contiene cinco dominios sushi, tres de ellos formados por seis residuos conservados de cisteína, otro dominio tipo sushi y un quinto dominio con dos residuos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro entre ellos (Ichinose et al. 1990). Este quinto dominio sushi se encuentra muy conservado, tanto en los ortólogos de DRO1 como en la proteína SRPX e incluso en células procariotas, por lo que se ha propuesto la existencia de una nueva familia de proteínas con el dominio P-DUDES (Prokaryotes-DRO1-URB-DRS-Equarin-SRPUL) (Pawlowski et al. 2010).

Además, la proteína de DRO1 cuenta con un alto porcentaje de lisinas entre los dominios 1 y 2, característica que augura a la proteína una localización nuclear (Liu et al. 2004). Esta región ha sido pronosticada con una estructura coiled-coil o de hélice superenrollada (Lupas et al. 1991), estructura presente en factores de transcripción e involucrada en funciones biológicas tan importantes como la regulación de la expresión de genes. Por otra parte, en esta misma zona también existe una región rica en treoninas (Liu et al. 2004) con gran similitud al receptor 2 de apolipoproteína E (ApoER2), lo que sugiere que DRO1 podría estar involucrado en el acoplamiento con la matriz extracelular (Pawlowski et al. 2010). Asimismo, se cree que toda esta región entre los dominios 1 y 2 no tiene una estructura organizada y definida (Linding et al. 2003). Finalmente, esta es

una región larga, flexible y desordenada que puede permitir muchas interacciones entre los dominios P-DUDES covalentemente unidos unos con otros por puentes disulfuro (Pawlowski et al. 2010).

Además, a lo largo de la proteína se han encontrado tres sitios susceptibles a N-glicosilación correspondientes a los aminoácidos 467, 666 y 834 del homólogo de ratón (Aoki et al. 2002). También se ha descrito la presencia de una pareja de aminoácidos básicos que permitiría la hidrólisis de la proteína en el residuo 523 por la enzima endoproteolítica furina (Aoki et al. 2002), así como un péptido señal en el extremo N-terminal de reconocimiento por enzimas proteolíticas (Liu et al. 2004; Bommer et al. 2005). Por otra parte, la región N-terminal de DRO1 es muy hidrófoba (Aoki et al. 2002), sugiriendo que podría ser una proteína de secreción ya que los picos hidrofóbicos en N-terminal (NHP) son característicos de proteínas de secreción (Gorr & Darling 1995). Estas secuencias actúan como péptido señal que facilita la translocación de la proteína al retículo endoplasmático donde muchas proteínas de secreción son N-glicosiladas (Miyakawa et al. 1999).

muy grande y diversa, mostrando un dominio estructural CxxxxR común que cataliza reacciones redox usando residuos conservados de cisteína (Atkinson and Babbitt 2009). Estas reacciones redox pueden ser de formación de puentes disulfuro, reacciones con glutatión y reacciones de reducción de hidroperóxidos. Respecto a las funciones de las proteínas tioredoxinas, las principales son la defensa frente a estrés y la señalización por peróxido (Hall et al. 2009).

Al igual que las proteínas tipo Trx, algunas proteínas P-DUDES (entre ellas DRO1) contienen dos residuos cisteína conservados CxxxxR. Sin embargo, la hipótesis de que el motivo CxxxxR en las proteínas P-DUDES sea el responsable de la función peroxirredoxina no está demostrada, pudiendo existir otras dos alternativas: una primera en la que las proteínas P-DUDES no tienen función oxidorreductasa y una segunda en la que la función oxidorreductasa en P-DUDES puede ser mediada por otros residuos diferentes al CxxxxR, como por ejemplo DNxxYF (Pawlowski et al. 2010). Los tres motivos P-DUDES de DRO1 tienen conservados sus residuos de cisteína catalíticos. Según Pawlowski (2010), una hipótesis es que funcionen como un heterotrímero de subunidades, posiblemente como parte de un multímero mayor, aunque los dímeros son la forma prevalente en las estructuras de peroxirredoxinas.

2.2- Expresión de DRO1.

2.2.1- Tejidos en los que DRO1 se expresa.

La expresión de DRO1 ha sido localizada en distintos tejidos según diversos estudios realizados con distintas especies (Tabla 1):

Tejidos	Especie	Referencia
(+) útero, hígado, pulmón, bazo, riñón, vesícula biliar, músculo esquelético y cerebro (-) glándula mamaria e intestino	Rata	Marcantonio et al. 2001a
(+) próstata	Rata	Marcantonio et al. 2001b
(+) tejido adiposo, cerebro, estómago, colon, recto, hígado, pulmón, riñón y testículos	Ratón	Aoki et al. 2002
(+) corazón, cerebro, hígado, médula espinal y nódulos linfáticos (-) médula ósea	Humano	Visconti et al. 2003
(+) células del estroma de médula ósea	Ratón	Liu et al. 2004
(+) corazón, timo, placenta, páncreas y bazo (-) cerebro, músculo esquelético, riñón, hígado y pulmón.	Humano	Liu et al. 2004
(+) células de la papila dérmica	Humano	Cha et al. 2005
(+) tejido adiposo	Humano y ratón	Okada et al. 2008
(+) cartílago	Ratón	Manabe et al. 2008

Tabla 1: Tejidos en los que se expresa DRO1. En la columna de la izquierda se identifican los diferentes tejidos humanos, de rata y ratón en los que se ha descrito la expresión de DRO1. Los símbolos (+) y (-) precediendo a los tejidos indican si la expresión de DRO1 es apreciable o no apreciable, respectivamente, en dichos tejidos.

2.2.2- Regulación de la expresión de DRO1.

DRO1 fue descrito inicialmente por Marcantonio y colaboradores (2001a) como un gen regulado por estrógenos. En su estudio emplearon ratas ovariectomizadas (el ovario es el principal órgano productor de estrógenos) para identificar nuevos genes que respondieran al tratamiento con 17- β -estradiol (E2). En estas condiciones observaron que la expresión de DRO1 disminuía tras el tratamiento con E2, llegando a la conclusión de que DRO1 es un gen reprimido por estrógenos. En su estudio localizaron la presencia de 4 medios sitios del elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en las bases -1061/-1066, -745/-750, 321/326 y 911/916 del promotor de DRO1. Por el contrario, los niveles de mensajero de DRO1 en la glándula mamaria no cambiaron, aunque sí aumentó la expresión de la proteína tras el tratamiento con E2. Esto sugiere que, además de la regulación transcripcional, la regulación de DRO1 depende de otros mecanismos de regulación postraduccionales que darían lugar a una mayor velocidad de traducción y/o a una reducción en el reciclado de la proteína. Alternativamente, dado que el

tamaño de la proteína de DRO1 mostrado por Marcantonio y colaboradores es muy inferior al realmente esperado, el tratamiento con E2 pudiera en realidad estar aumentando el reciclado de DRO1 y, por tanto, aumentar los productos derivados de su degradación, por lo que sería una interpretación totalmente distinta a la propuesta por los mencionados autores.

Los estrógenos no son las únicas hormonas esteroideas que regulan la expresión de DRO1, sino que también los andrógenos son capaces de hacerlo (Marcantonio et al. 2001b). A este respecto, la supresión de andrógenos por castración de ratas da lugar al aumento de los niveles de mRNA de DRO1 en la próstata ventral. Por el contrario, si estas ratas son tratadas con andrógenos como la testosterona o la dihidrotestosterona, los niveles de mensajero de DRO1 disminuyen. Estos resultados apoyan que la expresión de DRO1 está reprimida por andrógenos. No obstante, de forma similar a lo que ocurre en la mama de ratas tratadas con E2, los niveles de proteína aumentan en la próstata de ratas tratadas con andrógenos, lo contrario que ocurre con los niveles de mRNA. Estos resultados sugieren que además de la regulación transcripcional de DRO1, las regulaciones postraduccionales de la proteína juegan un papel importante en los niveles celulares de DRO1.

Además de por hormonas esteroideas, la expresión de DRO1 también está reprimida por oncogenes como β -catenina, γ -catenina, K-Ras, c-Myc y Gli (Bommer et al. 2005). Esta

regulación está mediada por represión transcripcional a través de la unión de dichos represores entre las bases -2504/-2032 de la región promotora de DRO1, puesto que su eliminación impide la acción represora de estos oncogenes. Además, la expresión de DRO1 está reprimida en varios tipos de cáncer (Visconti et al. 2003; Bommer et al. 2005; Pawlowski et al. 2010). Por tanto, es necesario un mayor conocimiento de los mecanismos que regulan los niveles de DRO1 para poder establecer la relevancia de DRO1 en la patogénesis del cáncer con posibilidad de ser considerado como un marcador tumoral e incluso como una potencial diana terapéutica.

2.3- Funciones biológicas de DRO1

2.3.1- DRO1 como supresor tumoral

Visconti y colaboradores (2003) fueron los primeros en proponer a DRO1 como supresor tumoral tras comprobar que se encontraba reprimido en diferentes carcinomas tiroideos. De hecho, observaron que la expresión de DRO1 era claramente detectable tanto en tejidos normales de tiroides humanos como en desórdenes hipoproliferativos como el bocio, mientras que era muy baja o indetectable en varias líneas celulares de carcinomas y en la mayoría de los tumores tiroideos, tanto malignos como benignos. Además, también observaron que DRO1 se encontraba reprimido en células PC Cl3 (células

tiroideas diferenciadas) transformadas con oncogenes como v-mos, v-src y PyMLV (virus del poliovirus de la leucemia murina) dando lugar a células indiferenciadas y tumorigénicas.

Coincidiendo con estos resultados, Bommer y colaboradores (2005) descubrieron que DRO1 está reprimido por los oncogenes β -catenina, γ -catenina, K-Ras, H-Ras, c-Myc y Gli en células epiteliales RK3E procedentes de riñón de rata. De igual modo, destacaba la expresión reducida de DRO1 tanto en líneas celulares de cáncer de páncreas y colon como en muestras de cánceres colorectales. DRO1 se expresa en tejidos epiteliales que son frecuentemente afectados por transformaciones neoplásicas asociadas con desregulación de las vías Wnt y Ras/Raf (Bommer et al. 2005) y defectos en la vía de señalización Wnt/APC/ β -catenina/TCF juegan un papel importante en la iniciación de la carcinogénesis colorrectal (Bienz and Clevers, 2000; Kolligs et al. 2002).

Además de estar reprimido en diferentes cánceres, la función de DRO1 como supresor tumoral viene dada también por su papel en la regulación de la proliferación y de la apoptosis. La expresión ectópica de DRO1 en células de cáncer que carecen de DRO1 endógeno da lugar a una reducción de la proliferación (Bommer et al. 2005). Para ello, Bommer y colaboradores estudiaron el efecto de la expresión de DRO1 en cultivos de células en suspensión y en cultivos de células en condiciones adherentes crecidas en placas de cultivo. En este

sentido, la expresión DRO1 es capaz de disminuir la proliferación en cultivos de células en suspensión, mientras que no se observaron diferencias en la velocidad de proliferación de células adheridas. Además, la expresión de DRO1 en los cultivos de células en suspensión también condujo a un aumento de la población celular en sub-G0/G1. Este fenómeno, conocido como anoikis, se debe a la inducción de muerte celular causada por una interacción inapropiada entre la célula y la matriz extracelular (Gilmore 2005). Por tanto, DRO1 ejerce un control negativo del crecimiento en células no adherentes por anoikis. Por el contrario, la expresión de DRO1 en células adherentes no produjo apoptosis, aunque fue capaz de sensibilizar las células a estímulos apoptóticos producidos con anticuerpos contra Apo1/CD95 (Bommer et al. 2005).

2.3.2- Papel de DRO1 en diferenciación celular y desarrollo

La diferenciación celular es el proceso por el que una célula no especializada, denominada célula madre, sufre cambios citológicos dando lugar a una célula descendiente con unas funciones especializadas. Este proceso se encuentra muy regulado y durante su desarrollo se produce la regulación de genes específicos, activándolos o reprimiéndolos con el fin de obtener el linaje requerido de células diferenciadas. La

diferenciación celular tiene lugar tanto en el estado embrionario como durante la vida del organismo pluricelular, dando lugar a los diferentes órganos y a su mantenimiento durante la fase adulta.

En el humano adulto, las células del estroma de médula ósea (BMSC) son células madre mesenquimales capaces de diferenciarse a condrocitos, osteoblastos y adipocitos en respuesta a diferentes estímulos externos (Pittenger et al. 1999; Muraglia et al. 2000). Se ha observado que DRO1 se encuentra expresado preferentemente en células BMSC indiferenciadas (Liu et al. 2004). En estas células, tras 7 días de inducción de diferenciación osteogénica se redujeron los niveles de mRNA de DRO1, siendo incluso indetectables a días 14 y 30 (Liu et al. 2004). Además, en este estudio también se observó que la expresión de DRO1 estaba regulada durante el desarrollo embrionario de ratón de forma que iba aumentando desde la primera semana postconcepción hasta los días 15-17 del desarrollo embrionario, manteniéndose luego estable hasta el nacimiento. Estos datos indican que DRO1 podría estar involucrado en la embriogénesis y en la osteogénesis.

Por otro lado, la diferenciación de células progenitoras mesenquimales a adipocitos empieza con una cascada transcripcional que da lugar a la inducción de los factores de transcripción C/EBP α , β , y δ , KLF5 y PPAR γ (Farmer 2006). En la diferenciación de adipocitos también están involucrados

eventos de señalización extracelular mediados por factores de secreción como las proteínas Wnt. La vía de señalización canónica de Wnt a través de β -catenina es crucial en la regulación negativa de la adipogénesis ya que la represión de la actividad transcripcional dependiente de β -catenina da lugar a la inducción de C/EBP α y PPAR γ (Bennett et al. 2002).

Durante la adipogénesis DRO1 se expresa de manera bifásica, siendo sus niveles muy bajos en cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-L1, mientras que los niveles aumentan al llegar a confluencia (día 0) y disminuyen 24h después del estímulo adipogénico para volver a aumentar a los 8 días cuando el adipocito está completamente diferenciado (Tremblay et al. 2009). La relevancia de DRO1 durante la adipogénesis queda reflejada en este estudio al impedirse la diferenciación tras el silenciamiento de DRO1. Sin embargo, la diferenciación se recupera al añadir medio condicionado de cultivos normales, sugiriendo que DRO1, al igual que otras adipocitoquinas, es secretado al medio.

Además, se ha observado que el silenciamiento de DRO1 en células 3T3L1 conducía a la represión de C/EBP α y PPAR γ y a la activación de KLF5, resultando en la disminución de la expresión de genes implicados en la absorción de ácidos grasos (CD36 y LPL), en la síntesis de triacilglicéridos (DGAT1 y DGAT2), en el metabolismo de lípidos (SCD1 y SCD2), y en la disminución del transportador de glucosa GLUT4 (Tremblay et

al. 2009). Sin embargo, el silenciamiento de DRO1 no produjo cambios en la expresión de los factores de transcripción C/EBP β y C/EBP γ , los cuales actúan al inicio de la adipogénesis. Puesto que durante la adipogénesis el aumento de la expresión de C/EBP α y PPAR γ requiere de la inhibición de la señalización de Wnt/ β -catenina (Farmer 2006), cabría esperar que DRO1 reprimiese esta vía. Efectivamente, Tremblay y colaboradores demostraron que DRO1 era necesario y suficiente para la represión de la vía Wnt/ β -catenina durante la adipogénesis. Además, también observaron que la expresión ectópica de DRO1 en células HepG2 (que tienen reprimido a PPAR γ por sobreexpresar β -catenina) era capaz de regular la actividad transcripcional de TCF produciendo un aumento de PPAR γ sin afectar a la expresión de β -catenina. No obstante, la sobreexpresión de DRO1 no producía mayor adipogénesis sino que la inhibía. Por tanto, Tremblay y colaboradores concluyeron que DRO1 modula la adipogénesis de forma bidireccional. Es decir, que DRO1 activa la adipogénesis inhibiendo la actividad transcripcional del complejo TCF/ β -catenina después del inicio de la adipogénesis. Pero por otra parte, DRO1 inhibe la adipogénesis por mecanismos independientes de la vía canónica de Wnt. Es por ello que para que transcurra la adipogénesis se debe lograr un balance y una expresión temporal de DRO1 que permitan la activación de C/EBP α y PPAR γ .

2.3.3- Papel de DRO1 en metabolismo

El hecho de que DRO1 esté expresado en tejido adiposo y que sea fundamental durante la adipogénesis indica que puede tener un papel importante en el metabolismo. En este sentido, Aoki y colaboradores (2002), tratando de identificar genes relacionados con obesidad encontraron sobreexpresión de DRO1 en el tejido adiposo de ratones deficientes en el receptor de bombesina 3 (BRS-3^{-/-}). Estos ratones sufren hiperfagia, índice metabólico reducido y una obesidad moderada que se inicia en el estadio adulto (Ohki-Hamazaki et al. 1997). Entonces, los ratones BRS-3^{-/-} son obesos a los 8 meses de edad pero no a las 7 semanas. En estos ratones, DRO1 se expresa tanto en tejido adiposo blanco como en el marrón. No obstante, los niveles de mRNA de DRO1 en el tejido adiposo blanco son similares en los ratones silvestres, tanto a los 8 meses de edad como a las 7 semanas. Sin embargo, en la grasa marrón, mientras que los niveles de DRO1 se mantienen iguales en ratones BRS-3^{-/-} y ratones silvestres con 7 semanas de edad (no obesos), a los 8 meses (ratones obesos) los niveles de DRO1 son 4 veces mayores en los ratones BRS-3^{-/-} con respecto a los ratones silvestres. A diferencia del tejido adiposo blanco (encargado de almacenar energía en forma de lípidos) el tejido adiposo marrón (caracterizado por su actividad termogénica) se encarga de consumir energía y disiparla en forma de calor. Por tanto, Aoki y colaboradores sugieren que la sobreexpresión de DRO1 es

tejido dependiente y tiene un papel importante en la regulación del metabolismo energético.

El tejido adiposo no es exclusivamente un tejido estático encargado de almacenar energía en forma de grasa, sino que también es un órgano endocrino que produce y secreta moléculas activas conocidas como adipocitoquinas. Cabe destacar que DRO1 también es secretado por adipocitos (Okada et al. 2008), sugiriendo una función semejante a la de alguna adipocitoquina. La desregulación en la producción de adipocitoquinas como la adiponectina da lugar al síndrome metabólico, caracterizado por obesidad abdominal, dislipidemia, hipertensión e hiperglucemia (Ryo et al. 2004). Curiosamente, los niveles de expresión de adiponectina están directamente relacionados con los de DRO1 en tejido adiposo. De hecho, ambos están disminuidos en el tejido adiposo blanco de modelos obesos de ratón *ob/ob* y *KKAy*, así como en ratones obesos inducidos por dieta (Okada et al. 2008). Además, la insulina, TNF α y los mecanismos de estrés inducidos por H₂O₂ e hipoxia, producen una disminución en la expresión de DRO1 y adiponectina (Okada et al. 2008). Estos resultados sugieren que al igual que la adiponectina, DRO1 también pudiera tener un papel protector antiinflamatorio y de favorecer la sensibilidad a insulina en tejidos periféricos.

3- AIB1

3.1- La familia p60 de coactivadores transcripcionales

3.1.1- Introducción y clasificación de las proteínas SRC

Las hormonas esteroideas, tiroideas, retinoides, vitamina D, prostaglandinas y ácidos biliares regulan eventos importantes en el desarrollo y en las funciones fisiológicas del organismo tras la unión a sus respectivos receptores nucleares y la activación de la transcripción de genes diana específicos para cada uno de ellos. Tras la unión del ligando a su respectivo receptor, como el de estrógenos (ER α y ER β), progesterona (PR-A y PR-B), andrógenos (AR), glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides, éstos cambian su conformación, liberándose de proteínas corepresoras como HSP70 y dimerizándose. Una vez activados, los dímeros se unen a sus respectivos elementos de respuesta a hormona (HRE) en el DNA, donde reclutan a proteínas coactivadoras que facilitan y amplifican la transcripción de los genes diana. En ausencia de ligando, los receptores nucleares que forman heterodímeros con el receptor X retinoide (RXR), como el receptor de hormonas tiroideas (TR), el receptor del ácido retinoico (RAR) y receptor de vitamina D, permanecen unidos a sus HRE asociados a

corepresores que inhiben la transcripción de sus genes diana (revisado en Xu and Li 2003). En presencia del ligando se produce la consecuente activación del complejo transcripcional, asociándose a moléculas coactivadoras que permiten la transcripción de los genes diana.

Muchas proteínas coactivadoras forman parte de complejos correguladores multiproteicos que poseen dos tipos de actividades enzimáticas (Rosenfeld et al 2006): 1) actividades enzimáticas que producen modificaciones covalentes en histonas mediante acetilaciones/desacetilaciones y metilaciones/desmetilaciones, o por fosforilación/desfosforilación, poli(ADP) ribosilasa, ubiquitina-ligasa y SUMO-ligasa; 2) actividades enzimáticas que producen remodelación de la cromatina de forma dependiente de ATP. Regulando la transcripción génica podemos encontrar diferentes complejos de coactivadores que poseen las actividades citadas anteriormente. Por ejemplo, un complejo coactivador es el BRG/Brm (“Brahma-Related-Gene-1”), que tiene actividad ATPasa y produce la remodelación de la cromatina de forma ATP-dependiente (Rosenfeld & Glass 2001). Por otra parte se encuentra el complejo coactivador TRAP/DRIP (“TR-Associated Protein/ vitamin D Receptor Interacting Protein”), encargado del reclutamiento de la RNA polimerasa II (Rosenfeld & Glass 2001). Un complejo que puede metilar la histona H3 es el formado por ASC-2 (“Activating Signal Cointegrator 2”) (Goo et al. 2003). Otro complejo coactivador es el complejo formado por SRC (“Steroid

Receptor Coactivator”) junto con acetiltransferasas (CBP, p300) y metiltransferasas (CARM1 y PRMT1), los cuales son reclutados en los promotores a través de la interacción entre el receptor nuclear y el coactivador SRC de forma dependiente de ligando (McKenna & O’Malley 2002; Xu & O’Malley 2002). La familia de coactivadores del receptor de esteroides (SRC) está formada por tres miembros homólogos:

-SRC-1: el coactivador del receptor de esteroides-1 es un gen localizado en el cromosoma 2 (p23) en humanos (Carapeti et al. 1998). La proteína que expresa interacciona con los receptores PR, ER y TR unidos a ligandos (Oñate et al. 1995; Takeshita et al. 1996; Kamei et al. 1996). SRC-1 está implicado en el desarrollo y función del cerebro, en metabolismo energético junto con PPAR γ y otras funciones biológicas (Auger et al. 2000; Puigserver et al. 1999). Por otra parte, SRC-1 promueve la metástasis en tumores de mama mediante la coactivación de PEA3 en la expresión de Twist (Qin et al. 2009). Sin embargo, aunque SRC-1 facilita la formación de metástasis, no tiene ningún efecto sobre la formación o iniciación del tumor primario (Wang et al. 2008).

-SRC-2: SRC-2, también conocido como GRIP-1 (Proteína de interacción con el receptor de glucocorticoides 1), TIF2 (Factor intermediario transcripcional 2) o NCoA2 (Coactivador de receptores nucleares 2) se encuentra genéticamente localizado en el cromosoma 8 (q21) en humanos.

Interacciona con los receptores GR y ER. Además, tiene un papel importante en el eje reproductor y en el comportamiento reproductivo (Apostolakis et al. 2002) y en el metabolismo de lípidos y balance energético (Picard et al. 2002).

-SRC-3: SRC-3, AIB1 (Amplificado en cáncer de mama 1), pCIP (Proteína de interacción con p300/CBP), NCoA3 (Coactivador de receptores nucleares 3), RAC3 (Coactivador asociado a receptores 3), ACTR (Acetiltransferasa) o TRAM1 (Molécula activadora del receptor de hormonas tiroideas 1) fue inicialmente identificado como un gen amplificado en 20q12 en cánceres de mama y ovario (Anzick et al. 1997). Además, las principales funciones fisiológicas de AIB1 son diferentes de las de SRC-1 y SRC-2. De hecho, a diferencia de los ratones SRC-1^{-/-} y SRC2^{-/-}, los ratones AIB1^{-/-} muestran retraso en el crecimiento y menor peso en adultos (Xu et al. 2000; Wang et al. 2000). Asimismo, AIB1 es el único de la familia que ha sido relacionado con la iniciación del cáncer (Yan et al. 2006; Tien, et al. 2009; Lahusen et al. 2009; Zhou et al. 2010), lo que ha dado lugar a un exhaustivo estudio de sus funciones biológicas y patológicas.

3.1.2- Mecanismo molecular de la activación transcripcional por SRC

Las proteínas SRC participan en la remodelación de la cromatina y activación transcripcional a través de un mecanismo molecular secuencial. En primer lugar se forman los complejos transcripcionales SRC que contienen, además de las proteínas SRC, las proteínas acetiltransferasas CBP y p300, y las metiltransferasas CARM y PRMT1. Estos complejos son reclutados en la cromatina por unión directa de SRC al receptor nuclear presente en el promotor de un gen diana. Como resultado, se produce la metilación y acetilación de histonas y la consecuente destrucción de los nucleosomas y apertura de la cromatina, facilitando el inicio de la transcripción. A continuación, el complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF es reclutado en la cromatina mediante interacciones directas o indirectas con CBP/p300. El reclutamiento del complejo es estabilizado tras la acetilación de las colas de histonas por CBP/p300. La actividad histona acetiltransferasa de este complejo depende de ATP y fomenta los cambios de la topología del DNA. El complejo mediador TRAP es también reclutado a los promotores activos a través de la interacción con las proteínas SRC o con los receptores nucleares. El complejo TRAP se comunica directamente con la maquinaria de transcripcional basal y activa la expresión génica. Todo este proceso puede ocurrir de forma cíclica, siendo regulado por

fosforilaciones en la zona C-terminal de la RNA polimerasa II, el intercambio secuencial de los coactivadores integrantes del complejo y por fosforilaciones y acetilaciones de los coreguladores (revisado en Ferrero and Font de Mora 2011). Además de interactuar con los receptores nucleares, los miembros de la familia SRC también interactúan directamente con factores de transcripción como AP-1 (Lee et al. 1998), NFκB (Werbajh et al 2000), STAT3 (Arimura et al. 2004) y E2F1 (Louie et al. 2004), activando la expresión de sus genes diana. Esta gran promiscuidad de los coactivadores SRC les otorga una gran relevancia en un gran número de procesos celulares y fisiológicos, incluyendo la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo embrionario, el eje reproductor y el metabolismo.

3.1.3- Estructura y dominios de las proteínas SRC

Las proteínas de la familia SRC tienen un peso molecular aproximado de 160 KDa. Cada proteína SRC tiene más de 1400 aminoácidos con una alta homología de secuencia entre sí, alcanzando el 50-55% de similitud y hasta un 43-48% de identidad entre los tres miembros. De hecho, todas contienen los siguientes dominios (Figura 2):

- Dominio bHLH/PAS: Localizado en la región N-terminal, es el dominio más conservado entre los tres miembros de la familia.

Esta región posee un dominio bHLH (basic helix-loop-helix) similar al de muchos reguladores transcripcionales (Murre et al. 1989) y dos dominios PAS (Per-AhR-Sim) característicos de muchas proteínas nucleares como Per, AhR y Sim (Swanson and Bradfield 1993). Este dominio se encuentra involucrado en la dimerización entre las proteínas que contienen este motivo (Huang et al. 1993) y es importante para la interacción con factores miogénicos como miogenina y MEF-2C (Chen et al. 2000).

- Región S/T: La parte central de la secuencia es una región rica en serinas y treoninas, por lo que es una zona susceptible de sufrir fosforilaciones. Estas modificaciones postraduccionales juegan un papel muy importante en la regulación y actividad de AIB1.

- Motivos LXXLL o LLXXL (L = Leucina; X = cualquier aminoácido): Son motivos conservados a lo largo de la región central de la secuencia de las proteínas SRC. Los tres dominios centrales (Dominios de interacción con receptores, RID) son los responsables de la interacción con los receptores nucleares, formando una hélice α anfipática que se une a los surcos hidrofóbicos expuestos por los receptores nucleares tras la unión del ligando (Shiau et al 1998). La preferencia de interacción de un coactivador SRC con un determinado receptor nuclear depende de la distancia entre los distintos dominios LXXLL así

como de la secuencia de aminoácidos entorno a cada uno de estos dominios.

- Dominio de activación 1 (AD1): Responsable de la interacción con las metiltransferasas CBP y p300, aunque no interacciona con los receptores nucleares (Voegel et al. 1996; Li et al. 1997; Oñate et al. 1998). Esta interacción con CBP y p300 se efectúa a través sus hélices hidrofóbicas con los motivos LXXLL presentes en el dominio de activación 1 de las proteínas SRC. De hecho, la mutación de estos motivos impide la unión de SRC con CBP (McInerney et al. 1998).

- Dominio de activación 2 (AD2): Se encuentra en la posición C-terminal de las proteínas SRC y es el responsable de su interacción con histona-metiltransferasas como CARM-1 y PRMT-1 (Chen et al. 1999; Koh et al. 2001).

- Dominio histona-acetiltransferasa (HAT): Está presente en la zona C-terminal de SRC-1 y AIB1. Es un dominio que tiene actividad histona-acetiltransferasa intrínseca, por lo que podría estar directamente relacionado con la remodelación de la cromatina, aunque no se ha comprobado su relevancia (Chen et al. 1997).

- Región rica en glutaminas (Q) y cadena de poliglutaminas (poliQ): Los miembros de la familia SRC poseen en la zona C-terminal una región rica de glutaminas (Xu & Li 2003). Además, AIB1 también tiene una cadena de poliglutaminas cuya longitud (entre 26 y 32 glutaminas) es un polimorfismo en

humanos que se ha intentado correlacionar con susceptibilidad a cáncer. De hecho, se ha observado en diferentes carcinomas de ovario que los genotipos que poseen una cadena de poliglutaminas más corta son más agresivos (Li et al. 2005). Sin embargo su importancia biológica es desconocida y en otros cánceres como el de mama existe una contradicción en los estudios existentes. Estos estudios no relacionan la agresividad de los genotipos en función de la longitud de la cadena de poliglutaminas cuando los genes BRCA1 y BRCA2 están mutados (Haiman et al. 2000; Spurdle et al. 2006).

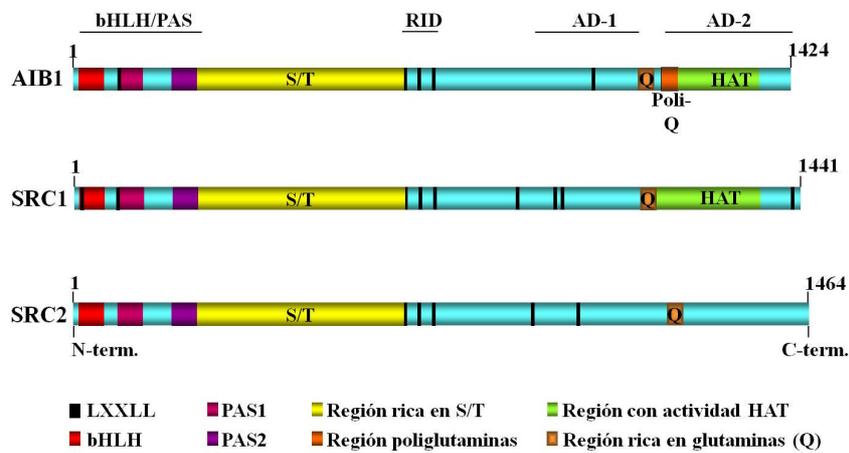


Figura 2: Dominios estructurales y funcionales de las proteínas de la familia SRC: Representación esquemática de los dominios de las proteínas SRC. Los números representan las posiciones de los aminoácidos desde N-terminal (izquierda) hasta C-terminal (derecha). Cada dominio está representado por un rectángulo coloreado indicado en la leyenda inferior de la figura.

3.2- Funciones fisiológicas y patológicas de AIB1

De manera similar a los otros miembros de la familia SRC, AIB1 está expresado en muchos tejidos. Se ha detectado mRNA de AIB1 en placenta, páncreas, pulmón, riñón, cerebro, hígado, intestinos, útero, oocitos, epitelio vaginal, hipocampo, bulbo olfatorio, pituitaria, músculo esquelético, músculo liso (endotelio), glándula mamaria y testículos. A nivel de proteína se ha detectado su expresión en testículos, pulmón, hígado, cerebro, corazón, glándula mamaria y ovario (Xu and Li 2003; Xu et al. 2000; Yuan et al. 2002). Curiosamente, AIB1 no se expresa en endometrio uterino, un tejido extremadamente sensible a los esteroides del ovario, mientras que sí lo hace con grandes niveles en la glándula mamaria, lo que muestra que la expresión de AIB1 no es estrictamente ubicua (Xu et al. 2000).

AIB1 juega un papel importante en diferentes funciones fisiológicas como el desarrollo, la reproducción y el metabolismo. Además, también participa en otros procesos como la vasoprotección y la respuesta inmune. Por otra parte, AIB1 se encuentra implicado con gran protagonismo en diferentes procesos patológicos como es el cáncer. A continuación se detalla en mayor profundidad estos procesos.

3.2.1- Papel de AIB1 en el desarrollo.

Se ha observado en ratones transgénicos que sobreexpresan AIB1 en la glándula mamaria que existen altos niveles del IGF-1R y AKT fosforilados debido a una mayor activación de la vía PI3K/AKT (Torres-Arzayus 2004). Esta mayor actividad coincide con la mayor secreción de IGF-I que actuaría de forma auto- y paracrina (Torres-Arzayus 2004). En este sentido, los niveles de IGF-1 circulantes están disminuidos en ratones $AIB1^{-/-}$ y conducen a un retraso en el crecimiento (Wang et al. 2000; Xu et al. 2000; Zhou et al. 2003). A diferencia de los ratones $SRC1^{-/-}$ y $SRC2^{-/-}$, los ratones $AIB1^{-/-}$ muestran retraso y disminución del crecimiento debido a los bajos niveles de IGF-1 y resistencia parcial de los tejidos a IGF-1 (Xu et al. 2000). Además, las hembras tienen bajos niveles de estrógenos y muestran un pobre desarrollo alveolar de la glándula mamaria debido a la deficiente respuesta a estrógenos y progesterona, lo que sugiere que AIB1 está implicado en la proliferación celular dependiente de hormonas esteroideas y la diferenciación durante el desarrollo de los alvéolos mamaros (Xu et al. 2000).

3.2.2- Papel de AIB1 en reproducción.

El retraso en el crecimiento suele ir acompañado de un retraso en el inicio de la pubertad. De hecho, los ratones $AIB1^{-/-}$

sufren un retraso en la maduración sexual posiblemente por la disminución de la capacidad de producir estrógenos (Xu et al. 2000). Además, en ratones machos $AIB1^{-/-}$ está disminuida la función reproductiva y en las hembras el desarrollo y función del sistema reproductivo es anormal mostrando una ovulación disminuida, menor frecuencia de embarazos, camadas más pequeñas y un ciclo estral más largo (Xu et al. 2000).

3.2.3- Papel de AIB1 en metabolismo.

Los ratones $AIB1^{-/-}$ tienen un mayor metabolismo mitocondrial en el tejido adiposo marrón y músculo esquelético (Coste et al. 2008). El metabolismo mitocondrial puede ser activado por PGC-1 α (PPAR γ coactivator-1 α) (Puigserver et al. 1998; Lin et al. 2005). La expresión de AIB1 se encuentra inducida por un exceso de aporte calórico provocando la inhibición de PGC-1 α y el gasto energético. La restricción calórica disminuye los niveles de AIB1, lo que conduce a un aumento de la actividad PGC-1 α y del gasto calórico (Coste et al. 2008). Además, los ratones $AIB1^{-/-}$ muestran una disminución del peso corporal y del tejido adiposo (Louet et al. 2006). AIB1 actúa de manera sinérgica con C/EBP para controlar la expresión de PPAR γ 2, un factor de transcripción esencial en la diferenciación adipocítica. Por tanto, AIB1 es necesario en la diferenciación de adipocitos hasta el punto de

que ésta se encuentra significativamente impedida en ausencia de AIB1 (Louet et al. 2006).

3.2.4- Otras funciones fisiológicas de AIB1.

Puesto que AIB1 coactiva al receptor de estrógenos, es normal que AIB1 tenga funciones fisiológicas compartidas con los estrógenos. Un efecto bien reconocido de los estrógenos es el de vasoprotector, de forma que las mujeres premenopáusicas sufren menos enfermedades cardiovasculares que las postmenopáusicas (Mendelson & Karas 1999). En este sentido se ha observado que AIB1 se expresa junto con ER α y ER β en células endoteliales y músculo liso vascular, favoreciendo los efectos vasoprotectores mediados por los estrógenos e inhibiendo la formación de la neointima después del daño vascular (Yuan et al. 2002).

Otra función fisiológica en la que AIB1 está implicado es la respuesta inmune y la inflamación. Concretamente, se ha observado que AIB1 interacciona con la quinasa I κ B (IKK) la cual lo fosforila (Wu et al. 2002). IKK es responsable de la degradación de I κ B dando lugar a la activación de NF- κ B, un factor de transcripción muy importante en la regulación de genes implicados en la respuesta inflamatoria y la supervivencia celular (Pennington et al. 2001). La fosforilación de AIB1 por IKK produce su translocación desde el citosol al núcleo donde activa la actividad transcripcional de NF κ B dando lugar a la

expresión de genes proinflamatorios como caspasas 4 y 5 (Wu et al. 2002).

3.2.5- Función de AIB1 en cáncer.

Por otra parte, AIB1 también juega un papel muy importante en diferentes patologías humanas, principalmente en cáncer. De hecho, AIB1 está amplificado en 20q12 en un 5% de cánceres de mama y ovario y está sobreexpresado en el 60% de distintos tipos de cáncer, estando relacionado con un fenotipo agresivo y un mal pronóstico de la enfermedad (Gojgis et al. 2010; Luo et al. 2008; Li et al. 2005; Wang et al. 2002; Anzik et al. 1997). Aunque los primeros estudios de AIB1 sugerían que el papel de AIB1 en cáncer estaba vinculado al receptor de estrógenos y otras hormonas esteroideas, hoy en día apuntan a que la expresión de otros genes como Her2 son también de gran importancia. De hecho, la expresión de proteína AIB1 en diferentes cánceres está correlacionada con la amplificación del gen Her2 y no con el del receptor de estrógenos (Lee et al. 2011). La sobreexpresión de AIB1 se ha hallado en cáncer de próstata (Hsing et al. 2002; Platz et al. 2000), carcinoma de endometrio (Glaeser et al. 2001; Kershah et al. 2004; Sakaguchi et al. 2007; Balmer et al. 2006), así como en otros cánceres como carcinoma de células escamosas del esófago, cáncer gástrico, carcinoma colo-rectal, cáncer pancreático, carcinoma hepatocelular y cáncer de uretra (Gojgis et al. 2010; Xu et al.

2007; Sakakura et al 2000; Xie et al. 2005; Henke et al. 2004; Wang et al. 2002; Luo et al. 2008). AIB1 también está implicado en cáncer del tracto respiratorio superior como el carcinoma nasofaríngeo (Liu et al. 2008). Asimismo, AIB1 tiene un papel fundamental en diferentes cánceres del sistema nervioso central como en los meningiomas (Carroll et al 2000).

3.3- Modificaciones postraduccionales de AIB1

El potencial oncogénico de AIB1 no sólo depende de sus niveles de expresión, sino que la actividad de AIB1 también se encuentra regulada por diferentes modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, ubicuitalaciones, sumoilaciones, metilaciones y acetilaciones (Ferrero & Font de Mora 2011). AIB1 es fosforilado en, al menos, 11 residuos: T24, S101, S102, S505, S509, S543, S601, S857, S860, S867 e Y1357 (Amazit et al. 2007; Li et al. 2008; Wu et al. 2004; Zheng et al. 2005; Wu et al. 2007; Giamas et al 2009; Oh et al. 2008). La activación de receptores de factores de crecimiento como HER2/neu o IGF-IR desencadena la señalización a través de distintas quinasas citosólicas entre las que se incluye MAPK (Font de Mora & Brown 2000; Migliaccio et al. 1996). Tras esta activación, MAPK fosforila a AIB1 en múltiples sitios del entorno del dominio de activación de la transcripción AD1, permitiendo el reclutamiento de p300 y aportando al complejo transcripcional la actividad histona-acetiltransferasa (Font de

Mora & Brown 2000). La fosforilación de AIB1 por MAPK despliega posiblemente su estructura conformacional, que permanecía inhibida por impedimento estérico impidiendo su interacción con p300. Además, la fosforilación de T24, S857 y S860 por MAPK es esencial para la translocación de AIB1 al núcleo y su posterior unión y coactivación de ER (Amazit et al. 2007). También se ha descrito el mecanismo molecular por el que la activación de ER por estrógenos también da lugar a la activación de MAPK a través de la tirosina quinasa Src (Migliaccio et al. 1996). Este cruce de señales constituye un mecanismo de retroalimentación en el que AIB1 participa como una molécula clave en la encrucijada de señalización entre hormonas esteroideas y factores de crecimiento. Por otra parte, la activación de la vía NFκB por TNFα conduce a la fosforilación de AIB1 en S857 por IKK, permitiendo la translocación de AIB1 al núcleo y la coactivación del factor de transcripción NFκB (Wu et al. 2002). Por tanto, la combinación de múltiples fosforilaciones de AIB1 da lugar a una compleja respuesta de AIB1, participando en diferentes vías de señalización y proporcionando un enclave por el cual diferentes señales pueden actuar a través de AIB1 modulando diferentes respuestas fisiológicas.

Por otra parte, la ubiquitilación es un proceso enzimático secuencial por el que se une covalentemente una pequeña proteína de 8 KDa (ubiquitina) a una lisina específica de la proteína diana para producir un efecto reversible

(monoubicuitilación) o irreversible (poliubiquitilación) que conduce a la degradación de la proteína por el proteasoma (Li & Shang 2007). AIB1 puede ser ubiquitilado en los residuos K723, K786 y K1194. La monoubicuitilación de AIB1 en K723 y K786 da lugar a un aumento de su capacidad coactivadora del ER, mientras que la poliubiquitilación conduce a su degradación por el proteasoma 26S (Wu et al. 2007).

La sumoilación es un proceso similar a la ubiquitilación, en el que el marcaje con la proteína SUMO modifica las propiedades funcionales de la proteína diana, dirigiendo su localización subcelular o su actividad, incluyendo la regulación transcripcional (Li & Shang 2007). AIB1 es también sumoilado en los residuos K723, K786 y K1194. La sumoilación de AIB1 ocurre en el núcleo y da lugar a una disminución de su actividad transcripcional. Además, la fosforilación y sumoilación de AIB1 ocurre de forma coordinada (Wu et al 2006). Es decir, la fosforilación de las serinas S505, S543, S860 y S867 por MAPK impide la sumoilación de AIB1. Al mismo tiempo, la sumoilación de las lisinas K723, K786 y K1194 impide la fosforilación de AIB1. Esto es entendible cuando la fosforilación induce la actividad transcripcional y la sumoilación la inhibe.

AIB1 también puede sufrir acetilación y metilación en diferentes residuos. Tras la acetilación de histonas e inicio de la transcripción, la acetilación de AIB1 tiene lugar en los residuos

K629 y K630 por las acetiltransferasas CBP/p300, neutralizando las cargas positivas de los residuos y conduciendo a la disociación del complejo coactivador. Por tanto, la acetilación reprime la señalización del coactivador proporcionando un bucle de retroalimentación para mantener la transcripción de genes diana bajo control (Chen et al. 1999). Por otro lado, AIB1 también tiene dos sitios de metilación entre las Arg 1163-1195 y 839-961 que dan lugar a una restricción en su actividad transcripcional (Naeem et al. 2006). Todas estas modificaciones transcripcionales dan un ajuste mucho más fino en la regulación enzimática de AIB1 y denotan la gran relevancia de AIB1 en la fisiología celular.

3.4- Mecanismos moleculares de la oncogénesis mediada por AIB1

3.4.1- Vía de transducción dependiente de hormona

La sobreexpresión de AIB1 se ha relacionado con cánceres de próstata hormonodependientes (Hsing et al. 2002; Platz et al. 2000) o carcinoma de endometrio (relacionado con estrógenos) (Glaeser et al. 2001; Kershah et al. 2004; Sakaguchi et al 2007; Balmer et al. 2006). Aproximadamente el 70% de los cánceres de mama expresan los receptores de hormonas ER α y/o PR, siendo biomarcadores indicativos de la dependencia a hormona (Miller et al. 2011). Puesto que la tumorigénesis en muchos

tipos de cáncer está estrechamente relacionada con la actividad hormonal, no es de extrañar que uno de los mecanismos por los que AIB1 media su capacidad oncogénica sea a través de la coactivación de los receptores hormonales. De hecho, la coactivación de ER por AIB1 da lugar a un aumento de la expresión de ciclina D1 y c-Myc (Planas-Silva et al. 2001; Zhang et al. 2004), dos genes implicados en proliferación celular cuya sobreexpresión está estrechamente vinculada con el desarrollo del cáncer (Figura 3).

3.4.2- Vías de transducción independientes de hormona

AIB1, además de interactuar y coactivar a receptores hormonales, también es capaz de interactuar con otros factores de transcripción como AP-1 (Nakuci et al. 2006), NFκB (Werbajh et al. 2000), STATs (Arimura et al. 2004) y E2F1 (Louie et al 2004), produciendo la activación de la expresión de sus genes diana. Como resultado de la expresión de estos genes se favorece la progresión del ciclo celular de forma independiente de hormonas. De hecho, la fuerte expresión de la proteína de AIB1 en cáncer de mama es un factor de mal pronóstico, especialmente en cánceres ER-negativos (Lee et al 2011). Por lo tanto, puesto que más del 30% de los cánceres de mama son negativos para ER (Normanno et al. 2005) es muy

trascendental conocer los mecanismos independientes de hormona en los que AIB1 está implicado. Además, es importante señalar que la proliferación celular independiente de hormona es responsable de gran parte de las resistencias a las terapias endocrinas empleadas en el tratamiento de muchos cánceres. Sin embargo, la pérdida de expresión de ER solo es responsable del 17% de los casos de resistencia a tamoxifeno (Gutierrez et al. 2005), lo que sugiere que los mecanismos independientes de hormona son de mayor importancia. Por lo tanto, es de gran interés elucidar estos mecanismos con el fin de proporcionar las bases necesarias para el desarrollo de nuevas terapias más eficaces contra el cáncer.

3.4.2.1- Vía de señalización E2F1

E2F1 es un factor de transcripción que regula la proliferación celular modulando la expresión de proteínas requeridas para la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, así como de proteínas necesarias para la síntesis de DNA. Durante G0 y las fases tempranas de G1, E2F1 se encuentra hipofosforilado y unido a RB impidiendo su actividad transcripcional. A medida que la célula avanza en G1 se produce la fosforilación de RB por CDK permitiendo la liberación de E2F1 para activar la transcripción (Harbour & Dean 2000). En el primer exón de AIB1 existen tres regiones evolutivamente conservadas, siendo la segunda de ellas (pb -250/+350)

poseedora de dos sitios de unión a E2F1 y de varios sitios de unión para el factor de transcripción Sp1 (Proteína específica 1). Sin embargo, la activación del promotor de AIB1 por E2F1 no se produce por unión a los elementos consenso del DNA para E2F1 sino que lo hace mediante la cooperación con el factor de transcripción Sp1 (Mussi et al. 2006). Una vez expresado AIB1, éste interacciona con E2F1 dando lugar a la expresión de ciclina A, ciclina E, Cdk2 y de los propios E2F1 y AIB1 que da lugar a un bucle de retroalimentación positiva acelerando la progresión de G1 a S (Figura 3) (Louie et al. 2004; Louie et al. 2006). La expresión de estos genes proliferativos puede ser un mecanismo importante para la proliferación celular independiente de hormonas. De hecho, la inducción de la expresión de AIB1 en células de cáncer de mama conduce a un aumento de la proliferación independiente de hormonas que requiere la asociación de AIB1 con E2F1 pero no con ER (Louie et al, 2004). Esto refuerza la relación de AIB1 en su papel oncogénico independiente de estrógenos.

3.4.2.2- Vía de señalización IGF-I/PI3K/AKT

La vía de señalización IGF-I/PI3K/AKT juega un papel muy importante en crecimiento celular, diferenciación, supervivencia y metástasis. Los efectos biológicos de los IGFs están mediados por el receptor de IGF-I (IGF-IR), un receptor tirosina quinasa con alta homología al receptor de insulina

(Rosenzweig & Atreya et al. 2010). Tras la activación de IGF-IR se produce la fosforilación de su sustrato (IRS-1 o IRS-2) que permite el reclutamiento de otros efectores a través de sus dominios SH2 o PTB (Baserga 2009). Entre los distintos efectores destaca PI3K (“Phosphatidylinositol 3-kinase”), cuya translocación a la membrana permite la fosforilación de su sustrato generando PIP3 (“Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate”), el cual actúa como segundo mensajero en diferentes vías de transducción de señales (Toker & Cantley 1997). PIP3 promueve la activación de AKT, una serina/treonina quinasa que fosforila y activa a mTOR, NFκB y MDM-2, e inhibe a GSK-3, FOXO3 y BAD (Figura 3) (Karar & Maity 2011; Ozes et al. 1999; Levav-Cohen et al. 2005; Yan et al. 2012; Matheny & Adamo 2009).

En estudios realizados en líneas celulares se ha observado que AIB1 tiene la capacidad de activar la ruta IGF-I/PI3K/AKT, promoviendo su acción proliferativa por una vía independiente de estrógenos. En la línea celular de cáncer de mama MCF-7, la disminución de la expresión de AIB1 conduce a una disminución en la expresión de IGF-IR e IRS-2 además de producir una disminución del crecimiento independiente de anclaje celular mediado por IGF-IR (Oh et al. 2004). Estos resultados se observan también en presencia de antiestrógenos, apoyando el papel de AIB1 en la activación de la vía de AKT de manera independiente a estrógenos. Por otra parte, en las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y PC3, la sobreexpresión

de AIB1 promueve el crecimiento celular de manera independiente de andrógenos aumentando la actividad AKT (Zhou et al. 2005). Además, la sobreexpresión de AIB1 en estas células produce el aumento en los niveles de expresión de diferentes componentes de la vía IGF-I/PI3K/AKT como son IGF-I, IGF-II, IRS-1, IRS-2, PI3CA y AKT1, mientras que la eliminación de AIB1 reduce la expresión de estas proteínas (Yan et al. 2006). Todos estos resultados sugieren que AIB1 tiene un papel importante en la proliferación celular dependiente de IGF-I en cáncer de mama y próstata.

La implicación de AIB1 en la vía IGF-I/PI3K/AKT ha sido también observada en estudios realizados con modelos murinos. Se ha observado que la sobreexpresión de AIB1 en ratones transgénicos está relacionada con el aumento de IGF1 circulante (Torres-Arzayus et al 2004). Como consecuencia, en la glándula mamaria normal y en los tumores de los ratones transgénicos de AIB1 se encuentra sobreactivada toda la ruta que depende de IGF-I (Torres-Arzayus et al 2004). Por el contrario, la supresión de AIB1 en ratones “knock-out” conduce a una disminución de los niveles de IGF-I y a un retraso en el crecimiento (Wang et al. 2000; Xu et al. 2000; Zhou et al. 2003). Además, los niveles de IRS-1 e IRS-2 se encuentran reducidos cuando AIB1 es suprimido en ratones que expresan el oncogén Ras (Luang et al. 2004), sugiriendo que AIB1 desempeña también un papel mediador en la señal de otros oncogenes. En conjunto, estos resultados apoyan el papel de AIB1 en la regulación de la

expresión de moléculas de la vía IGF-I/PI3K/AKT que son importantes para el desarrollo de tumores.

3.4.2.3- Vía de señalización NFκB

El factor de transcripción NFκB es importante en crecimiento, diferenciación y prevención de apoptosis. NFκB se encuentra inactivo en el citosol formando un complejo constituido por tres subunidades, p50 y p65, que son las que se unen al DNA, e IκB, que retiene al complejo en el citosol manteniéndolo inactivo (Lin & Karin 2003). Tras la estimulación de la célula por citoquinas como interleukina-1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) se produce la fosforilación y activación de la quinasa IκB (IKK) (Schwabe & Sakurai 2005). Tras la activación de IKK, esta es capaz de fosforilar la subunidad inhibitoria de NFκB, IκB. La fosforilación de IκB promueve su ubiquitilación, siendo rápidamente degradado por el proteasoma, liberando a NFκB de su inhibición que ahora es capaz de entrar al núcleo para regular la transcripción de genes (Ghosh & Karin 2002) (Figura 3).

Además, se ha descrito que IKK interacciona con AIB1, el cual es fosforilado por las dos subunidades catalíticas de IKK (IKKα e IKKβ) (Wu et al. 2002). La fosforilación de AIB1 en la serina S857 por IKK conduce a su translocación al núcleo. En el núcleo, AIB1 se une a la subunidad p65 de NFκB coactivando la

expresión de sus genes diana (Werbajh et al. 2000) tales como caspasas proinflamatorias e IRF-1 (Factor regulador del interferón 1), uno de los principales mediadores de la respuesta inmune producida por NFκB (Wu et al. 2002). Por otra parte, el promotor de IL-6 posee varios sitios de unión a NFκB y su expresión también es regulada por AIB1, jugando un papel importante en inflamación y en metástasis (Pages et al. 1999).

3.4.2.4- Vía de señalización HER2/neu/MAPK

HER2/neu es el oncogén de gran incidencia en cáncer de mama y está correlacionado con un mal pronóstico de la enfermedad. Este oncogén pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidermal (EGFR o ErbB). HER2/neu está formado por un dominio extracelular, un dominio transmembrana hidrofóbico y un dominio citosólico con actividad tirosina quinasa y con varios residuos tirosina cuya fosforilación es la responsable del acoplamiento de los efectores. El ligando (EGF) se une al dominio extracelular y estabiliza a HER2/neu en una conformación extendida que conduce a la dimerización del receptor. Uno de los dominios citoplasmáticos del dímero actúa como monómero regulador estabilizando el dominio tirosina quinasa. Mientras, el otro actúa como monómero catalítico en la conformación activa y presenta los residuos tirosina del monómero regulador al sitio catalítico del monómero catalítico. De esta forma, la dimerización de

HER2/neu permite la fosforilación de tirosinas (Revisado en Foley et al. 2010). Tras la activación de HER2/neu por EGF, tiene lugar una cascada de activación de diferentes quinasas como RAS/RAF/MEK/MAPK y PI3K/AKT/mTOR que concluye con la expresión de genes importantes en proliferación, diferenciación, metabolismo, supervivencia y migración celular (Figura 3) (Holbro et al. 2003; Tamborini et al. 2010; Zhang et al. 2011).

Estudios clínicos en pacientes con cáncer de mama muestran que la sobreexpresión de HER2/neu se correlaciona con la de AIB1 y está asociada con mal pronóstico y con la resistencia a tamoxifeno (Osborne et al. 2003). La sobreexpresión de Her2/neu ocurre en un alto porcentaje de pacientes durante la terapia. Esto sugiere que AIB1 es capaz de realizar su función de manera independiente a estrógenos mediante la activación de HER2/neu. La expresión de Her2/neu y el desarrollo de resistencia a la terapia ocurren por la competición entre AIB1 y PAX2 por ER en el sitio de regulación transcripcional de Her2/neu. La represión de Her2/neu por ER-PAX2 pasa a activación cuando PAX2 es desplazado por la sobreexpresión de AIB1 o en pacientes que adolecen de expresión de PAX2 (Hurtado et al. Nature 2008). Este mecanismo es a su vez fomentado por otras dos vías que llevan a la activación y estabilización de AIB1. La activación de MAPK por EGF da lugar a la fosforilación de AIB1 y a su asociación con CBP/p300, aumentando la coactivación de ER

(Font de Mora & Brown 2000). Además, la activación de AKT por EGF inhibe la degradación de AIB1, dando lugar a su acumulación y sobreexpresión (Ferrero et al 2008). Por otra parte, la proteína quinasa Abl, que también es activada por la acción de EGF, es capaz de fosforilar a AIB1 en la tirosina Y1357 permitiendo la asociación con ER α , p300 y CARM1 (Oh et al. 2008). Esta asociación produce la transcripción de genes dependiente de AIB1 conduciendo a cambios en el fenotipo así como crecimiento celular. Sin embargo, la inhibición de Abl por Imatinib es capaz de impedir esos cambios, lo que aporta una posible diana terapéutica para los cánceres resistentes a tamoxifeno que muestran elevada expresión de AIB1 y HER2/neu. Se ha observado en líneas celulares de tumores epiteliales que AIB1 es necesario para la proliferación independiente de anclaje inducida por EGF (Lahusen et al. 2007). Además, la expresión de AIB1 en tumores de ratones transgénicos que sobreexpresan Her2/neu, aumenta la fosforilación de Her2/neu, la expresión de ciclina D1 y ciclina E, y la sobreactivación de las vías de señalización de AKT y JNK (Fereshteh et al. 2008).

3.4.2.5- Vía de señalización PAK/FAK

EGF también es capaz de inducir la transducción de señales entre EGFR y FAK (Kinasa de adhesión focal) dando lugar a la migración celular. La migración celular es un evento

esencial para el crecimiento celular y la formación de metástasis en cáncer. EGF activa a su receptor (EGFR) promoviendo la migración celular y metástasis mediante la activación de diferentes proteínas quinasas como c-Src (Goi et al., 2000), PAK1 (Kinasa activada por p21) (Bokoch 2003) y FAK (Sieg et al. 2000). FAK es una tirosina quinasa intracelular que es activada y autofosforilada en Y397 por unión a complejos de integrinas (Schlaepfer & Mitra 2004). Tras la activación de FAK se produce el reclutamiento de la quinasa c-Src por unión a la tirosina Y397 a través de su dominio SH2 (Eide et al. 1995). Finalmente, c-Src fosforila a FAK en diferentes tirosinas, lo que produce una modificación en la interacción de FAK con otras proteínas promoviendo la migración celular (Revisado en Long et al. 2010) (Figura 3).

Es importante destacar que la inhibición de la expresión de AIB1 produce una alteración en la localización de FAK promoviendo la movilidad de las células de carcinoma de ovario (Yoshida et al. 2005). Por el contrario, la sobreexpresión de AIB1 estimula la activación de FAK y la invasión en carcinoma de próstata (Yan et al. 2008). Sin embargo, la isoforma truncada de AIB1 que carece del exon 4 (SRC-3 Δ 4) es la encargada de mediar la interacción entre EGFR con FAK para promover la migración celular (Long et al. 2010). En este estudio, Long y colaboradores establecen que SRC-3 Δ 4 es fosforilado en las serinas S659 y S676 por la quinasa PAK1, dirigiendo a SRC-3 Δ 4 a la membrana celular donde interacciona con EGFR y con

FAK a través de las S659 y S676 fosforiladas. Esta interacción hace de puente entre EGFR y FAK para promover la migración celular, lo que hace de SRC-3 Δ 4 una potencial diana terapéutica para luchar contra las metástasis en cánceres que presentan esta delección de AIB1.

3.5- Papel de AIB1 en proliferación celular y apoptosis y su implicación en cáncer

Una característica fundamental del cáncer es la pérdida del equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis. Diversos estudios apoyan que AIB1 tiene un papel importante en ambos procesos. Durante la involución de la glándula mamaria, la apoptosis se encuentra reducida en ratones transgénicos que sobrepresan AIB1 en el epitelio mamario (Torres-Arzayus et al. 2004). En cambio, tanto el desarrollo evolutivo de la mama como durante el embarazo revela mayor proliferación epitelial en los ratones transgénicos de AIB1. A partir de los 8 meses de edad se encontró que el 76% de los ratones transgénicos de AIB1 desarrollaron tumores, frente al 5% de los ratones control. Estos datos indican que AIB1 tiene actividad antiapoptótica y favorece la proliferación celular, desestabilizando el equilibrio entre ambos procesos y explicando su capacidad para inducir el desarrollo del cáncer. Otros estudios refuerzan el papel antiapoptótico de AIB1 afirmando que AIB1 promueve la

supervivencia celular en respuesta a estrés celular tras exponer a los cultivos a privación de suero, radiación ultravioleta o bajas temperaturas (Horiguchi et al. 2006). En este caso se observa que en células DT40 (linfocitos B de pollo) sometidas a estrés existe una mayor muerte celular en las células en las que se ha provocado una disminución de la expresión de AIB1 (células AIB1-KD) con respecto a las que expresan AIB1. Además, la pérdida de AIB1 en estas células da lugar a un aumento en la activación de la vía JNK/c-Jun inducida por estrés y previene la activación de la subunidad RelA de NFκB (Horiguchi et al. 2006). La presencia de AIB1 es necesaria para la fosforilación de AKT inducida por estrés, dando lugar a la replicación del DNA y favoreciendo la progresión en la fase S del ciclo celular. Por tanto, AIB1 es un intermediario molecular entre la supervivencia inducida por AKT/p65 y la muerte celular regulada por JNK/c-Jun en respuesta al estrés celular.

La pérdida de regulación del ciclo celular es importante en cáncer y, precisamente, AIB1 juega un papel muy importante en el transcurso del ciclo celular. El ciclo celular se encuentra controlado por un programa transcripcional dinámico responsable de la expresión temporal de ciclinas, Cdks y proteínas con funciones en síntesis y replicación del DNA. Este programa está mediado principalmente por ciclina D1 y por proteínas de la familia E2F. La ciclina D1 es un gen diana de ER y se ha demostrado que AIB1 coactiva la transcripción mediada por ER produciendo un aumento de ciclina D1, lo que favorece

la progresión en el ciclo celular (Planas-Silva et al 2001). AIB1 también es necesario para la transición de la fase G1 a S del ciclo celular de forma independiente de estrógenos gracias a su asociación con el factor de transcripción E2F1 (Louie et al. 2004). Al mismo tiempo, AIB1 es necesario para la expresión de genes con funciones críticas en la replicación del DNA como son ciclina A2, ciclina E, Cdk2, Cdc2, Cdc6, Cdc25A y MCM7 (Louie et al 2006). Otro dato importante es que el silenciamiento de AIB1 produce una disminución de la población celular en fase S mientras que aumenta en las fases G1 y G2/M. Notablemente, en células epiteliales de la mama del ratón se observa que la nuclearización de AIB1 coincide con el paso por la fase S del ciclo celular (Avivar et al 2006). Además de la función de AIB1 en la progresión G1-S, estos resultados sugieren que AIB1 también tiene un importante papel durante o después de la fase S del ciclo celular.

Todos estos datos apuntan al papel de AIB1 en la progresión del ciclo y en la supervivencia celular. El control de ambos procesos es fundamental en el desarrollo del cáncer y explicaría el comportamiento oncogénico de AIB1. Por lo tanto, lograr un mejor conocimiento de los mecanismos por los que AIB1 regula ambos procesos es muy importante para localizar dianas farmacológicas con el fin de desarrollar nuevas terapias frente a cánceres dependientes de AIB1. Aunque algunos de los mecanismos moleculares por los que AIB1 regula la progresión del ciclo celular han sido descritos con cierto detalle, la

regulación de la prevención de apoptosis por AIB1 es muy poco conocida y constituye uno de los objetivos del proyecto de investigación de esta tesis doctoral.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Cultivos celulares y reactivos utilizados

Durante los diferentes experimentos se emplearon distintas líneas celulares en función de las necesidades experimentales y de las características intrínsecas de cada una de ellas, las cuales se indican en la tabla 2. Las líneas celulares empleadas requerían de diferentes medios de cultivo y suplementos para garantizar las condiciones óptimas de crecimiento (Tabla 3). Los sueros empleados como suplemento fueron previamente inactivados a 55°C durante 30 minutos. Los cultivos celulares se mantuvieron en crecimiento exponencial evitando que llegaran a confluencia. Antes de confluencia, las células se despegaron de la superficie de la placa de cultivo mediante tratamiento con Tripsina-EDTA (Invitrogen) y se dividieron adecuadamente en nuevas placas de cultivo. El crecimiento de todas estas líneas celulares se realizó a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. En los casos requeridos de ayuno, se cambió el medio de cultivo de células exponencialmente creciendo al mismo medio sin FBS, manteniéndose el cultivo 24 h adicionales. Cuando lo que se requirió fue la ausencia de estrógenos, los cultivos se mantuvieron una semana en medio DMEM sin rojo fenol (Gibco) suplementado con FBS 10%, tratado con carbón activo y dextrano (Hyclone) para eliminar los estrógenos y glucocorticoides. Los reactivos y condiciones empleados en los diferentes experimentos se muestran en la tabla 4.

Línea celular	Especie	Tejido	Características
MCF7	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de mama	Alta expresión de AIB1 y baja expresión de DRO1. Alta sobreexpresión de ER α
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de cérvix	Moderada expresión de AIB1 y baja expresión de DRO1
ZR75	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de mama	Alta expresión de AIB1 y baja expresión de DRO1. Sobreexpresión de ER α y de Her2/neu
A549	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de pulmón	Expresión similar de AIB1 y DRO1
U2OS	<i>Homo sapiens</i>	Osteosarcoma	Baja expresión de AIB1 y alta expresión de DRO1
HMEC	<i>Homo sapiens</i>	Epitelio mamario	Cultivo primario no canceroso
MDA-MB-231	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de mama	Crecimiento independiente del receptor de estrógenos, negativa para ER α y Her2/neu. P53 mutado
MDA-MB-468	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de mama	Crecimiento independiente del receptor de estrógenos
H1299	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma de pulmón (NSCLC)	Baja expresión de AIB1 y DRO1
COS-1	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Riñón	Sistema idóneo para la expresión ectópica de proteínas
BOSC	<i>Homo sapiens</i>	Riñón embrionario	Célula empaquetadora de retrovirus derivada de 293 y de alta capacidad de expresión de proteínas
MCF-7 TetOn pTRE2hygr DRO1-Flag	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de mama	Expresión inducible de DRO1-Flag

BT474	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma de mama	Alta expresión de AIB1 y baja expresión de DRO1. Sobreexpresión de Her2/neu y p53 mutado.
HUVEC	<i>Homo sapiens</i>	Células de endotelio de vena umbilical	Crecimiento en monocapa

Tabla 2: Líneas celulares empleadas. Sumario de las líneas celulares empleadas durante los diferentes estudios realizados. Se indica la especie animal y el tejido de procedencia así como las características intrínsecas de cada una por las que se han empleado.

Las líneas celulares se almacenaron durante un tiempo prolongado mediante criopreservación. Para ello, células exponencialmente creciendo se resuspendieron en FBS con DMSO al 12% en criotubos estériles (Corning), y se introdujeron en un congelador a -80°C dentro un contenedor de poliestireno de Nalgene con isopropanol para que la temperatura disminuyera paulatinamente y así evitar la formación de cristales que dañaran las células.

Línea celular	Medio de cultivo	Suplementos
MCF-7, HeLa, A549, U2OS, MDA-MB-321, MDA-MB-468, COS-1, BOSC	DMEM (Invitrogen)	2mM L-glutamina 1% (v/v) (Gibco) Penicilina/Estreptomicina (100 µg/ml) (Gibco) Suero bovino fetal 10%
MCF7 TetOn pTRE2hygr DRO1-Flag	DMEM (Invitrogen)	2mM L-glutamina 1% (v/v) (Gibco) Penicilina/Estreptomicina (100 µg/ml) (Gibco) Suero bovino fetal certificado sin tetraciclinas 10% (Gibco) G418 (Sigma) 100µg/mL Higromicina 100µg/mL (Invitrogen)
BT474, ZR75, H1299	RPMI 1640 (Invitrogen)	2mM L-glutamina 1% (v/v) (Gibco) Penicilina/Estreptomicina (100 µg/ml) (Gibco) Suero bovino fetal 10%
HMEC	MEBM (Clonetics)	MEGM (Clonetics)
HUVEC	EBM2 (Lonza)	EGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (Lonza)

Tabla 3: Medios de cultivo y suplementos empleados. Sumario de las líneas celulares empleadas durante los diferentes estudios realizados junto con los medios de cultivo y los suplementos requeridos para cada tipo de cultivo.

Reactivo	Concentración final	Función	Tiempo	Casa comercial
17-β- Estradiol	10 nM	Agonista del receptor de estrógenos	8-24h	Sigma-Aldrich
4- Hidroxi-tamoxifeno	10 μM	Antagonista parcial del receptor de estrógenos	8-24h	Sigma-Aldrich
Brefeldina A	100 ng/ml	Inhibe transporte del retículo endoplásmico al Golgi y la secreción proteínas / Induce Apoptosis por estrés en retículo endoplásmico	6h	Sigma-Aldrich
Cicloheximida	10 μg/ml	Inhibe síntesis de proteínas	1-5h	Sigma-Aldrich
Doxiciclina	10 μg/ml	Inducción del sistema TetOn	48-96h	Sigma-Aldrich
Estaurosporina	1 μM	Inducción de apoptosis	6h	Sigma-Aldrich
G-418	700 / 100 μg/ml	Antibiótico derivado de neomicina usado en la selección de clones estables resistentes a G-418	Permanente	Sigma-Aldrich
Higromicina B	500 / 100 μg/ml	Antibiótico usado en la selección de clones estables resistentes a Higromicina B	Permanente	Sigma-Aldrich
ICI-182780	1 μM	Antagonista puro del receptor de estrógenos	8-24h	AstraZeneca Pharmaceuticals
MG132	20 μM	Inhibidor del proteasoma	1-5h	Biomol
Nocodazol	150 ng/ml	Bloquea células en la entrada de mitosis	17h (Tras 24h sin FBS)	Sigma-Aldrich
TNFα	50 ng/ml	Citoquina proinflamatoria inductora de apoptosis en presencia de cicloheximida	3.5h	Sigma-Aldrich

Tabla 4: Reactivos empleados. Sumario de los reactivos empleados en los diferentes estudios realizados. También se indica la concentración y el tiempo a la que fueron empleados así como su función y la casa comercial de procedencia.

2- Cultivo y transformación de bacterias

Para la producción de plásmidos recombinantes se emplearon cepas bacterianas de *Escherichia coli* DH5 α . Estas bacterias se crecieron en medio Luria Bertani (LB) (Sigma) a 37°C en agitación, para un crecimiento exponencial, o en placas de LB con 20% agar (p/v) para obtener colonias. Para la selección de clones y su mantenimiento se emplearon los antibióticos ampicilina 100 μ g/ml o kanamicina 50 μ g/ml, según el marcador de selección del plásmido con el que se transformó cada línea bacteriana.

La generación de las células competentes se hizo siguiendo el protocolo de Inoue y colaboradores de 1990. Para ello se sembraron células *E. coli* DH5 α en una placa de cultivo con medio LB que se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se pasaron 2-3 colonias independientes a 4 mL de medio de cultivo SOB (Sigma) sin antibiótico y se dejaron a 37°C durante otra noche. A la mañana siguiente se traspasó el cultivo a 250 mL de medio SOB fresco en frascos de cultivo de 2 L. Al día siguiente se midió periódicamente la densidad óptica (OD₆₀₀) de los cultivos empleando medio SOB fresco como blanco. Cuando la OD₆₀₀ de los cultivos alcanzó 0.6-0.8, los frascos de cultivo se colocaron en hielo durante 10 minutos. A continuación los cultivos se transvasaron a frascos de centrifuga y se centrifugaron a 2500 x g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 80 mL de tampón TB frío (10 mM

PIPES Na; 15mM CaCl₂; 250 mM KCl; 55 mM MnCl₂) y se dejó 10 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo se volvió a centrifugar a 2500 x g durante 10 minutos a 4°C. Luego el precipitado se resuspendió nuevamente en 20 mL de tampón TB frío al que se le añadió DMSO hasta una concentración final del 7 %, se dejó 10 minutos en hielo y se repartió toda la resuspensión bacteriana en alícuotas de 200-300 µL en tubos eppendorff estériles. Finalmente, las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido durante una noche y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la transformación bacteriana se añadió 10 ng de DNA de plásmidos recombinantes a 100 µl de células competentes. Sin embargo, si el plásmido recombinante procedía directamente de una reacción de ligación, a los 100 µl de células competentes se les añadieron 2 µL de los 10 µL de la reacción. La entrada del plásmido recombinante en las bacterias se indujo mediante choque térmico manteniendo la suspensión 30 minutos en hielo seguidos de 45 segundos a 42°C y dos minutos más en hielo. A continuación se añadió 1 ml de LB y se incubó la suspensión celular durante 1 h a 37°C. Seguidamente, se extendieron 100 µl de la suspensión en una placa de LB con agar y el antibiótico de selección, incubándose 16 h a 37°C para obtener las colonias transformadas. En el caso de transformaciones procedentes de una ligación, el mL de suspensión bacteriana se centrifugó brevemente, se resuspendió en unos 100 µL de LB y se extendió todo en una placa como se ha descrito anteriormente. Todo este

procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad. Finalmente, para comprobar que la transformación había tenido éxito se seleccionaron varios clones y se hizo una PCR con oligonucleótidos específicos para el inserto introducido. En el caso de plásmidos a cuyo inserto le hubiéramos introducido una mutación dirigida, se seleccionaron 2 ó 3 colonias para aislar sus plásmidos y secuenciar independientemente cada uno de ellos.

Con el fin de obtener grandes cantidades del plásmido recombinante se hizo crecer una colonia transformada en LB y se hicieron minipreps o maxipreps con los kits *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega) y *JETstar Plasmid Purification Maxikit/20* (Genomed), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3- Sobreexpresión y silenciamiento de genes

3.1- Transfecciones transitorias y estables

La sobreexpresión de los genes de interés subclonados en vectores de expresión convencionales se realizó mediante diferentes transfecciones según el tipo celular y siguiendo las indicaciones del fabricante en cada caso. La eficiencia de la expresión del vector se comprobó mediante inmunotransferencia 48 h después de la transfección.

Línea celular	Método de transfección
COS-1	Fugene HD (Roche)
HeLa, MCF-7	Lipofectamina 2000 o Lipofectamina LTX (Invitrogen)

Tabla 5: Métodos de transfección empleados en las diferentes líneas celulares.

Las células MCF-7 del sistema TetOn (Clontech) se obtuvieron transfectando en primer lugar el vector pTetOn y seleccionando clones estables con G418 (700 µg/mL). Seguidamente se transfectó el vector pTRE2hyg DRO1-Flag y se seleccionaron clones estables con higromicina (500µg/mL). Los clones doblemente estables se mantuvieron con 100 µg/mL de G418 e higromicina para que no perdieran la expresión de los vectores. Uno de estos clones resultó expresar DRO1-Flag de manera inducible al añadir doxiciclina al medio de cultivo.

3.2- Infecciones adenovíricas

Las células HMEC se infectaron con adenovirus Ad5 para expresar AIB1 humano o GFP como control. Para ello se añadió al cultivo 40 MOI de adenovirus (40 partículas víricas por célula). Transcurridas 48 h desde la infección se cuantificaron los niveles de expresión de proteínas y mRNA según los

protocolos explicados más adelante. Los adenovirus se generaron en el servicio del Centro de Biotecnología Animal i Terapia Génica de la Universidad Autónoma de Barcelona.

3.3- Silenciamiento mediante siRNA

DRO1 y AIB1 se silenciaron con diferentes secuencias de siRNA de Invitrogen (HSS135766, HSS135767 y HSS136768 para DRO1 y HSS188686 y HSS112044 para AIB1). Estos siRNA son Stealth Select RNAi siRNA (RNAi = RNA interferencia; siRNA = *short/small interfering RNA*) formados por duplos de RNA de 25 nucleótidos que han sido químicamente modificados para hacerlos más estables. Para el silenciamiento de los genes se sembraron 200.000 células por pocillo en placas de seis pocillos y se dejaron crecer durante toda la noche. Al día siguiente se transfectaron con 40nM de siRNA y lipofectamina 2000 siguiendo las indicaciones del fabricante. La eficacia del silenciamiento se comprobó a las 48 h por inmunotransferencia o por qPCR.

4- Técnicas de biología molecular

4.1- Técnicas con DNA

4.1.1- Extracción de DNA

Los diferentes plásmidos recombinantes empleados durante los experimentos se obtuvieron a partir de cultivos de la cepa DH5 α de *E. coli* transformadas con dichos vectores. Con el fin de obtener plásmido recombinante se creció la bacteria en LB y se hicieron minipreps o maxipreps con los kits *Wizard Plus SV Minipreps* (Promega) o *JETstar Plasmid Purification Maxikit/20* (Genomed), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los distintos plásmidos se resuspendieron en Tris-HCl 20mM pH 7.5, se cuantificaron en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) y se almacenaron a -20°C.

4.1.2- Clonaciones

El promotor de DRO1 se amplificó a partir del DNA genómico de células U2OS mediante PCR convencional. Los fragmentos más pequeños del promotor se generaron a partir del clon original. Para la PCR se empleó la DNA polimerasa Pwo (Roche) en 25 μ L de agua con 0.5 μ g DNA, 0.2 mM dNTPs (Roche) y 0.5 μ M de los oligonucleótidos específicos para las

diferentes zonas del gen (Tabla 6). El gen DRO1 se amplificó del RNA de células U2OS mediante RT-PCR con los oligonucleótidos indicados en la Tabla 6. Los fragmentos amplificados se resolvieron en gel de agarosa y se purificaron con *QUIAEX II gel extraction kit* (Qiagen). Los fragmentos purificados se clonaron en el vector correspondiente tras digerir el vector y los insertos con las enzimas de restricción adecuadas (New England Biolabs), y ligándolos con la enzima DNA ligasa T4 (New England Biolabs). En la ligación se empleó una relación molar plásmido:inserto de 1:3, excepto en los casos en los que dicho inserto tenía un tamaño similar al del plásmido, en cuyo caso se empleó una proporción 1:6.

Finalmente, se transformaron bacterias competentes con cada uno de las ligaciones, se aislaron clones y se verificó la inserción de los distintos fragmentos en el vector. Se comprobó que los fragmentos de DNA estaban correctamente insertados mediante digestión con enzimas de restricción y también por secuenciación.

Plásmido	Inserto	Oligonucleótidos	Sitios de restricción
pGL3basic	DRO1 (-4813/-2134)	Fw:5'CTACAAGGTTTCCCA GCAA3' Rv:5'GGGCTTCAGAAAATC CTCCT3'	KpnI y NheI
pGL3basic	DRO1 (-2094/-1)	Fw:5'AAGCCCCACTTTGCCA GTGT3' Rv:5'GAGTGAGAAGGCTGT TCTTTG3'	NheI y BglII
pGL3basic	DRO1 (+5/+1829)	Fw:5'CTGAGTCCACTCTGAA CGTGCT3' Rv:5'TTCTCACCTTGCCTCC TTCT3'	BglII y HindIII
pGL3basic	DRO1 (-4813/-3795)	Fw:5'CTACAAGGTTTCCCA GCAA3' Rv:5'GCGCGCTAGCTTCTC TTATGTCAGGTGCTGA3'	KpnI y NheI
pGL3basic	DRO1 (-3794/-2745)	Fw:5'GGCCGGTACCCATTA CAGAAATTGGCTTTGG3' Rv:5'GCGCGCTAGCTTGGTT CTCTGCACAAAG3'	KpnI y NheI
pGL3basic	DRO1 (-2744/-2134)	Fw:5'GGCCGGTACCCGGCA TGTGACAGAAACCC3' Rv:5'GGGCTTCAGAAAATC CTCCT3'	KpnI y NheI
pcDNA3.1-	DRO1-Flag	Fw:5'GCGCCTCGAGATGAC ATGGAGAATGGGACCC3' Rv:5'GCGGAATTCTCACTT <u>GTCGTCATCGTCCTGTAG</u> <u>TCGTAAGGGTATCCATG3'</u>	XhoI y EcoRI
pFlagCMV2	DRO1-Flag	(Subclonado a partir de digestión de pcDNA3.1-DRO1-Flag)	XhoI/SalI y EcoRI
pTRE2hyg	DRO1-Flag	(Subclonado a partir de digestión de pFlagCMV2-DRO1-Flag)	BamHI y NotI
pFastBacHis HTb	DO1-Flag	(A partir de digestión de pBlueBacHis2A con DRO1-Flag insertado como XhoI/EcoRI)	BamHI/BglII y SalI

Tabla 6: Construcciones de plásmidos empleados. Secuencias de oligonucleótidos y sitios de restricción empleados para generar las diferentes construcciones empleadas. También se muestran los oligonucleótidos empleados para amplificar la secuencia de interés del DNA genómico y clonarlo en el plásmido de interés. (Bases subrayadas: secuencia de Flag)

4.1.3- Mutagénesis dirigida

La mutación de pares de bases específicas se llevó a cabo mediante el empleo del *QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit* de Stratagene siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos empleados para la mutación de la serina 728 de AIB1 a alanina y a ácido glutámico (S278A y S728E) fueron 5'GTCAAGCAGGAGCAGCTAGCTCCTAAGAA GAAGGAGAAT3' y 5'GTCAAGCAGGAGCAGCTAGAACCTA AGAAGAAGGAGAAT3' respectivamente. En la reacción de mutagénesis dirigida se emplearon también los oligos complementarios respectivos para cada caso. Tras la mutación el plásmido se amplificó en bacterias competentes DH5 α y se comprobó la presencia de la mutación deseada mediante secuenciación.

4.1.4- Visualización del DNA y secuenciación

Visualización del DNA en geles de agarosa: los fragmentos de DNA se resolvieron en geles de agarosa al 0.8% para tamaños mayores de 1kb y al 2% para fragmentos mayores de 1kb. La agarosa se disolvió por ebullición en tampón TAE (Tris-HCl 40mM pH 7.6, ácido acético 30 mM y EDTA 1mM) y 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio (Invitrogen). En los pocillos del gel se cargó el DNA resuspendido en tampón de carga (*Blue/Orange 6x loading dye*, Promega). La electroforesis se

realizó en tampón TAE a voltaje constante de 80 V. Se tomaron como referencia de tamaño molecular los marcadores de DNA Lambda/HindIII (Invitrogen) para los rangos de entre 125-23130 pb y PhiX 174/Hae para rangos entre 72-1353 pb. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se visualizó en una lámpara de luz UV de BioRad, comprobándose que el tamaño del DNA era el esperado.

Secuenciación: con el fin de asegurarnos que en la secuencia de los productos amplificados por PCR no se había introducido ninguna mutación, las muestras se secuenciaron en un secuenciador de capilares de tipo ABI3730xl de Applied Biosystems en el servicio de secuenciación del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

4.2- Técnicas con RNA

4.2.1- Extracción de RNA

El RNA empleado en las qPCR se extrajo de cultivos celulares utilizando TRIzol® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El precipitado de RNA obtenido se lavó con alcohol al 70%, se resuspendió en 100 µL de tampón para DNasa y se incubó 30 minutos a 37°C con 20 unidades de DNasa (Takara) para digerir los restos de DNA que contuviera la muestra. Finalmente, el RNA se purificó mediante el sistema RNeasy (Qiagen), y se cuantificó en el espectrofotómetro

NanoDrop (Thermo Scientific), almacenándose a -80°C hasta el momento de su uso.

4.2.2- RT-PCR y qRT-PCR

Las reacciones de transcripción inversa (RT) se realizaron partiendo de 1µg de RNA total, 1 µL de dNTPs 10mM, 0.5 µL de hexámeros nucleotídicos aleatorios 50 ng/µL y agua libre de DNAsas y RNAsas hasta 10 µL. La síntesis del cDNA se realizó empleando el *SuperScript First-Strand Synthesis System* (Invitrogen) en un termociclador eppendorf . Los cDNAs obtenidos se almacenaron a -80°C para su posterior análisis o clonación en el vector deseado.

Los experimentos de PCR a tiempo real se hicieron con el cDNA procedente de 50ng de RNA por cada reacción y *SYBR green supermix 2x* (Bio-Rad). Cada muestra se amplificó por triplicado en un termociclador Opticon de Bio-Rad con 300 nM de oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 7), y la expresión relativa de cada gen se calculó con el programa *MJ Opticon Monitor* de Bio-Rad con GAPDH como control interno.

En el caso de las qRT-PCR de las colecciones de genes de SABiosciences (Qiagen) se emplearon únicamente los productos del kit y se realizó todo según el protocolo RT2 Profiler PCR Array System.

Gen	Oligonucleótidos
AIB1	5' GGCCAGTGATTACGAAAACG 3' 5' ACTTCCTGCTCCCGTCTCC 3'
DRO1	5' TATGTGCAACAACGTGATGA 3' 5' AAGTGGTTCGATTTTCATGGT 3'
GAPDH	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3" 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'

Tabla 7: Oligos empleados para la amplificación de los diferentes genes mediante qPCR

4.2.3- *GeneChip*[®]

Para la determinación del perfil de expresión génica en cultivos primarios epiteliales de mamas de ratones silvestres y AIB1-tg se empleó el *GeneChip*[®] MG U74Av2 de Affymetrix. Como muestras de estudio empleamos mRNA extraído de cuatro ratones silvestres y cuatro AIB1-tg. Con este mRNA sintetizamos el cDNA que se hibridó con los oligonucleótidos del sistema *GeneChip*[®].

Los resultados obtenidos se normalizaron empleando un algoritmo basado en la normalización por cuantiles, el RMA (*Robust Multiarray Analysis*). Por otra parte, la expresión de cada gen se calculó por el método Irizarry incluido también en el paquete RMA. Por último, el cálculo de la expresión diferencial significativa de los genes en la muestras silvestres y AIB1-tg se calcularon por el método SAM (*Significance análisis of Microarrays*), basado en permutaciones aleatorias, y mediante

el cálculo de significación estadística basado en FDR (*False Discovery Rate*). Estos análisis fueron realizados por el Dr. Javier de las Rivas del grupo de Bioinformática y Genómica Funcional del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.

4.3- Técnicas con proteínas

4.3.1- Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó mediante la lisis celular en medio hipertónico con el tampón comercial *10x Cell Lysis* (Cell Signaling) suplementado con NaF 1mM, hasta 150mM de NaCl, AEBSF (Roche) 1mM y un complejo inhibidor de proteasas (Roche). Las células se resuspendieron en dicho tampón, se dejaron en hielo y se agitaron 15 segundos con vórtex cada 3 minutos durante 15 minutos. A continuación se centrifugó la suspensión a 16000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el precipitado y se obtuvieron los extractos de proteínas en el sobrenadante. Seguidamente se cuantificó la cantidad de proteína presente en cada lisado. Las cuantificaciones se realizaron por métodos fotométricos a una longitud de onda de 595 nm empleando la técnica de Bradford (Bio-Rad). Como blanco se empleó el tampón de lisis en el cual se encontraba la suspensión proteica. La concentración proteica fue determinada mediante extrapolación de los valores de absorbancia obtenidos por las muestras frente a los valores de

una recta patrón con concentraciones conocidas de albúmina del suero bovino (BSA, Sigma).

4.3.2- Fraccionamiento subcelular

En las ocasiones indicadas la extracción proteica se realizó de manera diferente a la explicada anteriormente con el fin de obtener extractos proteicos de fracciones subcelulares específicas. El fraccionamiento citosol/mitocondrias nos permitió obtener extractos proteicos de la fracción citosólica y de una fracción enriquecida en mitocondrias. Para ello, los cultivos celulares se despegaron previamente de la placa de cultivo con tripsina, se lavaron con PBS (Tampón con sales de fosfato) (NaCl 8 g/L; KCl 0.2 g/L; Na₂HPO₄ 1.44 g/L; H₂PO₄ 0.24 g/L; pH 7.4) frío y se resuspendieron con 200 µL de tampón de lisis A (sacarosa 250 mM; HEPES KOH, pH 7.4, 20 mM; KCl 10 mM; EGTA 1.5 mM; MgCl₂ 1 mM; DTT 1 mM; H₂O) durante 20 minutos. A continuación se traspasó la suspensión celular a un homogenizador externamente incluido en hielo y se agitó hasta que observó la pérdida de birrefringencia de las membranas celulares en el microscopio. Seguidamente se centrifugó la suspensión a 800 x g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el precipitado conteniendo núcleos celulares, orgánulos de gran tamaño y células intactas. Sin embargo, el sobrenadante obtenido se ultracentrifugó a 24000 x g durante 15 minutos a 4°C. El nuevo sobrenadante obtenido se

almacenó como fracción citosólica mientras que el precipitado, conteniendo las mitocondrias, se resuspendió en tampón de lisis B (HEPES KOH, pH 7.4, 50 mM; NP-40 1%; glicerol 10%; EDTA 1 mM; DTT 2 mM; H₂O) durante 20 minutos y posteriormente se ultracentrifugó a 24000 x g durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, el sobrenadante se almacenó como fracción mitocondrial.

En el caso del fraccionamiento “fracción insoluble nuclear/ fracción soluble citosólica” se siguió un protocolo adaptado del descrito por Muchardt et al. 1996. Para ello, los cultivos celulares en placas de 10 cm de diámetro con PBS frío y, a continuación, se les añadió 300 µL de tampón de lisis A (KCl 60 mM; NaCl 15 mM; MgCl₂ 5 mM; EGTA 0.1 mM; Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM; DTT 0.5 mM; sacarosa 300 mM; NP-40 0.3%; H₂O) y se incubó en hielo durante 3 minutos. Luego se despegaron las células ayudándose de una espátula y se transfirió la suspensión a un tubo eppendorf para ser centrifugado a 16000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante aislado se almacenó como fracción soluble citosólica mientras que el precipitado se resuspendió en el tampón de lisis empleado para lisados celulares totales y se sometió al mismo procedimiento que para éstos. El extracto obtenido se identificó como fracción insoluble nuclear. Finalmente, se cuantificó la cantidad de proteína en cada fracción mediante la técnica de Bradford.

4.3.3- Inmunotransferencia de proteínas

Tras determinar la concentración de proteínas de los lisados, se hirvieron en solución desnaturizadora de Laemmli (50mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol y 0.0625% de azul de bromofenol). La suspensión proteica desnaturizada fue almacenada a -20°C hasta su uso en caso de que no fuera a ser resuelta inmediatamente por electroforesis. A continuación, se cargó una cantidad conocida de proteína (30-50 μg) en geles desnaturizantes de porcentaje variable de poliacrilamida según el tamaño molecular de las proteínas a detectar (12.5% para proteínas de 10-70 kDa o 7.5% para proteínas de 50-200kDa). La electroforesis en vertical se realizó en tampón SDS-PAGE (Tris 25mM, glicina 192mM y SDS 1.7mM) a un voltaje constante de 100V durante el empaquetamiento y a 150V durante la separación de las proteínas.

Las proteínas resueltas en el gel se transfirieron a membrana de PVDF (Millipore) previamente activada en metanol durante 2-3 minutos. La transferencia se realizó en Tris-HCl 25mM, glicina 19mM y metanol al 20%, a 200mA durante 16 horas. Tras la transferencia, la membrana se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) al 5% en T-TBS (Tris 25mM, NaCl 50mM, KCl 2.5mM, Tween 20 al 0.1%) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se incubó secuencialmente con los anticuerpos

primarios en BSA al 3% a 4°C, durante toda la noche, y con los secundarios unidos a peroxidada durante 1 h a temperatura ambiente. Entre ambas incubaciones la membrana se lavó 4 veces con T-TBS durante 5 minutos cada vez. Finalmente, las proteínas se detectaron por la emisión de luz producida por la actividad peroxidasa tras la adición del sustrato ECL (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Thermo Scientific), seguida de la exposición de una película fotográfica sobre la membrana.

4.3.4- Inmunofluorescencia

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal previamente esterilizados con etanol e introducidos en la placa de cultivo. Tras los tratamientos oportunos de las células para cada experimento, los cristales con las células adheridas en su superficie se lavaron tres veces con PBS y las células se fijaron con metanol o con solución tamponada a pH 7.5 de formaldehído al 5%, según el anticuerpo a emplear. En los casos en los que se empleó el anticuerpo de conejo de elaboración propia, la fijación/permeabilización se realizó con metanol a -20°C durante 1 minuto. Por el contrario, cuando se empleó el anticuerpo de ratón monoclonal contra el epítipo Flag, las células se fijaron con formalina 10% (Sigma) durante 10 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1% durante otros 10 minutos. A continuación, se bloquearon con BSA 3% / HS (Suero de caballo) 2% en PBS durante 1 h. Luego se

incubaron con el anticuerpo primario en PBS durante toda la noche a 4°C y seguidamente con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente. Tras cada incubación con anticuerpo se hicieron tres lavados con PBS. Finalmente, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (1µg/mL) durante 5 minutos, se lavaron de nuevo tres veces con PBS y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia (DakoCytomation).

En los estudios de localización subcelular de DRO1 se empleó el sistema de *Organelle lights* (Invitrogen) para producir fluorescencia en los siguientes orgánulos celulares: mitocondria, endosomas, peroxisomas, membrana nuclear, retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Las células se infectaron durante 4 h con cada uno de los diferentes virus de expresión de GFP fusionados a los péptidos señal específicos de cada orgánulo. Seguidamente, se dejaron toda la noche para permitir la expresión de la proteína fluorescente y al día siguiente se procedió a la fijación, permeabilización e incubación con el anticuerpo contra Flag. La fijación se realizó con formalina 10%, condición en que GFP no pierde su capacidad de fluorescencia.

4.3.5- Coimmunoprecipitación de complejos

Para comprobar la interacción de DRO1 con el factor de transcripción PLZF se lisaron células MCF7-TetOn-DRO1-Flag previamente tratadas con doxiciclina (10µg/mL) durante 48 h para inducir la expresión de DRO1-Flag. Se inmunoprecipitaron 500µg de proteína total con 0.5µg de anticuerpo monoclonal de ratón contra Flag a 4°C en rotación durante toda la noche. Seguidamente, se añadió 30µL de proteína G sefarosa y se incubó 1h a 4°C en rotación para facilitar la unión de las inmunoglobulinas (anticuerpo contra Flag). Los inmunocomplejos se recuperaron mediante centrifugación a 16000 x g durante 15 segundos. El precipitado se lavó dos veces con tampón de lisis, una con LiCl 0.5M en PBS y finalmente con tampón de lisis. El complejo proteico se desnaturalizó hirviendo con Laemmli y se analizó por inmunotransferencia con anticuerpos contra PLZF.

4.3.6- Transcripción/traducción de proteínas *in vitro*.

Para la síntesis de la proteína ERα *in vitro* se empleó el sistema de transcripción/traducción *T_NT*[®] *T7 Quick for PCR DNA* (Promega). La mezcla de la reacción contenía 20 µL de *T_NT*[®] *T7 Quick Master Mix*, 1 µL de metionina 1 mM, 1 µg de plásmido recombinante con la secuencia de ERα y agua libre de

nucleasas hasta un volumen final de 25 μ L. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 90 minutos. Como control se realizó otra reacción con un vector vacío, carente de ER α . La correcta síntesis de la proteína ER α se comprobó mediante una inmunotransferencia con un anticuerpo específico contra ER α .

4.3.7- Síntesis de proteínas fusionadas a GST

La introducción en fase de la secuencia génica de una proteína en el vector pGEX conduce a la expresión de una proteína fusionada con la enzima glutatión-S-transferasa (GST). Puesto que la proteína GST tiene gran afinidad por glutatión, el glutatión unido a sefarosa nos permite la purificación de esta proteína híbrida recogiendo en el precipitado de sefarosa tras una breve centrifugación. Las células competentes BL21 DE3 transformadas con cada una de las construcciones del vector pGEX se crecieron durante toda la noche en 20 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL). A la mañana siguiente se añadieron 200 mL de LBA fresco con ampicilina y se mantuvieron creciendo a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.8-1.0. La expresión de la proteína se indujo con IPTG 0.4 mM. Tras 2-4 horas se centrifugó a 5000 x g durante 5 minutos y el precipitado bacteriano se resuspendió con 5.5 mL de tampón de resuspensión por cada litro de cultivo (25 mL de PBS, 1 mM AEBSF y 10 mM DTT) a 4°C. Seguidamente, la suspensión fue sometida a ultrasonidos 5 veces durante 30

segundos cada vez a máxima amplitud. Luego se añadió Tritón X-100 al 1%, se agitó y se centrifugó a 10000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante conteniendo la proteína de interés se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL y se incubó en rotación con 100 µL de glutatión-sefarosa al 50% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 30 segundos y se lavó 3 veces con PBS. Finalmente se almacenó el precipitado formado por la resina glutatión-sefarosa unida a la proteína fusionada a GST.

4.3.8- Ensayos de interacción proteica (ensayos *pull-down*)

Se añadieron a lisados celulares las proteínas fusionadas a GST y unidas a sefarosa (10 µL proteína fusionada a GST en 500 µL lisado) y se incubaron durante 1h a 4°C en agitación por rotación. A continuación, se centrifugó a 16000 x g durante 30 segundos para precipitar la resina de glutatión-sefarosa unida a la proteína fusionada a GST. La centrifugación de la proteína fusionada a GST arrastra consigo las proteínas que se encuentran en interacción con ella, concentrándolas en el precipitado. El precipitado se lavó dos veces con PBS seguidos de un tercer lavado con LiCl 0.5M en PBS. La purificación de las proteínas se comprobó en geles desnaturalizantes de

poliacrilamida teñidos con Coomassie y la presencia de la proteína híbrida se confirmó por inmunotransferencia.

4.3.9- Estudios de secreción de proteínas

Células MCF7-TetOn-DRO1-Flag y MCF7-TetOn fueron sembradas en placas de 10 cm en un total de 1.500.000 células/placa. A continuación, se dejaron crecer las células durante 4 y 7 días en presencia de doxíciclina. Un día antes de la recogida de las muestras se lavaron las células con PBS y se cambió el medio de cultivo por otro sin FBS pero conteniendo el cóctel inhibidor de proteasas (Roche). Más tarde, se recogieron los medios de cultivo resultantes, se centrifugaron 5 minutos a 200 x g y se descartó el precipitado de células y residuos celulares. En último lugar, se procedió a la concentración del medio empleando el sistema de concentración de proteínas *Centricón-30* (Amicon) siguiendo las indicaciones del fabricante. Con la centrifugación, el disolvente y las moléculas superiores a 30 KDa pasan a través de la membrana a un colector inferior, concentrándose en la parte superior todas las moléculas superiores a 30 KDa. Del concentrado proteico obtenido cargamos una séptima parte del total en un gel de acrilamida para observar mediante inmunotransferencia la presencia de DRO1 secretado al medio de cultivo. En el caso de los cultivos primarios de grasa subcutánea de ratón, no fue necesaria la concentración del medio de cultivo debido a la alta

concentración de DRO1 secretado, analizándose en este caso directamente por inmunotransferencia con 30 μ L del medio.

4.3.10- Anticuerpos empleados

Los anticuerpos empleados durante la experimentación fueron:

Antígeno	Animal de procedencia	Dilución para WB	PM banda WB (kDa)	Dilución para IF	Casa comercial
AIB1	Ratón	1/1000	160	1/50	BD Trasduction Laboratories
β -actina	Ratón	1/10000	42	1/200	Sigma-Aldrich
β -catenina	Conejo	1/1000	92	1/100	Cell Signaling (9562)
β -tubulina	Ratón	1/2000	55	1/100	Santa Cruz Biotech
DRO1	Conejo	1/2000	110-150	1/200	Producción propia
E-cadherina	Ratón	1/2000	120	1/50	BD Trasduction Laboratories (610181)
Flag	Ratón	1/1000	Depende proteína fusion	1/250	Sigma (F 1804)
ICAM-1	Conejo	1/500	85-110	--	Santa Cruz (sc-7891)
IGF-I-R β	Conejo	1/500	95	1/200	Cell Signaling (3027)
IGFBP-5	Ratón	1/500	31	--	R & D Systems (MAB578)

Tabla 8: Anticuerpos primarios

Conjugado	Antígeno (Ig)	Dilución	Casa comercial
Alexa Fluor 488	Conejo	1/2000	Molecular Probes (Invitrogen)
Alexa Fluor 633	Ratón	1/2000	Molecular Probes (Invitrogen)
CY3	Conejo	1/125	Jackson ImmunoResearch
CY3	Ratón	1/250	Jackson ImmunoResearch
FITC	Conejo	1/125	Jackson ImmunoResearch
FITC	Ratón	1/125	Jackson ImmunoResearch
Peroxidasa	Conejo	1/5.000	Dako (Z0113)
Peroxidasa	Ratón	1/5.000	Sigma (A9044)

Tabla 9: Anticuerpos secundarios

5- Determinación de apoptosis y del ciclo celular

5.1- Citometría de flujo

Tras el tratamiento realizado a las células en los diferentes experimentos, las células se despegaron de las placas de cultivo empleando Tripsina-EDTA durante 1 minuto y se lavaron con PBS centrifugando las células a 200 x g durante 5 minutos. A continuación, se pusieron 250.000 células en cada tubo de

citometría y se centrifugaron a 200 x g durante 5 minutos. Las células se fijaron en 1mL de etanol a -20°C añadido sobre el precipitado de células mientras se agitaban con el agitador vórtex. Las células fijadas se almacenaron durante al menos 16 h a -20°C. A continuación, se hicieron tres lavados con PBS tras el mismo número de centrifugaciones a 200 x g durante 5 minutos. Finalmente, las células fijadas se resuspendieron en 250µL de PBS con 50µg/µL de yoduro de propidio (que se une al DNA aportándole fluorescencia) y 1 ng/mL de RNasa (Roche) para degradar el RNA y evitar que el yoduro de propidio se uniese también al RNA. Esta suspensión se dejó toda la noche en agitación, a 4°C y en oscuridad hasta que se cuantificó en el citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Los resultados se analizaron con el programa WinMDI Version 2.8.

5.2- Ensayo TUNEL

La apoptosis también se cuantificó mediante ensayo TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*) empleando el *In Situ Cell Death Detection Kit, POD* (Roche). Para ello, se sembraron células MCF7-TetOn-DRO1-Flag, expresando y sin expresar DRO1, sobre cubreobjetos como en una inmunofluorescencia y se trataron durante 6 h con estaurosporina. A continuación se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y se lavaron tres veces con PBS. Luego se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% durante 10 minutos y

se lavaron de nuevo tres veces con PBS. Finalmente, se añadió la mezcla de la reacción TUNEL para proporcionar fluorescencia a las células apoptóticas. Estos cubreobjetos se montaron como una inmunofluorescencia normal y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia.

5.3- Ensayo de proliferación celular (XTT)

La proliferación celular se determinó mediante la adición de la sal de tetrazolio XTT a los cultivos celulares. El XTT posee un color amarillo que pasa a naranja (absorbancia a 450 nm) tras ser metabolizado a formazán. Puesto que este proceso ocurre exclusivamente en células viables, la intensidad del color naranja dependerá del número de células viables presentes en el cultivo. Se sembraron 10.000 células MCF7-DRO1-Flag y MCF7-TetOn por pocillo en placas de 96 pocillos con 100 µl de medio de cultivo conteniendo o no doxiciclina. A tiempos de 24, 48, 72 y 96 h se añadió a cada pocillo 50 µl de la mezcla XTT del *Cell Proliferation Kit II* (Roche). A continuación se dejó incubando el cultivo con el XTT durante 24 h en condiciones normales de cultivo. Tras la incubación, se midió la absorbancia a 450 nm en el lector de placas *VICTOR 2 V 1420 Multilabel HTS counter* (Wallac). Cada una de las condiciones se hizo por quintuplicado.

6- Medida de la actividad transcripcional: Ensayo de luciferasa

El promotor de DRO1 fue segmentado en diversos fragmentos (-4813/-2134; -4813/-3795; -3794/-2745; -2744/-2134 -2094/-1; +5/+1829) que fueron clonados en el vector pGL3 basic, regulando la expresión del gen de luciferasa. El día anterior a la transfección se sembraron 50.000 células COS1 por pocillo en placas de seis pocillos. Cada condición se repitió por sextuplicado con el fin de poder discriminar valores dispersos. Cada pocillo se transfectó con 30 ng pRL-TK para expresar renilla como control interno de la transfección, 500ng del vector pGL3 basic con o sin inserto, y 100ng de pcDNA3.1+AIB1 ó 56ng pcDNA3.1- como control negativo. Las células se crecieron durante 48 h y se midió la actividad luciferasa empleando el kit de *Renilla luciferase assay sistem* (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad de luz producida fue medida en un luminómetro (Berthold Detectin Systems).

7- Estudio de la migración transendotelial

El estudio de la capacidad de migración transendotelial (TEM) se hizo con un ensayo TEM adaptado de un protocolo para ensayos de procesos de extravasación (Ma & Wang 2008). En primer lugar se creció una monocapa de células HUVEC en

placas de cultivo con soportes permeables (cámaras *transwell*) de 8 μm de poro (Corning 3422). Para ello, se cubrió de Matrigel GFR (BD Biosciences) la membrana permeable. Una vez reconstituida la capa de Matrigel se sembraron 50.000 células HUVEC en cada cámara superior con 100 μL de medio EGM2 y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia. Para determinar cuándo llegaban a confluencia y asegurarnos de que la monocapa formada era continua, la cámara inferior fue rellenada con 600 μL de medio EGM2 y se añadieron a la cámara superior 4 μL de dextrano de alto peso molecular unido a FITC ($C_0 = 25 \text{ mg/mL}$) (Sigma FD40S). A continuación se recogieron cada 30 minutos 50 μL del medio de la cámara inferior y se midió la emisión de fluorescencia a 492/520 nm en el lector de placas *VICTOR 2 V 1420 Multilabel HTS counter* (Wallac). Estos 50 μL fueron repuestos en cada momento por medio EGM2 nuevo. La confluencia e integridad de la monocapa se estableció cuando tras dos mediciones consecutivas no se observaba ningún aumento de fluorescencia. Seguidamente, las células MCF7-TetOn y MCF7-DRO1 se marcaron con 5-(6)-carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester (CFSE) 5mM (CellTrace; Invitrogen C34554). Tras dicho paso, se sembraron 100.000 de las células marcadas con medio EGM2 en la cámara superior y se cambió el medio de la cámara inferior a medio DMEM que actúa como quimioatrayente para las células MCF7. Al cabo de 24 h se levantó con tripsina todas las células que habían pasado a la cámara inferior, que

posteriormente fueron cuantificadas en el *VICTOR 2 V 1420 Multilabel HTS counter* (Wallac) mediante la emisión de fluorescencia emitida a 488 nm por el CFSE.

RESULTADOS

1- DRO1 está reprimido por AIB1

Con el fin de observar cambios en la expresión de genes en ratones AIB1-tg (ratones transgénicos que sobreexpresan AIB1) se empleó la tecnología *GeneChip*[®] de Affymetrix. Se aisló mRNA de cultivos primarios epiteliales de mamas de 4 hembras silvestres y 4 AIB1-tg. A partir del mRNA extraído, se sintetizó cRNA y se hizo hibridar con los oligonucleótidos de los chips. La señal de todos los chips se normalizó utilizando el método RMA (Robust Multi-Array average) basado en la normalización por cuantiles. Seguidamente el cálculo de la expresión de cada gen se hizo según el método de Irizarry incluido también en el paquete RMA. Finalmente la comparación entre los distintos chips se hizo partiendo de la consideración de dos grupos, silvestre y AIB1-tg, y el cálculo de la expresión diferencial significativa de los genes se hizo por el método SAM (Análisis de significancia de microarrays) (Tusher et al. 2001) basado en permutaciones aleatorias y con cálculo de significación estadística basado en la tasa de descubrimiento falso (FDR). El análisis lo realizó el Dr. Javier de las Rivas, Jefe del Grupo de Bioinformática y Genómica Funcional del Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca).

En nuestro estudio se emplearon cultivos primarios de células del epitelio mamario de 4 ratones silvestres y 4 ratones AIB1-tg. Como resultado se obtuvieron diversos genes cuya

expresión se encontró significativamente modulada por AIB1. Entre estos genes se encuentra DRO1, cuya expresión está reprimida en las células de ratones AIB1-tg (Figura 4).

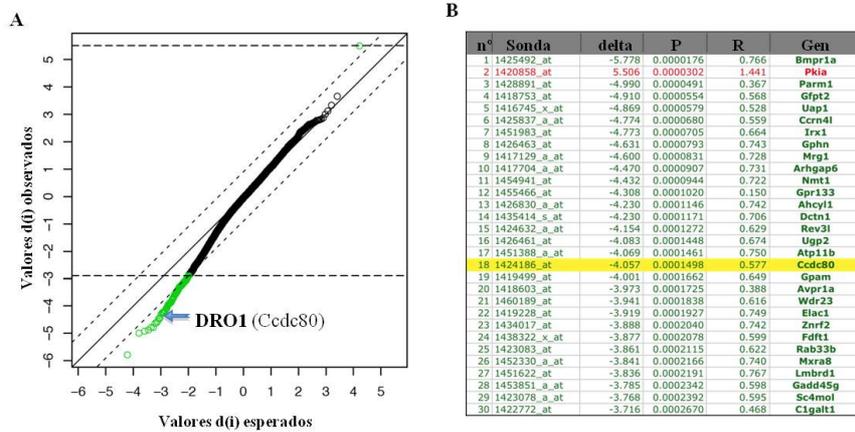


Figura 4: La expresión de DRO1 está disminuida en ratones AIB1-tg. A) Resultados del análisis de expresión diferencial obtenidos mediante el algoritmo SAM en células de epitelio mamario de ratón procedentes de 4 ratones silvestres frente 4 ratones AIB1-tg empleando oligonucleótidos de *microarrays* de *Affymetrix* (modelo MOE430A con 22690 sondas). El corte de genes significantes se estableció a $FDR < 0.10$. Esto dio lugar a 135 sondas que correspondían a 135 genes de ratón conocidos. B) Tabla con los 30 genes con mayor represión diferencial obtenidos por el algoritmo SAM en las condiciones descritas anteriormente. La tabla incluye: el parámetro estadístico delta calculado por SAM para detectar una regulación positiva (+) o negativa (-); los valores P de SAM correspondientes a cada gen; el incremento de R que corresponde con el incremento de la expresión en escala \log_2 . DRO1 (*Ccdc80*) es el número 18 de la lista.

Puesto que DRO1 había sido descrito como un supresor tumoral con características proapoptóticas, nos resultó interesante confirmar estos resultados. Para ello nos propusimos determinar si existía alguna variación en los niveles de DRO1 cuando modificábamos los niveles de AIB1. En este sentido, la sobreexpresión de AIB1 en cultivo primario humano de epitelio mamario (HMEC) disminuyó los niveles de mRNA de DRO1 (Figura 5A), confirmando el papel de AIB1 como regulador negativo de DRO1. Por el contrario, el silenciamiento de la expresión de AIB1 en células MCF-7 (células humanas de carcinoma mamario que sobreexpresan AIB1) da lugar a un aumento significativo en los niveles de DRO1 (Figura 5B), sugiriendo que DRO1 se reprime por AIB1 en células MCF-7. En paralelo se cuantificó la expresión de DRO1 en diferentes líneas celulares de cáncer y se comparó con la expresión de AIB1. A pesar de las grandes variaciones en la expresión de DRO1 entre las diferentes líneas celulares se observó que en muchas de ellas existía una correlación inversa entre los niveles de expresión de DRO1 y de AIB1 (Figura 5C) (Ferragud et al. 2011). Estos resultados sugieren que, al igual que en el modelo murino, AIB1 puede participar en la regulación negativa de DRO1 en líneas de cánceres humanos.

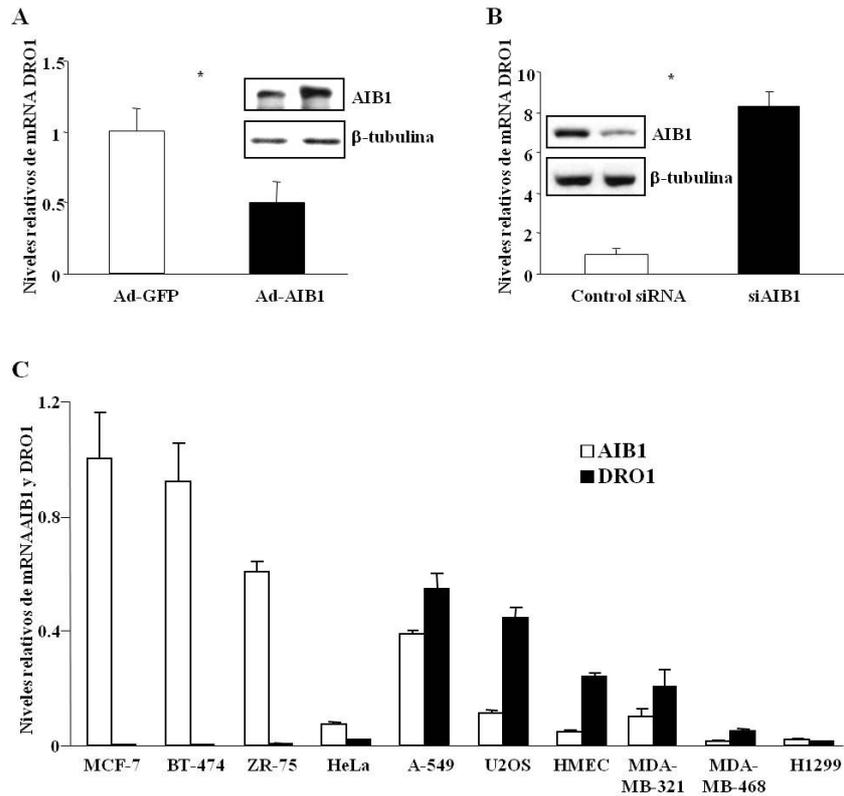


Figura 5: AIB1 regula negativamente los niveles de mRNA de DRO1. A) Células HMEC se infectaron con adenovirus de expresión de la proteína GFP (barras abiertas) o de AIB1 (barras negras) y 2 días después se determinaron los niveles relativos de mRNA de DRO1 mediante qRT-PCR. Los valores se normalizaron frente a los niveles de GAPDH. Las barras representan el valor medio de tres experimentos independientes \pm EE. $*p < 0.01$. B) Células MCF-7 se transfectaron con siRNA control (barras abiertas) o con siRNA AIB1 (barras negras). Dos días después se cuantificaron los niveles relativos de mRNA de DRO1. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm EE. Las inmunotransferencias insertadas en A) y B) muestran los niveles de AIB1 en cada momento. C) Las líneas celulares de cáncer humano indicadas y el cultivo primario no canceroso HMEC se crecieron en las condiciones estándar para cada caso. Los niveles de mRNA de DRO1 (barras negras) y de AIB1 (barras abiertas) se cuantificaron por qRT-PCR y se normalizaron frente a GAPDH de acuerdo con la ecuación de Pfaff's. Las barras representan los valores medios de cuatro experimentos independientes \pm EE.

2- DRO1 está reprimido por otros oncogenes y por estrógenos

La expresión de DRO1 se encuentra también disminuida tras la transformación neoplásica por β -catenina o K-Ras (Bommer et al. 2005). Con objeto de determinar si DRO1 puede ser reprimido por otros oncogenes transfectamos los oncogenes *v-H-ras*, *v-src* y HER2 en células U2OS. Como resultado de la expresión de estos oncogenes observamos que la expresión de DRO1 se encuentra disminuida en los tres casos, siendo muy significativa en el caso de *v-H-ras* (Figura 6A) (Ferragud et al. 2011).

Se ha observado que la expresión de DRO1 se encuentra disminuida en el útero de ratas ovariectomizadas tras el tratamiento con E2 (Marcantonio et al. 2001a), sugiriendo que la regulación de DRO1 también puede estar mediada por hormonas esteroideas. Además, también se ha examinado cómo los andrógenos reprimen la expresión de DRO1 en la próstata ventral de ratas castradas (Marcantonio et al. 2001b). Esto resulta particularmente interesante porque AIB1 juega un papel muy importante en la regulación de la expresión de genes diana de receptores esteroideos (Planas-Silva et al. 2001; Zhang et al. 2004), por lo que AIB1 podría estar regulando a DRO1 a través de receptores esteroideos. Consecuentemente, esta hipótesis nos llevó a profundizar en el papel que juegan los estrógenos en la regulación de DRO1. Para ello, células MCF-7 se privaron de

estrógenos durante una semana y seguidamente se trataron con el agonista de estrógenos 17- β -estradiol o con los antiestrógenos 4-hidroxitamoxifeno (tamoxifeno) o ICI182780 (Fulvestrant). El resultado de este estudio nos reveló que el tratamiento con 17- β -estradiol produjo una disminución de los niveles de mRNA de DRO1 a lo largo del tiempo, mientras que los antiestrógenos aumentaron los niveles de DRO1, notablemente mayores a las 24h (Figura 6B) (Ferragud et al. 2011). El análisis de la región promotora de DRO1 nos reveló la existencia de 14 secuencias incompletas del elemento de respuesta a estrógenos (ERE) (Figura 6C). Este dato sugiere que la regulación de la expresión de DRO1 mediada por estrógenos pudiera ser debida a una regulación en *cis* por el ER y que AIB1 pudiera estar actuando como correpresor en dicha regulación.

Figura 6: Represión de DRO1 por oncogenes y por estrógenos. A) Niveles relativos de mRNA de DRO1 determinados en células U2OS transfectadas con 500 ng de vector vacío como control o conteniendo los oncogenes *v-H-ras*, *v-src*, o HER2. Las barras representan los valores medios de cuatro experimentos independientes \pm EE. * $p= 0.016$. B) Células MCF-7 privadas de estrógenos durante una semana y posteriormente tratadas con 17- β -estradiol 10 nM, tamoxifeno 10 μ M e ICI182780 1 μ M. El RNA se obtuvo a los tiempos indicados tras los tratamientos y se determinaron los niveles de mRNA de DRO1 por qPCR. Los valores son las medias de 3 experimentos independientes \pm EE. Las inmunotransferencias insertadas representan los niveles de la proteína DRO1 en células MCF-7 tratadas con (+E2) o sin estradiol (-E2). C) Secuencia del promotor de DRO1 desde la base -5959 hasta la -1. En rojo las secuencias incompletas del ERE. (A: Adenina; C: Citosina; G: Guanina; T: Timina)

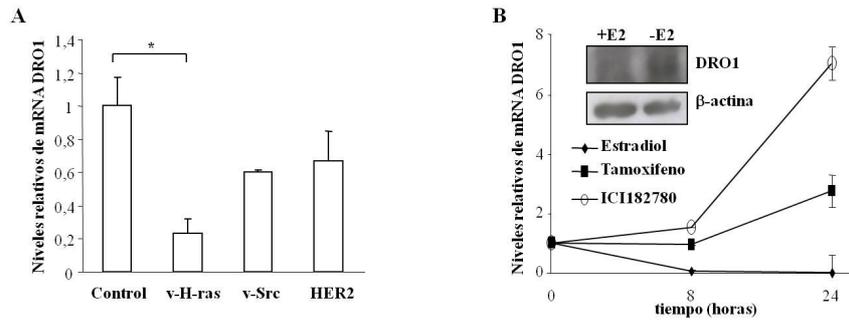


Figura 6: Represión de DRO1 por oncogenes y por estrógenos.

3- AIB1 reprime a DRO1 a nivel de promotor

Con el fin de profundizar en el estudio de la regulación de DRO1 y localizar sus elementos reguladores afectados por AIB1, clonamos diferentes regiones del promotor de DRO1 en un vector reportero de luciferasa. En un primer cribado clonamos el promotor en tres fragmentos grandes (entre 2000-3000 pares de bases cada uno) para acotar los elementos reguladores dependientes de AIB1. Estos tres fragmentos corresponden a una región del promotor distal del sitio de inicio de la transcripción (-4813/-2134), a una región proximal (-2094/-1) y a una región transcrita que contiene hasta parte del segundo exón (+5/+1829) (Figura 7A). A continuación estas construcciones se transfectaron solas o conjuntamente con AIB1 en células COS1 para cuantificar la actividad luciferasa como medida directa de la activación transcripcional dependiente de cada secuencia. Las regiones -2094/-1 y +5/+1829 mostraron un aumento de la actividad cuando eran cotransfectadas junto con AIB1 (Figura 7B), esto podría explicarse por la presencia de varios elementos de respuesta para factores de transcripción para los que AIB1 es también un coactivador, incluyendo varios sitios potenciales de unión para NFκB y Pax-2. Sin embargo, la región distal del promotor (-4813/-2134) mostró una disminución significativa de la actividad transcripcional al ser cotransfectada junto con AIB1, revelando que los elementos que regulan la represión de DRO1 por AIB1 se encuentran en esta

región. Tras esta primera aproximación, decidimos restringir aún más la región implicada en la represión de DRO1 por AIB1. Para ello, se clonaron tres nuevos fragmentos de menor tamaño (entre 600-1000 bases) que abarcaban la región distal del promotor (-4813/-3795, -3794/-2745 y -2744/-2134) (Figura 7A). Seguidamente se procedió del mismo modo que en el caso anterior, observando que el dominio regulado por AIB1 se encuentra en la región -4813/-3795 (Figura 7C). Además, con el fin de demostrar que esta regulación ocurre en diferentes líneas celulares realizamos un nuevo ensayo en células MCF-7, las cuales muestran elevados niveles de AIB1 pero muy bajos de DRO1. En este caso, el silenciamiento de AIB1 produce un aumento de la actividad luciferasa al transfectar la región -4813/-3795, mientras que permanece inalterada al transfectar las otras regiones (Figura 7D). Estos resultados confirman la represión de DRO1 por AIB1 y que lo hace a través del dominio -4813/-3795 (Ferragud et al. 2011).

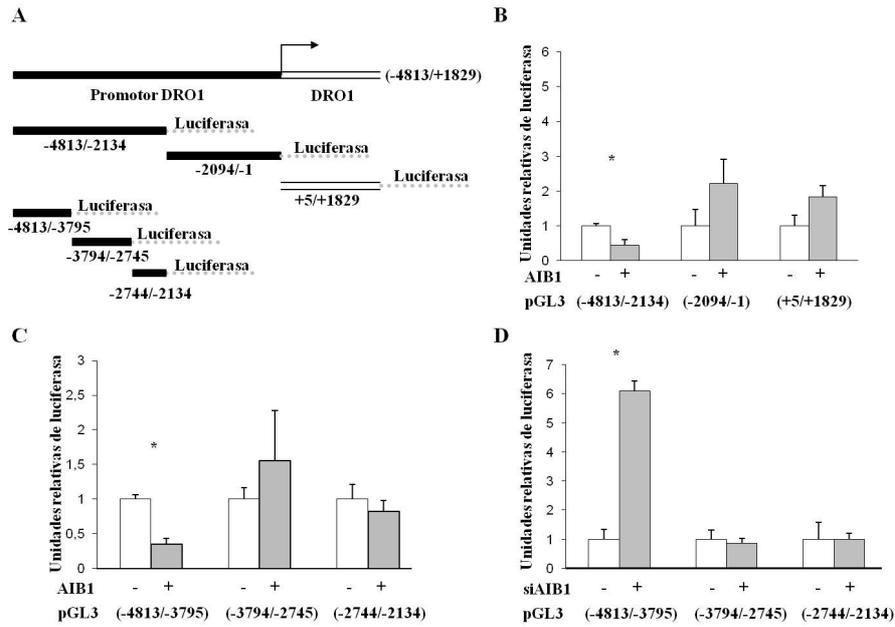


Figura 7: Regulación transcripcional del promotor de DRO1 por AIB1.

A) Representación esquemática del promotor de DRO1 y de las construcciones analizadas regulando la expresión de luciferasa como gen reportero. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. La barra negra representa la región promotora y la barra blanca corresponde al transcrito de DRO1, incluyendo el primer intrón y parte del segundo exón. B) Células COS1 se transflectaron con cada una de las regiones genómicas de DRO1 indicadas y con AIB1 o con el vector pCDNA3.1 vacío como control. Los valores representan los incrementos de actividad luciferasa con AIB1 (barras cerradas) respecto a la actividad sin AIB1 (barras abiertas). * $p = 0.02$. C) Los fragmentos del promotor distal se generaron por PCR y se analizaron de manera similar a B). Los valores representan los incrementos en la actividad luciferasa con AIB1 respecto a la actividad sin AIB1. * $p = 0.01$. D) Células MCF-7 se silenciaron con RNA de interferencia para AIB1 (+) o con RNAi control (-). Dos días después se determinó la actividad luciferasa como en B). Los valores representan los incrementos de actividad luciferasa silenciando AIB1 respecto al control con RNAi. * $p = 0.0001$.

4- Obtención de un sistema biológico para el estudio de DRO1

A la hora de abordar el estudio de los efectos producidos por la expresión de una proteína determinada a nivel celular es importante disponer de un sistema biológico idóneo para dicho estudio. Este sistema debe permitir evaluar los efectos biológicos debidos exclusivamente a la expresión de dicha proteína. Con este fin, nos propusimos obtener una línea celular de cáncer de mama humano que expresara DRO1 de forma inducible (Figura 8A). Escogimos la línea celular MCF-7 por tener niveles endógenos de expresión de DRO1 muy bajos. Para ello empleamos el sistema TetOn[®] (Clontech). Con éste método se obtuvieron diferentes clones celulares estables con sólo el vector pTetOn (células denominadas MCF-7-TetOn, empleadas como control del efecto de la doxíciclina en los siguientes experimentos), o con ambos vectores pTetOn y pTRE2hyg-DRO1-Flag (células denominadas MCF-7-TetOn-DRO1-Flag), que expresan DRO1-Flag de forma inducible por doxíciclina. De los diferentes clones de células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag obtenidos, el clon número 5 se seleccionó para estudios posteriores por mostrar mayor expresión de proteína DRO1-Flag tras la inducción con doxíciclina, pero expresión mínima en ausencia de ésta (Figura 8B). Estudios posteriores con dicho clon indicaron un aumento de seis veces en el mRNA de DRO1 tras la adición de doxíciclina al medio de cultivo (Figura 8C).

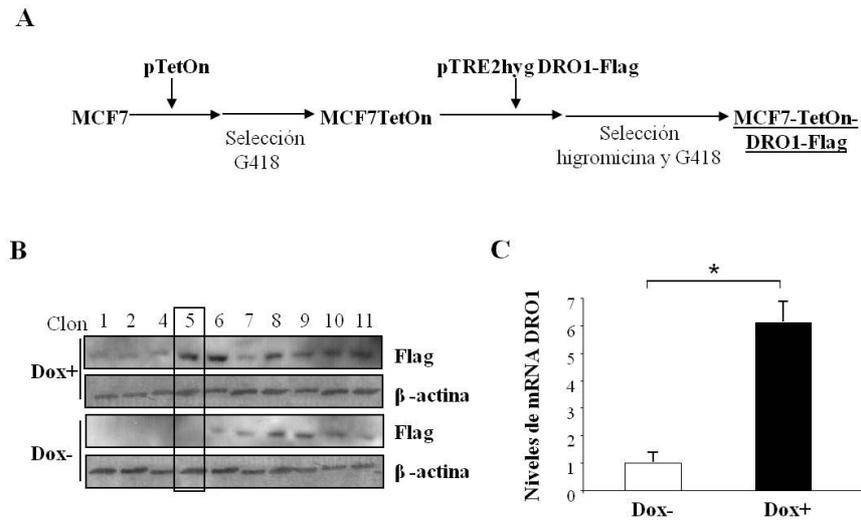


Figura 8: Obtención de un clon celular que expresa DRO1 de forma inducible. A) Representación esquemática del proceso para la generación de clones celulares que expresan DRO1 de forma inducible. B) Inmunotransferencias de lisados de los diferentes clones obtenidos. La expresión de DRO1 se detectó con anticuerpos contra Flag en muestras de células sin ser previamente inducidas con doxiciplina (dox-) o tras la inducción con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxiciplina durante 72h (dox+). La detección de β -actina se utilizó como control de carga. C) Representación gráfica del incremento de los niveles relativos de mRNA de DRO1 en el clon 5 al inducir su expresión con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxiciplina durante 72h (barra cerrada) con respecto a las células sin inducir (barra abierta). Los niveles de mRNA de DRO1 se cuantificaron mediante qRT-PCR y se normalizaron con los de GAPDH. Las barras representan el valor medio de tres experimentos independientes \pm EE. * $p < 0.05$.

5- Efecto de la expresión de DRO1 en cultivos celulares

Una vez generado un sistema biológico adecuado para estudiar la biología celular de DRO1, pudimos constatar cómo la inducción de la expresión de DRO1 daba lugar a cambios morfológicos en las células, así como a una ralentización de la ocupación de la placa de cultivo y al crecimiento en parches de los cultivos celulares. Como se puede observar en la Figura 9, tres días después de la inducción de la expresión de DRO1 se produjo un cambio en la morfología celular, pasando de una forma prismática pequeña a una forma más alargada y grande. Además, según iban transcurriendo los días, las células que no expresaban DRO1 crecían pegadas unas con otras formando grupos, mientras que las que expresaban DRO1 lo hacían de forma más separada y abarcando una mayor superficie. Finalmente, cuando las células alcanzaron la confluencia se produjo un desprendimiento masivo de células en los cultivos que expresaban DRO1 mientras que los que no lo hacían permanecieron muy compactadas. Estos resultados indican que la expresión de DRO1 podría estar dando lugar a cambios en diferentes procesos celulares que conducen a una deficiente acción de las moléculas de adhesión celular o, incluso, a apoptosis.

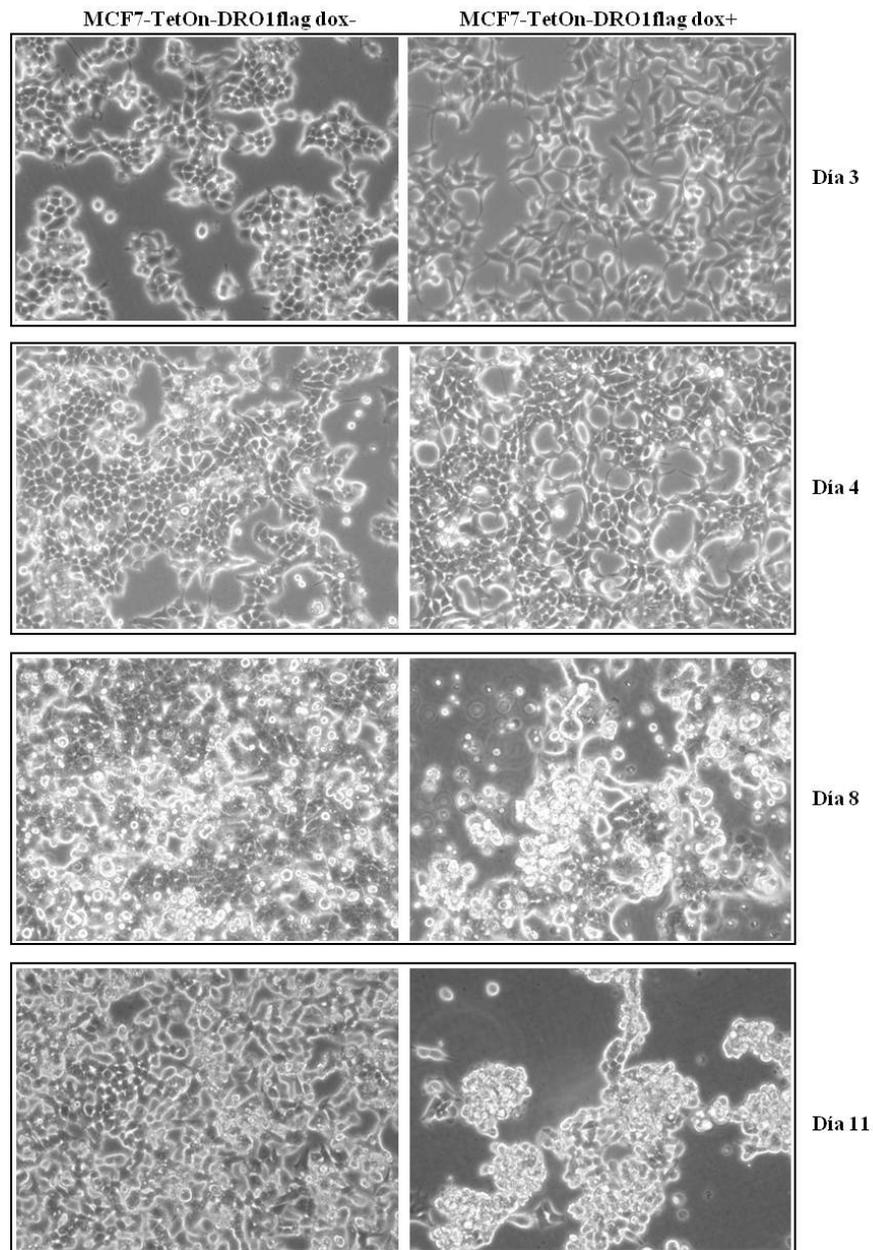


Figura 9: La expresión de DRO1 da lugar a cambios morfológicos y al desprendimiento celular. Imágenes en campo claro de cultivos celulares MCF7-TetOn-DRO1flag +/- doxiciclina 10 µg/mL mantenidos en crecimiento a lo largo del tiempo en las mismas placas cambiando únicamente el medio cada 3 días.

6- Efecto de DRO1 en la expresión de genes implicados en diferentes procesos celulares

En estudios anteriores se ha observado que DRO1 participa en procesos biológicos como apoptosis y diferenciación adipocítica (Bommer et al. 2005; Tremblay et al. 2009). Además, también se ha descrito que DRO1 se secreta y se encuentra en la matriz extracelular (Manabe et al. 2008; Okada et al. 2008). Con el fin de obtener mayor información sobre el papel de DRO1 en los diferentes procesos biológicos con los que ha sido relacionado nos propusimos realizar un análisis de expresión de genes implicados en dichos procesos. Para ello, empleamos el RNA extraído de las células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag inducidas o sin inducir con doxiciclina para analizar la expresión diferencial de genes implicados en apoptosis, ciclo celular, diabetes, matriz extracelular y adhesión celular. En la Figura 10 se muestran los incrementos de expresión más notables, positivos o negativos, de los genes incluidos en el análisis.

Varios genes implicados en apoptosis varían su expresión tras la inducción de DRO1. Entre ellos cabe destacar el aumento en la expresión de los genes proapoptóticos BCLAF1 y RIPK2, con 1.95 y 2.22 veces respectivamente. Sin embargo, la expresión de DRO1 también conduce a un aumento de la expresión de genes antiapoptóticos como BIRC2 y XIAP, o a

una disminución de otros genes proapoptóticos como CASP4, TNF, TNFRSF11B, TNFRSF25 y TP73.

La expresión de DRO1 provocó el cambio en la expresión de genes reguladores del ciclo celular, siendo los cambios más llamativos la disminución de 2.28 veces la expresión de MCM2 y el aumento de 2.28 veces la de RBBP8.

En el caso de los genes implicados en metabolismo y diabetes, hay un gran número de ellos cuya expresión varía tras la inducción de DRO1. Entre ellos destaca IL6, que se encuentra disminuida hasta 4.46 veces en las células que expresan DRO1. IL6 está abundantemente expresada en tejido adiposo y sus niveles en plasma están directamente relacionados con la obesidad y la resistencia periférica a insulina (Kern et al. 2001). Además, también se ha visto que IL6 promueve la angiogénesis y el crecimiento tumoral, por lo que su disminución podría inhibir dichos procesos. Otro gen cuya expresión también se encuentra disminuida es NOS3, que codifica la enzima encargada de sintetizar óxido nítrico (NO). La vía NO-cGMP controla la biogénesis mitocondrial y el balance energético corporal (Nisoli et al. 2003). Por otra parte, tras la inducción de DRO1 aumentó la expresión de PRKAA1 (AMPK), cuya fosforilación y activación se estimula por adiponectina para la utilización de glucosa y la oxidación de ácidos grasos (Yamauchi et al. 2002).

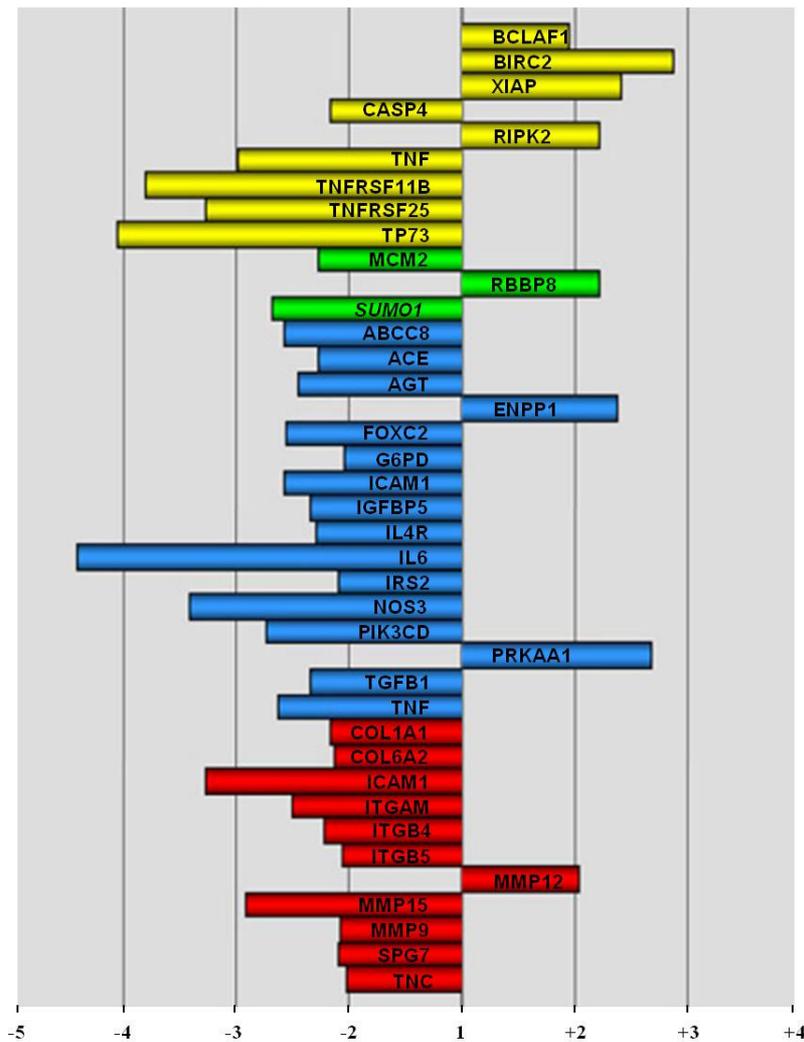


Figura 10: Representación gráfica de la expresión de genes inducidos por DRO1. Expresión de genes inducidos por DRO1 cuantificados por qRT-PCR, empleando las colecciones comerciales de *PCR arrays* agrupadas por funciones celulares (SABioscience). Se muestran los genes cuya expresión sufrió un incremento mayor de ± 2 veces tras la inducción de DRO1. El control sin inducir se tomó como control de referencia (=1). Los colores amarillo, verde, azul y rojo corresponden respectivamente a genes de los *arrays* de apoptosis, ciclo celular, diabetes y moléculas de adhesión celular y de la matriz extracelular.

Adicionalmente, diversos genes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión celular sufrieron cambios en su expresión cuando se indujo la de DRO1. Cabe destacar la disminución de ICAM-1, una molécula de adhesión dependiente de calcio que es reconocida por integrina- β 2 (CD18) expresada en leucocitos, por integrina- α L (CD11a) y por integrina- α M (CD11b, disminuida también 2.5 veces). También varió la expresión de metaloproteasas, proteínas involucradas en la hidrólisis de la matriz extracelular en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario (Szabova et al 2010) o la remodelación de tejidos (Wiseman et al 2003), y en procesos patológicos como la artritis (Lin & Liu 2010) o el cáncer (Foley et al 2012). Finalmente, otras proteínas de la matriz extracelular como colagenasas e integrinas están también disminuidas al inducir la expresión de DRO1.

7- DRO1 está localizado en el aparato de Golgi y en la membrana citoplasmática

Hasta la fecha no existe unanimidad en la bibliografía respecto a la localización subcelular de DRO1. Hay autores que lo sitúan en el aparato de Golgi (Visconti et al. 2003), otros en el citoplasma y retículo endoplásmico (Bommer et al. 2005), otros en la matriz extracelular (Manabe et al. 2008) y otros en el medio extracelular (Okada et al. 2008).

A la hora de determinar la función y/o mecanismos de acción de una proteína es muy importante saber su localización celular. Para determinar la localización subcelular de DRO1 realizamos la búsqueda de DRO1 en diferentes orgánulos en los que pudiera encontrarse, teniendo en cuenta sus funciones apoptóticas y reguladoras del ciclo celular, y en base a su capacidad de ser N-glicosilada y secretada. Para colocalizar a DRO1 con algún compartimiento subcelular empleamos el sistema de *Organelle lights* (Invitrogen) en células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag. Los orgánulos marcados de manera individual fueron: mitocondria, endosomas, peroxisomas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi. (Figura 11). La Figura 11 muestra el marcaje de cada uno de los orgánulos indicados junto con la proteína DRO1-Flag. Sólo en el caso del aparato de Golgi se superpuso la señal de GFP con la de DRO1-Flag, dando color combinado amarillo y, por tanto, revelando su localización en éste orgánulo. Además, cuando se prolongó la expresión de DRO1-Flag durante 10 días se observó que también se encontraba localizado en la membrana citoplasmática (señalado con flechas en la Figura 11).

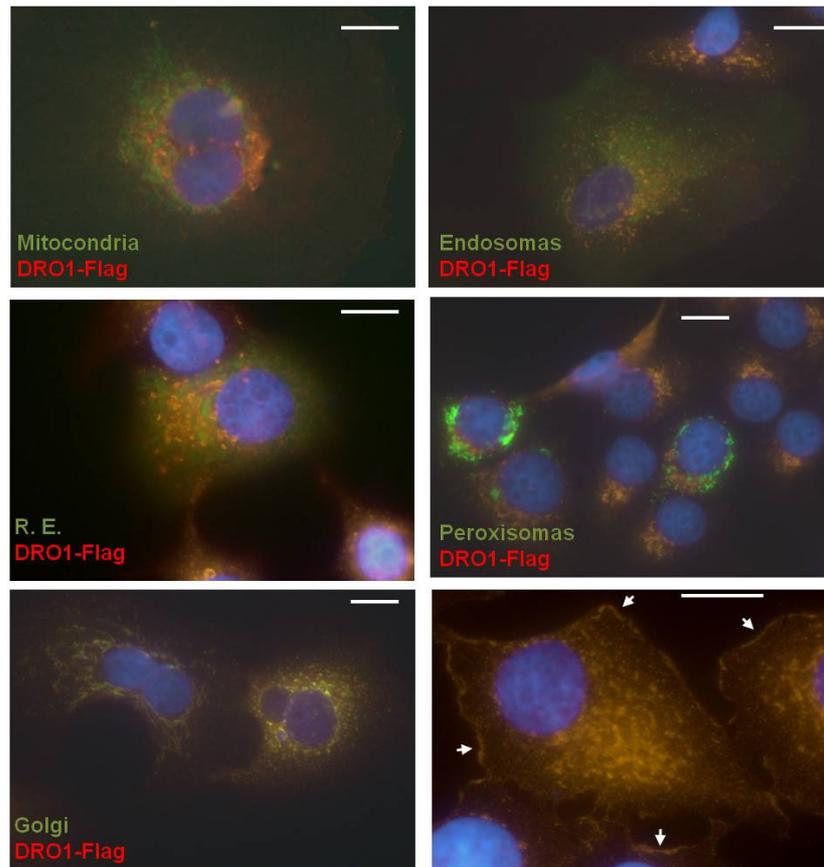


Figura 11: Localización de DRO1 en el aparato de Golgi y en el perímetro celular. La expresión de DRO1-Flag se indujo en células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag mediante tratamiento con doxiciclina durante 2 días (imágenes mostrando orgánulos) y durante 10 días (imagen inferior derecha). Para el marcaje de los orgánulos indicados en verde, los cultivos se infectaron con baculovirus de expresión de GFP en cada uno de los diferentes compartimentos. DRO1 se visualizó con anticuerpos anti-Flag en rojo (Cy3). La tinción de DRO1-Flag alrededor del perímetro celular está indicada con flechas. Barra de escala = 10 μ m.

8- DRO1 es una proteína de secreción

Una de las principales funciones del aparato de Golgi es la preparación de las proteínas para ser secretadas. La ubicación de DRO1 en el aparato de Golgi apoya estudios anteriores que describen a DRO1 como una proteína de secreción N-glicosilada. Con el fin de comprobar si DRO1 es también secretada en nuestro sistema biológico MCF-7-TetOn-DRO1-Flag, llevamos a cabo el análisis del medio condicionado del cultivo celular. El análisis por inmunotransferencia reveló la presencia de DRO1 en el medio de cultivo de células confluentes, mientras que no estaba presente en el medio procedente de células preconfluentes (Figura 12A). El tamaño de la proteína detectada era de unos 90 kDa (Figura 12A, 3ª calle), inferior al tamaño de 108 kDa esperado, sugiriendo que la proteína podía haber sufrido algún tipo de modificación. Efectivamente, la adición de inhibidores de proteasas hizo aparecer una nueva banda a unos 110 kDa al mismo tiempo que la banda inferior disminuyó su intensidad (Figura 12A, 4ª calle). Estos resultados confirman que DRO1 es secretado al medio extracelular y que puede ser procesado por proteasas.

En estudios anteriores se ha descrito que DRO1 juega un papel importante en la regulación del metabolismo. Además, la posibilidad de que DRO1 fuera secretado y actuara regulando la adipogénesis de manera similar a ciertas adipoquinas ha sido objeto de debate (Okada et al. 2008; Tremblay et al. 2009). Por

otra parte, también AIB1 está implicado en metabolismo. La sobreexpresión de AIB1 sensibiliza la activación de la vía de la insulina e IGF-I al aumentar la expresión de IGF-I e IRS2 (Torres-Arzayus et al 2004; Yan et al. 2006). La vía de la insulina es fundamental en la regulación del metabolismo y para ello es importante la secreción de insulina por las células β pancreáticas. Un eje regulador del mantenimiento funcional de la célula β pancreática es CDK4-RB-E2F1 (Fajas et al. 2010). Curiosamente, AIB1 interacciona con el factor de transcripción E2F1 para regular el ciclo celular (Louie et al. 2004; Louie et al. 2006), por lo que AIB1 pudiera estar también implicado en esta regulación. 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. Los ratones IRS2-KO terminan desarrollando diabetes (Withers et al 1998) y lo mismo ocurre tras la pérdida de expresión de CDK4 (Rane et al. 1999). CDK4 es un efector esencial de la señalización por IRS2 en células β ya que la expresión de CDK4 rescata de la diabetes en los ratones IRS2-KO (Burks 2008). Por lo tanto, nos propusimos observar la secreción de DRO1 por células de grasa subcutánea de ratones IRS2-KO, CDK4-tg e IRS2-KO/CDK4-tg. Como podemos observar en la Figura 12B, los medios de cultivo procedentes de

células grasas de ratones silvestres mostraron una elevada secreción de DRO1, similar a las células CDK4-tg. Por el contrario, no se detectó secreción de DRO1 en las células IRS2-KO, rescatándose extensamente la secreción de DRO1 en las células IRS2-KO/CDK4-tg.

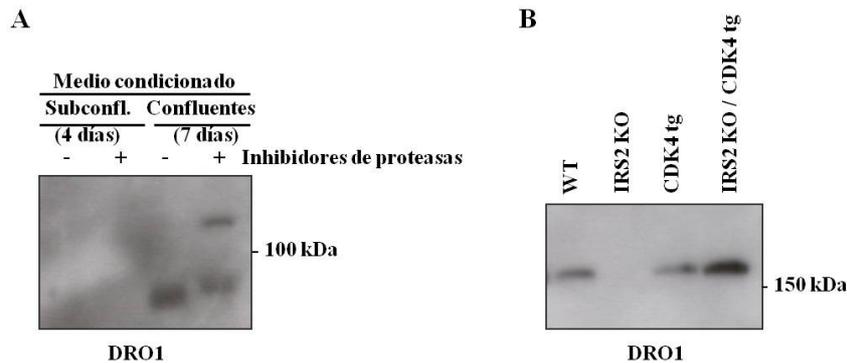


Figura 12: DRO1 es una proteína de secreción. A) El medio condicionado procedente de células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag estimuladas con doxiciclina durante los tiempos indicados se analizó por “western blot” con anticuerpos específicos contra DRO1. Se añadieron inhibidores de proteasas (+) o no (-) al medio durante las últimas 24 h para prevenir la proteólisis de DRO1. B) Análisis por “western blot” con anticuerpos anti-DRO1 del medio condicionado procedente de cultivos primarios de grasa subcutánea de ratones silvestre, IRS2-KO, CDK4-tg e IRS2-KO/CDK4-tg.

Tras confirmar que DRO1 se localiza en el aparato de Golgi y que es una proteína de secreción, nos propusimos determinar si la secreción de DRO1 se bloqueaba al impedir el

paso de DRO1 al aparato de Golgi. Para ello tratamos cultivos celulares MCF-7-TetOn-DRO1-Flag con brefeldina A durante diferentes tiempos. La brefeldina A es una lactona macrocíclica que inhibe la secreción de proteínas impidiendo su transporte desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi (Fujiwara et al. 1998). Tras el tratamiento se observó una acumulación progresiva de DRO1-Flag en el interior celular, llegando a niveles máximos después de 8h (Figura 13A). Esta acumulación confirma que DRO1 es una proteína de secreción que se acumula en la célula al bloquear su liberación al medio. No obstante, después de 24h los niveles acumulados de DRO1-Flag sufren una disminución, posiblemente por degradación de la proteína acumulada, por regulación de su expresión, o por algún otro mecanismo como la apoptosis de células con mayor acumulación de DRO1. A concentraciones de brefeldina A entre 30-100 ng/mL durante 48h se induce apoptosis ocasionando estrés en el retículo endoplasmático (Simón & Daskal 2008). Dado el papel de DRO1 en apoptosis, nos surgió la hipótesis de que DRO1 pudiera estar produciendo apoptosis por estrés en el retículo endoplasmático. Para comprobar si esta hipótesis era cierta se cuantificó la apoptosis producida por Brefeldina A en células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag y se comparó con las mismas condiciones pero silenciando DRO1. Sin embargo, aunque se produjo alrededor de un 30% de apoptosis tras el tratamiento con brefeldina A, el silenciamiento de DRO1 no ocasionó ningún descenso significativo de dicha apoptosis (Figura 13B).

Esto sugiere que, aunque la secreción de DRO1 está bloqueada por brefeldina A dando lugar a su acumulación celular, el silenciamiento de DRO1 no es suficiente para impedir la apoptosis producida por brefeldina A. Sin embargo, puesto que la apoptosis por estrés en el retículo endoplasmático está producida por la acumulación de diferentes proteínas en dicho orgánulo, es posible que DRO1 participe en dicho proceso pero que su contribución no sea esencial en el mismo, por lo que su silenciamiento no es suficiente para reducir significativamente la apoptosis en las condiciones analizadas.

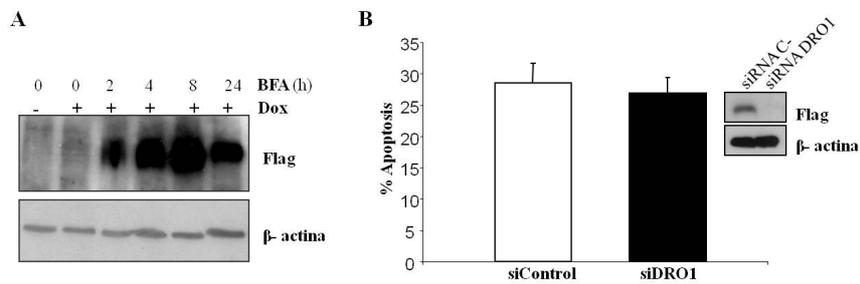


Figura 13: La inhibición de la secreción produce la acumulación de DRO1 dentro de la célula. A) Inmunotransferencia de lisados de células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag, inducidas (+) o sin inducir (-) con doxiciclina durante 72 h y con 100 ng/mL de brefeldina A (BFA) durante los tiempos indicados; B) Cuantificación de la apoptosis en células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag expresando DRO1, tras el tratamiento con 100 ng/mL de BFA durante 48h. Las células se transfectaron con siRNA control (barra abierta) o con siRNA DRO1 (barra cerrada) 48 h antes del tratamiento con BFA. La apoptosis se cuantificó por citometría de flujo como la población subG0/G1. Cada barra representa la media de tres muestras independientes \pm EE. Las inmunotransferencias insertadas representan un experimento en paralelo para confirmar la efectividad del silenciamiento de DRO1-Flag.

9- Papel de DRO1 en apoptosis

Aunque se ha descrito que DRO1 sensibiliza el efecto de estímulos apoptóticos (Bommer et al. 2005), el mecanismo por el que se produce este efecto es totalmente desconocido. Uno de nuestros principales objetivos fue determinar dicho mecanismo. Tras el estímulo apoptótico se producen cambios en la localización de proteínas apoptóticas como Bax, que se transloca del citosol a la mitocondria participando en el proceso apoptótico (Wolter et al. 1997). En primer lugar quisimos establecer los cambios de localización que sufría DRO1 tras diferentes estímulos apoptóticos. Para determinar si DRO1 era translocado durante la apoptosis, indujimos apoptosis con estaurosporina en células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag. En estas condiciones DRO1 se liberó del aparato del Golgi (Figura 14A, imagen de la izquierda), pero no se translocaba a la mitondria (Figura 14A, imagen central). Resultados similares se obtuvieron tras inducir apoptosis con cicloheximida y TNF α en células HeLa. Además, en el análisis por inmunotransferencia del fraccionamiento subcelular se observa que DRO1 permanecía dentro de la fracción soluble y no pasaba a la fracción mitocondrial (Figura 14B). Curiosamente, DRO1 se encontraba parcialmente retenido en el retículo endoplasmático (Figura 14A, imagen de la derecha), de manera similar a lo que ocurre por colapso del aparato de Golgi. Este resultado sugiere de nuevo que DRO1 participa en la apoptosis inducida por estrés

en el retículo endoplasmático. Además, la expresión ectópica de DRO1 es suficiente para activar caspasa 3 sin necesidad de un estímulo apoptótico previo (Figura 14C).

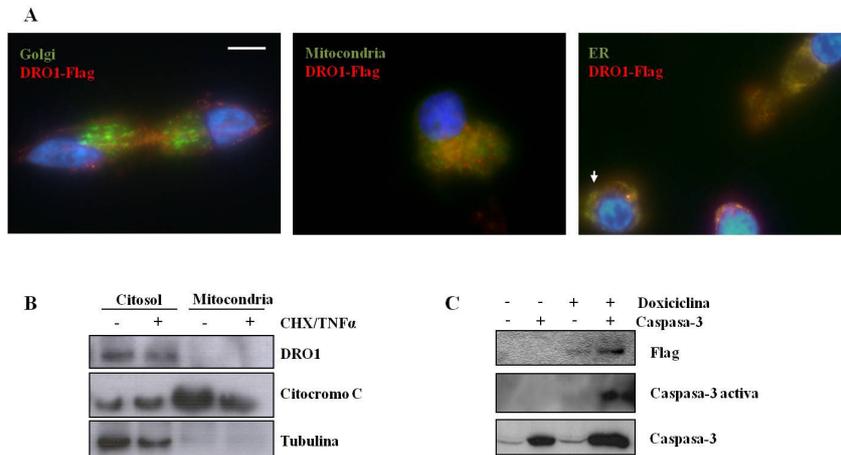


Figura 14: DRO1 pasa del aparato de Golgi al RE tras un estímulo apoptótico. A) Inmunofluorescencia de células MCF-7-TetOn-DRO1flag expresando GFP en los distintos compartimentos subcelulares indicados en verde (Golgi, Mitochondria, Retículo Endoplasmático). Las células se trataron con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxiciclina durante 48h para inducir la expresión de DRO1-Flag seguido del estímulo apoptótico con estaurosporina 1 μM durante 6h. B) Análisis por inmunotransferencia de las fracciones subcelulares “fracción soluble” (citosol) y “fracción rica en mitocondrias” (mitocondria) de células HeLa estimuladas (+) o sin estimular (-) con cicloheximida (CHX) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 30 minutos antes de ser tratadas con TNF α 50 ng/ml durante 3.5 h para inducir apoptosis. La detección de tubulina se empleó para confirmar la ausencia de contaminación del citosol en la mitocondria C) Inmunotransferencia de lisados de MCF-7-TetOn-DRO1flag sin transfectar (control) o transfectados con 3 μg de pcDNA3.1-caspasa-3. Las células se recogieron y lisaron 48h después de la transfección para su posterior análisis.

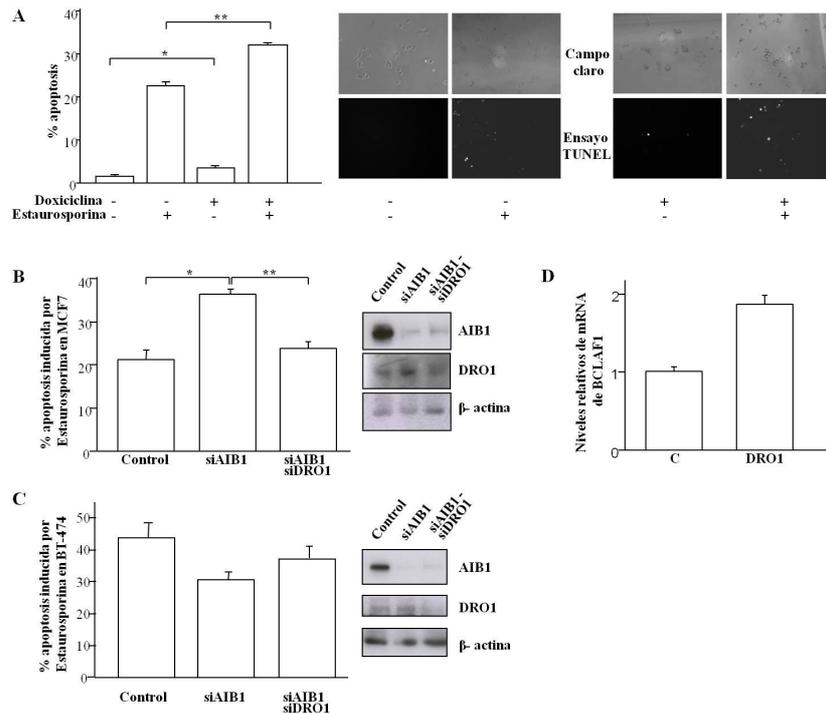


Figura 15: DRO1 es un mediador de la capacidad antiapoptótica de AIB1 en células MCF-7. A) Análisis por citometría de flujo (gráfica de la izquierda) y por ensayo TUNEL (imágenes de la derecha) de la apoptosis generada en células MCF-7-TetOn-DRO1flag tratadas (+) o sin tratar (-) con 10 μM doxiciclina durante 4 días y seguidamente estimuladas (+) o no (-) durante 6h con 1 μM estaurosporina. La gráfica muestra los porcentajes de apoptosis correspondientes a los valores medios de tres ensayos \pm EE, $*p = 0.002$; $**p = 0.001$. B) Análisis por citometría de flujo de la apoptosis inducida por estaurosporina 1 μM durante 6h en células MCF-7 sin silenciar (control), silenciando AIB1 (siAIB1) y silenciando AIB1 y DRO1 (siAIB1/siDRO1) durante 48h. La gráfica muestra los niveles de apoptosis y las barras representan los valores medios de tres ensayos \pm EE, $*p = 0.004$; $**p = 0.002$. En paralelo se hizo una inmunotransferencia para demostrar los niveles de AIB1 y DRO1 bajo las condiciones mencionadas. C) Lo mismo que en B) pero con células BT-474.

Figura 15 (Continuación): D) Niveles relativos de BCLAF1 determinados por RT-qPCR con oligos específicos comerciales en células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag inducidas con doxiciclina durante 3 días para expresar DRO1. Los valores relativos de mRNA de BCLAF1 se normalizaron frente a HPRT1 como control. Los análisis se hicieron a partir de los resultados de tres cultivos independientes.

Para determinar la capacidad apoptótica de DRO1 analizamos las células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag mediante citometría de flujo. La expresión ectópica de DRO1 fue suficiente para duplicar la población de células apoptóticas (Figura 15A, * pasa de 1.7% a 3.64%). Además, tras el estímulo apoptótico con estaurosporina, la expresión de DRO1 condujo a un incremento importante de la población de células apoptóticas (** pasando de un 22.52% a un 31.85%). Resultados cualitativos similares se obtuvieron por ensayo TUNEL en cultivos celulares sometidos a las mismas condiciones anteriores (Figura 15A, fotografías). Por otra parte, quisimos establecer si la represión de DRO1 por AIB1 podía explicar parte de la capacidad antiapoptótica de AIB1. Para ello, silenciamos AIB1 solo o AIB1 y DRO1 conjuntamente en células MCF-7 y posteriormente las tratamos con estaurosporina para inducir apoptosis. El silenciamiento de AIB1 produjo un aumento de los niveles de expresión de DRO1, coincidiendo con el aumento en la apoptosis con respecto al control (Figura 15B). Por el

contrario, el silenciamiento de DRO1 junto con AIB1 recuperó los niveles de apoptosis a valores similares al control. Sin embargo, en la línea celular BT-474 no se observó esta relación entre la apoptosis por AIB1 y DRO1 (Figura 15C). Estos resultados sugieren que gran parte de la actividad antiapoptótica de AIB1 está mediada por el silenciamiento de DRO1 en la línea celular MCF-7. La sobreexpresión de otros oncogenes, como Her2, en la línea celular BT-474 pueden hacer que AIB1 no tenga la misma capacidad de reprimir DRO1, como ocurre en células MCF-7. Finalmente, quisimos corroborar los resultados obtenidos en los *PCR arrays* en los que la expresión de DRO1 aumentaba la expresión del gen proapoptótico BCLAF1. Para ello, cuantificamos los niveles de mRNA de BCLAF1 mediante RT-qPCR. El ensayo se hizo por triplicado con los mismos oligos específicos que en el *PCR-array*. Los resultados obtenidos confirmaron que el nivel de expresión de BCLAF1 es mayor en células expresando DRO1 (Figura 15D).

10- Efecto de DRO1 en proliferación

Los resultados obtenidos del análisis mediante *PCR array* de la expresión de genes implicados en la regulación del ciclo celular muestran que la expresión de DRO1 disminuye la expresión de MCM2 y aumenta la de RBBP8 (Figura 10). Estos resultados sugieren que DRO1 podría actuar también como

regulador del ciclo celular. Además, en estudios previos de nuestro laboratorio se empleó el sistema de doble híbrido de levaduras usando a DRO1 como cebo con el fin de identificar proteínas con las que interacciona. El sistema de doble híbrido de levaduras es una herramienta de biología celular que permite la identificación de interacciones proteicas basada en permitir el crecimiento de la levadura sólo cuando hay interacción entre la proteína cebo y otra proteína a identificar. De entre los distintos clones aislados en el primer cribado, sólo el factor de transcripción PLZF resultó ser un clon positivo (Avivar, 2008). PLZF posee un dominio conservado entre represores transcripcionales y existen diversos estudios que han relacionado a PLZF con el control negativo de la proliferación, la diferenciación celular y el aumento de apoptosis (Shaknovich et al. 1998).

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos por el sistema de doble híbrido de levadura realizamos un estudio directo de interacción de proteínas mediante coimmunoprecipitación de complejos. Para ello se indujo la expresión de DRO1 en las células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag. El lisado se incubó con anticuerpos anti-Flag y con proteína G-agarosa. Estos inmunocomplejos se analizaron por inmunotransferencia con anticuerpos anti-PLZF. Como podemos observar, la señal de PLZF se intensificó en los complejos inmunoprecipitados, confirmando así la interacción con DRO1 (Figura 16A).

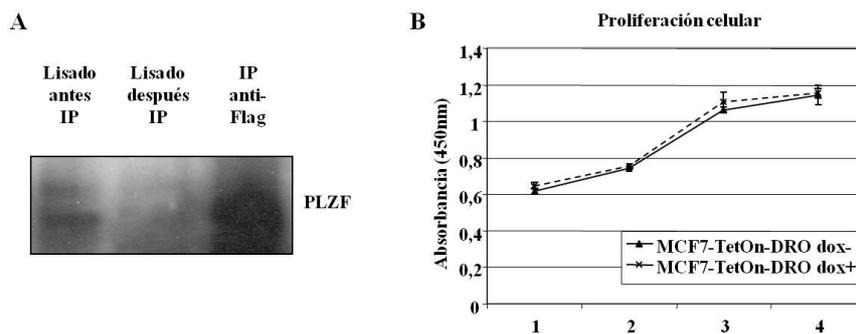


Figura 16: DRO1 interacciona con PLZF. A) Inmunotransferencia con anticuerpos anti-PLZF de los inmunocomplejos procedentes de 500 μg de lisado de células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag inducidas con doxiciplina durante 48h e inmunoprecipitados (IP) con 0.5 μg de anticuerpo anti-Flag. Las dos primeras calles contienen 30 μg (6% del total) del lisado antes y después de la IP, mientras que la última calle contiene el 100% del IP. B) Ensayo de proliferación celular. A día 0 se sembraron en placas de 96 pocillos 10.000 células MCF-7-TetOn-DRO1flag por pocillo. Los cultivos se crecieron en presencia (+) o ausencia (-) de doxiciplina durante el transcurso del experimento. A los días indicados se determinó el índice de proliferación mediante un ensayo de proliferación celular (XTT). Los valores son las medias de 5 muestras independientes \pm EE.

Con objeto de determinar si la expresión de DRO1 producía alguna diferencia en la proliferación celular en cultivos de MCF-7-TetOn-DRO1-Flag, hicimos un seguimiento diario de cultivos paralelos crecidos en presencia o ausencia de doxiciplina. La proliferación se cuantificó mediante el marcaje con XTT. Sin embargo, no se observaron diferencias de proliferación entre las células que expresaban DRO1 y las que no lo hacían (Figura 16B). Por lo tanto, la simple expresión de

DRO1 no refleja un cambio en la velocidad de proliferación celular, sugiriendo que otros mecanismos pudieran estar implicados.

11- Efecto de DRO1 sobre proteínas de adhesión celular y su implicación en migración transendotelial

Las proteínas de la matriz extracelular forman el entramado estructural en el que se asientan las células, mientras que las moléculas de adhesión celular son las que permiten la unión directa entre células adyacentes. Cabe pensar que cambios en la expresión de estas proteínas promueven cambios en la morfología de los cultivos celulares. Nuestros resultados revelaron que la expresión de DRO1 en las células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag producía cambios en la expresión de proteínas de la matriz y de adhesión celulares, así como cambios en el patrón de crecimiento y morfología (Figura 17A). Este cambio de morfología recuerda al observado por Hanai y colaboradores (2005), donde células 4T1 (células de cáncer de mama de ratón) crecían formando grupos adoquinados, pero tras la transformación con *ras* lo hacían de forma alargada y separada. Estos cambios son característicos de la transición epitelio-mesénquima (EMT) donde células epiteliales pasan a tener características mesenquimales aumentando el potencial

metastásico de los tumores epiteliales. Por otro lado, DRO1 puede actuar como supresor tumoral en células epiteliales, sugiriendo que si DRO1 también participara en EMT, ésta sería independiente y exclusiva de su función supresora. Para estudiarlo, nos propusimos analizar los cambios morfológicos y correlacionarlos con la expresión de dos proteínas cuya presencia y localización es diferente en células epiteliales que en células mesenquimales. Concretamente, observamos β -catenina y E-cadherina, los cuales forman un complejo en la membrana plasmática de células epiteliales como MCF-7 (Gusakova & Surmacz 1997). β -catenina forma parte de la vía canónica de Wnt y tras su activación pasa al núcleo celular donde promueve la transcripción de genes (Huber et al 1996). Durante el proceso de EMT, β -catenina también pasa al núcleo para transcribir genes, mientras que E-cadherina pasa a endosomas y lisosomas donde es secuestrada y degradada (Morali et al. 2001). Sin embargo, como queda comprobado mediante inmunotransferencia de lisados de células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag (Figura 17B), los niveles de β -catenina y E-cadherina permanecen inalterados tras la expresión de DRO1. Además, la expresión de DRO1 tampoco produce la expresión de vimentina, una proteína exclusiva de células mesenquimales. Estos resultados muestran que DRO1 no produce EMT en nuestro modelo biológico, aunque podrían existir otros modelos en donde sí lo hiciera o que nuestro modelo necesitara de algún cambio adicional que desencadenara el proceso.

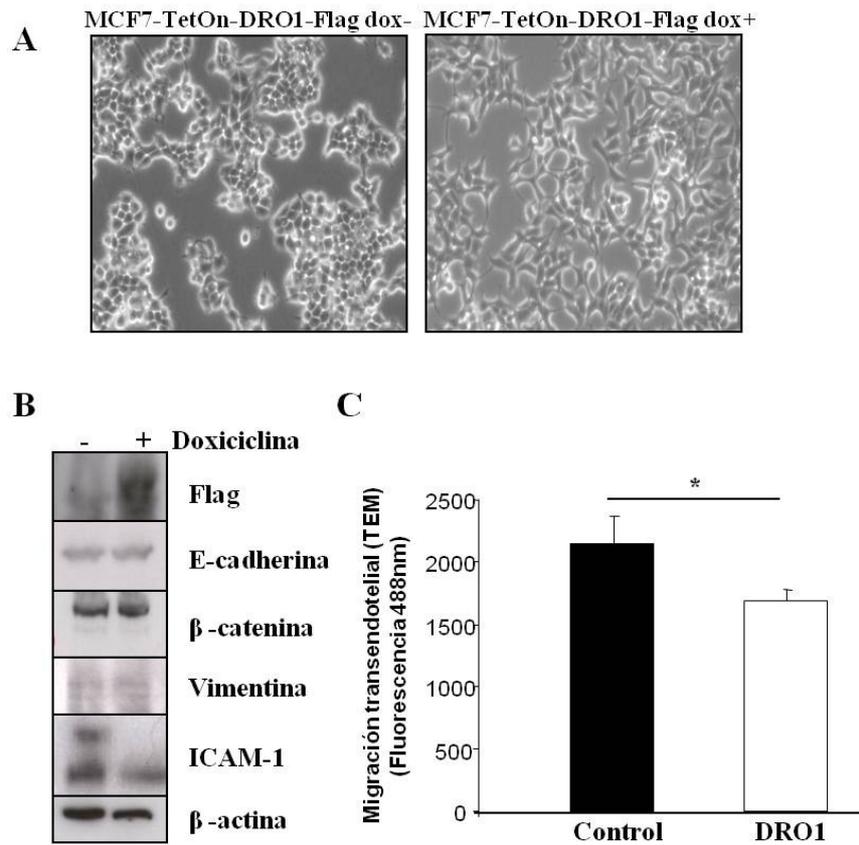


Figura 17: DRO1 disminuye la migración transendotelial. A) Fotografías de campo claro de células MCF-7-TetOn-DRO1flag que revelan los cambios de morfología y del patrón de crecimiento cuando se induce la expresión de DRO1-Flag con doxiciclina (dox+). B) Inmunotransferencia de lisados de células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag revelada contra Flag para comprobar expresión DRO1-Flag. Adicionalmente se analizaron los niveles de expresión de β -catenina, E-cadherina, vimentina (marcador de células mesenquimales), ICAM-1 y β -actina como control de carga. C) Ensayo de migración transendotelial (TEM). Las barras indican los valores medios de 3 muestras independientes \pm EE. * $p < 0.05$. A-D) Las células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag se crecieron con y sin doxiciclina 10 μ g/mL durante 72h antes de realizar cada experimento.

Una explicación para el crecimiento separado de células que expresan DRO1 es la represión de alguna otra molécula de adhesión que forme uniones estrechas entre células. De hecho, en los análisis de la expresión de genes en células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag inducidas con doxiciclina (apartado 6, Figura 10) nos llamó la atención la fuerte represión de la molécula de adhesión celular ICAM-1. Como podemos observar en la Figura 17C, la represión de ICAM-1 se confirmó mediante inmunotransferencia de un lisado de dichas células. Este resultado sugiere que la represión de ICAM-1 por la expresión de DRO1 pudiera ser un importante factor en la menor adhesión intercelular y en el patrón de crecimiento con mayor separación entre células. Puesto que la expresión de ICAM-1 está disminuida considerablemente tras la expresión de DRO1, es posible que la capacidad de estas células de sufrir migración transendotelial (TEM) esté también mermada. Con el fin de comprobar esta hipótesis reconstruimos *in vitro* el proceso de migración transendotelial. Para ello se cultivó una monocapa de células endoteliales (HUVEC) sobre una cámara de cultivo con soportes permeables y, seguidamente, se sembraron sobre ellas células MCF-7-TetOn-DRO1-Flag marcadas con el fluoróforo CFSE y tratadas con o sin doxiciclina. Finalmente, tras 24h se determinó la fluorescencia como medida de la cantidad de células que habían migrado a la otra parte de la barrera. La migración fue significativamente menor en el caso de las células que expresan DRO1 (Figura 17D). Estos resultados apoyan que

DRO1 disminuye la migración transendotelial y que este efecto podría deberse a la represión de ICAM-1.

12- La fosforilación de AIB1 en S728 favorece la interacción con ER α y TFIIE α

El estudio reciente de AIB1 durante mitosis en nuestro laboratorio nos permitió establecer que AIB1 se fosforila en las serinas S728 y S867 por CDK1/ciclina B al inicio de la mitosis y que esta fosforilación permanece hasta la salida de la fase M, cuando es revertida por la fosfatasa PP1. Curiosamente, esta fosforilación no está asociada con ubiquitilación ni degradación y tampoco altera las propiedades transcripcionales de AIB1 (Ferrero, 2010).

Con el fin de determinar si esta fosforilación estaba implicada en alterar la interacción con factores de transcripción como ER α , nos propusimos generar un fragmento de AIB1 fusionado a GST para hacer ensayos de interacción o *pull down*. El fragmento de AIB1 generado va desde el aminoácido 693 al 933, conteniendo la serina S728. Además, también generamos dos mutantes del mismo fragmento en el que cambiamos la serina por alanina (S728A, que impide la fosforilación en este residuo) o por ácido glutámico (S728E, que mimetiza el efecto de la fosforilación en este residuo) (Figura 18A). Seguidamente realizamos los ensayos de interacción incubando los fragmentos

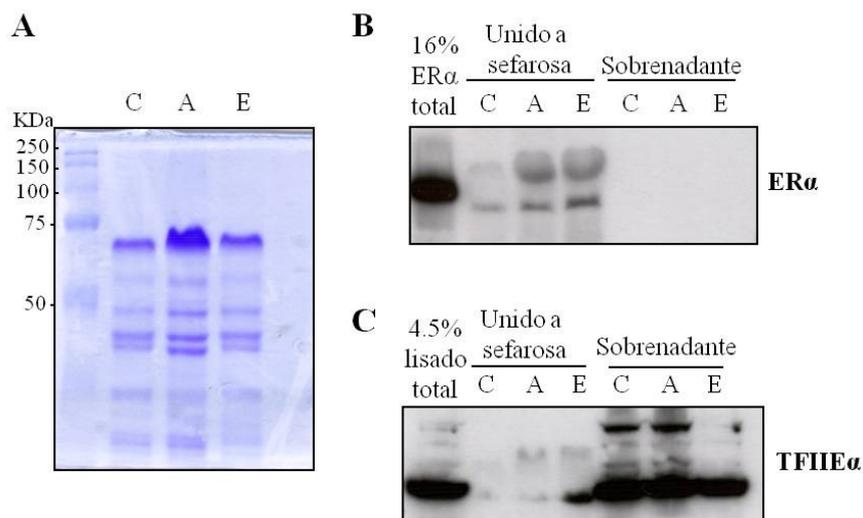


Figura 18: Ensayos de interacción con el dominio 693-933 de AIB1. A) Tinción Coomassie de SDS-PAGE de la proteína híbrida purificada GST fusionada al fragmento 693-933 de AIB1 (C), o a sus mutantes S728A (A) y S728E (E). La muestra A contiene aproximadamente el doble de concentración de proteína que las otras dos, por lo que en los ensayos de interacción se cargó la mitad de muestra A que del resto, es decir, 10 μ L de C y E y 5 μ L de A. B) Ensayo de interacción con ER α . Los fragmentos 693-933 AIB1 (C) y sus mutantes S728A (A) y S728E (E) se incubaron 1 hora a 4°C con ER α sintetizado *in vitro* y seguidamente se incubaron con agitación a 4°C con glutatión-sefarosa. Finalmente, la fracción unida a sefarosa se separó del sobrenadante por centrifugación, se resolvieron ambas mediante SDS-PAGE y se visualizaron por inmunotransferencia con anticuerpos contra ER α . La muestra con sólo ER α corresponde al 16% de lo empleado en cada una de las incubaciones. C) Ensayo de interacción con TFIIIE α . Se procedió como en B) pero incubando los fragmentos de AIB1 con un lisado de células MCF-7. Las muestras se analizaron por inmunotransferencia con anticuerpos contra TFIIIE α . La muestra con lisado total representa el 4.5% de lo empleado en cada una de las incubaciones.

de AIB1-GST con ER α sintetizado *in vitro* o con lisados de células MCF-7. Como podemos observar en la Figura 18B, todos los fragmentos son capaces de interactuar con ER α , aunque el mutante S728E parece tener mayor afinidad. Por otra parte, sólo el mutante S728E es capaz de interactuar con el factor de transcripción TFIIIE α (Figura 18C).

13- La fosforilación de AIB1 en S728 excluye a AIB1 de la cromatina durante la mitosis

En estudios previos de nuestro laboratorio se observó que la localización de AIB1 es mayoritariamente nuclear en células MCF-7 exponencialmente creciendo (Ferrero et al. 2008). En ocasiones, la fosforilación de una proteína produce un cambio en la localización subcelular. Por lo tanto, nos propusimos investigar si la fosforilación de AIB1 modulaba su localización subcelular. Para ello y dado que la fosforilación de S728 tiene lugar en mitosis, realizamos inmunofluorescencias en células MCF-7 y buscamos células mitóticas basándonos en su típica morfología del DNA teñido con DAPI y de la distribución de β -tubulina formando el huso mitótico. Los resultados observados en la Figura 19A mostraron que AIB1 se excluía de la cromatina en células mitóticas, sugiriendo que su fosforilación durante mitosis pudiera estar regulando su acceso a la cromatina (Ferrero et al. 2011). La exclusión de AIB1 fosforilado (pAIB1)

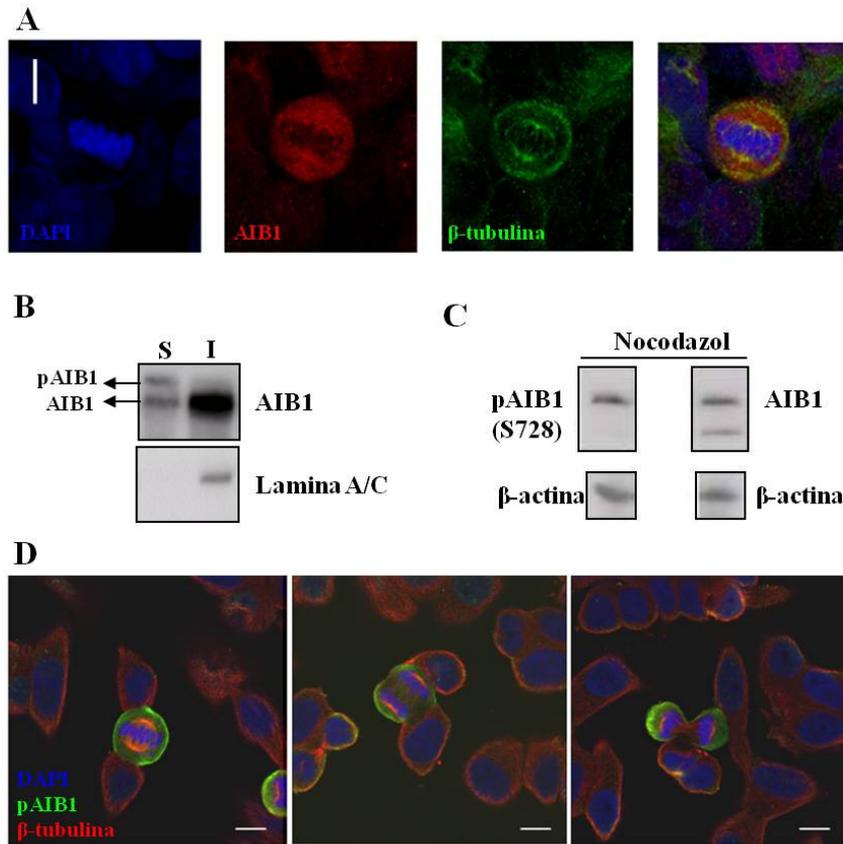


Figura 19: La fosforilación de AIB1 en S728 durante mitosis coincide con su exclusión de la cromatina. A) Análisis por microscopía confocal de inmunofluorescencias de células MCF-7 teñidas con DAPI (azul) y anticuerpos contra AIB1 (Alexa Fluor 488) y β -tubulina (Alexa Fluor 633) para revelar el huso mitótico. La imagen de la derecha representa la mezcla de los tres canales. Barra de escala = 10 μ m. B) Análisis por inmunotransferencia de las fracciones soluble (S) e insoluble (I) de células MCF-7 bloqueadas en mitosis con nocodazol. El anticuerpo contra AIB1 detecta tanto la forma fosforilada (banda superior) como la no fosforilada (banda inferior). La proteína nuclear lamina A/C se empleó para descartar contaminación de la fracción I en la fracción S.

Figura 19 (Continuación): C) Análisis por inmunotransferencia de lisados totales de células MCF-7 bloqueadas en mitosis con nocodazol. El anticuerpo fosfoespecífico detecta solo la banda superior mientras que el anticuerpo contra AIB1 detecta ambas bandas. D) Análisis por microscopía confocal de células MCF7 asincrónicas marcadas con DAPI (azul), anti-pS728-AIB1 (Alexa Fluor 488) y anti- β -tubulina (Alexa Fluor 633). Barra de escala = 10 μ m.

de la cromatina la demostramos también por inmunotransferencia en células bloqueadas en prometafase con nocodazol. Para ello, hicimos un fraccionamiento celular que permite obtener la fracción soluble (S; citosol y nucleoplasma) e insoluble (I; enriquecida con proteínas unidas a la cromatina y a la matriz nuclear). Las células que permanecen adheridas a la placa de cultivo tras el tratamiento con nocodazol contienen tanto la forma fosforilada de AIB1 como la no fosforilada (Ferrero et al. 2011), por lo que constituyen una población celular ideal para estudiar las diferencias entre los dos tipos moleculares de AIB1. Es interesante destacar que la banda con menor movilidad electroforética (perteneciente a la forma fosforilada) se encontraba sólo en la fracción soluble, mientras que la banda que representa al AIB1 no fosforilado estaba enriquecida en la fracción insoluble (Figura 19B). Estos resultados apoyan las observaciones en inmunofluorescencias en las que la fosforilación de AIB1 se correlaciona con su exclusión de la cromatina. Al mismo tiempo, también generamos anticuerpos fosfoespecíficos contra S728 de AIB1

para demostrar que la fosforilación de S728 se correlacionaba con dicho efecto. Efectivamente, el análisis por inmunotransferencia de lisados de células MCF-7 tratadas con nocodazol reveló que el anticuerpo fosfoespecífico detectaba sólo la banda de menor movilidad electroforética (Figura 19C). Además, el empleo de este anticuerpo en inmunofluorescencia mostró la tinción exclusiva de células mitóticas, demostrando que la fosforilación de AIB1 en S728 ocurría exclusivamente en mitóticas y que coincidía con la exclusión de AIB1 de la cromatina (Figura 19D) (Ferrero et al. 2011).

DISCUSIÓN

1- Regulación de la expresión de DRO1

1.1- DRO1 está reprimido por AIB1

Hasta la fecha, todos los estudios realizados para explicar el potencial oncogénico de AIB1 han llevado al descubrimiento de la regulación de otros oncogenes y vías oncogénicas. En dichos estudios se constata que los mecanismos por los que AIB1 promueve la iniciación y progresión tumoral involucran diferentes vías de señalización como ER, IGF/PI3K/AKT, HER2, NFκB y Ets, así como la regulación del ciclo celular (Revisado en Lahusen et al. 2007).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que DRO1 se encontraba significativamente disminuido en células del epitelio mamario de ratones transgénicos que sobreexpresan AIB1. Reforzando estos resultados se observó que el silenciamiento o sobreexpresión de AIB1 en células HMEC produce un aumento o una disminución, respectivamente, en los niveles de DRO1. Además, los niveles de DRO1 son inversamente proporcionales a los de AIB1 en diferentes líneas celulares de cáncer. Asimismo, DRO1 también está reprimido en carcinoma colorrectal (Bommer et al. 2005) y la sobreexpresión de AIB1 se correlaciona con el estado clínico de carcinoma colorrectal humano (Xie et al. 2005). Todos estos resultados sugieren que AIB1 es un regulador negativo de DRO1.

1.2- DRO1 está reprimido por otros oncogenes y por estrógenos

Aunque nuestros estudios revelan que la expresión de DRO1 es inversamente proporcional a la de AIB1, existen excepciones como las líneas celulares de cáncer de pulmón H1299 y A549, que contienen bajos niveles tanto de AIB1 como de DRO1. Estos ejemplos nos llevaron a pensar que, además de AIB1, otros genes podían estar implicados en la regulación de la expresión de DRO1. Oncogenes como β -catenina o K-Ras ya habían sido descritos como represores de DRO1 (Bommer et al. 2005). Adicionalmente, nosotros demostramos que los oncogenes *v-H-ras*, *v-src* y la sobreexpresión de HER2 también disminuían los niveles de expresión de DRO1, ampliando la creciente lista de oncogenes que reprimen a DRO1. Por lo tanto, podemos concluir que DRO1 es un supresor tumoral cuya expresión se encuentra frecuentemente reprimida por oncogenes para evadir sus efectos protectores.

Por otra parte, en la regulación del crecimiento juega un papel fundamental el receptor de estrógenos, que puede ser coactivado tanto por oncogenes como AIB1, como por factores de crecimiento o citoquinas. En nuestro estudio hemos observado que los estrógenos disminuyen la expresión de DRO1 y los antiestrógenos la aumentan. Estos resultados apoyan los

datos observados en otro trabajo donde relacionan la represión de DRO1 con el tratamiento con estrógenos (Marcantonio et al. 2001a). Además, el análisis de la secuencia del promotor de DRO1 revela que en ella se encuentran 14 secuencias semicompletas del elemento de respuesta a estrógenos, sugiriendo que la represión de DRO1 por estrógenos se puede producir en *cis* por la regulación directa de DRO1 por ER.

1.3- AIB1 reprime a DRO1 a nivel de promotor

El promotor de DRO1 no posee islas de CpG con alta estringencia, aunque se ha localizado una de baja estringencia en el exon 2, cerca del sitio del inicio de la traducción. Sin embargo, estudios en líneas de cáncer de colon y de epitelio normal con el agente desmetilador 5-azacitidina sugieren que esta región no está involucrada en la regulación epigenética de la expresión de DRO1 (Bommer et al. 2005). Estos resultados apoyan a que la represión de DRO1 por oncogenes ocurre a través de represores transcripcionales en su promotor y no por metilación del mismo. En nuestro estudio observamos que la región promotora de DRO1, situada entre las bases -4813/-3795 antes del sitio de inicio de la transcripción, es esencial para la represión de la expresión de DRO1 por AIB1. Este hallazgo le confiere a AIB1 una función nueva como represor transcripcional de supresores tumorales. Además, dado que existen diferentes ERE en esta región y que AIB1 interacciona

con ER, es posible que esta regulación esté mediada por la acción conjunta de ambos. Sin embargo, futuros análisis como CHIP serán necesarios para confirmar esta hipótesis.

2- DRO1 es un supresor tumoral que induce apoptosis y reduce la migración de células cancerosas

2.1- Papel de DRO1 en apoptosis

La obtención de las células MCF7-TetOn-DRO1-Flag, nos permitió expresar DRO1 de forma inducida al añadir doxiciplina al medio de cultivo. Dichas células fueron una herramienta muy útil para poder analizar los efectos de la expresión de DRO1 en diferentes condiciones. En nuestros experimentos, pudimos observar cómo la expresión permanente de DRO1 impedía que el cultivo llegara a confluencia y que las células terminaran despegándose de la placa. En cambio, las células MCF7-TetOn-DRO1-Flag en las que no se indujo la expresión de DRO1, continuaron creciendo exponencialmente hasta alcanzar la confluencia, permaneciendo adheridas a la placa formando una capa continua. Una de las posibles explicaciones de este desprendimiento masivo es la muerte de dichas células. Este fenotipo tan llamativo se produjo después de más de una semana de expresión de DRO1, tiempo suficiente para acumular el

resultado de una apoptosis generalizada en el cultivo. La expresión de DRO1 durante 4 días produjo un incremento de más del doble en la población apoptótica (de un 1.7% a 3.64%) cuantificada como población subG0/G1 mediante citometría de flujo, apoyando la hipótesis del papel de la apoptosis en el patrón de crecimiento del cultivo. El ensayo TUNEL también confirmó estos cambios a nivel cualitativo. El aumento de apoptosis fue más notable tras el estímulo apoptótico con estaurosporina, pasando del 22% al 32%. Estos resultados refuerzan el papel de DRO1 en la inducción y sensibilidad a la apoptosis.

Aunque el mecanismo molecular preciso por el que DRO1 regula la apoptosis todavía está por elucidarse, nuestros resultados revelan que la expresión del gen proapoptótico BCLAF1 se duplica tras la inducción de la expresión de DRO1. BCLAF1 es un factor de transcripción asociado con Bcl2 que reprime la transcripción de genes e induce apoptosis (Kasof et al. 1999). Los miembros proapoptóticos de la familia Bcl2 promueven apoptosis por activación de la vía intrínseca controlando la permeabilidad mitocondrial, la liberación de proteínas mitocondriales proapoptóticas y la activación de caspasas (Danial & Korsmeyer 2004). De este modo, ya que la expresión de BCLAF1 está activada por DRO1, la actividad proapoptótica de DRO1 podría estar mediada por esta vía. Además, nuestros resultados muestran que la expresión de DRO1 también conduce al aumento de RIPK2. RIPK2 es un gen

proapoptótico que interacciona con miembros del complejo de señalización de TNFR1 produciendo muerte celular y activación de NFκB (McCarthy et al 1998). Este resultado sugiere que DRO1 también participa de la activación de apoptosis por la vía extrínseca, por lo que su regulación de apoptosis podría ser un mecanismo básico en el que convergen ambas vías.

La mitocondria participa en la activación de apoptosis por la vía intrínseca, liberando citocromo C y activando el apoptosoma. Sin embargo, DRO1 no ejerce su función apoptótica en la mitocondria de forma directa, ya que tras el estímulo apoptótico se produce su translocación desde el aparato de Golgi hasta el retículo endoplasmático. Esta translocación sugiere que DRO1 podría estar implicado en la producción de apoptosis por estrés en el retículo endoplasmático. Durante el estrés en el retículo endoplasmático se activan las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl2 y la translocación de Bax y Bak a la mitocondria donde oligomerizan para formar poros en la membrana mitocondrial. Finalmente, a través de estos poros se libera el citocromo C al citosol, donde se produce la activación de las caspasas y se inicia el proceso de apoptosis. Además, Bax y Bak también son capaces de oligomerizar en la membrana del retículo endoplasmático causando la liberación de Ca^{2+} al citosol (Revisado en Schröder 2007). Curiosamente, se ha descrito que BCLAF1 regula a Bax (Rénert et al. 2009), y en nuestro estudio hemos observado que DRO1 aumenta la expresión de BCLAF1. Por lo tanto, el hecho de que la

expresión de DRO1 induzca la expresión de BCLAF1 y se transloque al retículo endoplasmático tras el estímulo apoptótico apoya la implicación de DRO1 en la apoptosis por estrés en el retículo endoplasmático.

Por otra parte, AIB1 es un oncogén con actividad antiapoptótica capaz de activar la vía de señalización de IGF-1/Akt (Torres-Arzayus et al 2004). Además, AIB1 impide la activación de la vía JNK/c-Jun inducida por estrés favoreciendo la fosforilación y activación de AKT y de la subunidad p65 de NFκB para promover la supervivencia celular (Horiguchi et al. 2006). En nuestro estudio hemos podido profundizar en el papel antiapoptótico de AIB1 y hemos constatado que su silenciamiento produce un aumento de apoptosis. El silenciamiento simultáneo de AIB1 y DRO1 no varió los niveles de apoptosis con respecto al control, sugiriendo que la actividad antiapoptótica de AIB1 está en gran parte mediada por la inhibición de la expresión de DRO1. De acuerdo con esta hipótesis, el silenciamiento de AIB1 en células MCF-7 provocó un aumento de la expresión de DRO1, confirmando la represión de DRO1 por AIB1. Por lo tanto, aunque la inhibición de la apoptosis dependiente de AIB1 podría estar también mediada por otras vías como la sobreexpresión de IGF-1 y la sobreactivación de AKT, nuestros resultados revelan que DRO1 es una diana importante de AIB1 para prevenir la apoptosis. Esta regulación nos proporciona un nuevo mecanismo que explica el papel de AIB1 como oncogén. Sin embargo, la sobreexpresión

de AIB1 no siempre va acompañada de la represión de DRO1 y la inhibición de apoptosis ya que el silenciamiento de AIB1 en células BT-474 no restauró la expresión de DRO1 ni el aumento de apoptosis (Figura 15C). Una explicación es la sobreexpresión de Her2 en esta línea celular (Eltner et al. 2002), que reprimiría por una lado la expresión de DRO1 y por otro activaría mecanismos antiapoptóticos.

2.2- Papel de DRO1 en migración transendotelial

Las proteínas de la matriz extracelular y de adhesión celular están constituidas por macromoléculas de naturaleza fibrosa (colágeno y elastina), proteoglicanos y glicoproteínas que permiten el anclaje de las células, y confieren las propiedades de turgencia y rigidez propias de cada tejido (Lu et al. 2012). Aunque la matriz extracelular está estrechamente regulada durante la organogénesis y la homeostasis de los tejidos, en patologías como el cáncer se desregula y facilita la progresión tumoral y metastasis. En nuestro estudio hemos localizado a DRO1 en el perfil celular y en el medio de cultivo como proteína de secreción, sugiriendo que DRO1 es una proteína asociada a la matriz extracelular. Además, la expresión de DRO1 produce cambios en la expresión de genes de proteínas de la matriz extracelular y de adhesión celular. Entre estos genes se encuentran colágenos, como COL1A1 y COL6A2, que se encuentran reprimidos. También está

disminuida la expresión de algunas subunidades de integrinas como ITGAM, ITGB4 e ITGB5. Las integrinas son proteínas transmembrana formadas por heterodímeros de subunidades α y β , que median la adhesión célula-matriz y célula-célula, transducen señales que regulan la expresión de genes y el crecimiento celular, y pueden estar implicadas en metástasis. La disminución de integrinas podría ser la causante de la pérdida de adhesión celular que observamos al inducir la sobreexpresión de DRO1. El resultado es el crecimiento en mosaico, inhibiéndose la confluencia del cultivo. En este patrón de crecimiento contribuye también el aumento de apoptosis observada, actuando sinérgicamente con la pérdida de adherencia. La expresión de DRO1 también afecta a la expresión de metaloproteasas, disminuyendo la expresión de MMP15 y MMP9 y aumentando la de MMP12. Resulta particularmente interesante que AIB1 regula la transcripción de MMP9 a través del factor de transcripción PEA3 (Qin et al., 2009). Con ello, la regulación de MMP9 dependería de un doble mecanismo dependiente de AIB1 y DRO1 y de la regulación entre ambos. Cabe destacar la disminución de la expresión de ICAM1, una molécula de adhesión calcio-dependiente que es reconocida por integrinas- β 2 (halladas en leucocitos), integrina- α L e integrina- α M. ICAM1 está activada por estímulos inflamatorios como TNF α e IL1 (Dustin et al. 1986) y su activación es importante en adhesión y migración de neutrófilos circulantes y monocitos que se unen a ICAM1 a través de las integrinas- β 2. Además, la

disminución de los niveles de ICAM1 está relacionada con una menor formación de metástasis (Rosette 2005). Por tanto, nuestros resultados apuntan a ICAM1 como uno de los mecanismos que utiliza DRO1 para disminuir la migración y adhesión celulares.

El efecto de DRO1 sobre la expresión de las citadas proteínas de matriz extracelular y moléculas de adhesión celular nos sugirió que DRO1 podría ser un factor importante en la prevención de metástasis. El estudio de la migración transendotelial nos reveló que las células que expresan DRO1 tienen menor capacidad de atravesar la barrera endotelial. Una interpretación de este resultado es la mayor dificultad de la célula cancerosa para adherirse al endotelio por falta de ICAM1 y de integrinas. Sin embargo, serían necesarios futuros ensayos para conocer el mecanismo preciso por el que DRO1 disminuye la migración transendotelial.

2.3- Papel de DRO1 en proliferación celular

Nuestros resultados sugieren que DRO1 interacciona con el factor de transcripción PLZF. PLZF contiene un dominio conservado en represores transcripcionales y existen diversos estudios que han relacionado a PLZF con el control negativo de la proliferación, la diferenciación celular y el aumento de apoptosis (Shaknovich et al. 1998). De hecho, PLZF es capaz de

regular la progresión del ciclo celular gracias a su unión a los promotores de genes como ciclina A (Yeyati et al. 1999; Rho et al. 2006) o c-myc (McConnell et al. 2003), los cuales son reprimidos por PLZF. Además, en estudios previos en nuestro laboratorio se ha observado que la expresión de DRO1 en células MCF7 reprime la expresión de ciclina A, mientras que el silenciamiento de PLZF la aumenta, aunque este aumento es menor cuando se expresa DRO1 (Avivar 2008). Por lo tanto, la interacción de DRO1 con PLZF podría constituir una nueva función celular de DRO1 actuando como correpresor transcripcional de genes reguladores del ciclo celular.

Conjuntamente, nuestro estudio también muestra que la inducción de DRO1 disminuye la expresión de genes reguladores del ciclo celular como MCM2, una proteína importante en el inicio de la replicación del DNA y en la división celular (Mincheva et al. 1994). Por el contrario, la expresión de DRO1 condujo al aumento de RBBP8, una proteína nuclear que se une directamente a la proteína del retinoblastoma (RB) haciendo de puente de unión entre RB y CtBP (Meloni et al. 1999). Por lo tanto RBBP8 permite la formación del complejo E2F/RB/RBBP8/CtBP encargado de la represión transcripcional que conduce a la detención del crecimiento celular por daño al DNA, regulando así la proliferación celular y actuando como supresor tumoral (Liao et al 2010). De este modo, es posible que la disminución de la expresión de MCM2 por DRO1 impida la replicación del DNA

y división celular, y el aumento de RBBP8 medie la inhibición de la proliferación tras daño al DNA.

Estos resultados apoyan, por tanto, la función de DRO1 como supresor tumoral y sugieren los posibles mecanismos por los que realiza dicha acción. Sin embargo, en nuestro estudio no hemos observado una disminución de la proliferación celular tras la expresión de DRO1. Esta contradicción podría tener diferentes explicaciones. Por una parte, existe la posibilidad que otros mecanismos celulares independientes de DRO1 jueguen un papel de mayor importancia en la regulación de la proliferación en la línea celular empleada. Por otra parte, al igual que ocurre con la proteína de retinoblastoma, DRO1 podría ser un inhibidor de la proliferación celular que requiriera de una activación previa o de sus efectores tras sufrir un daño celular. A pesar de todo, las evidencias observadas aportan una información importante que sugiere el papel de DRO1 como regulador de la proliferación celular. Por lo tanto, sería interesante desarrollar nuevos estudios al respecto para profundizar en el papel de DRO1 como regulador de la proliferación, así como para determinar los mecanismos por los que realiza dicha acción.

3- DRO1 y metabolismo

Uno de los tejidos en los que más se expresa DRO1 es el adiposo, y lo hace tanto en la grasa marrón (Aoki et al. 2002)

como en la blanca (Okada et al. 2008). El tejido adiposo es un órgano muy importante en metabolismo, tanto por su función como almacén de energía en forma de grasa como por su función endocrina en la secreción de adipocitoquinas. Los niveles de DRO1 en el tejido adiposo se encuentran directamente relacionados con los niveles de adiponectina, estando ambos disminuidos en obesidad y síndrome metabólico (Okada et al 2008). Dado el efecto antiinflamatorio de la adiponectina y su capacidad de activar a AMPK favoreciendo el catabolismo de lípidos en el hígado (Rogers et al. 2008), es factible pensar que DRO1 ejerza también un efecto positivo sobre el metabolismo lipídico. A pesar de los estudios que muestran la necesidad de DRO1 en la adipogénesis (Tremblay et al. 2009), las claves de la función fisiológica de DRO1 nos vendrán dadas mediante el estudio de ratones deficientes en DRO1.

En nuestro estudio hemos identificado diversos genes implicados en metabolismo y diabetes cuya expresión se encuentra regulada tras la inducción de DRO1. Cabe destacar la disminución de la expresión de las citoquinas IL-6 y TNF α , cuyos niveles se encuentran elevados en obesidad activando la respuesta inflamatoria e induciendo la resistencia a insulina típica del síndrome metabólico (Mauri & Brichard 2010). Esto, unido al hecho de que DRO1 se encuentra disminuido en tejido adiposo de ratones obesos (Okada et. al. 2008), sugiere que DRO1 es importante para prevenir la obesidad característica del

síndrome metabólico. Sin embargo, los niveles de IRS2 e IGFBP5, proteínas efectoras de la señalización por insulina, se encuentran disminuidos tras expresar DRO1. Por lo tanto, la inhibición de resistencia a insulina por DRO1 debe ocurrir por un mecanismo posterior al efecto de estos mediadores o mediante una vía independiente de la activación del receptor de insulina. Una posibilidad es la disminución de los niveles de G6PD tras la inducción de DRO1, ya que la sobreexpresión de G6PD produce un aumento de la lipogénesis. Esto conduce a un aumento de triglicéridos y ácidos grasos libres que son claves en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Park et al. 2005).

Además, en nuestro estudio también hemos observado que la expresión de DRO1 disminuye los niveles de la enzima NOS3. Esta enzima tiene un papel importante en el metabolismo activando la biogénesis mitocondrial para producir ATP (Nisoli et al. 2003). Por otra parte, un gen aumentado tras la inducción de DRO1 es PRKAA1. La activación de PRKAA1 por fosforilación es estimulada por adiponectina (Yamauchi et al. 2002) y conduce a la activación de SIRT1, aumentando los niveles de NAD⁺ y produciendo la desacetilación y regulación de la actividad de factores de transcripción implicados en metabolismo como PPAR γ 1 α , FOXO1A y FOXO3A (Cantó et al 2009).

De manera similar al comportamiento endocrino del tejido adiposo en la secreción de adipocitoquinas, nuestros resultados

muestran que también son capaces de secretar DRO1. Además, la secreción de DRO1 por células de grasa subcutánea está muy disminuida en ratones IRS2-KO, pero es rescatada por la expresión del transgen CDK4. Sin embargo, la expresión del transgen CDK4 en ratones IRS2 silvestre no produce ningún cambio en la secreción de DRO1. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la secreción o la síntesis de DRO1 está modulada de manera conjunta por IRS2 y CDK4. Además, es interesante destacar que los ratones IRS2-KO terminan desarrollando diabetes (Withers et al 1998) y lo mismo ocurre tras la pérdida de expresión de CDK4 (Rane et al. 1999). Curiosamente, la expresión de CDK4 rescata de la diabetes a los ratones IRS2-KO (Burks 2008). Estos fenotipos guardan una relación interesante con lo que ocurre con la secreción de DRO1, lo que sugiere que DRO1 podría estar involucrado en dichos procesos.

En conjunto, los resultados obtenidos apuntan a que DRO1 pudiera estar jugando un papel importante en el metabolismo y pudiera estar correlacionado con la aparición de enfermedades metabólicas. De ser esto cierto, se podrían desarrollar diferentes estrategias que modulen la expresión y/o secreción de DRO1 para ayudar a prevenir y/o tratar diferentes enfermedades metabólicas como la obesidad y la resistencia periférica a insulina. Sin embargo, serán necesarios más estudios en el futuro para validar la relevancia de DRO1 en el metabolismo (por ejemplo a través de ratones deficientes en DRO1) y

elucidar los mecanismos celulares y fisiológicos en los que DRO1 participa en el control metabólico.

4- La fosforilación de AIB1 en S728 lo excluye de la cromatina pero favorece la interacción con ER α y TFIIE α

La fosforilación de proteínas tras la entrada en mitosis y su desfosforilación a la salida son procesos que requieren una regulación precisa para mantener la integridad del ciclo celular. Nuestros resultados han demostrado que AIB1 se fosforila en las serinas 728 y 867 durante la mitosis mediante el complejo CDK1/Ciclina B, y es desfosforilado, muy posiblemente por PP1, a la salida de mitosis (Ferrero et al. 2011). Coincidiendo con esta fosforilación, hemos observado que AIB1 se excluye de la cromatina durante mitosis. Durante la interfase, los factores de transcripción y proteínas asociadas se encuentran frecuentemente distribuidos homogéneamente en el núcleo de las células. Muchas de estas proteínas, como la RNA polimerasa II, son desalojadas de la cromatina durante la mitosis, mientras que otras como TFIID y TFIIB permanecen asociadas a los promotores de los genes activos durante la mitosis (Christova & Oelgeschlager 2002). Curiosamente, la fosforilación del coactivador transcripcional BRG1 durante la mitosis está relacionada también con la exclusión de la cromatina, aunque no

impide su asociación con el factor de transcripción SNF5 (Muchardt et al. 1996). En el caso de AIB1, mutaciones que mimetizan o bloquean la fosforilación en S728 tampoco alteran su capacidad de interactuar con ER α ni su capacidad de coactivar a ER α . Incluso dicha fosforilación es capaz de aumentar la afinidad de AIB1 por el factor de transcripción TFIIE α . Sin embargo, mutaciones puntuales en S728 de AIB1 no alteran su actividad transcripcional endógena ni su capacidad de coactivar al ER α (Ferrero et al. 2011) Estos resultados revelan que la fosforilación de AIB1 en S728 por CDK1 no regula su actividad pero coincide con su restricción física de la cromatina, constituyendo un mecanismo alternativo de regulación transcripcional durante mitosis. Es posible que esta exclusión de la cromatina sirva para impedir la transcripción inadecuada de genes (por ejemplo ciclinas D1, A1 y A2) durante la mitosis. Finalmente, la desfosforilación de AIB1 a la salida de mitosis restauraría su capacidad de coactivar la transcripción de genes implicados en progresión a través de la fase G1. Por lo tanto, la desfosforilación de AIB1 podría representar un nueva diana terapéutica frente a los cánceres dependientes de AIB1.

CONCLUSIONES

1. La transcripción de DRO1 está reprimida por AIB1 y por los oncogenes *v-H-ras*, *v-src* y HER2, coincidiendo con la disminución de los niveles de proteína.
2. La transcripción de DRO1 está inversamente regulada por moduladores del receptor de estrógenos.
3. AIB1 reprime a DRO1 a través de una región distal en su promotor, situada entre las bases -4813 y -3795.
4. DRO1 tiene actividad apoptótica y sensibiliza a estímulos apoptóticos.
5. El efecto antiapoptótico de AIB1 en células MCF-7 depende de la represión de DRO1.
6. DRO1 inhibe la migración transendotelial de células MCF-7.
7. DRO1 podría estar regulando el ciclo celular mediante interacción con PLZF y regulando la expresión de MCM2 y RBBP8.
8. DRO1 es una proteína de secreción.
9. La secreción de DRO1 está modulada por IRS2 y CDK4 en células de grasa subcutánea de ratón.
10. La expresión de DRO1 modula la expresión de genes importantes para el metabolismo y podría proteger contra el síndrome metabólico.

11. La fosforilación de AIB1 por CDK1 en S728 ocurre exclusivamente en células mitóticas.
12. La fosforilación de AIB1 por CDK1 en S728 lo excluye de la cromatina. Esta exclusión podría actuar como un mecanismo potencial de la regulación transcripcional durante la mitosis.

ABREVIATURAS

BFA: Brefeldina A

BSA: Albúmina de suero bovino

dNTP: desoxiribonucleótido trifosfato

DE: Desviación estándar

E2: Estradiol

EE: Error estándar

ER: Receptor de estrógenos

ERE: Elemento de respuesta a estrógenos

g: unidad de medida equivalente a la fuerza de la gravedad

h: Horas

H₂O: agua

HS: suero de caballo (“Horse Serum”)

IF: inmunofluorescencia

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

KDa: Kilo Dalton

LB: medio de cultivo Luria Bertani

pb: pares de bases

PBS: “Phosphate buffered saline”

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PM: peso molecular

p/v: proporción peso/volumen

qPCR: PCR cuantitativa

RE: Retículo endoplasmático

RT: transcripción reversa

TEM: migración transendotelial

Tg: gen transgénico (ej: AIB1-tg)

TUNEL: “TdT-mediated dUTP nick end labeling”

UV: radiación ultravioleta

WB: western blot

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.M., Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**: 1324-1337.
- Agbunag, C., Bar-Sagi, D. (2004). Oncogenic K-ras drives cell cycle progression and phenotypic conversion of primary pancreatic duct epithelial cells. *Cancer Res.* **64(16)**: 5659-5663.
- Albihn, A., Johnsen, J.I., Henriksson, M.A. (2010). MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv. Cancer Res.* **107**: 163-224.
- 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., Mancini, M.A. (2007). Regulation of SRC-3 intercompartmental dynamics by estrogen receptor and phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **27**, 6913-6932.
- Andera, L. (2009). Signaling activated by the death receptors of the TNFR family. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **153(3)**: 173-180.
- 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., Meltzer, P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **277**: 965-968.
- Aoki, K., Sun, Y.J., Aoki, S., Wada, K., and Wada, E. (2002). Cloning, expression, and mapping of a gene that is upregulated in adipose tissue of mice deficient in bombesin receptor subtype-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290(4)**: 1282-1288.
- Apostolakis, E.M., Ramamurphy, M., Zhou, D., Oñate, S., O'Malley, B.W. (2002). Acute disruption of select steroid receptor coactivators prevents

reproductive behaviour in rats and unmasks genetic adaptation in knockout mice. *Mol. Endocrinol.* **16**: 1551-1523.

-Arden, K.C. (2007). FoxOs in tumour suppression and stem cell maintenance. *Cell* **128**: 235-237.

-Arimura, A., van Perr, M., Schroder, A.J., Rothman, P.B. (2004). The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA-3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6. *J. Biol. Chem.* **279**:31105-12.

-Artandi, S.E., DePinho, R.A. (2009). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* **31**(1): 9-18.

-Atkinson, H.J., Babbitt, P.C. (2009). An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations. *PLoS Comput. Biol.* **5**(10):e1000541.

-Auger, A.P., Tetel, M.J., McCarthy, M.M. (2000). Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7551-7555.

-Avivar, A. (2008). Bases moleculares de la oncogénesis mediada por AIB1. (Tesis doctoral - Universidad de Granada), (En línea), Disponible en: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1946/1/17571467.pdf> (Consulta: 28 de enero de 2012).

-Baserga, R. (2009). The insulin receptor substrate-1: A biomarker for cancer? *Exp. Cell. Res.* **315**: 727-732.

-Bennett, C.N., Ross, S.E., Longo, K.A., Bajnok, L., Hemati, L., Johnson, N., Harrison, K.W., and MacDougald, O.A. (2002). Regulation of Wnt Signaling during Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 30998-31004.

-Bienz, M., and Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell.* **103**, 311-320.

- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: aging, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 611-622.
- Boerma, E.G., Siebert, R., Kluin, P.M., Baudis, M. (2009). Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge. *Leukemia* **23(2)**: 225-234.
- Bokoch, G.M. (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 743-781.
- Bommer, G.T., Jäger, C., Dürr, E.M., Baehs, S., Eichhorst, S.T., Brabletz, T., Hu, G., Fröhlich, T., Arnold, G., Kress, D.C., Göke, B., Fearon, E.R., Kolligs, T. (2005). DRO1, a Gene Down-regulated by Oncogenes, Mediates Growth Inhibition in Colon and Pancreatic Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **280(9)**: 7962-7975.
- Bottos, A., Martini, M., Di Nicolantonio, F., Comunanza, V., Maione, F., Mináís, A., Appendino, G., Bussolino, F., Bardelli, A. (2012). Targeting oncogenic serine/threonine-protein kinase BRAF in cancer cells inhibits angiogenesis and abrogates hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109(6)**: E353-359.
- Brown, C.J., Lain, S., Verma, C.S., Fersht, A.R., Lane, D.P. (2009). Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat. Rev. Cancer* **9(12)**: 862-873.
- Burks, D.J. (2008). Laboratory of molecular endocrinology. Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, Spain). CIBERDEM Annual Report 2008.
- Cantley, L.C. and Neel, B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4240-4245.

- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458(7241)**: 1056-1060.
- Carapeti, M., Aguilar, R.C., Chase, A., Goldman, J.M., Cross, N.C. (1998). Assignment of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene to human chromosome band 2p23. *Genomics* **52**: 242-244.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **69(Suppl.3)**: 4-10.
- Carroll, R.S., Brown, M., Zhang, J., DiRenzo, J., Font De Mora, J., Black, P.M. (2000). Expression of a subset of steroid receptor cofactors is associated with progesterone receptor expression in meningiomas. *Clin. Cancer Res.* **6(9)**: 3570-3575.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* **132**: 885-896.
- Cascales, M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.* **69**: 36-64.
- Cha, S., Sung, Y.K., Im, S., Kwack, M.H., Kim, K.M. (2005). URB expression in human dermal papilla cells. *Journal of Dermatological Science* **39**: 128-130.
- 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, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W., Stallcup, M.R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* **284**: 2174-2177.

- Chen, S.L., Dowhan, D.H., Hosking, B.M., 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.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell.* **37(3)**: 299-310.
- Christova, R., Oelgeschlager, T. (2002). Association of human TFIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo. *Nat. Cell. Biol.* **4**: 79-82.
- Chung, C.S., Jiang, Y., Cheng, D., Birt, D.F. (2007). Impact of adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene in human colon cancer cell lines on cell cycle arrest by apigenin. *Mol. Carcinog.* **46(9)**: 773-782.
- Coste, A., Louet, J.F., Lagouge, M., Lerin, C., Antal, M.C., Meziane, H., Schoonjans, k., Puigserver, P., O'Malley, B.W., Auwerx, J. (2008). The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 17187-17192.
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* **116**: 205-219.
- del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R., Nuñez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278(5338)**: 687-689.
- Donate, L.E., Blasco, M.A. (2011). Telomeres in cancer and ageing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **366(1561)**: 76-84.
- Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A., Springer, T.A. (1986). Induction by IL1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* **137(1)**: 245-254.

- Eide, B.L., Turck, C.W., Escobedo, J.A. (1995). Identification of Tyr-397 as the primary site of tyrosine phosphorylation and pp60src association in the focal adhesion kinase, pp125FAK. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 2819-2827.
- Elkholi, R., Floros, K.V., Chipuk, J.E. (2011). The role of BH3-Only proteins in tumor cell development, signalling, and treatment. *Genes & Cancer* **2(5)**: 523-537.
- Elstner, E., Williamson, E.A., Zang, C., Fritz, J., Heber, D., Fenner, M., Possinger, K., Koeffler, H.P. (2002). Novel therapeutic approach: Ligands for PPAR γ and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **74(2)**: 155-165.
- Evan, G. and Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* **281**: 1317-1322.
- Fajas, L., Blanchet, E., Annicotte, J.S. (2010). The CDK4-pRB-E2F1 pathway: A new modulator of insulin secretion. *Islets* **2(1)**: 51-53.
- Farmer, S.R.(2006). Transcriptional control of adipocyte formation.. *Cell Metab.* **4**, 263-273.
- Fereshteh, M.P., Tilli, M.T., Kim, S.E., Xu, J., O'Malley, B.W., Wellstein, A., Furth, P.A., 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(10)**: 3697-3706.
- Ferragud, J., Avivar, A., Pla, A., de las Rivas, J., Font de Mora, J. (2011). Transcriptional repression of the tumor supresor DRO1 by AIB1. *FEBS Letters* **585**: 3041-3046.
- Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**: 789-791.
- Ferrero, M. (2010). Mecanismos moleculares que regulan la capacidad oncogénica de AIB1. (Tesis doctoral - Universidad de Valencia), (En línea),

Disponible en: <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/41730/ferro .pdf?sequence=1> (Consulta: 23 de abril de 2012).

-Ferrero, M., Avivar, A., García-Macías, M.C., Font de Mora, J. (2008). Phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling can promote AIB1 stability independently of GSK3 phosphorylation. *Cancer Res.* **68(13)**: 5450-5459.

-Ferrero, M., Ferragud, J., Orlando, L., Valero, L., Sánchez del Pino, M., Farràs, R., Font de Mora, J. (2011). Phosphorylation of AIB1 at mitosis is regulated by CDK1/CYCLIN B. *PLoS ONE* **6(12)**: e28602.

-Ferrero, M., Font de Mora, J. (2011). AIB1: A transcriptional coactivator which integrates signaling cross talk in cancer cells. En: Cell signalling & molecular targets in cancer. Editores: Chatterjee, M., Kashfi, K. Editorial: Springer New York Dordrecht Heidelberg London. p129-166. ISBN 978-1-4614-0729-4.

-Foley, C.J., Luo, C., O'Callaghan, K., Hinds, P.W., Covic, L., Kuliopulos, A. (2012). Matrix metalloprotease-1a promotes tumorigenesis and metastasis. *J. Biol. Chem.* **Doi**: 10.1074/jbc.M112.356303.

-Foley, J., Nickerson, N., Nam, S., Allen, K.T., Gilmore, J.L., Nephew, K.P., Riese, D.J. (2010). EGFR signalling in breast cancer: bad to the bone. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **21(9)**: 951-960.

-Font de Mora, J., Brown, M. (2000). AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol. Cell Biol.* **20**: 5041-5047.

-Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **263**:18545–18552.

-Fulop, T., Larbi, A., Kotb, R., de Angelis, F., Pawelec, G. (2011). Aging, immunity, and cancer. *Discov. Med.* **11(61)**: 537-550.

- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **13(9)**: 1423-1433.
- Ghardi, M., Moreels, M., Chatelain, B., Chatelain, C., Baatout, S. (2012). Radiation-induced double strand breaks and subsequent apoptotic DNA fragmentation in human peripheral blood mononuclear cells. *Int. J. Mol. Med.* doi: 10.3892/ijmn.2012.907.
- Ghosh, S., Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 suppl.**: S81-S96.
- Giamas, G., Castellano, L., Feng, Q., Knippschild, U., Jacob, J., Thomas, R.S., Coombes, R.C., Smith, C.L., Jiao, L.R., Stebbing, J. (2009). CK1delta modulates the transcriptional activity of ERalpha via AIB1 in an estrogen-dependent manner and regulates ERalpha-AIB1 interactions. *Nucleic Acids Res.* **37(9)**: 3110-3123.
- Gilmore, A.P. (2005). Anoikis. *Cell Death Differ.* **12(2)**: 1473-1477.
- Glaeser, M., Floetotto, T., Hanstein, B., Beckman, M.W., Niederacher, D. (2001). Gene amplification and expression of the steroid receptor coactivator SRC3 (AIB1) in sporadic breast and endometrial carcinomas. *Horm. Metab. Res.* **33(3)**: 121-126.
- GLOBOCAN 2008 (IARC) [En línea] Section of Cancer Information [Consulta: 27/2/2012] <<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>>.
- Goh, A.M., Coffill, C.R., Lane, D.P. (2011). The role of mutant p53 in human cancer. *Journal of Pathology* **223**: 116-126.
- Goi, T., Shipitsin, M., Lu, Z., Foster, D.A., Klinz, S.G., Feig, L.A. (2000). An EGF receptor/Ral-GTPase signalling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity. *Embo J.* **19**: 623-630.

- Gojis, O., Rudraraju, B., Alifrangis, C., Krell, J., Libalova, P., Palmieri, C. (2010). The role of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) in human malignant disease. *EJSO* **36**: 224-229.
- Goo, Y.H., Sohn, Y.C., Kim, D.H., Kim, S.W., Kang, M.J., Jung, D.J., Kwak, E., Barlev, N.A., Berger, S.L., Chow, V.T., Roeder, R.G., Azorsa, D.O., Meltzer, P.S., Suh, P.G., Song, E.J., Lee, K.J., Lee, Y.C., Lee, J.W. (2003). Activating signal cointegrator 2 belongs to a novel steady-state complex that contains a subset of trithorax group proteins. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 140-149.
- Gordon, G.M., Du, W. (2011). Conserved RB functions in development and tumor suppression. *Protein Cell.* **2(11)**: 864-878.
- Gorr, S., Darling, D.S. (1995). An N-terminal hydrophobic peak is the sorting signal of regulated secretory proteins. *FEBS Letters* **361(1)**: 8-12.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446(7132)**: 153-158.
- Grinberg, A. (2003). Mechanisms by which IGF-I may promote cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2**: 630-635.
- Gupta, P.B., Fillmore, C.M., Jiang, G., Aspira, S.D., Tao, K., Kuperwasser, C., Lander, E.S. (2011). Stochastic state transitions give to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* **146(4)**: 633-644.
- Gutierrez, M.C., Detre, S., Johnston, S., Mohsin, S.K., Shou, J., Allred, D.C., Schiff, R., Osborne, C.K., Dowsett, M. (2005). Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Clinical Oncology* **23**: 2469-2476.
- Guvakova, M.A., Surmacz, E. (1997). Overexpressed IGF-I receptors reduce estrogen growth requirements, enhance survival, and promote E-cadherin-

mediated cell-cell adhesion in human breast cancer cells. *Exp. Cell. Res.* **231(1)**: 149-162.

-Haiman, C.A., Hankinson, S.E., Spiegelman, D., Colditz, G.A., Willett, W.C., Speizer, F.E., Brown, M., Hunter, D.J. (2000). Polymorphic repeat in AIB1 does not alter breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* **2**: 378-385.

-Hall, A., Karplus, P.A., Poole, L.B. (2009). Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* **276(9)**: 2469-2477.

-Hanahan, D., Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364.

-Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

-Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**: 646-674.

-Harbour, J.W., Dean, D.C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* **14**: 2393-2409.

-Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. *A review. Biochemistry* **62**: 1180- 1190.

-Hayflick, L., Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* **25**: 585-621.

-He, B., Lu, N., Zhou, Z. (2009). Cellular and nuclear degradation during apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21(6)**: 900-912.

-Henke, R.T., Haddad, B.R., Kim, S.E., Rone, J.D., Mani, A., Jessup, J.M., Wellstein, A., Maitra, A., Riegel, A.T. (2004). Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB1 (SRC-3) during progression of pancreatic adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10(18 Pt 1)**: 6134-6142.

-Holbro, T., Civenni, G., Hynes, N.E. (2003). The Erb receptors and their role in cancer progresión. *Exp. Cell Res.* **284**: 99-110.

- Hollander, M.C., Blumenthal, G.M., Dennis, P.A. (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat. Rev. Cancer* **11(4)**: 289-301.
- Horiguchi, K., Arai, S., Nishihara, T., Nishikawa, J. (2006). AIB1 promotes DNA replication by JNK repression and AKT activation during cellular stress. *J. Biochem.* **140**: 409-419.
- Hsing, A.W., Chokkalingam, A.P., Gao, Y.T., Wu, G., Wang, X., Deng, J., Cheng, J., Sesterhenn, I.A., Mostofi, F.K., Chiang, T., Chen, Y.L., Stancyk, F.Z., Chang, C. (2002). Polymorphic CAG/CAA repeat length in the AIB1/SRC-3 gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **11(4)**: 337-341.
- Huang, Z.J., Edery, I., Rosbash, M. (1993). PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. *Nature* **364**: 259-262.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G., Kemler, R. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech. Dev.* **59(1)**: 3-10.
- Hunker, C.M., Galvis, A., Veisaga, M.L., Barbieri, M.A. (2006). Rin1 is a negative regulator of the IL3 receptor signal transduction pathways. *Anticancer Res.* **26(2A)**: 905-916.
- Hurtado, A., Holmes, K.A., Geistlinger, T.R., Hutcheson, I.R., Nicholson, R.I., Brown, M., Jiang, J., Howat, W.J., Ali, S., Carroll, J.S. (2008). ERBB2 regulation by estrogen receptor-Pax2 determines tamoxifen response. *Nature* **456(7222)**: 663-666.
- Ichinose, A., Bottenus, R.E. and Davie, E.W. (1990). Structure of transglutaminases. *J. Biol. Chem.* **265**, 13411-13414.
- Igney, F.H. and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2(4)**: 277-288.

- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Jang, J.Y., Lee, C.E. (2006). IL-4-induced upregulation of adenine nucleotide translocase 3 and its role in Th cell survival from apoptosis. *Cell Immunol.* **241(1)**: 14-25.
- Jiang, B.H., Liu, L.Z. (2009). PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* **102**: 19-65.
- Junttila, M.R., Evan, G.I. (2009). P53 - a Jack of all trades but master of none. *Nat. Rev. Cancer* **9**: 821-829.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**: 403-414.
- Karar, J., Maity, A. (2011). PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* **4**: 51.
- Kasof, G.M., Goyal, L., White, E. (1999). Btf, a novel death-promoting transcriptional repressor that interacts with Bcl-2-related proteins. *Molec. Cell. Biol.* **19**: 4390-4404.
- Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**: 745-751.
- Kershah, S.M., Desouki, M.M., Koterba, K.L., Rowan, B.G. (2004). Expression of estrogen receptor coregulators in normal and malignant human endometrium. *Gynecol. Oncol.* **92(1)**: 304-313.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**: 52-67.
- Koh, S.S., Chen, D., Lee, Y.H., Stallcup, M.R. (2001). Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two

- coactivators with protein methyltransferase activities. *J. Biol. Chem.* **276**: 1089-1098.
- Kolligs, F.T., Bommer, G., and Goke, B. (2002). Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestión* **66**, 131-144.
- Lahusen, T., Fereshteh, M., Oh, A., Wellstein, A., 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., Riegel, A.T. (2009). The role and regulation of the nuclear receptor co-activator AIB1 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **116(2)**: 225-237.
- Larizza, L., Gervasini, C., Natacci, F., Riva, P. (2009). Developmental abnormalities and cancer predisposition in neurofibromatosis type 1. *Curr. Mol. Med.* **9(5)**: 634-653.
- Lee, K., Lee, A., Song, B.J., Kang, C.S. (2011). Expression of AIB1 protein as a prognostic factor in breast cancer. *World J. Surg. Oncol.* **9**: 139.
- Lee, S.K., Kim, H.J., Na, S.Y., Kim, T.S., Choi, H.S., Im, S.Y., et al. (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**: 16651-4.
- Levav-Cohen, Y., Haupt, S., Haupt, Y. (2005). Mdm2 in growth signalling and cancer. *Growth Factors* **23(3)**: 183-192.
- Li, A.J., Lerner, D.L., Gapuzan, M.E., 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., O'Malley, B.W. (2008). Essential phosphatases and a phosphor-degron are critical for

regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function and turnover. *Mol. Cell.* **31(6)**: 835-849.

-Li, H., Gomes, P.J., 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, S., Shang, Y. (2007). Regulation of SRC family coactivators by post-translational modifications. *Cellular Signalling* **19**: 1101-1112.

-Liao, C.C., Tsai, C.Y., Chang, W.C., Lee, W.H., Wang, J.M. (2010). RB-E2F1 complex mediates DNA damage responses through transcriptional regulation of ZBRK1. *J. Biol. Chem.* **285(43)**: 33134-33143.

-Lin, A., Karin, M. (2003). NFκB in cancer: a marked target. *Semin. Cancer Biol.* **13**: 107-114.

-Lin, E.A., Liu, C.J. (2010). The role of ADAMTSs in arthritis. *Protein cell.* **1(1)**: 33-47.

-Lin, J., Handschin, C., Spiegelman, B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* **1**:361-370.

-Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., Russell, R.B. (2003). Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure.* **11(11)**:1453-1459.

-Lim, K.H., Ancrile, B.B., Kashatus, D.F., Counter, C.M. (2008). Tumour maintenance is mediated by eNOS. *Nature* **452**: 646-649.

-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., Zeng, Y.X. (2008). Overexpression of AIB1 in nasopharyngeal carcinomas correlates closely with advanced tumor stage. *Am. J. Clin. Pathol.* **129(5)**: 728-734.

-Liu, Y., Monticone, M., Tonachini, L., Mastrogiacomo, M., Marigo, V., Cancedda, R., Castagnola, P. (2004). URB expression in human bone marrow

stromal cells and during mouse development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**; **322(2)**: 497-507.

-Long, W., Yi, P., Amazit, L., LaMarca, H.L., Ashcroft, F., Kumar, R., Mancini, M.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (2010). SRC-3 Δ 4 mediates the interaction of EGFR with FAK to promote cell migration. *Mol. Cell.* **37(3)**: 321-332.

-Louet, J.F., Coste, A., Amazit, L., Tannour-Louet, M., Wu, R., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Auwerx, J., O'Malley, B.W. (2006). Oncogenic steroid coactivator-3 is a key regulator of the white adipogenic program. *PNAS* **103**: 17868-17873.

-Louie, M.C., Zou, J.X., Rabinovich, A., Chen, H.W. (2004). ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol. Cell Biol.* **24**: 5157-71.

-Louie, M.C., Revenko, A.S., Zou, J.X., Yao, J., 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.

-Lowe, S.W., Cepero, E., Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**: 307-315.

-Lu, P., Weaver, V.M., Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J. Cell. Biol.* **196**: 497-511.

-Lukashev, M.E. and Werb, Z. (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* **8**: 437-441.

-Luo, J.H., Xie, D., Liu, M.Z., Chen, W., Liu, Y.D., Wu, G.Q., Kung, H.F., Zeng, Y.X., 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(11)**: 2554-2561.

- Lupas, A., Van Dyke, M., Stock, M. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*. **252(5009)**:1162-1164.
- Ma, C., Wang, X. (2008). In vitro assays for the extracellular matrix protein-regulated extravasation process. *Cold Spring Harb. Laboratory Press* **3(8)**: 1-5.
- Mac Gabhann, F., Popel, A.S. (2008). Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation* **15**: 715-738.
- Marcantonio, D., Chalifour, L.E., Alaoui-Jamali, M.A., Huynh, H.T. (2001). Steroid-sensitive gene-1 is an androgen-regulated gene expressed in prostatic smooth muscle cells in vivo. *Journal of Molecular Endocrinology* **26**: 175-184.
- Marcantonio, D., Chalifour, L.E., Alaoui-Jamali, M.A., Alpert, L., Huynh, H.T. (2001). Cloning and characterization of a novel gene that is regulated by estrogen and is associated with mammary gland carcinogenesis. *Endocrinology* **142(6)**: 2409-2418.
- Matheny, R.W., Adamo, M.L. (2009). Current perspectives on Akt activation and Akt-ions. *Exp. Biol. Med.* **234(11)**: 1264-1270.
- Maury, E., & Brichard, S.M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **314**: 1-16.
- McCarthy, J.V., Ni, J., Dixit, V.M. (1998). RIP2 is a novel NF-kappa-B-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* **273**: 16968-16975.
- McConnell, M.J., Chevallier, N., Berkofsky-Fessler, W., Giltane, J.M., Malani, R.B., Staudt, L.M., Licht, J.D. (2003). Growth suppression by acute promyelocytic leukaemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol. Cell. Biol.* **23(24)**: 9375-9388.
- McKenna, N.J., O'Malley, B.W. (2002). Combinational control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **108**: 465-474.

- 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., Rosenfeld, M.G. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev.* **12(21)**: 3357-3368.
- Meloni, A.R., Smith, E.J., Nevins, J.R. (1999). A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96(17)**: 9574-9579.
- Mendelsohn, M.E., Karas, R.H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* **340**: 1801-1811.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* **15(6)**: 1292-1300.
- Miller, T.W., Balko, J.M., Fox, E.M., Ghazoui, Z., Dunbier, A., Anderson, H., Dowsett, M., et al. (2011). ER α -dependent E2F transcription can mediate resistance to estrogen deprivation in human breast cancer. *Cancer Discov.* **1(4)**: 338-351.
- Mincheva, A., Todorov, I., Werner, D., Fink, T. M., Lichter, P. (1994). The human gene for nuclear protein BM28 (CDCL1), a new member of the early S-phase family of proteins, maps to chromosome band 3q21. *Cytogenet. Cell Genet.* **65**: 276-277.
- Minjgee, M., Toulany, M., Kehlbach, R., Giehl, K., Rodemann, H.P. (2011). K-RAS(V12) induces autocrine production of EGFR ligands and mediates radioresistance through EGFR-dependent Akt signaling and activation of DNA-PKcs. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **81(5)**: 1506-1514.
- Miyakawa, K., Hatsuzawa, K., Kurokawa, T., Asada, M., Kuroiwa, T., Imamura, T. (1999). A hydrophobic region locating at the center of fibroblast

growth factor-9 is crucial for its secretion. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 29352-29357.

-Morali, O.G., Delmas, V., Moore, R., Jeanney, C., Thiery, J.P., Larue, L. (2001). IGF-II induces rapid β -catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene* **20**: 4942-4950.

-Mu, H., Ohta, K., Kuriyama, S., Shimada, N., Tanihara, H., Yasuda, K., Tanaka, H. (2003). Equarin, a novel soluble molecule expressed with polarity at chick embryonic lens equator, is involved in eye formation. *Mechanisms of Development* **120**: 143-155.

-Muchardt, C., Reyes, J.C., Bourachot, B., Leguoy, E., 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.

-Muraglia, A., Cancedda, R., Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.* **113**: 1161-1166.

-Murre, C., McCaw, P.S., Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**: 777-783.

-Mussi, P., Yu, C., O'Malley, B.M., Xu, J. (2006). Stimulation of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) gene overexpression by a positive regulatory loop of E2F1 and SRC-3. *Molecular endocrinology* **20(12)**: 3105-3119.

-Nabetani, A., Ishikawa, F. (2011). Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *J. Biochem.* **149(1)**: 5-14.

-Naeem, H., Cheng, D., Zhao, Q., Underhill, C., Tini, M., Bedford, M.T., Torchia, J. (2006). The activity and stability of the transcriptional coactivator

p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-Dependent methylation. *Mol. Cell Biol.* **27**: 120-134.

-Nakuci, E., Mahner, S., Drenzo, J., ElShamy, W.M. (2006). BRCA1-IRIS regulates cyclin D1 expression in breast cancer cells. *Exp. Cell. Res.* **312(16)**: 3120-3131.

-Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonillo, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolín, M., Moncada, S., Carruba, M.O. (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: The role of endogenous nitric oxide. *Science* **299** (5608): 896-899.

-Normanno, N., Di Maio, M., De Maio, E., De Luca, A., de Matteis, A., Giordano, A., Perrone, F. (2005). Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer.* **12**: 721-747.

-Oh, A., List, H.J., Reiter, R., Mani, A., Zhang, Y., Gehan, E., Wellstein, A., Riegel, A.T. (2004). The nuclear receptor coactivator AIB1 mediates insulin-like growth factor 1-induced phenotypic changes in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **64(22)**: 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., 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(21)**: 6580-6593.

-Ohki-Hamazaki, H., Watase, K., Yamamoto, K., Ogura, H., Yamano, M., Yamada, K., Maeno, H., Imaki, H., Kikuyama, S., Wada, E., and Wada, K. (1997). Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity. *Nature* **390**: 165-169.

-Okada, T., Nishiazawa, H., Kurata, A., Tamba, S., Sonoda, M., Yasui, A., Kuroda, Y., Hibuse, T., Maeda, N., Kihara, S., Hadama, T., Tobita, K., Akamatsu, S., Maeda, K., Shimomura, I., and Funahashi, T. (2008). URB is

abundantly expressed in adipose tissue and dysregulated in obesity. *Biochem. And Biophys. Res. Commun.* **367**: 370-376.

-Okegawa, T., Pong, R.C., Li, Y., Hsieh, J.T. (2004). The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochimica Polonica* **51(2)**: 445-457.

-OMS 2012. Cáncer [En línea] Nota descriptiva N°297 [Consulta: 27/2/2012] < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html> >

-Oñate, S.A., Boonyaratanakornkit, V., Spencer, T.E. Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Edwards, D.P., O'Malley, B.W. (1998). The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J. Biol. Chem.* **273**: 12101-12108.

-Oñate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., 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., et al. (2003). Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J. Natl. Cancer inst.* **95**: 353-361.

-Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M., Donner, D.B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**: 82-85.

-Pages, f., Vives, V., Sautes-Fridman, C., Fossiez, F., Berger, a., Cugnenc, P.H., et al. (1999). Control of tumor development by intratumoral cytokines. *Immunol. Lett.* **68**: 135-139.

-Paik, J.H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., et al. (2007). FoxOs are lineage-restricted redundant tumour suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* **128**: 309-323.

- Pappou, E.P., Ahuja, N. (2010). The role of oncogenes in gastrointestinal cancer. *Gastrointestinal Cancer Res. Nov-Dec Supplement 1*: S2-S15
- Park, J., Rho, H.K., Kim, K.H., Choe, S.S., Lee, Y.S., Kim, J.B. (2005). Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Mol. Cell. Biol.* **25(12)**: 5146-5157.
- Pawlowski, K., Muszewska, A., Lenart, A., Szczepinska, T., Godzik, A., Grynberg, M. (2010). A widespread peroxiredoxin-like domain present in tumor suppression- and progression-implicated proteins. *BMC Genomics* **11**: 590.
- Pennington, K.N., Taylor, J.A., Bren, G.D., Paya, C.V. (2001). I κ B kinase-dependent chronic activation of NF- κ B is necessary for p21WAF1/Cip1 inhibition of differentiation-induced apoptosis of monocytes. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 1930-1941.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T., Fesik, S.W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1644**: 83-94.
- Picard, F., Gehin, M., Annicotte, J., Rocchi, S., Champy, M.F., O'Malley, B.W. Chambon, P., Auwerx, J. (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* **111**: 931-941.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**:143-147.
- Planas-Silva, M.D., Shang, Y., Donaher, J.L., Brown, M., Weinberg, R.A. (2001). AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Res.* **61**, 3858-3862.

- Platz, E.A., Giovannucci, E., Brown, M., Cieluch, C., Shepard, T.F., Stampfer, M.J., Kantoff, P.W. (2000). Amplified in breast cancer-1 glutamine repeat and prostate cancer risk. *Prostate J.* **2**: 27-32.
- Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., Spiegelman, B.M. (1999). Activation of PPAR γ coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* **286**: 1368-1371.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptative thermogenesis. *Cell* **92(6)**: 829-839.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* **11(11)**: 761-774.
- Qi, Y., Grishin, N.V. (2005). Structural classification of thioredoxin-like fold proteins. *Proteins*. **58(2)**:376-388.
- Qin, L., Liu, Z., Chen, H., Xu, J. (2009). The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer Res.* **69(9)**: 3819-3827.
- Ramos, J.C., Sin, S.H., Staudt, M.R., Roy, D., Vahrson, W., Dezube, B.J., Harrington, W. Jr., Dittmer, D.P. (2011). Nuclear factor kappa B (NFkB) pathway associated biomarkers in AIDS defining malignancies. *Int. J. Cancer* doi: 10.1002/ijc.26302.
- Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P., Barbacid, M. (1999). Loss of cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* **22**: 44-52.
- Raynaud, C.M., Hernandez, J., Llorca, F.P., Nuciforo, Mathieu, M.C., Commo, F., Delalogue, S., Sabatier, L., André, F., Soria, J.C. (2010). DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* **33(4)**: 341-345.

- Rénert, A.F., Leprince, P., Dieu, M., Renault, J., Raes, M., Bours, V., Chapelle, J.P., Piette, J., Merville, M.P., Fillet, M. (2009). The proapoptotic C16-ceramide-dependent pathway requires the death-promoting factor Btf in colon adenocarcinoma cells. *J. Proteome Res.* **8(10)**: 4810-4822.
- Rho, S.B., Park, Y.G., Park, K., Lee, S.H., Lee, J.H. (2006). A novel cervical cancer suppressor 3 (CCS-3) interacts with the BTB domain of PLZF and inhibits the cell growth by inducing apoptosis. *FEBS Lett.* **580(17)**: 4073-4080.
- Roa, I., Melo, J., Araya, J., Villaseca, M., de Aretxabala, X. (2000). Mutación del gen p53 en el cáncer de la vesícula biliar.
- Roberts, D.L., Dive, C., Renehan, A.G. (2010). Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. *Annu. Rev. Med.* **61**: 301-316.
- Rogers, C.Q., Ajmo, J.M., You, M. (2008). Adiponectin and alcoholic fatty liver disease. *IUBMB Life* **60(12)**: 790-797.
- Rogosnitzky, M., Danks, R. (2010). Validation of blood testing for K-ras mutations in colorectal and pancreatic cancer. *Anticancer Res.* **30(7)**: 2943-2947.
- Rosenfeld, M.G., Glass, C.K. (2001). Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* **276**: 36865-36868.
- Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., Glass, C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes & Dev.* **20**: 1405-1428.
- Rosenzweig, S.A., Atreya, H.S. (2010). Defining the pathway to insulin-like growth factor system targeting in cancer. *Biochem. Pharmacol.* **80(8)**: 1115-1124.

- Rosette, C., Roth, R.B., Oeth, P., Braun, A., Kammerer, S., Ekblom, J., Denissenko, M. (2005). Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **26(5)**: 943-950.
- Roy, R., Chun, J., Powell, S.N. (2011). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* **12(1)**: 68-78.
- Rubin, H. (2011). The early history of tumor virology: Rous, RIF, and RAV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108(35)**: 14389-14396.
- Ruiter, R., Visser, L.E., Van Duijn, C.M., Ch Stricker, B.H. (2011). The ACE insertion/deletion polymorphism and risk of cancer, a review and meta-analysis of the literature. *Curr. Cancer Drug Targets.* **11(4)**: 421-430.
- Ryo, M., Nakamura, T., Kihara, S., Kumada, M., Shibasaki, S., Takahasi, M., Nagai, M., Matsuzawa, Y., and Funahashi, T. (2004). Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ. J.* **68**: 975-981.
- Sakaguchi, H., Fujimoto, J., Sun, W.S., Tamaya, T. (2007). Clinical implications of steroid receptor coactivator (SRC)-3 in uterine endometrial cancers. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **104(3-5)**: 237-240.
- Sakakura, C., Hagiwara, A., Yasuoka, R., Fujita, Y., Nakanishi, M., Masuda, K., Kimura, A., Nakamura, Y., Inazawa, J., Abe, T., Yamagishi, H. (2000). Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int. J. Cancer* **89(3)**: 217-223.
- Sanchez, G., Delattre, O., Auboeuf, D., Dutertre, M. (2008). Coupled alteration of transcription and splicing by a single oncogene: boosting the effect on cyclin D1 activity. *Cell Cycle* **7(15)**: 2299-2305.
- Sánchez, M.J., Payer, T., De Angelis, R., Larrañaga, N., Capocaccia, R., Martínez, C., and for the CIBERESP Working Group (2010). Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Annals of Oncology* **21(3)**: 30-36.

- Sánchez-Tilló, E., de Barrios, O., Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A., Postigo, A. (2011). β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108(48)**: 19204-19209.
- Schlaepfer, D.D., Mitra, S.K. (2004). Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 92-101.
- Schmalhofer, O., Brabletz, S., Brabletz, T. (2009). E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **28(1-2)**: 151-66.
- Schrevel, M., Gorter, A., Kolkman-Uljee, S.M., Trimbos, J.B., Fleuren, G.J., Jordanova, E.S. (2011). Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with cervical cancer. *Modern Pathology* **24**: 720-728.
- Schröder, M. (2007). Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**: 862-894.
- Schwabe, R.F., Sakurai, H. (2005). IKK β phosphorylates p65 at S468 in transactivation domain 2. *The FASEB Journal* **19(12)**: 1758-1760.
- Selvaggi, G., Novello, S., Torri, V., Leonardo, E., De Giuli, P., Borasio, P., Mossetti, C., Ardisson, F., Lausi, P., Scagliotti, G.V. (2004). Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **15(1)**: 28-32.
- Seville, L.L., Shah, N., Westwell, A.D., Chan, W.C. (2005). Modulation of pRB/E2F functions in the regulation of cell cycle and in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* **5(3)**: 159-170.
- Shaknovich, R., Yeyati, P.L., Ivins, S., Melnick, A., Lempert, C., Waxman, S., Zelent, A., Licht, J.D. (1998). The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **18(9)**: 5533-5545.

- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, p.J., Agard, D.A., Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* **95**: 927-937.
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., Schlaepfer, D.D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat. Cell. Biol.* **2**: 249-256.
- Simon, C.M., Daskal, I. (2008). Brefeldin A activates CHOP promoter at the AARE, ERSE and AP-1 elements. *Mol. Cell Biochem.* **319**: 203-208.
- Spurdle, A.B., Antoniou, A.C., Kelemen, L., Holland, H., Peock, S., Cook, M.R., Smith, P.L., et al. (2006). The AIB1 polyglutamine repeat does not modify breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **15**: 76-79.
- Steidl, U., Haas, R., Kronenwett, R. (2000). Intercellular adhesion molecular 1 on monocytes mediates adhesion as well as trans-endothelial migration and can be downregulated using antisense oligonucleotides. *Ann. Hematol.* **79(8)**: 414-423.
- Swanson, H.I. and Bradfield, C.A. (1993). The Ah-receptor: Genetics, structure and function. *Pharmacogenetics* **3**: 213-230.
- Szabova, L., Son, M.Y., Shi, J., Sramko, M., Yamada, S.S., Swaim, W.D., Zervas, P., Kahan, S., Holmbeck, K. (2010). Membrane-type MMPs are indispensable for placental labyrinth formation and development. *Blood* **116(25)**: 5752-5761.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., et al. (2007). Induction of pluripotent ítem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**: 861-872.

- Takeshita, A., Yen, P.M., Misisti, S., Cardona, G.R., Liu, Y., Chin, W.W. (1996). Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* **137**: 3594-3597.
- Tamborini, E., Viridis, E., Negri, T., Orsenigo, M., Brich, S., Conca, E., Gronchi, A., Stacchiotti, S., Manenti, G., Casali, P.G., Pierotti, M.A., Pilotti, S. (2010). Analysis of receptor tyrosine kinases (RTKs) and downstream pathways in chordomas. *Neuro. Oncol.* **12(8)**: 776-789.
- Tang, L.L., Yokoyama, Y., Wan, X., Iwagaki, S., Niwa, K., Tamaya, T. (2006). PTEN sensitizes epidermal growth factor-mediated proliferation in endometrial carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **15(4)**: 855-859.
- Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T.K., Lee, S.R., Zhao, Y., Harris, D.C., Zheng, G. (2011). E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *J. Biomed. Biotechnol.* doi: 10.1155/2011/567305.
- Tien, J.C., Zhou, S., Xu, J. (2009). The role of SRC-1 in murine prostate carcinogenesis is nonessential due to a possible compensation of SRC-3/AIB1 overexpression. *Int. J. Biol. Sci.* **5(3)**: 256-264.
- Toker, A., Cantley, L.C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**: 673-676.
- Torres-Arzayus, M.I., Font de Mora, J., Yuan, J., Vazquez, F., Bronson, R., Rue, M., Sellers, W.R., 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.
- Tremblay, F., Revett, T., Huard, C., Zhang, Y., Tobin, J.F., Martinez, R.V. (2009). Bidirectional modulation of adipogenesis by the secreted protein Ccdc80/DRO1/URB. *The journal of biological chemistry* **284(12)**: 8136-8147.
- Tsai, W.B., Chung, Y.M., Zou, Y., Park, S.H., Xu, Z., Nakayama, K., Lin, S.H., Hu, M.C. (2010). Inhibition of FOXO3 tumor suppressor function by

betaTrCP1 through ubiquitin-mediated degradation in a tumor mouse model. *PLoS One* **5(7)**: e11171.

-Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98(9)**: 5116-5121.

-Visconti, R., Schepis, F., Iuliano, R., Pierantoni, G.M., Zhang, L., Carlomagno, F., Battaglia, C., Martelli, M.L., Trapasso, F., Santoro, M., Fusco, A. (2003). Cloning and molecular characterization of a novel gene strongly induced by the adenovirus E1A gene in rat thyroid cells. *Oncogene* **22(7)**: 1087-1097.

-Vita, M., Henriksson, M. (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin. Cancer Biol.* **16**: 318-330.

-Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, v., Chambon, P., 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.

-Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* **15**: 3667-3675.

-Wan, Z.T., Chen, X.L. (2010). Mechanisms of HIV envelope-induced T lymphocyte apoptosis. *Viol. Sin.* **25(5)**: 307-315.

-Wang, S., Yuan, Y., Liao, L., Kuang, S.Q., Tien, J.C., O'Malley, B.W., Xu, J. (2008). 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., 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(11)**: 2346-2352.

-Wang, Z., Rose, D.W., Hermanson, O., Liu, F., Heiman, T., Wu, W., Szeto, D., Gliberman, A., Krones, A., Pratt, K., Rosenfeld, R., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (2000). Regulation of somatic growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13549-13554.

-Weidinger, C., Krause, K., Mueller, K., Klagge, A., Fuhrer, D. (2011). FOXO3 is inhibited by oncogenic PI3K/Akt signalling but can be reactivated by the NSAID sulindac sulfide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96(9)**: E1361-1371.

-Weinstein, I.B. (2000). Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* **21(5)**: 857-864.

-Werbajh, S., Nojek, I., Lanz, R., Costas, M.A. (2000). RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. *FEBS Lett.* **485**: 195-9.

-Wiseman, B.S., Sternlicht, M.D., Lund, L.R., Alexander, C.M., Mott, J., Bissell, M.J., Soloway, P., Itohara, S., Werb, Z. (2003). Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J. Cell. Biol.* **162(6)**: 1123-1133.

-Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towey, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., Bonner-Weir, S., White, M.F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **392(6670)**: 900-904.

-Wolter, K.G., Hsu, Y., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell. Biol.* **139(5)**: 1281-1292.

-Wong, L.J., Dai, P., Lu, J.F., Lou, M.A., Clarke, R., Nazarov, V. (2006). AIB1 gene amplification and the instability of polyQ encoding sequence in breast cancer cell lines. *BMC Cancer* **6**: 111.

- 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., O'Malley, B.W. (2007). SRC-3coactivator 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., Tsay, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (2002). Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB1/RAC-3/TRAM-1) coactivator activity by IκB kinase. *Mol. Cell Biol.* **22**: 3549-3561.
- Wu, R.C., Qin, J., Yi, P., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (2004). Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signalling 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., Guan, X.Y. (2005). Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma. *Hum. Pathol.* **36**: 77-783.
- Xu, F.P., Xie, D., Wen, J.M., Wu, H.X., Liu, Y.D., Bi, J., Lv, Z.L., Zeng, Y.X., Guan, X.Y. (2007). SRC-3/AIB1 protein and gene amplification levels in human esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Lett.* **245(1-2)**: 69-74.
- Xu, J., Li, Q. (2003). Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Molecular endocrinology* **17(9)**: 1681-1692.
- Xu, J., Liao, L., Ning, G., Yoshida-Komiya, H., Deng, C., 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. USA* **97**: 6379-6384.

- Xu, J., O'Malley, B.W. (2002). Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **3**: 185-192.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B., Kadowaki, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* **8**: 1288-1295.
- Yan, D., Avtanski, D., Saxena, N.K., Sharma, D. (2012). Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β -catenin activation via Akt/GSK3-dependent and MTA1/Wnt1-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* (En prensa)
- Yan, J., Erdem, H., Li, R., Cai, Y., Ayala, G., Timan, M., Yu-Lee, L.Y., Tsai, S.Y., 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(13)**: 5460-5468.
- Yan, J., Tsai, S.Y., Tsai, M. (2006). SRC-3/AIB1: transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta Pharmacologica Sinica* **27(4)**: 387-394.
- Yeyati, P.L., Shaknovich, R., Boterashvili, S., Li, J., Ball, H.J., Waxman, S., Nason-Burchenal, K., Dmitrovsky, E., Zelent, A., Licht, J.D. (1999). Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* **18(4)**: 925-934.
- Yoshida, H., Liu, J., Samuel, S., Cheng, W., Rosen, D., Naora, H. (2005). Steroid receptor coactivator-3, a homolog of Taiman that controls cell migration in the Drosophila ovary, regulates migration of human ovarian cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **245**: 77-85.

- Yuan, Y., Liao, L., Tulis, D.A., Xu, J. (2002). Steroid receptor coactivator-3 is required for inhibition of neointima formation by estrogen. *Circulation* **105**: 2653-2659.
- Zelent, A., Guidez, F., Melnick, A., Waxman, S., Licht, J.D. (2001). Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* **20(49)**: 7186-7203.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87(4)**: 619-628.
- Zhang, B., Beeghly-Fadiel, A., Long, J., Zheng, W. (2011). Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Lancet. Oncol.* **12(5)**: 477-488.
- Zhang, H., Yi, X., Sun, X., Yin, N., Shi, B., Wu, H., Wang, D., Wu, G., Shang, Y. (2004). Differential gene regulation by the SRC family of coactivators. *Genes & Development* **18**: 1753-1765.
- Zhang, K., Wong, P., Zhang, L., Jacobs, B., Borden, E.C., Aster, J.C., Bedogni, B. (2012). A Notch-neuregulin1 autocrine signalling loop contributes to melanoma growth. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2011.606.
- Zhang, W., Ding, W., Chen, Y., Feng, M., Ouyang, Y., Yu, Y., He, Z. (2011). *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **43(8)**: 647-653.
- Zheng, F.F., Wu, R.C., Smith, C.L., 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., Tsai, M.J. (2003). Role of the steroid coactivator SRC-3 in cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7742-7755.

-Zhou, H.J., Yan, J., Luo, W., Ayala, G., Lin, S.H., Erdem, H., Ittmann, M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. (2005). SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res.* **65(17)**: 7976-7983.

-Zhou, X.E., Suino-Powell, K.M., Li, J., He, Y., Mackeigan, J.P., Melcher, K., Yong, E.L., Xu, H.E. (2010). Identification of SRC3/AIB1 as a preferred coactivator for hormone-activated androgen receptor. *J. Biol. Chem.* **285(12)**: 9161-9171.

