



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

Análisis de la presencia y formación de heterodímeros HER2/HER3 y la activación de la vía PI3K/AKT en células de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

QFB. Octavio Alberto Zerecero Carreón

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

**Dra. Isabel Soto Cruz
FES Zaragoza, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón
FES Zaragoza, UNAM**

MÉXICO, D.F.

Septiembre, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Análisis de la presencia y formación de heterodímeros HER2/HER3 y la activación de la vía PI3K/AKT en células de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

QFB. Octavio Alberto Zerecero Carreón

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. Isabel Soto Cruz
FES Zaragoza, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón
FES Zaragoza, UNAM

MÉXICO, D.F.

Septiembre, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de abril de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **OCTAVIO ALBERTO ZERECERO CARREÓN** con número de cuenta **400072076** con la tesis titulada **"Análisis de la presencia y formación de heterodímeros HER2/HER3 y la activación de la vía PI3K/AKT en células de carcinoma de cérvix CALO e INBL"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ**:

Presidente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Vocal: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Suplente: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Suplente: DR. DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de agosto de 2014.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la formación académica y el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Al programa de becas para estudiantes de posgrado del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el apoyo.

A DGAPA, UNAM por el apoyo para el desarrollo del proyecto (Proyecto PAPIIT IN221512).

A los miembros del Comité Tutor

Dra. Isabel Soto Cruz
Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón

A los sinodales

Dra. Vilma Maldonado Lagunas
Dr. Alejandro Zentella Dehesa

AGRADECIMIENTOS

Para y por los compañeros

DEDICATORIA

A mis padres.

I.	RESUMEN	10
	ABSTRAC	11
II.	INTRODUCCIÓN	12
	a) Familia ErbB/HER	12
	b) Dominios estructurales ErbB	16
	c) Señalización, cinasa PI3K.	17
	d) Dominio PH	19
	e) Dominio C2	20
	f) Dominio SH2.	21
	g) Estructura de PI3K	21
	h) Inhibidores de PI3K	22
	i) Dominio de unión PTB	23
	j) Cinasa AKT/PKB	24
	k) mTOR	27
III.	ANTECEDENTES	29
IV.	HIPÓTESIS	30
V.	OBJETIVO GENERAL	30
VI.	OBJETIVO PARTICULAR	30
VII.	MÉTODOLOGIA	31
	a. Cultivo celular	31
	b. Inmunoprecipitación	32
	c. Inmunoblot y electroforesis	32
	d. Citometría de flujo	33
	e. Microscopia confocal, co-localización	34
VIII.	RESULTADOS	35
	a. Citometría de flujo, análisis de la presencia del receptor HER3	35
	b. Ensayo de co-localización de las proteínas Her3/Her2.	36
	c. Formación de dímero Her2/Her3	38
	d. Determinación de la presencia y estado de fosforilación de la cinasa PI3K	39
	e. Efecto del ligando NRG1 β en el estado de fosforilación de la cinasa PI3K	40
	f. Presencia de la cinasa Akt y su estado de fosforilación	41
	g. Efecto de la Wortmanina sobre la fosforilación de Akt	42
IX.	DISCUSIÓN	43
X.	CONCLUSIONES	47
XI.	BIBLIOGRAFÍA	48

Índice de figuras y tablas	Página
Figura1. Estructura general de un receptor ErbB.	13
Figura 2. Dominios presentes en la familia ErbB	16
Figura3. .Dominio cinasa del receptor ErbB	17
Figura 4. Fosfoinositoles	18
Figura 5.Fosforilación del anillo de inositol	19
Figura 6. Regiones y dominios de la cinasa PI3K	21
Figura 7.PI3K, vías de señalización activadas por receptores.	22
Figura 8 Estructura de inhibidores específicos de PI3K.	23
Figura 9 Forma inactiva del dominio catalítico de la cinasa Akt	24
Figura 10.Forma activa del dominio catalítico de la cinasa Akt	25
.Figura 11.Citometría, líneas celulares CALO e INBL, análisis de la presencia del receptor de membrana Her3.	35
Figura 12. Colocalización HER2/HER3 en la línea celular CALO	36
Figura13.Colocalización HER2/HER3 en la línea celular INBL	37
Figura 14. Inmunoblot IP: anti-HER3, heterodímero HER2/HER3	38
Figura.15.Inmunoblot IP: anti-PI3K, estado de fosforilación de PI3K	39
Figura.16Inmunoblot IP: anti-PI3K, efecto de la NRG1 β	40
Figura.17Inmunoblot IP: anti-pAkt (Ser473)	41
Figura.18 Efecto de la Wortmanina sobre la fosforilación de Akt	42

RESUMEN

La familia de Receptores para factor de crecimiento epidérmico ErbB, se encuentra involucrada en la proliferación celular, diferenciación, sobrevivencia celular y apoptosis. Todos los miembros integran un sistema especial de formación de homodímeros y heterodímeros, activados por un grupo numeroso de ligandos específicos. Los ligandos para el receptor ErbB, se unen al dominio extracelular, promoviendo un cambio conformacional que posiciona el tallo C-terminal del dominio citoplasmático de un receptor cerca del asa de activación del otro, de esta forma facilitando la fosforilación en tras resultando la activación por formación de homodímeros o la formación de heterodímeros. La fosforilación de residuos de tirosina sirve como sitios de anclaje para el reclutamiento de diversas proteínas adaptadoras con dominios SH2 y PTB. Todas estas adaptadoras son regularmente por si mismas blancos de los receptores ErbB o de cinasas citoplasmáticas vías de señalización río abajo incluyendo las vías Ras- MAPK y PI3K/Akt, cuya activación aberrante juega un papel importante en la progresión de la tumorigenesis. Nuestro equipo de trabajo ha demostrado la presencia de HER2 activado de manera constitutiva en células de carcinoma de cérvix, que es importante para su proliferación. En el presente trabajo se orientó en detectar la presencia del dímero HER3/HER2 y evaluar la participación en la activación de la vía de señalización PI3K/Akt. Para determinar la presencia del Heterodímero se utilizó la microscopía confocal y ensayos de co-precipitación, los resultados obtenidos muestran la co-localización de ambos receptores HER3/HER2. Asimismo, utilizando ensayos de co-precipitación se hace evidente la interacción entre ambos receptores de membrana sugiriendo la formación del heterodímero HER3/HER2. Para determinar la participación del Heterodímero HER3/HER2 en la activación de la vía de señalización PI3K/Akt, las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL, fueron tratadas con NRG1 β , que es el ligando natural de HER3. Los resultados muestran que HER3 es fosforilada al igual que PI3K, interesantemente Akt se encuentra fosforilada de manera constitutiva en ambas líneas celulares. Para determinar si PI3K participa en la activación de Akt, las células de carcinoma de cérvix fueron en presencia de wortmanina y los resultados no muestran ningún cambio en la fosforilación constitutiva de Akt. Por lo tanto los resultados que la vía PI3K/Akt es activa, pero PI3K no participa en la activación de Akt, lo que implica la posibilidad de que otras cinasas, como mTOR, pudieran activar río debajo de la cinasa PI3K la vía de señalización de Akt en células de carcinoma de cérvix.

ABSTRACT

The epidermal growth factor receptor family ErbB/HER, is involved in cell proliferation, differentiation, cell survival, and apoptosis. All members integrate an especial system of homodimer and heterodimer formation, activated by numerous and specific ligands. The ligands for ErbB receptor binds to the extracellular domain, promote a conformational switch that positions the C-terminal cytoplasmic tail of one receptor near the activation loop of the other, thereby facilitating phosphorylation in trans resulting in receptor activation by homodimers or heterodimers formation. Phosphorylation of tyrosine residues serves as docking sites for recruitment of diverse adaptor proteins containing SH2 and PTB domains. All these adaptors are often themselves targets of ErbB receptors or by cytoplasmic kinases activating downstream signaling pathways including Ras-MAPK and PI3K/Akt, whose aberrant activation plays an important role in progression to tumorigenesis. Our work group has demonstrated the presence of a constitutive active form of HER2 in cervical cancer cell lines, which is important for their proliferation. In the present work we aimed to detect the presence of HER3/HER2 dimers and to evaluate its participation in the activation of the PI3K/Akt signalling pathway. To determine the presence of the heterodimer we used confocal microscopy and co-precipitation assays. Our results show the presence and co-localization of both receptors HER3/HER2. Moreover, using co-precipitation assays the interaction between both membrane receptors is shown suggesting the formation of the HER2/HER3 heterodimer. To determine the participation of HER3/HER2 heterodimer in the activation of the PI3/Akt signaling pathway, cervical cancer cell lines CALO and INBL were treated with NRG1b, a natural ligand of HER3. The results show that HER3 is phosphorylated as well as PI3K. Interestingly, Akt is constitutively active in both cervical cancer cell lines. To determine if PI3K participates in the activation of Akt, cervical cancer cells were incubated in the presence of wortmannine and results show that the constitutive phosphorylation of Akt does not change. Therefore, our results suggest that the PI3K/Akt signaling pathway is active, but PI3K does not participate in the activation of Akt which implies the possibility that other kinases, like mTOR, could activate downstream of PI3K the Akt signaling pathway in cervical cancer cells.

INTRODUCCIÓN

a) Familia ErbB

Los sistemas celulares de producción y reconocimiento de una señal extracelular son los llamados sistemas de transducción de señales. Dentro de estos eventos, uno de los más importantes es la regulación mediante mecanismos de fosforilación (realizado por las proteínas con actividad tirosina cinasa) y desfosforilación (realizada por las fosfatasas). Algunas proteínas con actividad de tirosina cinasa pueden funcionar como receptores, se encargan de la transferencia de un grupo fosfato entre el ATP y una biomolécula susceptible a ser fosforilada, después de que se ha llevado a cabo la interacción receptor-ligando, esto representa uno de los principales mecanismos de activación de transducción de señales. Entre los receptores responsables de esta función se encuentran los factores de crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis. Se ha relacionado la presencia de mutaciones en proteínas receptoras como la causa de muchas enfermedades como el cáncer, diabetes, entre otras ⁽¹⁻⁷⁾. En general, los receptores son glicoproteínas ancladas o embebidas en la membrana citoplasmática que interactúan con un ligando, y se inducen o reprimen por diferentes estímulos durante sus etapas de proliferación y diferenciación. Un receptor prototipo de la familia de receptores de tirosina cinasa es el Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), consta de un dominio extracelular amplio compuesto por cuatro subregiones, permanece cerrado o inactivo (figura 1), está constituido por interacciones intramoleculares entre las subregiones II y IV, previene la extensión del dominio extracelular del receptor y evita la exposición de las sub-regiones II y IV que pudieran dar lugar a la formación de dímeros y al mismo tiempo la yuxtaposición de las subregiones I y III en el sitio de unión al ligando; un dominio o región transmembranal y un dominio intracelular yuxtapuesto con el dominio de tirosina cinasa y una región C- terminal de regulación (Fig. 1). La unión del ligando a su receptor activa la región con actividad tirosina cinasa localizado en el dominio citoplasmático. Las tirosinas fosforiladas de inmediato se vinculan con las moléculas efectoras, ancladas en la superficie interna de la membrana o con mediadores citosólicos ^(7,8). La familia de receptores EGFR (Receptores de factor de crecimiento epidérmico) se compone de cuatro miembros: EGFR, HER2, HER3, HER4, que forman unidades específicas con sus ligandos respectivos capaces de oligomerizar y formar homodímeros y heterodímeros entre los miembros de la misma familia, los receptores con actividad tirosina cinasa, familia EGFR (fig. 1) ^(1,3).

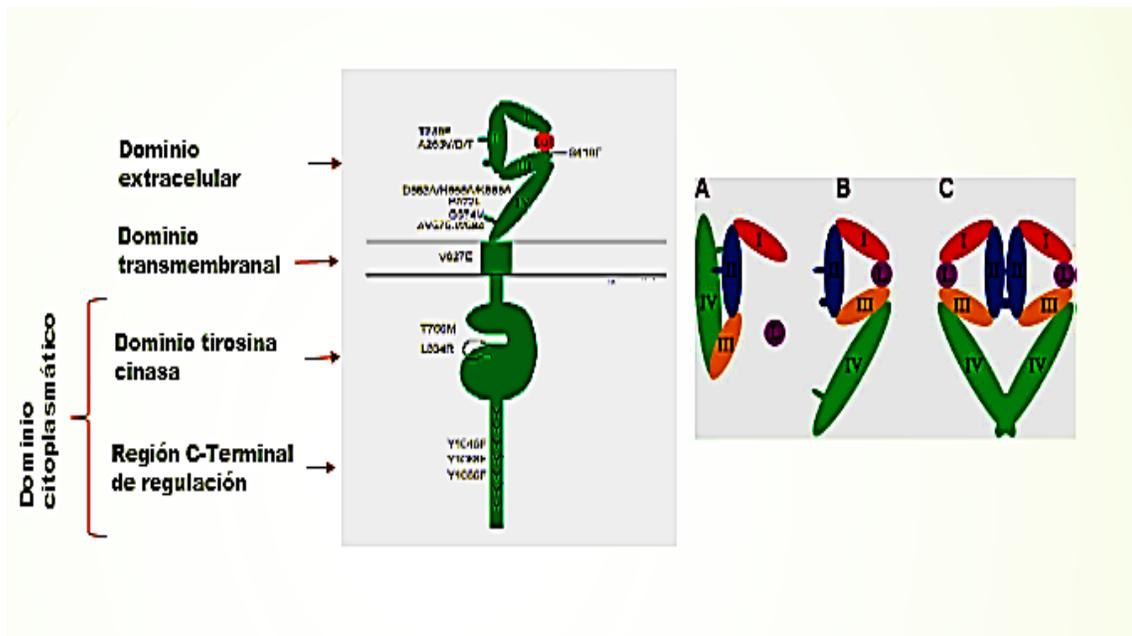


Fig. 1 Estructura general y disposición espacial de los dominios que conforman a cada uno de los miembros de la familia EGFR, y los distintos estados en los que pueden encontrarse los receptores EGFR, (A) representa el estado basal en ausencia de ligando, (B) muestra la unión del ligando a su receptor, (C) formación de dímeros, modificado de Burgess, Riese^(1,2).

La formación de dímeros robustece la transducción de señales, como sucede en la formación de los dímeros ErbB1–ErbB1 si se compara con el heterodímero ErbB1–ErbB2⁽⁹⁻¹¹⁾. Todos los miembros de la familia EGFR/ErbB tienen el potencial para estimular las cascadas de señalización PI3K/Akt, Raf-MEK-ERK⁽¹¹⁾, otras uniones particulares como la fosfolipasa C α que se une a fosfotirosinas en ErbB1 lo que favorece la formación de diacilglicerol e inositol 1, 4,5-trifosfato que son segundos mensajeros. La unión específica de la subunidad reguladora p85 de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) a fosfotirosinas en los receptores ErbB3 y ErbB4 conlleva a la activación de la enzima; la activación del fosfatidil inositol 3-fosfato activa a su vez a la proteína cinasa B o AKT⁽¹¹⁻¹³⁾.

Cuando se forman los heterodímeros entre los diferentes miembros de la familia ErbB/EGFR, incrementa la diversidad de reconocimiento de ligandos que individualmente no sería posible, ya que permite el reclutamiento de diferentes complementos o moléculas con capacidad de unión o reconocimiento a fosfotirosinas e incrementa ampliamente el repertorio de vías de señalización que podrían ser activadas por un solo receptor⁽⁴⁻¹⁵⁾. Las proteínas con dominios

SH2, pueden formar enlaces con fosfotirosinas en las regiones C-terminal en el primer dominio y N-terminal en el segundo dominio⁽⁹⁻¹⁵⁾.

Existen algunas variaciones entre los miembros de la familia de EGFR/ErbB, se compone de un dominio extracelular de unión a EGF, compuesto de 622 residuos, un segmento transmembranal de 23 residuos, y un dominio intracelular de 522 residuos con actividad de tirosina cinasa (figuras 1, 3). Para el segundo miembro HER2/ErbB2, se desconoce hasta el momento su ligando, y tiende a formar heterodímeros en lugar de homodímeros; tales heterodímeros pueden unirse a factores de crecimiento cuya variedad propicia una amplia gama de tipos de cáncer como el cáncer de mama, cérvix, colón, endometrio, esofágico, de pulmón y de páncreas^(10, 11, 15,16).

Estructuralmente hablando, el receptor HER2 está constituido por tres dominios: el dominio extracelular dividido en subregiones formadas por 632 aminoácidos; de manera particular la conformación del dominio extracelular no es propicia para formar un sitio de unión al ligando como sucede en los demás miembros de la familia EGFR. Esto se puede explicar mediante análisis por cristalografía, ya que estudios realizados a estructuras cristalinas del receptor HER2 muestran, una variación en el arreglo de las subregiones III y IV, donde se aprecia una relación de interdominio que asemeja un estado de activación similar al que presentan otros miembros de la familia EGFR cuando se unen a su ligando respectivo. Probablemente esto se debe a que no se conservan dos regiones clave en la subregión IV, en donde los residuos de contacto Gly563, His565 presentes en HER3 se remplazan por residuos de Pro y Phe respectivamente en HER2, lo cual puede explicar la ausencia de región de contacto de las subregiones II y IV y la interfase I y III favorecida por la existencia de grupos de residuos hidrofóbicos rodeados por contactos hidrofílicos que inducen una conformación más estable. Todos estos cambios perfilan el funcionamiento de ErbB/HER2 como receptor cooperador con otros miembros de la familia de receptores que si poseen ligados propios, por lo que HER2/ErbB2, sería un receptor con actividad constitutiva por no requerir la unión directa a un ligando específico^(9,23,24).

El tercer miembro de la familia, ErbB3/HER3, a pesar de presentar una gran homología en el dominio tirosina cinasa con los otros miembros de la familia no posee actividad de proteína cinasa, presenta una estructura hélice α C, rotada hacia afuera con respecto de su propia conformación espacial dentro del

dominio tirosina cinasa, lo anterior, genera un empaquetamiento del asa de activación dentro del mismo sitio activo de la cinasa, bloqueando de esta forma el sitio de unión a sustrato. Presenta cambio en la hélice α -C de un residuo de Glu 738 por una histidina, importante en la formación de un puente salino entre un residuo de lisina conservada Lys 721 que coordina el ATP. Aún cuando si presenta unión a ligando, requiere la formación de heterodímeros con los otros miembros de ErbB. ErbB3 se encuentra presente en casos de cáncer de mama, colon, próstata y estómago ^(11, 15,17).

Destacando de manera importante la capacidad de formación de heterodímeros HER2/HER3, por presentar gran afinidad y complementariedad de ambos receptores

ErbB4, el último miembro de la familia, comparte prácticamente el 75% de los residuos que componen el dominio transmembranal con los otros miembros, un 70% en el dominio intracelular que son alrededor de 276 residuos y un 20% en la región C-terminal dentro del dominio catalítico ^(10,18). ErbB4 también forma heterodímeros con los otros miembros de la familia ErbB, principalmente con ErbB1y ErbB2 ⁽¹⁰⁾.

Una de las actividades más importantes de los receptores EGFR es la activación de la cascada de señalización que incluye a las vías de señalización Ras-Raf-MEK-MAPK y PI3K/AKT, ambas vías involucradas en la trascricpción de genes que participan en la proliferación celular, diferenciación y migración de células en el proceso de carcinogénesis ^(1,4-6). La activación aberrante de la red EFGR, se asocia frecuentemente con transformaciones celulares y desarrollo de cáncer en mama, pulmón, ovario, próstata por mencionar algunos ^(5,- 10).

Bajo condiciones fisiológicas la unión del ligando a su receptor promueve la formación de homodímeros u heterodímeros de los receptores, y la activación de su dominio citoplasmático, la dimerización resulta en una auto o transfosforilacion de residuos de tirosina en el extremo C-Terminal del sitio catalítico del receptor (figuras 2 y 3), que a su vez sirve como lugar de anclaje de moléculas con dominio SH2 y PTB. En la figura 2 se pueden identificar los diversos sitios de reclutamiento de proteínas que pueden interactuar con cada uno de los miembros de la familia ErbB; destacando de manera particular la predominancia de sitios de anclaje presentes en ErbB3 para la cinasa PI3K, muy probablemente favoreciendo la interacción de ErbB-PI3K sobre los otros miembros de la familia ErbB ⁽⁶⁻⁸⁾.

b) Dominios estructurales familia ErbB

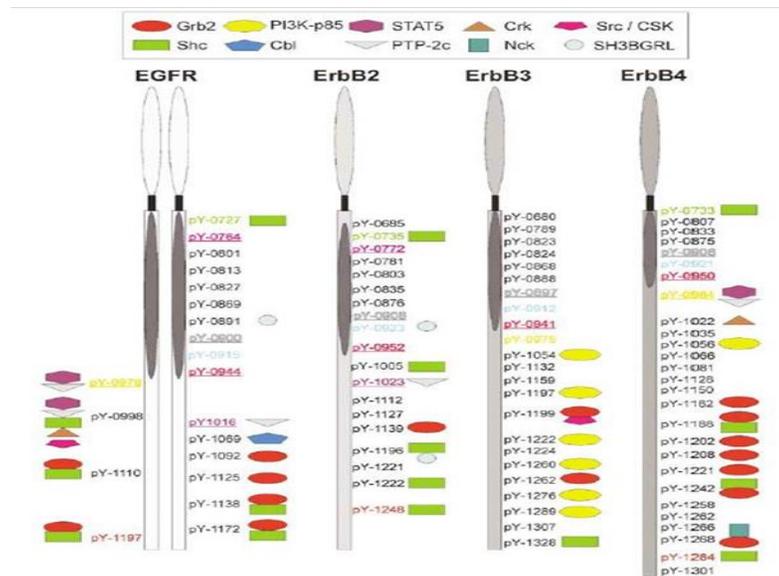


Fig. 2. Familia ErbB/HER, dominios estructurales presentes en cada miembro de la familia ErbB. Ubicación de los residuos de tirosina fosforilados presentes en cada dominio, que pueden servir como sitios de anclaje a diferentes proteínas cuya interacción regula diferentes vías de señalización, los dominios de unión a PI3K ,presentes en el miembro ErbB3 son más abundantes que en los otros miembros de la familia ErbB . Modificado de Burgess⁽²⁾

Se ha relacionado la formación del heterodímero HER2/HER3, así como su activación inapropiada con el desarrollo y severidad de diferentes tipos de cáncer, al mismo tiempo de presentar una mayor resistencia a tratamientos por radiación y quimioterapia⁽⁸⁻¹¹⁾.

El presente trabajo se centra en el análisis de la presencia de formación del heterodímero HER2/HER3 y su probable implicación en la activación de la vía de señalización AKT/PKB en líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL. La importancia radica en su asociación con el desarrollo y progresión de tumores altamente invasivos^(1,11-14).

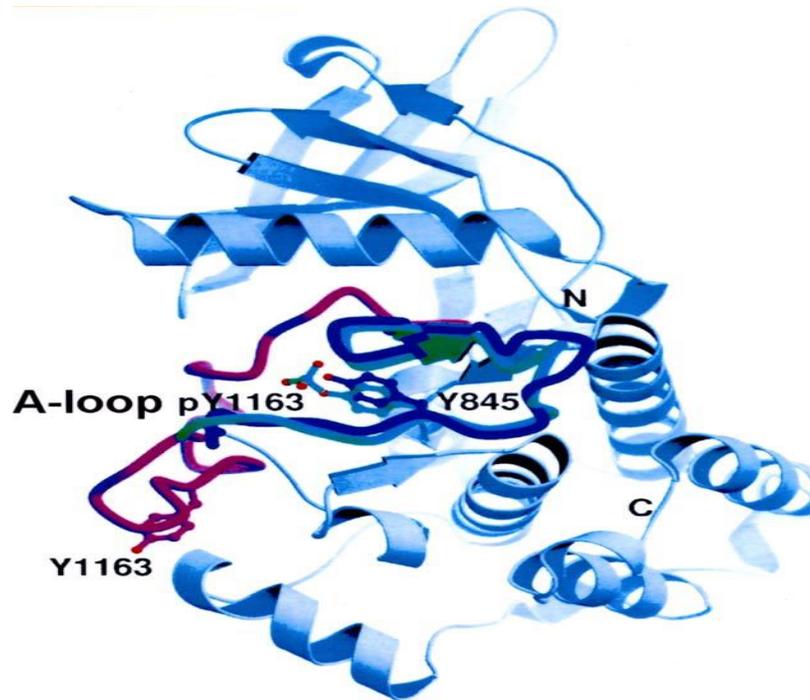


Fig. 3 Estructura general bilobulada del dominio tirosina cinasa del receptor ErbB. La presente figura esquematiza la estructura y orientación de las regiones que comprenden el dominio tirosina cinasa, de manera particular la posición de tirosinas específicas asociadas a la regulación del asa de activación, necesaria para la activación del dominio tirosina cinasa modificado de Burgess⁽²⁾.

c) Cinasa PI3K. Señalización

La familia PI3Ks (Cinasa de fosoinositoles), se ha subdividido para su mejor comprensión en tres clases o isoformas. Éstas involucran estructuras, dominios específicos, interacciones específicas, presencia en determinados grupos de seres vivos, hasta su especialización en determinados procesos celulares.

En las células de mamíferos se conocen por lo menos tres clases:

PI3K, clase I, que se constituye por una subunidad catalítica p110 y una subunidad reguladora-adaptadora p85, la clase PI3K II, una estructura más larga compuesta por 170 – 210 kDa, pero carente de subunidad reguladora – adaptadora p85, presentando una homología del 40-50 % con la clase I, dentro de su estructura presenta un dominio tipo C2 en el carboxilo terminal, teniendo como sustratos preferentes PtdIns, PtdIns-4-P, la última isoforma se ha encontrado en levadura y tiene como sustrato preferente PtdIns para transformarlo en PtdIns(3)P, (figura 4).

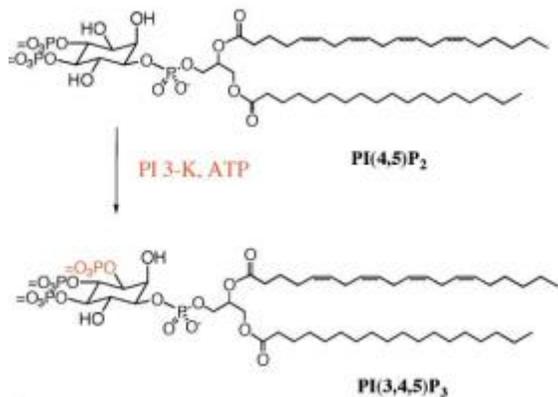


Fig.4 Fosfoinositoles, fosforilación en la posición 3 del anillo de inositol por acción de la cinasa PI3Ks, una vez fosforilados en la posición 3 del anillo de inositol por la cinasa PI3K pueden actuar como segundos mensajeros capaces inducir la activación de la vía de señalización PI3K/AKT, Modificado de Hyun, Mason ⁽³⁹⁾.

Probablemente una de las actividades que realiza la cinasa PI3K, es la fosforilación de la posición del grupo 3-OH(hidroxilo) presente en el anillo de inositol de tres especies diferentes de fosfoinositoles (PtdIns) figura 4, que son el sustrato natural de la cinasa PI3K conocidos según la posición donde se encuentren directamente unidos en principio los grupos fosfato como: PtdIns , PtdIns-(4)P, PtdIns-(4,5)P2 (figura 5).

Estos tres fosfoinositidos actúan coordinando la localización y función de múltiples proteínas efectoras. Por lo anterior, se reconoce que el control del metabolismo de los fosfolípidos es realmente fundamental para los procesos de señalización, de hecho se conocen dos grandes rutas en el metabolismo de los fosfolípidos, la primera implica la hidrólisis de PtdIns(4,5)P2 a inositol In(1,4,5)P3, el cual tiene acción en el incremento en la concentración de iones Ca^{+2} , así como la formación de diacilglicerol; que representa un segundo mensajero que puede activar a la familia de cinasa de serina y treonina PKC.

La segunda ruta igualmente importante es aquella que involucra a la familia PI3Ks que de manera particular fosforila la posición 3-OH del anillo de inositol del fosfolípido, produciendo PtdIns (3) P, PtdIns (3,4) P2 y PtdIns (3, 4,5) P3.

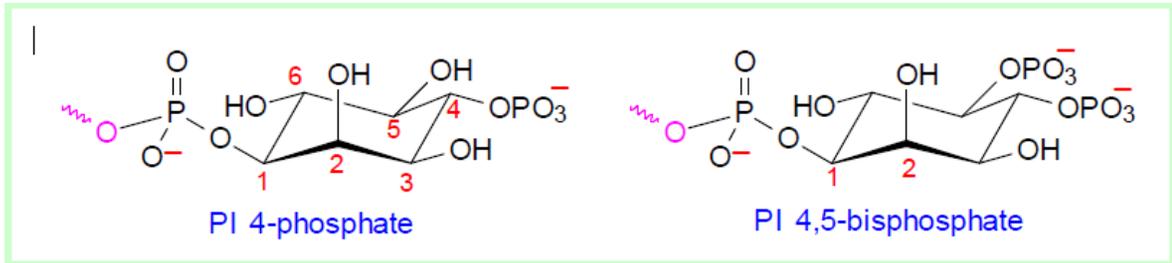


Fig. 5. Fosforilación del anillo de inositol por medio de la cinasa PI3K en la posición 5. La cinasa PI3K también puede utilizar como sustrato al fosfatidilinositol monofosfato para dar lugar al PtdIns (4,5)P₂ y posteriormente obtener mediante una fosforilación sucesiva obtener el PtdIns (3,4,5) favoreciendo la activación de la vía PI3K/AKT. Modificado de Hyun, Mason⁽³⁹⁾.

Por acción de receptores anclados a la membrana plasmática PI3K I puede fosforilar a PtdIns (4,5) P₂, dando lugar a PtdIns (3, 4,5) P₃ que localizados en cúmulos lipídicos en la membrana plasmática, van sirviendo como sitios de unión a grupos de proteínas que contengan en su estructura dominios PH. La unión o interacción de estos fosfoinositidos con el dominio PH, puede generar una modificación alosterica que a su vez produzca un cambio en la actividad o inducir una relocalización de la proteína definiendo áreas de la membrana plasmática donde pueda llevarse a cabo la activación de la proteína.

d) Dominio PH

Los dominios PH, se han caracterizado por módulos de 100 a 120 a. a, y se encuentran en una amplia gama de proteínas asociadas a procesos celulares de señalización y tráfico de moléculas, remodelación del citoesqueleto. De manera general se conocen hasta la fecha 250 dominios PH asociados al humano, que de manera constante presentan estructuras o núcleos de 7 hojas beta en forma de emparedado formados con dos hojas beta en forma ortogonal. Las asas β 1 y β 2 del dominio PH presentan residuos básicos, conformando una estructura definida de unión de grupos fosfato de las cabezas de los fosfoinositidos; reconociéndose cierta selectividad de algunos dominios PH por determinados fosfoinositidos, como PtdIns (4,5) P₂, PtdIns (3,4) P₂, PtdIns (3, 4,5) P₃. Esta interacción permite la localización de la proteína en la membrana, interacción con otras proteínas o con otros mensajeros lipídicos, que terminará por incidir en la transmisión de señales río abajo hacia otras moléculas dentro de la cascada de señalización.

e) Dominio C2

Este tipo de dominios se estructuran como regiones de aproximadamente 130 residuos, se han encontrado en una amplia gama de proteínas (por lo menos 100) cuya característica particular, es la interacción con fosfolípidos con o sin dependencia del catión divalente Ca^{+2} , la presencia de este catión y las estructuras que lo rodean establecen cambios conformacionales en el dominio, favoreciendo la formación de cargas de potencial electrostático, permitiendo una mayor interacción y unión con los fosfolípidos, con carga o sin carga.

f) Dominio SH2

Dominios SH2 o dominios homólogos a Src 2, este tipo de dominios se forman generalmente por cien amino ácidos aproximadamente y se especializan en reconocer secuencias conservadas de 3 a 6 residuos en la vecindad de una fosfotirosina, el arreglo de estos, es decir su secuencia confiere la especificidad. De manera general los dominios SH2, reconocen secuencias en el dominio C - terminal, sin embargo los dominios SAP SH2, pueden reconocer a fosfotirosinas en las regiones C - terminal y N – terminal.

g) ESTRUCTURA de PI3K

La familia de cinasas PI3K, son cinasas con injerencia en el control del crecimiento celular, proliferación, motilidad, sobrevivencia, diferenciación y tráfico intracelular. En base a su estructura primaria, regulación de la misma y especificidad sobre el sustrato lipídico, la familia PI3K se ha subdividido en función de sus dominios estructurales y en su capacidad de formar dímeros estructurales para las clases I y II. La clase PI3K IA, de manera particular es la que más se ha estudiado y de manera particular la subunidad p110 donde se han relacionado mutaciones se conforma a partir de un dímero compuesto por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85), la familia PI3K se ha subdividido principalmente conforme a la similitud de dominios presentes en cada isoforma, (figura 6).

Existen tres isoformas descritas para la unidad catalítica p110 conocidas como: $\alpha\beta\gamma\delta$, así como, tres genes codificantes para la subunidad p85 ($\alpha\beta$ y p55 γ).

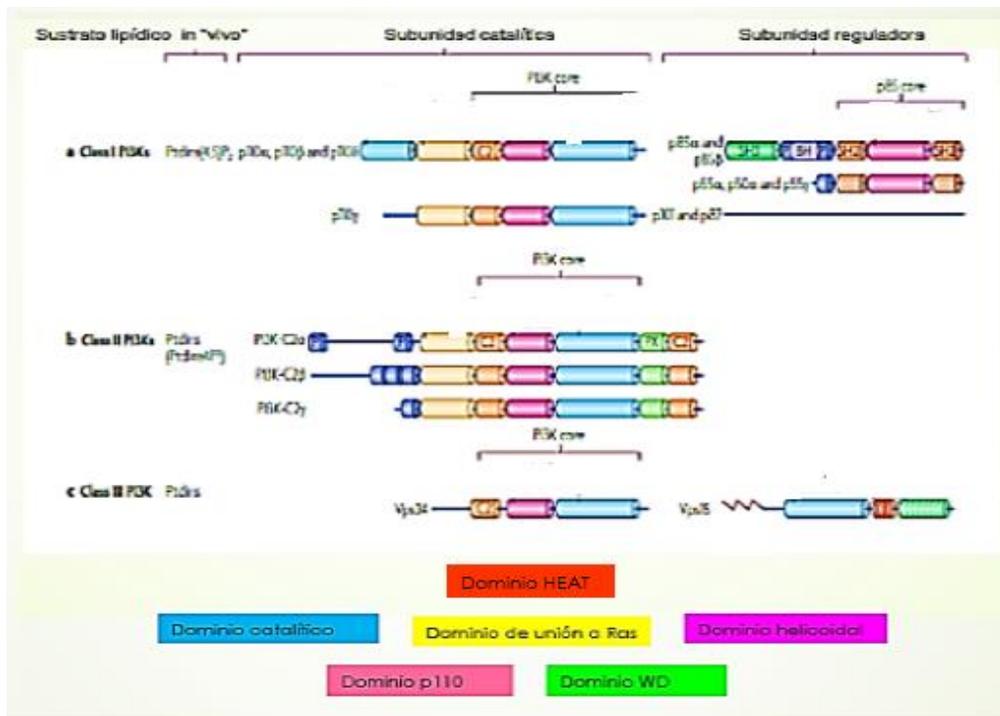


Fig.6 Regiones que conforman de las diferentes familias e isoformas de la cinasa de fosoinositidos PI3K. En esta figura, se pueden comparar entre las diferentes familias la presencia o ausencia dominios con los que puede interactuar PI3K con otras proteínas. De manera particular, la subunidad reguladora como p85, solamente se encuentra presente en la clase PI3K IA. Modificado de Vanhaesebroeck, Guillermet⁽²³⁾.

La interacción de PI3K y un receptor con actividad de tirosina cinasa, inicia con la activación del receptor por medio de un ligando, que a su vez permitirá el reclutamiento de moléculas como la subunidad p110, que a través de su unidad reguladora p85, la afinidad de ambas estructuras (receptor y la subunidad p85), es mediada por el dominio homólogo II a Scr, o conocido como SH2, capaz de reconocer secuencias específicas de aminoácidos que incluyen a tirosinas fosforiladas presentes en el dominio citoplasmático del receptor. El proceso anterior es crucial para la activación de PI3K, con la consecuente actividad enzimática de esta proteína en el proceso de fosforilación del sustrato PtdIns (4,5)P₂, transformándolo en PtdIns(3,4,5)P₃, que es el sustrato de otras proteínas cinasas río abajo. La actividad de la subunidad p85, no solo implica el reconocimiento y posterior modificación de un sustrato, sino que a su vez resulta ser un regulador de la subunidad catalítica de PI3K. Se han reportado tres clases de moléculas involucradas en la señalización y que son reguladas

por la presencia de estos inositidos: proteínas intercambiadoras de nucleótidos de la familia de GTPasas Rho, la familia de tirosinas cinasas TEC tales como BTK e ITK en linfocitos B y T, y la superfamilia de proteínas cinasas de Serina/treonina AGC figura 7. Todas estas moléculas pueden ser activadas por una variedad de estímulos extracelulares ampliamente implicados en procesos celulares como; progresión celular, crecimiento celular, motilidad celular, adhesión celular, remodelación supervivencia celular.

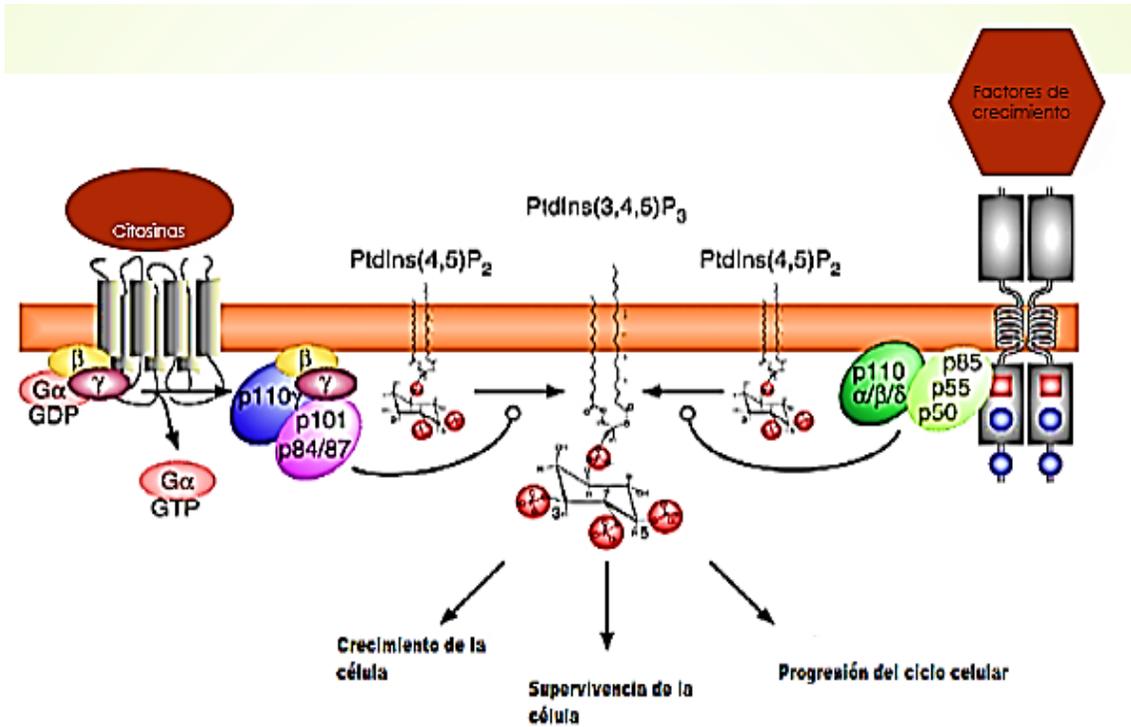


Fig7. La presencia de la cinasa PI3K permite la fosforilación de fosfoinosítidos anclados a la membrana plasmática, que sirven como segundos mensajeros para la activación de vías de señalización en el citosol. El reclutamiento de la cinasa PI3K por receptores de citocinas o de factores de crecimiento, se inicia con la interacción específica de ligandos asociados a receptores de superficie. Modificada de Aksamitene, Kiyatkin⁽²⁴⁾.

h) INHIBIDORES DE PI3K

La mayoría de los principales inhibidores sintéticos para PI3K, fueron en principio diseñados en función de las semejanzas estructurales encontradas dentro de las estructuras de sitios catalíticos de cinasas de lípidos y proteínas, como homologos sintéticos de ATP. Similar en muchos aspectos a proteínas cinasas, la PI3K, presenta un sitio catalítico de unión a ATP, localizado entre el lobulo N-terminal y el lobulo C-terminal del dominio catalítico; que en su conjunto forman una especie de hendidura o cavidad donde la lisina 802, en

PI3K α , y la lisina 833y actuan realizando un ataque nucleofílico al anillo furano, específicamente en el carbono C20, contenido en la estructura de la Wortmanina, por lo que se rompe el anillo furano formando un aducto estructural muy estable (figura 8).

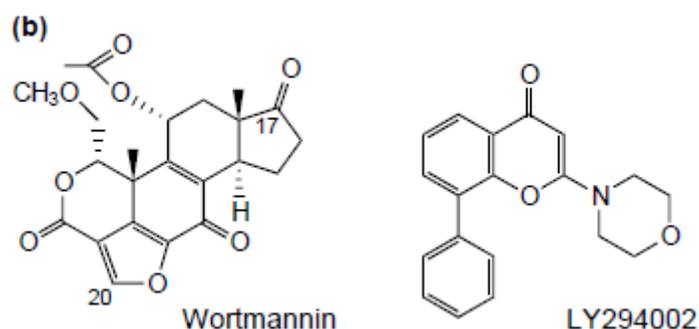


Figura.8. Estructuras de inhibidores específicos para PI3K, homologos de ATP.El carbono en la posición 20 del inhibidor wortmanina es el responsable mayoritario de la interacción del inhibidor con el sitio catalítico de la cinasa PI3K. Modificado de Crabbe, Welham ⁽²⁹⁾.

i) DOMINIO DE UNIÓN A FOSFOTIROSINAS (PTB)

Este tipo de dominios se conforman regularmente por módulos de 100–150 a.a. que tienden a reconocer secuencias consenso de Asparagina-Prolina-X-Tirosina. Los dominios PTB correspondientes a las proteínas de unión Shc, IRS-1 requieren la fosforilación del ligando en un residuo de tirosina (NPXpY) para su unión. Requieren de igual forma secuencias específicas de gran afinidad en el dominio N-Terminal; el péptido se une como hoja beta a una hoja beta antiparalela.

j) Cinasa Akt/PKB

LA familia de la cinasa AKT en humanos se conforma de las siguientes isoformas: Akt1, Akt2, Akt3 o también conocidas como PKB (α , β , γ respectivamente).

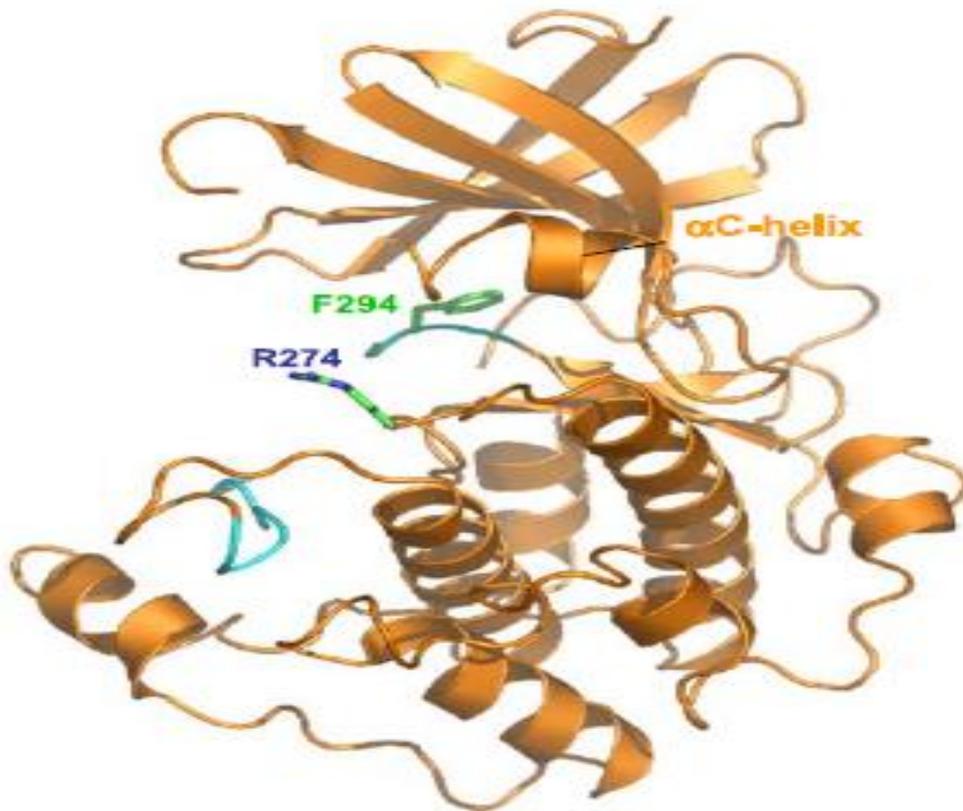


Fig.9. Forma inactiva del dominio catalítico de la cinasa Akt. Estructura desordenada de la hélice B, y la hélice α C, conjuntamente con el asa de activación. La activación del dominio catalítico de la cinasa Akt requiere la fosforilación de los residuos de Ser 473 y Thr 308; la fosforilación de estos residuos permite un rearrreglo necesario de la estructura de la cinasa, desplazando el asa de activación que bloquea el sitio catalítico; logrando así la activación de la cinasa e interacción cinasa-sustrato con la cinasa Akt. Modificado de Aksamitiene, Kiyatkin⁽²⁴⁾.

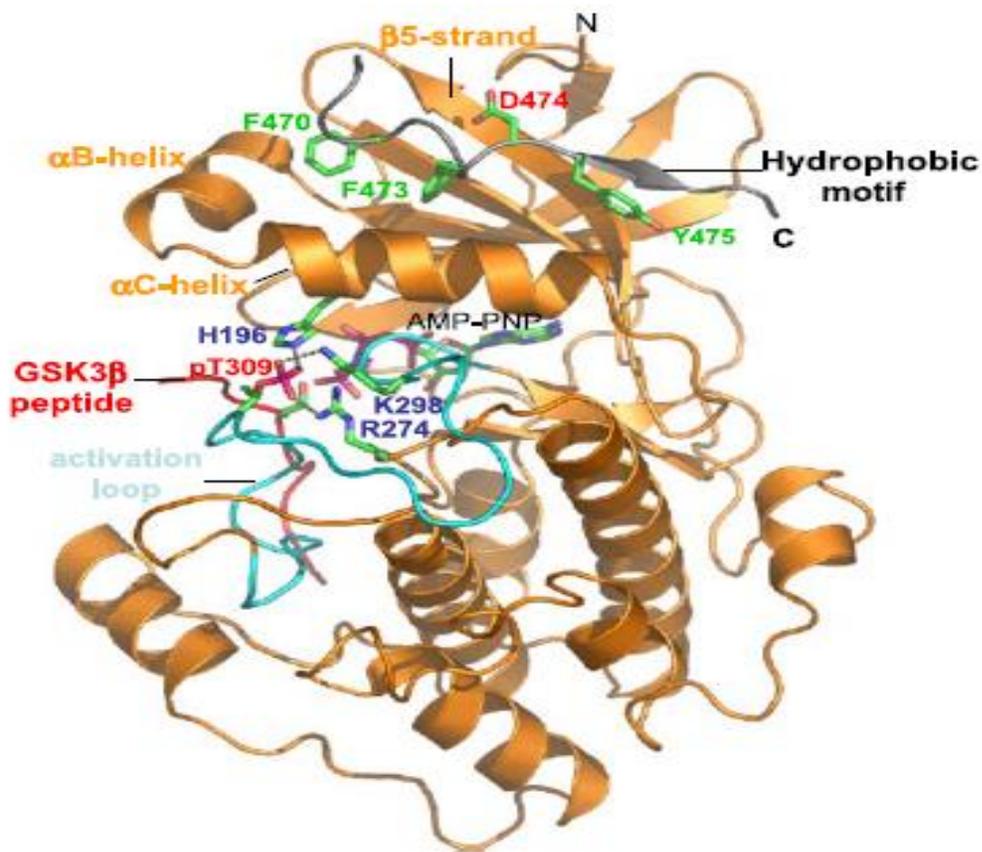


Fig.10. Forma activa del dominio catalítico de la cinasa Akt, formando un complejo ternario con el peptido GSK3 α y AMP-PNP. La activación y estabilización de la estructura del dominio cinasa de la proteína Akt se logra a través de interacciones intramoleculares entre el motivo fosforilado presente en el dominio hidrofóbico y la estructura del aceptor, dentro del llamado surco hidrofóbico formado por la helice α B y la helice α C, a la cual se suma la interacción del asa de activación con la helice α C. Modificado de Aksamitiene, Kiyatkin ⁽²⁴⁾.

Esta familia se ha caracterizado por la presencia de un dominio homólogo de pleckstrina en la región amino terminal, conformado por un grupo aproximado de 110 aminoácidos, un dominio con actividad intrínseca de cinasa de aproximadamente 260 a. a, separados por una asa o gozne, región de aproximadamente 39 aminoácidos y un dominio regulador C- Terminal compuesto por 70 aminoácidos.

De manera general las tres isoformas comparten un alto porcentaje de homología, que es del 90-95% para el dominio cinasa, 60% para el dominio PH, con 25 % para la región del linker.

La vía canónica de activación de Akt, requiere en primera instancia el reclutamiento de la cinasa PI3K como resultado de la señalización activada por diferentes citocinas, factores de crecimiento; insulina; que conllevan la activación de los receptores específicos y el reclutamiento de PI3K a la membrana plasmática. Posteriormente esto se traduce en un aumento de PtdIns (3, 4,5), que es el sustrato de la cinasa dependiente de fosfatidilinositol PDK1; que tiene como función fosforilar en el residuo de Thr 308. Cabe señalar que un aumento en la presencia de conglomerados de fosfatidilinositol 4,5 difosfato y fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato en la membrana plasmática favorecen la translocación y reclutamiento de las proteínas cinasas, PI3K, PDK1, Akt, a través de su dominio PH.

Para que se pueda llevar a cabo la activación de Akt, es necesario tanto la estructura del dominio PH que rige la translocación a la membrana plasmática, y por lo menos dos procesos de fosforilación llevados a cabo en el residuo Thr 308, que se encuentra en la asa de activación y el residuo de Ser 473, presente en el dominio hidrófobico, ambos procesos de manera conjunta favorecen cambios e interacciones intramoleculares e intermoleculares que presentan en, en el asa catalítica, interacción con el ion de magnesio, y en la asa de unión al sustrato que a su vez generan un nuevo arreglo conformacional activando a la cinasa Akt, (figuras 9 y 10).

La activación de Akt controla la supervivencia celular a través de la fosforilación de moléculas diana que dependen de ella, con el resultado neto del incremento en la supervivencia celular, proliferación, crecimiento y metabolismo. Las moléculas que activan a Akt pueden ser clasificadas en distintos grupos: factores de transcripción y proteínas cinasas.

Akt tiene la capacidad de fosforilar directamente dos proteínas asociadas a rutas apoptóticas, BAD (Ser 136) y caspasa 9 (Ser196) que es una proteasa crucial en la iniciación de la cascada apoptótica, promoviendo por tanto la supervivencia celular.

Los factores de transcripción pueden bien ser activados o inhibidos mediante procesos de fosforilación a través de Akt. Esta cinasa activa el factor de transcripción NF- κ B, HIF-1 α y CREB, lo que tiene como consecuencia un incremento en la transcripción de genes anti-apoptóticos.

El factor de transcripción NF- κ B es el mediador central de la respuesta inmune, respuesta inflamatoria y la respuesta de supervivencia celular. NF- κ B es activado por Akt a través de la fosforilación de la cinasa inhibidora IKK. Tras su activación, IKK fosforila I κ B, marcándolo para la ubiquitinación y degradación en el proteosoma. Esto expone los lugares de localización nuclear de NF- κ B y le permite la translocación al núcleo donde induce la expresión de proteínas tales

como Bcl-2 y Bcl-X_L anti-apoptóticas, también la inactivación y retención citosólica de FOXO, conlleva al bloqueo en la transcripción de FasL o conocido como fas ligando, de esta forma burla la activación de la apoptosis vía extrínseca. Los factores de crecimiento como EGF activan NF-κB y protegen contra la apoptosis y, por el contrario, la inhibición de NF-κB sensibiliza a la célula a una amplia variedad de estímulos pro-apoptóticos.

Además, la activación de HIF-1 inducida por EGF y mediada por Akt conduce a una mayor expresión del factor de crecimiento endotelial (*VEGF*) que protege a las células de la apoptosis. Akt también fosforila directamente CREB activando su actividad transcripcional y sobre expresando genes anti-apoptóticos como Mcl-1. Por el contrario, Akt inactiva factores de transcripción FOXO (familia Forkhead) y p53, bien directamente fosforilando proteínas FOXO o por fosforilación y activación de MDM2, regulador negativo de p53. En ambos casos, la expresión de genes pro-apoptóticos disminuye causando un aumento de la supervivencia celular.

Gsk-3 también es un sustrato de fosforilación de Akt, lo que determina su inactividad, bloqueando su actividad transcripcional y la regulación de su metabolismo. La inhibición de Gsk-3 protege a las células de la apoptosis pero el mecanismo exacto no se conoce.

Específicamente, la fosforilación de mTOR por Akt ocurre a través de la inactivación del complejo de esclerosis tuberosa (*TSC*). El complejo TSC es un heterodímero que consiste en tuberina (*TSC2*) no fosforilada y hamartina (*TSC1*), que actúa como proteína GTPasa activadora (*GAP*), inhibiendo a la pequeña proteína G-Rheb. Por fosforilación de TSC2, Akt interrumpe el complejo, permitiendo a Rheb, unirse a ATP y pasar desde el estado GDP inactivo al estado activo. Rheb, unido a GTP, activa a mTOR.

En una ruta paralela la proteína AMPK fosforila, aunque en este caso activa, TSC2, inhibiendo así la activación de mTOR en respuesta a cambios intracelulares de la relación ATP/AMP. Esto une la ruta que detecta niveles de energía (a través de aminoácidos y ATP), con la ruta de mTOR. LKB1, una serina-treonina quinasa (también llamada STK11), es una cinasa activadora de AMPK, que sirve como un importante inhibidor de la ruta mTOR en respuesta a la escasez de energía.

k) mTOR

mTOR (**m**ammalian **T**arget **o**f **R**apamycin) es una cinasa de serina/treonina de 289kDa. La familia de proteínas TOR tiene funciones pleiotrópicas y participa en la regulación del inicio de la transcripción del ARNm y la traducción a proteína

en respuesta a concentraciones intracelulares de aminoácidos y otros nutrientes esenciales. Interviene en la organización del citoesqueleto de actina, en el tráfico de membrana, degradación de proteínas, señalización de PKC y biogénesis del ribosoma. mTOR regula rutas de señalización esenciales y está implicada en el acoplamiento del estímulo de crecimiento y la progresión del ciclo celular.

Existen dos complejos que contienen mTOR: el complejo sensible a rapamicina (también llamado complejo mTOR-1 o mTORC1), que se define por su interacción con la proteína Raptor ("regulatory-associated protein of mTOR"), y un complejo insensible a rapamicina (también llamado complejo *mTOR2* o *mTORC2*), que se define por su interacción con Rictor ("rapamycin-insensitive companion of mTOR"), MLST8, DEPTOR, mSin1 y Protor. Al contrario que mTORC1, que fosforila los efectores de mTOR como la cinasa S6K1 y el factor de iniciación eucariótico de unión a proteína 1 4EBP1, mTORC2 controla el citoesqueleto de actina, regula a la cinasa inducida por glucocorticoides y serum (SGK), asociada al transporte de sodio en células epiteliales, también activa a la cinasa Akt/PKB, fosforilando el residuo de Ser⁴⁷³ asociado a la activación total de la cinasa.

El complejo raptor-mTOR regula de forma positiva el crecimiento celular, y su inhibición causa una disminución del tamaño celular. La rama raptor de la ruta mTOR modula la traducción de RNAm, la biogénesis del ribosoma, el metabolismo de los nutrientes y autofagia. El heterodímero formado por TSC1 (hamartina) y TSC2 (tiberina) regula la ruta raptor mTOR. TSC1/TSC2 es la proteasa activadora de GTPasa (*GAP*) para la proteína rheb de unión a GTP, perteneciente a la familia ras, que se une directamente y activa al complejo raptor-mTOR.

Raptor-mTOR responde a dos señales relacionadas con el metabolismo a través de TSC1/2. En condiciones de escasez de energía, lo que provoca un incremento en la relación AMP/ATP, AMPK se vuelve activa y fosforila TSC2 para estimular su actividad GAP, inhibiendo rheb y presumiblemente raptor-mTOR. La detección de oxígeno por la ruta raptor-mTOR requiere del complejo TSC1/2, pero funciona a través de un mecanismo diferente que implica al factor inducible por hipoxia (HIF). Akt/PKB, RSK1 y ERK unen Raptor-mTOR a las señales de crecimiento por fosforilación e inhibición de la función de TSC2^(3, 4, 5).

III ANTECEDENTES

El receptor con actividad de tirosina cinasa HER2/neu, juega un papel preponderante en múltiples procesos celulares, incluyendo la carcinogénesis ⁽⁹⁻¹¹⁾. La característica oncogénica de HER2/neu se encuentra ligada a su habilidad para afectar a una variedad de rutas o mecanismos de control celular que derivan en la apoptosis, creando, de esta manera un ambiente anti-apoptosis en las células que presentan una sobre-expresión de esta proteína. Tanto HER2 como HER3 son miembros disfuncionales de la familia EGFR, donde el primero carece de la capacidad de unión a ligando y el segundo, tiene un dominio catalítico que permanece inactivo a pesar de poseer la capacidad de unión a ligando ^(11,13-15). Sin embargo, ambos receptores se complementan formando un complejo con el ligando Neregulina cuya tasa de disociación es la más lenta dentro de la familia de receptores EFGR ^(13, 14,16).

En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha encontrado que las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL expresan el receptor HER2 fosforilado en tirosina de manera constitutiva. Además, hemos encontrado que el receptor para el factor de crecimiento epidérmico, EGFR, está presente en estas células pero no está activado de manera constitutiva ^(17,18).

Tomando en consideración estos antecedentes, es importante investigar el papel que juega el receptor HER2 en la activación de vías de señalización, como la PI3K/Akt, que es una vía de sobrevivencia, además, es importante también analizar si el receptor erbB3 se encuentra presente en este tipo de células y cuál es su participación en la proliferación y sobrevivencia de las células de carcinoma de cérvix. Descifrar el papel que desempeñan estas moléculas es de gran importancia para el desarrollo de fármacos más eficientes y de menor toxicidad para el tratamiento del cáncer de cérvix ^(1, 7,10-21).

IV HIPÓTESIS

El receptor HER2 formará dímeros con HER3, HER2/HER3, funcionando como sitios de unión para proteínas con dominios SH2, y de esta manera estará reclutando a la cinasa PI3K y en consecuencia potenciará señales de sobrevivencia activando a la vía PI3K/Akt en células de carcinoma de cérvix.

V OBJETIVO GENERAL

Investigar el papel de los receptores HER2 y HER3 en la activación de la vía de sobrevivencia PI3K/Akt para inducir sobrevivencia en células de carcinoma de cérvix.

VI Objetivos Particulares

1. Determinar la presencia del receptor HER3 y su estado de fosforilación.
2. Determinar la formación de heterodímeros HER2/HER3.
3. Determinar el estado de fosforilación de PI3K y Akt.
4. Analizar el efecto de neregulina en la activación de los dímeros.

VII METODOLOGÍA

a) Cultivo celular

El material biológico consistió en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO (estadio clínico IIIB) e INBL (estadio clínico IVB) obtenidas a partir de biopsias de pacientes mexicanas, así como la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y la línea celular HACAT (línea celular de queratinocitos humanos normales). Estas células permanecen criopreservadas en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza UNAM.

Las células CALO e INBL se cultivaron en medio RPMI-1640 (Microlab, México) adicionado con 10% suero fetal de bovino previamente desactivado (Invitrogen USA.),

Las líneas celulares MCF-7 y HACAT se cultivaron en medio D-MEM (Microlab, México) adicionado con 10% suero fetal de bovino previamente desactivado (Invitrogen USA.); la línea celular HACAT (queratinocitos) se cultivo en medio suplementado con 10% piruvato de sodio y 10% aminoácidos no esenciales (Sigma) con un 20% de SFB.

Todos los cultivos se mantuvieron en incubadora (Sanyo Electric Co; Ltd. Moriguuchi City, Osaka Japón, MCO-17AC, Inc. USA.) en un ambiente al 5% de CO₂, 37°C y humedad saturante en botellas de cultivo de 75cm² (NUNC, ServingLifeScience).

Cultivo en presencia de EGF o Neregulina 1 β

Para el ensayo con el ligando EGF, se cultivaron 500,000 células por línea, todas las células fueron cultivadas en los medios antes mencionados adicionados con 0.5 % de SFB, 12 horas antes de ser estimuladas con 20 ng/ml de EGF durante 2 minutos.

Para el ensayo con Neregulina 1 β , se cultivaron 15×10^6 células por línea celular, cultivadas en los medios respectivos adicionados con 0.5 % de SFB, 12 horas antes de ser estimuladas con 50 ng/ml durante 15 minutos.

b) Inmunoprecipitación

Se utilizaron 15×10^6 células por línea, agregando 1ml de buffer de lisis (Tritón 1%, PMSF 0.1M, Ortovanadato 0.005%, EDTA 0.5M, NaCl 5M, Pirofosfato de sodio 0.1M, NaF 0.5M, TRIS 1M pH 7.5) con inhibidores de proteasas y de fosfatasa (Leupeptina, Aprotinina, Pepstatina) en frío, utilizando agitación intermitente (vortex) por 15 minutos y se centrifugaron por 20 min a 4°C. La cuantificación de la proteína se realizó con el kit RC-DC Protein Assay (BIORAD, 500-0121). El sobrenadante resultante se incubó con esferas de agarosa-proteína A previamente acopladas con anticuerpos específicos para las proteínas de interés durante tres horas a 4°C con agitación constante. Una vez transcurrido este tiempo, las esferas se lavaron con buffer de lisis, y se agregaron 20 microlitros de buffer de Laemmli reductor a cada tubo, se hirvieron por 5 min y se guardaron a -20°C.

c) Inmunoblot. Condiciones de la electroforesis

La electroforesis SDS-PAGE se realizó utilizando geles SDS-PAGE 10%. Las proteínas separadas mediante electroforesis utilizando buffer de corrida (SDS 0.1%, Glicina 0.192M, Tris 0.041M, pH 8.3), 85 milivolts/3 horas, se transfieren a membrana de nitrocelulosa a 135 miliamperios por 1 hora utilizando buffer de transferencia (SDS 0.17%, Tris 0.027M, Glicina 0.192M pH 8.3) y se bloquearon con albúmina bovina al 3% (p/v) en buffer TBS (TRIS 1M, NaCl 5M) durante toda la noche a 4°C.

Todas las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado con peroxidasa durante 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo de la incubación las membranas se lavaron 5 veces con TBS-Tween (TRIS 1M, Tween 0.001%) por 5 min. c/u y se revelaron utilizando quimioluminiscencia.

Los ensayos para inmunoblot se realizaron con anticuerpos primarios anti-HER2, anti-HER3 (Santa Cruz); secundarios Donkey α -rabbit con fracción Fab biotinilado RP1004, (Amersham) Texas-Red streptavidin, RP1004, (ZYMED).

Para determinar la identidad de las proteínas fosforiladas en tirosina, se incubó la membrana con la solución de ácida (SDS 0.5%, Glicina 0.1%, pH 2.5) para eliminar anticuerpos. Posteriormente, se probaron otros anticuerpos, como anti-HER2, HER-3, PI3K sobre la misma membrana. Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia.

Para obtener el radio de fosforilación se utilizó el software Win_Image Studio Digits_4.0.2.1; que permite obtener el radio de fosforilación a partir de una imagen la relación de áreas que comprenden los blots presentes en una imagen; entre la proteína de interés fosforilada y la no fosforilada.

d) Citometría de Flujo

Para realizar el ensayo por Citometría para la detección del receptor de membrana HER3, se sembraron 500,000 células por caja de cada línea celular aplicando tratamiento con 20ng/ml de EGF por 2 min por línea celular. Posteriormente, se despegaron las células con verseno, se centrifugaron y resuspendieron en PBS/SFB 5%. Se colocaron 500,000 células/ tubo para FACS y centrifugando a 3500 rpm por 5 minutos, obteniendo el botón celular respectivo. Se lavaron dos veces con PBS con suero fetal bovino al 5% frío (200µl). Se incubaron las células con anticuerpo anti-HER3 (1:300 en PBS/SBA 5%) durante 1:30 hr a 4°C en oscuridad.

Transcurrido el periodo de incubación se centrifugaron las muestras retirando el sobrenadante y realizando 2 lavados con la solución PBS/SFB, adicionando el anticuerpo secundario conjugado con FITC (1:300 en solución PBS/SFB) e incubando por 30 min a 4°C en oscuridad.

Como control negativo se utilizó un isotipo semejante (1:300 en solución PBS/SFB), transcurrido el tiempo se lavaron las células, realizando 2 lavados con 300 µL solución PBS/SFB y una vez con PBS. Las células se fijaron en paraformaldehído al 1%, por 20 minutos y se lavaron una vez con PBS, finalmente se resuspendieron gentilmente y se colocaron en refrigeración a 4°C y protegidas de la luz.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro FACS Calibur (BD).

e) Microscopía confocal

Se cultivaron 25,000 células de cada línea celular, CALO e INBL, en cubreobjetos redondos colocados dentro de cajas Petri, bajo las condiciones de cultivo con medio al 0.5% de SFB por 24 hr, después se les retiró el medio de cultivo y se les adiciono medio solo a cada muestra por 15min.

Las muestras se lavaron 2 veces con PBS solo, y se bloquearon 15 min con PBS/5% SFB. Posteriormente se incubaron las muestras 30min/4°C con 10ng/mL de anticuerpo primario HER2. Transcurrido el periodo de incubación se realizaron dos lavados con solución PBS/SFB, agregando el anticuerpo secundario α -rabbit - FITC (1/150 μ L) incubándose a temperatura ambiente por 30min.

Se realizaron dos lavados con solución PBS/SFB y se incubaron 30min/4°C con el anticuerpo anti-HER3 se realizaron dos lavados con solución PBS/SFB y se agregó el anticuerpo secundario goat- α -conejo biotinilado (1/500 μ L) incubando a temperatura ambiente en oscuridad por 30min, se realizaron dos lavados con solución PBS/SFB. Posteriormente se agregó el fluorocromo estreptavidina – Texas Red (1/1000 μ L) a 4°C en oscuridad por 30min.

Finalmente, se realizaron 2 lavados con solución PBS/SFB y se montaron en portaobjetos de vidrio en medio de montaje bálsamo de Canadá y sellando con barniz de uñas transparente.

Las muestras fueron analizadas con un microscopio concofocal OLYMPUS FLUOVIEW FV 1000, utilizando el programa FV10-ASW 2.0 Viewer.

VII RESULTADOS

a) Análisis de la presencia del receptor HER3 en las líneas celulares CALO e INBL.

Para determinar la presencia del receptor HER3 en la superficie de las líneas celulares CALO e INBL se realizaron ensayos de citometría de flujo. Las células fueron estimuladas con EGF (factor de crecimiento epidérmico), para determinar si tenía efecto sobre la expresión del receptor HER3.

Los resultados muestran la presencia del receptor HER3 en ambas líneas celulares. Total de eventos capturados de 10000: para la línea celular CALO 95.78% y de 95.23% para la línea celular INBL;. En el caso de la línea celular CALO (Fig.11A) se observa un 7.05% de células positivas (con estímulo), para el receptor HER3, menor, en comparación con la línea celular INBL 10.66% de células positivas (con estímulo) para el receptor de membrana HER3 (Fig.11B). En ambas líneas celulares se observa que el tratamiento con EGF no induce una mayor expresión del receptor.

Presencia del receptor HER3 en las líneas de cáncer de cérvix CALO e INBL

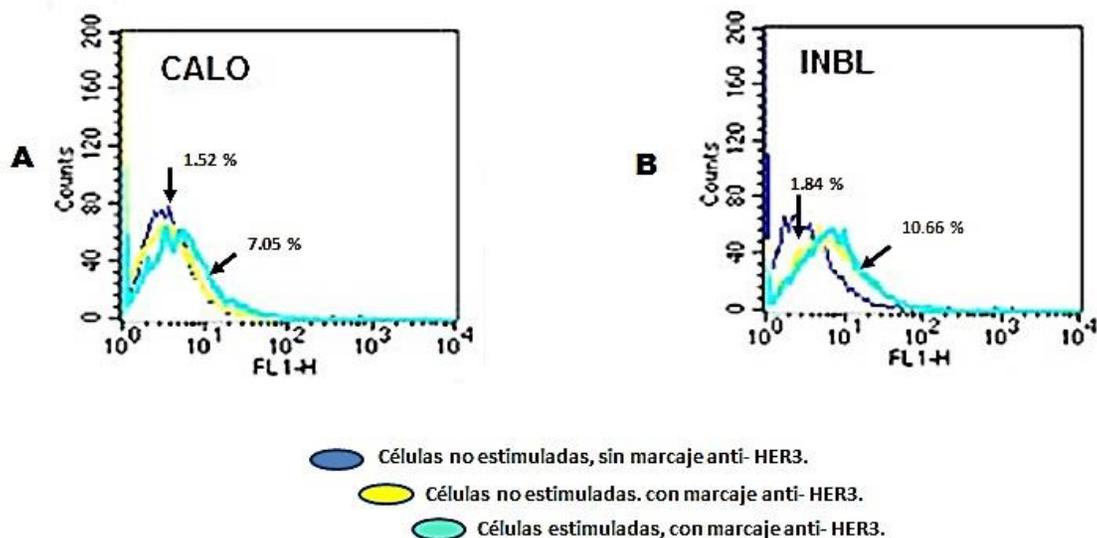


Fig.11 Presencia del receptor HER3 en células de carcinoma de cérvix CALO(A) e INBL (B). Células sin estimular, sin marcaje anti-HER3 (Azul). Células no estimuladas, con marcaje anti-HER3 (Amarillo). Células estimuladas con 20ng/ml/15 minutos con marcaje anti-HER3 (Verde). Las células fueron incubadas con anticuerpo anti-cabra conjugado con FITC. La línea celular INBL al ser estimuladas con el ligando EGF, expresa más receptores de membrana HER3 en la superficie celular.

b) Ensayo de Colocalización del receptor HER3 con el receptor HER2 en células CALO e INBL.

Para corroborar la expresión del receptor HER3 en la superficie y su posible interacción con el receptor HER2, se hicieron tinciones directas sobre la superficie celular utilizando anticuerpos anti-receptor y anti cuerpos secundarios conjugados con fluoróforos y se analizó la tinción mediante microscopía confocal. La figura 12A muestra el contraste de fases, los resultados de la tinción para la línea celular CALO muestran la presencia de la proteína HER3 (Texas-red) en la superficie de las células (Fig.12C), de la misma manera, la presencia de la proteína HER2 (FITC) con una distribución homogénea sobre la superficie de las células (Fig. 12B). De manera automática el microscopio realiza una superposición de imágenes para determinar la co-localización de los dos receptores. De esta sobre posición de ambas imágenes se pueden observar regiones donde ambas proteínas se encuentran co-localizadas figura 12D (amarillo).

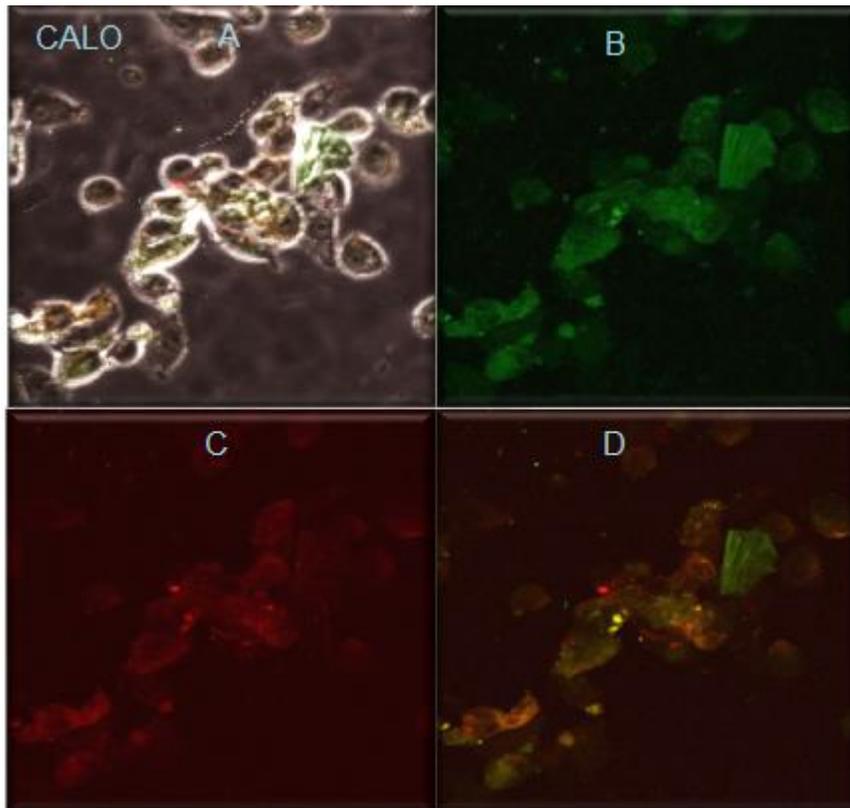


Figura 12. Colocalización del receptor HER3 con el receptor HER2 en células CALO Células CALO, (A) contraste de fases, (B) proteína HER2 (FITC, verde), (C) Presencia de la proteína HER3 (Texas-Red). (D) sobre posición de ambas imágenes (co-localización).

En la Figura 13 se muestra la presencia de los receptores HER3 y HER2 en la línea celular INBL. En la figura A, se aprecia el contraste de fases. Se distingue la presencia de la proteína HER3 (Fig.13C, Texas-red) distribuida en la superficie de toda la célula, también se observa la presencia de la proteína HER2 (Fig. 13B, FITC), distribuida en toda la superficie celular de manera homogénea. La sobre posición de ambas imágenes (Fig. 3D, amarillo) se observa en algunas regiones de la membrana celular, lo cual indica la co-localización de las proteínas HER2/HER3.

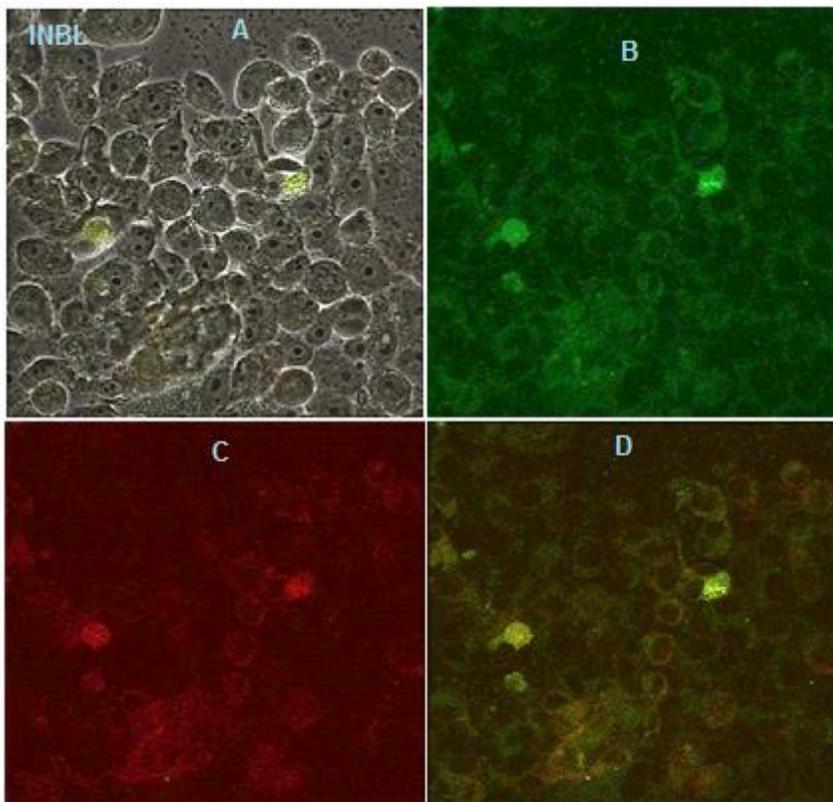


Figura 13. Colocalización del receptor HER3 con el receptor HER2 en células INBL, (A) contraste de fases, (B) Presencia de la proteína HER2 (FITC, verde), (C) Presencia de la proteína HER3 (Texas-Red). (D) sobre posición de ambas imágenes (co-localización).

c) Formación de dímeros HER2-HER3

Para confirmar la presencia del receptor HER3 y la formación del heterodímero HER2-HER3 en ausencia de estímulo, en las líneas celulares CALO e INBL, se llevó a cabo una inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HER3. Después de transferir las proteínas separadas por electroforesis y analizarlas por inmunoblot anti-fosfotirosina, los resultados muestran la presencia de una proteína fosforilada de aproximadamente 190 kDa que corresponde al peso molecular de la proteína HER3 en las cuatro líneas celulares (Figura 14).

Posteriormente, se eluyó el anticuerpo anti-fosfotirosina de la membrana en medio ácido, para después incubarla con anticuerpos específicos anti-HER2 (figura 14B), para determinar si existe una co-precipitación entre ambos receptores. Los resultados muestran la interacción y sugieren la presencia de heterodímeros HER2/HER3. Es evidente la co-precipitación de ambos receptores en las líneas celulares CALO, INBL, y en el control positivo MCF-7; no así en la línea celular HaCat (control negativo para el receptor HER3).



Figura.14 Formación del heterodímero HER2/HER3. A partir de los lisados celulares de 20×10^6 células, se inmunoprecipito la proteína HER3. (A) blot anti-PY, se observa la presencia de la proteína HER3 fosforilada. Las líneas celulares MCF-7 e INBL presentan un mayor estado de fosforilación. (B) Blot anti-HER2, coprecipitación de ambos receptores. La presencia del receptor de membrana HER2 es más evidente en las líneas celulares MCF-7 y INBL que en la línea celular CALO.

d) Determinación de la presencia y estado de fosforilación de la cinasa PI3K

Para poder establecer si la sola presencia de los receptores de membrana HER2 y HER3 en ausencia de cualquier estímulo, es suficiente para formar un heterodímero capaz de activar la vía de señalización PI3K/Akt, se procedió a determinar la presencia de la cinasa PI3K en las líneas celulares CALO e INBL sin ningún tratamiento. Para esto se realizó una inmunoprecipitación utilizando 15×10^6 células por cada línea celular. Se transfirieron las proteínas separadas por electroforesis y se analizaron mediante inmunoblot anti-fosfotirosina. Los resultados no muestran la presencia de una proteína fosforilada que corresponda a 85 kDa (peso de la sub-unidad reguladora p-85 de PI3K), esto en ambas líneas celulares CALO e INBL (figura15). En la línea celular MCF-7, que se utilizó como control positivo, no se observa la banda de 85 kDa, lo mismo en la línea HaCat de queratinocitos normales que se usó como control negativo.

Los anticuerpos anti-py fueron eluidos de las membranas en medio ácido y estas se bloquearon con BSA toda la noche, posteriormente fueron incubadas con anticuerpos anti-PI3K y reveladas mediante quimioluminiscencia

Los resultados muestran la presencia de una banda de aproximadamente 85 kDa correspondiente al peso de la subunidad reguladora p85 de la cinasa PI3K en las cuatro líneas celulares.



Figura15. Estado de fosforilación de la cinasa PI3K en todas las líneas celulares en ausencia de estímulo. (A) IP/PI3K, blot anti-Py ausencia de tirosinas fosforiladas. (B) presencia de la cinasa PI3K en todas las líneas celulares (subunidad reguladora p85).

e) Efecto del ligando Neregulina 1 β (NRG1 β) en el estado de fosforilación de la cinasa PI3K.

Para poder establecer el efecto del ligando natural de HER3, Neregulina 1 β , sobre la fosforilación de la cinasa PI3K, se incubaron 15 X 10⁶ células con 50 ng de NRG1 β . Posteriormente se llevó a cabo una inmunoprecipitación de PI3K; se analizó la fosforilación en tirosina de la subunidad p85 de la cinasa PI3K

Los resultados muestran que la estimulación con el ligando NRG1 β induce fosforilación de la subunidad p85 de la cinasa PI3K (Figura 16). Se puede apreciar una mayor fosforilación en la línea celular CALO en comparación con las líneas celulares INBL y MCF-7(A). No se observa fosforilación en las células HaCat. En la gráfica se observa una mayor respuesta a la estimulación con neregulina1 por parte de la línea celular CALO, figura B.

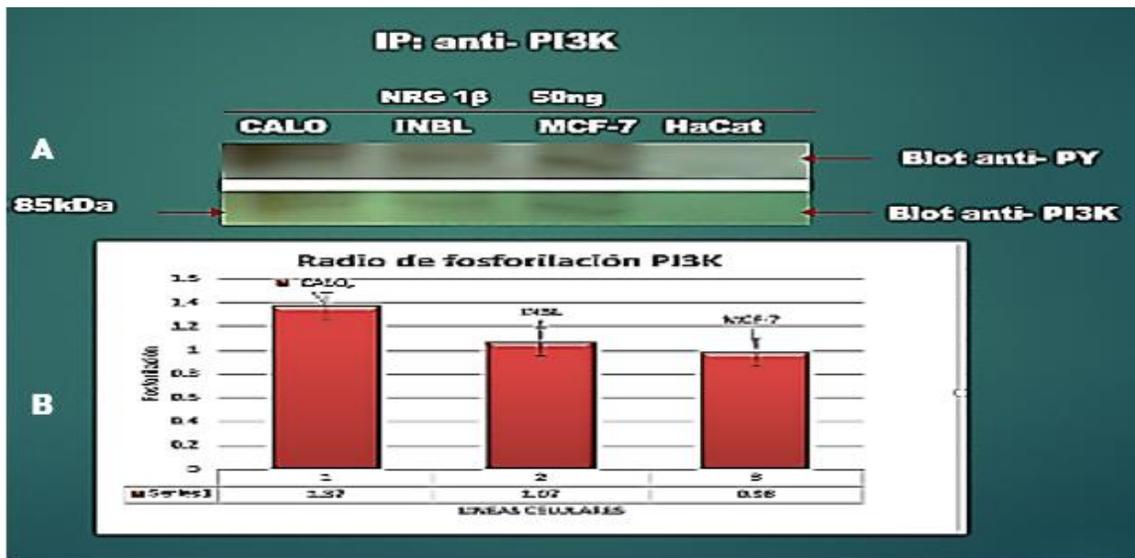


Figura16. Efecto de la Neregulina-1 β sobre la fosforilación de la cinasa PI3K. (A) IP/PI3K, blot anti-PY (subunidad p85), células estimuladas con 50ng/ml/15min de NRG1 β . (B) Grafica radio de fosforilación para cada línea celular.

f) Presencia de la cinasa Akt y estado de fosforilación

Con el objeto de poder establecer si la presencia e interacción de los receptores HER2/HER3 en ausencia de cualquier estímulo es suficiente para activar la vía de señalización PI3K/Akt en células de carcinoma de cérvix CALO e INBL, se procedió primeramente a determinar la presencia y estado de fosforilación de la proteína cinasa serina /treonina Akt; en las líneas celulares CALO e INBL se realizó una inmunoprecipitación utilizando 5×10^6 células por cada línea celular. Después de transferir las proteínas separadas por electroforesis y analizarlas por inmunoblot anti-p-Akt, los resultados muestran la presencia de una proteína de aproximadamente 55 kDa, correspondiente al peso molecular de la proteína Akt en ambas líneas celulares; se puede observar la proteína fosforilada de manera constitutiva en ambas líneas celulares figura 17A. En la línea celular MCF-7, que se utilizó como control positivo, también se observa la banda 55kDa (Figura17A).

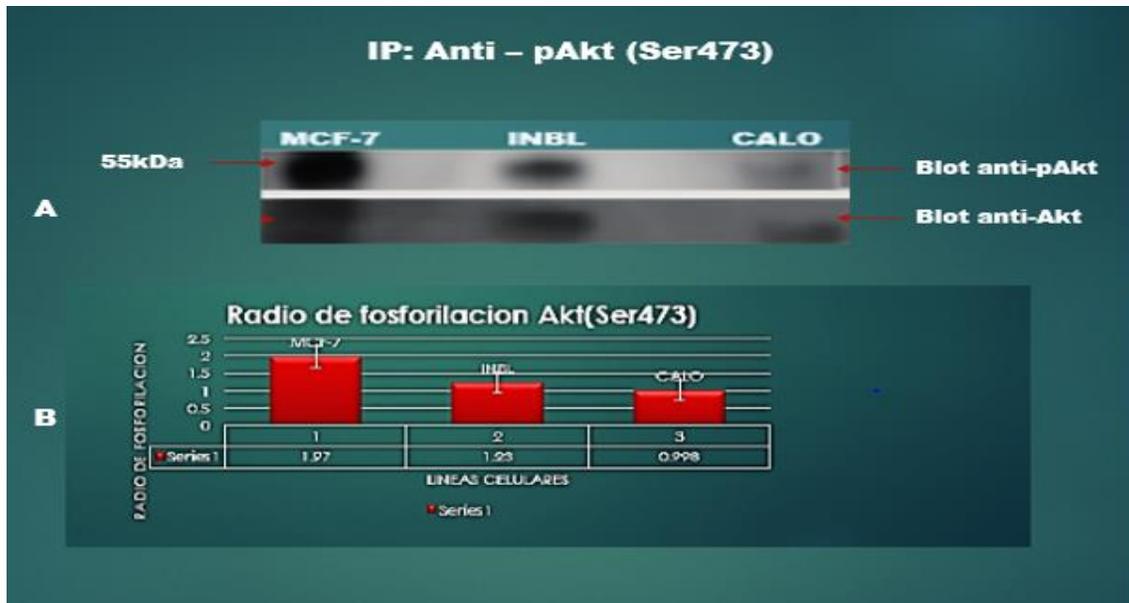


Figura 17. Presencia y estado de fosforilación de la cinasa Akt en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL. (A) Blot anti-Akt, presencia de la cinasa AKT es mayor en las líneas celulares MCF-7 e INBL. Blot anti-pAkt(Ser⁴⁷³), se aprecia una mayor fosforilación de Akt(Ser⁴⁷³) en las líneas celulares MCF-7 e INBL. (B) Diferencia en el radio de fosforilación en función de la proteína Akt, el radio de fosforilación de la cinasa Akt presente en la línea celular MCF-7 es significativamente mayor(1.97) que en las líneas celulares CALO(0.99) e INBL(1.23).

f) Efecto de la Wortmanina sobre la fosforilación de Akt.

Para poder establecer el papel de la cinasa PI3K en la activación de la cinasa de serina y treonina Akt y subsecuente activación de la vía anti-apoptótica PI3K/Akt, se incubaron las células en presencia de la wortmanina (inhibidor específico de PI3K).

Las células fueron incubadas en presencia de la wortmanina durante una hora. Posteriormente las células fueron lisadas y se inmunoprecipito pAkt (Ser⁴⁷³). Después de transferir las proteínas separadas y analizarlas por inmunoblot anti-pAkt (Ser⁴⁷³), los resultados muestran la presencia de una proteína fosforilada de aproximadamente 55 kDa (peso de la cinasa Akt) en las líneas celulares CALO e INBL tanto en presencia y ausencia de inhibidor, así como en la línea celular MCF-7 que se utilizó como control positivo. Se observa la presencia de la cinasa Akt fosforilada y activa de manera constitutiva en ausencia de cualquier estímulo y sin ningún cambio apreciable en su estado de fosforilación y activación total de la cinasa (Ser⁴⁷³) cuando se utiliza el inhibidor específico de la cinasa PI3K; en la línea celular HaCat la presencia del inhibidor no afecta la fosforilación total de la proteína cinasa Akt, implicando que la cinasa PI3K no es relevante para la activación de la cinasa Akt (figura 18).

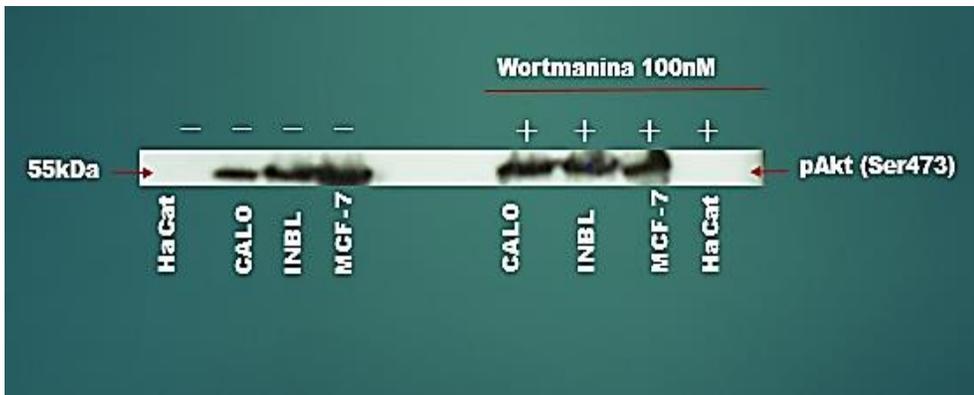


Figura 18. Efecto de la wortmanina sobre la fosforilación de la cinasa Akt. IP/ α -pAkt revelado α -Akt (Ser⁴⁷³), en presencia y ausencia del inhibidor Wortmanina. Las células (5×10^6) fueron incubadas en presencia de 100nM de wortmanina durante una hora. Apartir de los lisados celulares, se inmunoprecipitó la cinasa Akt fosforilada en serina 473. En el blot anti-pAkt(Ser⁴⁷³), las líneas celulares CALO, INBL, MCF-7 presentan la proteína cinasa Akt fosforilada de manera constitutiva en presencia y ausencia del inhibidor wortmanina, excepto el control negativo, línea celular HaCAT.

IX DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La familia de proteínas receptores de superficie EGFR o ErbB en conjunto con sus ligandos se han descrito como una red de señalización que comprende a los receptores, ligandos, transactivadores, procesamiento de señal, adaptadores, moduladores, señalización en cascada y factores de transcripción lo que se relaciona de manera inherente con consecuencias biológicas a partir de la interacción misma del ligando y su receptor tales como proliferación, inhibición de la apoptosis y diferenciación celular. En diferentes estudios se ha relacionado la presencia y sobre expresión de los miembros de la familia en diferentes tipos de cáncer como cáncer de pulmón, próstata, estómago, ovario, mama, donde se ha logrado identificar el dímero involucrado en el proceso canceroso y en algunos casos altamente invasivo como es la presencia y sobre expresión de HER2 y HER3 como heterodímero, en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, y cáncer de mama entre otros, sin embargo, no existen reportes en carcinoma de cérvix^(8,11,15,21-27).

En los resultados obtenidos en este trabajo, se observa la presencia de HER3, tanto en células tratadas con EGF como sin tratar, en ambas líneas celulares, lo que indica que al parecer el tratamiento no induce un aumento en la expresión de la proteína en la superficie celular.

Con los ensayos de inmunoprecipitación, fue posible determinar la presencia de la proteína HER3 en las células MCF-7 (HER3+) así como en las líneas celulares CALO e INBL; al parecer la proteína no está presente en la línea celular HaCat que se usó como control negativo(fig. 5.)

Por otro lado, en ambas líneas celulares se puede observar la presencia de las proteínas de superficie HER3 y HER2, y su co-localización en algunas regiones de la membrana de las células, aunque es más abundante en la línea celular INBL. Por lo anterior, es posible que las proteínas puedan interactuar en esa región particular de la membrana en ambas líneas celulares. Esta interacción se puede confirmar con los ensayos de co-inmunoprecipitación, figuras 14 A y 14B; donde ambos receptores efectivamente co-precipitan en tres de las líneas celulares a excepción del control negativo (HaCat). Esto concuerda con la presencia y co-localización de ambos receptores en la membrana plasmática.

La presencia de HER2 y HER3, es de particular interés ya que como se ha reportado, estos dos miembros de la familia de receptores de membrana se han encontrado comúnmente formando dímeros presentes en muchos procesos tumorales, de hecho existe una prevalencia de formar unidades heterodiméricas

capaces de activar sus respectivos dominios intracelulares con actividad intrínseca de tirosina cinasa, proceso que implica el reclutamiento de moléculas que activan cascadas de señalización. Algunas de ellas eventualmente conllevan a procesos proliferativos, migración y mecanismos de evasión o resistencia a la apoptosis.

Se ha descrito, al ligando natural de HER3, neregulina1 β , como principal inductor en la formación del heterodímero HER2/HER3, asociado a la activación de la vía PI3K/Akt ^(25,27-35) para la formación del heterodímero, y por lo tanto un cambio en el estado de fosforilación de PI3K al estimular con NRG1 β indicaría la subsecuente activación de la vía de señalización como resultado de la activación del heterodímero.

Bajo condiciones fisiológicas, la dimerización resulta en una auto fosforilación o una transfosforilación de los residuos de tirosina en el segmento C-Terminal del dominio citoplasmático. Lo anterior se traduce en la fosforilación de los residuos de tirosina del segmento C-Terminal del receptor HER3 por el receptor HER2; dando lugar a sitios de anclaje o reclutamiento de proteínas citoplasmáticas que poseen dominios SH2, capaces de reconocer y formar enlaces con tirosinas fosforiladas presentes en el receptor HER3.

La proteína de superficie HER3, que pertenece a la familia de receptores de factor de crecimiento epidermal EGFR, como todos los miembros de la familia puede formar dímeros con los demás miembros, así también tiene la capacidad de interactuar con un ligando en particular, Neregulina1 β (NGR1 β). La presencia o la ausencia de un ligando en particular puede favorecer o desfavorecer la capacidad de formación de los diferentes heterodímeros entre los miembros de la familia EGFR y por consiguiente la activación de una vía de señalización en particular como las vías de MAPK ó PI3K/AKT ^(12-16,25, 27,28).

La presencia de la proteína de superficie HER2 favorece en gran medida la complementariedad del dímero HER2/HER3 aportando un dominio tirosina cinasa activo, robustece la capacidad de señalización del dímero. Este dímero se disocia más lentamente que el formado por los otros miembros de la familia ErbB, proporcionando una señalización por más tiempo.

Por otro lado, la subunidad p85 de la cinasa PI3K no se encontró fosforilada en las líneas celulares estudiadas, (figura 15). Lo anterior es de particular interés, la presencia de tirosinas fosforiladas en la subunidad reguladora p85 se asocia a un mecanismo de activación de la cinasa PI3K, esto tiene relevancia si fuera la cinasa PI3K el efector para la activación de la vía PI3K/Akt.

Al evaluar el posible efecto que tendría la presencia del ligando natural de la proteína de membrana HER3, en la formación del heterodímero HER2/HER3 y su probable implicación en el estado de fosforilación y la subsecuente activación de PI3K, se encontró que utilizando al ligando natural NRG1 β , a una concentración de 50ng/ml, se fosforila la subunidad reguladora de la cinasa PI3K (figura16). De manera indirecta se muestra la posibilidad de activación de la vía PI3K/Akt por acción de la formación y activación del dímero HER2/HER3 en presencia de un ligando natural de HER3, que estimula de manera específica para la formación del dímero y su activación, lo que implica el probable reclutamiento y activación de la subunidad reguladora p85 de la cinasa PI3K (24, 27, 34,35-38).

La presencia de la cinasa Akt fosforilada de manera constitutiva en las líneas de cáncer de cérvix CALO e INBL, supone una activación de la vía PI3K/Akt; aun cuando por su peso molecular ligeramente inferior, podría tratarse de una isoforma (Akt2) de la cinasa Akt (figura 17). Para corroborar la actividad de la cinasa PI3K sobre la activación de Akt se utilizó la wortmanina inhibidor específico de PI3K (figura 18). Sin embargo, los resultados, muestran un estado de fosforilación constitutiva de la cinasa Akt a pesar de la presencia del inhibidor de la cinasa PI3K. Lo anterior implica que la cinasa PI3K no participa en la activación de la cinasa Akt. Existe la posibilidad que se encuentren mutaciones presentes en la subunidad catalítica p110 que no requiere de la subunidad reguladora p85, así como mutaciones presentes en el sitio de unión a ATP, que desfavorezcan la interacción específica de la wortmanina con la lisina 802 para PI3K α , ó en la lisina 833 para PI3K γ por un residuo hidrófobo; o bien la presencia de un residuo polar con carga negativa (29, 52,55). Por otro lado, se ha reportado que posibles mutaciones presentes en Akt, como la tirosina 315 y la tirosina 326 pueden favorecer un estado activado de manera constitutiva sobre la treonina 308. Así mismo, existen otros mecanismos implicados como ya se han descrito en algunos trabajos sobre el status de Akt (35, 50,52). Puede ser el caso de Ack1, que puede fosforilar a la tirosina 176, involucrada en un incremento en la activación de la cinasa AKT. En recientes trabajos se ha señalado la capacidad de algunas cinasas de tirosina que presentan flexibilidad de la estructura conformacional afectando de manera positiva la exposición del asa que contiene a la serina 473 que no es afectada por inhibidores específicos de PI3K, lo cual conlleva a la fosforilación de la serina 473 y la treonina 308, residuos fosforilables y específicos para la activación total de la cinasa Akt (24, 29, 32, 35, 37, 52,55).

También se encuentra documentada la capacidad de Scr de fosforilar directamente las tirosinas 315 y 316. Otro residuo involucrado en la activación

de la cinasa Akt es la tirosina 215 que es fosforilada por la cinasa de la proteína 6 (PTK6).

Otra posibilidad es la secuenciación de la cinasa de unión 1 TANK, (TBK1), también conocida como la cinasa asociada a TRAF2 (T₂K), cinasa de serina y treonina, asociada a la fosforilación y activación de factores de respuesta IRF3 y IRF7 que realizan un papel importante en la inducción de interferón tipo 1. Esta cinasa puede fosforilar en tres residuos: Treonina 195, serina 378 y serina 473 de manera independiente de la cinasa PI3K. De manera particular, se ha encontrado activa a TKB1 en musculo cardiaco que presenta knockout en TORC ^(2848, 50,52).

Muy interesante es la cinasa I-kappa-B-épsilon (IKKε o IKBKE), la cual se ha demostrado que al encontrarse en su forma activa puede fosforilar la serina 137 en las isoformas de Akt 1/3 y a la treonina 308 y serina 473, aun en presencia de inhibidores de PI3K homólogos a ATP (wortmanina, LY294002), así como los inhibidores triciribina y perifosina que tienen como blanco el dominio homólogo a pleckstrina, dominio importante de translocación de Akt a la membrana plasmática ^(24-30,45,50,52,54).

Todo lo anterior sugiere un contexto más amplio para intentar comprender el proceso de activación de la cinasa Akt; se puede sugerir la utilización de un cóctel de inhibidores para poder ir descartando dentro del conjunto de cinasas anteriormente mencionadas así como siRNAs dirigidos a regiones muy particulares del dominio PH, para poder dilucidar que cinasas intervienen en su activación ⁽³⁰⁻⁴⁵⁾. La secuenciación de la cinasa Akt, permitiría identificar la presencia de posibles mutaciones o deleciones, que pudieran favorecer un estado constitutivo de Akt

Las posibles implicaciones de mecanismos alternos o no canónicos de activación de la vía PI3K/Akt, conducen a replantear la capacidad de activación aberrante de la cinasa Akt, así como conferir resistencia a combinación de diferentes inhibidores, de una vía tan importante asociada a procesos de crecimiento de tumores y procesos metastásicos ^(40,48,49-55,56).

Se sugiere realizar la secuenciación de la subunidad p110 de la cinasa PI3K así también de la cinasa de serina treonina Akt, particularmente en las regiones o dominios asociados a la interacción con sustrato.

Para poder dilucidar la probable relevancia del complejo mTORC2, en la activación de la cinasa Akt, se sugiere utilizar un inhibidor específico para las subunidades, Rictor y sin1 pertenecientes al complejo mTORC2.

X CONCLUSIONES

- El receptor HER3 está presente en las células de carcinoma de cérvix CALO e INBL.
- Ambos receptores de membrana, HER2 y HER3, co-localizan en la membrana plasmática y presentan una fuerte interacción.
- La cinasa PI3K es fosforilada en función de la presencia del heterodímero HER2/HER3 y el ligando NRG1 β .
- La inhibición de la cinasa de fosfoinositidos PI3K por la presencia de un inhibidor específico como Wortmanina, no afecta el estado de fosforilación y activación total de la cinasa de serina y treonina Akt.
- La presencia de Akt activada de manera constitutiva, sugiere la presencia de una vía alterna, capaz de favorecer la activación total de la cinasa Akt en ausencia o por inactivación de la cinasa PI3K. Un probable mecanismo de activación podría ser a través del complejo mTORC2.

XI BIBLIOGRAFIA

1. Burgess A. EGFR family: Structure physiology signaling and therapeutics targets. *Growth Factors*, 2008; **26**: 263 – 274.
2. Riese D, Gallo R, Settleman J. Mutational activation of ErbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis. *BioEssays*, 2007; **29**: 558 – 565.
3. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell*, 2003; **103**:211 -225.
4. Hutchinson J, Jin J, Cardiff R, Woodgett J, Muller W. Activation of Akt (Protein Kinase B) in Mammary Epithelium Provides a Critical Cell Survival Signal Required for Tumor Progression *Mol and Cell Biol*, 2001; **21**:2203-2212.
5. Harris R, Chung E, Coffey R. EGF receptor ligands *Exp. Cell. Res*, 2003; **284**:2-13.
6. Salomon D, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*, 1995; **19**:183 -235.
7. Carpenter G. ErbB mechanism of action and biology. *Exp Cell Res*, 2003; **284**:66-77.
8. Roskoski R. The ErbB/HER2 receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *BBRC*, 2004; **319**:1-11.
9. Shannon E, Telesco R. Atomistic insights into regulatory mechanisms of the HER2 tyrosine kinase domain: A molecular dynamics study. *Biophysical Journal*, 2009; **96**:2321-2334.
10. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancinno M, Maiello M, De Luca A. The ErbB receptors and their ligands in Cancer: An Over view, *Current Drug Targets*, 2005, **6** 243 – 257.
11. Qing-Bai She, Chandarlapaty S, Qing Ye, Lobo J, Haskell K, Leander K, DeFeo-Jones D. Huber H, Rosen N . Breast Tumor Cells with *PI3K* Mutation or *HER2* Amplification Are Selectively Addicted to Akt Signaling. *PLoS ONE*, 2008; **3**:3056- 3065.
12. Bryan T. Hennessy, Debra L. Smith, Prahlad T. Ram, Yiling Lu and Gordon B. Mills. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature*, 2005; **4**:988 -1004.

13. Grushko J, Filiaci V, Mundt J, Riderstrale K, Olopade O, Fleming G. An exploratory analysis of HER2 amplification and overexpression in advanced endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*; 2008; **198**:3-9.
14. Karunakaran D, Azahar E, Beerli D, Chen X, Grass-Porta D, Ratzin B, Seger, Hynes E, Yarden. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications in breast cancer. *J EMBO*, 1996; 15:254-264.
15. Burke CL, Stern D. Activation of Neu(ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface. *Mol. Cell. Biol*, 1998; **18**:5371-5379.
16. André F, Nahta R, Conforti R, Boulet T, Aziz M, Yuan L, Meslin F, Spilmann M, Esteva J. Expression patterns and predictive value of phosphorylated AKT in early-stage breast cancer. *Ann Oncol*, 2008; 19: 315-320.
17. Prenzel N, Zwick E, Leserer M, Ullrich A. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification, 2006; 2:184-190.
18. Soto I, Rangel R, Valle A, Moreno V, Santiago R, Weiss B, Cáceres J. The tyroprostin B42 inhibits cell proliferation and HER2 phosphorylation in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Invest*, 2008; **26**: 136-44.
19. Soto I, Santiago A, Morales X, Rangel R, Cáceres J. Implication of tyrosine kinase receptors c-kit and HER-2 in cell growth of cervical carcinoma. *Res Adv in Cancer*, 2003; **3**: 1–13.
20. Androutsopoulos G, Adonakis G, Liava A, Ravazoula P. Expression and potential role of ErbB receptors in type II endometrial cancer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2013; **168**: 204 – 208.
21. Stern D. ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2. DUET in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol/Neoplasia*, 2008; **13**:215 – 223.
22. Park J, Sarode V, Euhus D, Kittler R, Scherer P. Noregulin 1-HER axis as a key mediator of hyperglycemic memory effects in breast cancer. *PNAS*, 2012; **18**: 45-51.
23. Vanhaesebroeck B, Julie Guillermet, J, Graupera G, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signaling. *Molecular Cell Biology*. 2010, Volume **11**: 329- 341
24. Aksamitiene E, Kiyatkin, Kholodenko B. Cross talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance- *Biochem. Soc. Trans*, 2012; **40**: 139 – 146.
24. [www. ncbi.gov.mx](http://www.ncbi.gov.mx).

26. Carney W, Bernhardt D, Jasani. Circulating Her2 extracellular domain: A specific and quantitative biomarker of prognostic value in all breast cancer patients? *Biomarkers in cancer*, 2013; 5:31- 39.
27. Jaiswal B, Kljavin N, Stawaski E, Chan E, Parikh C, Durinck S, Chaudhuri S, Pujara K, Guillory J, Sauvage F. Oncogenic ERBB3 mutation in human cancer. *Cancer Cell*, 2013; 23: 603 – 617.
28. Griner S, Wang K, Joshi J, Nahta R. Mechanisms of adipocytokine-mediated trastuzumab resistance in Her2- positive breast cancer cell lines. *Curr Pharmacogenomics Person Med*. 2013; 11:31 – 41.
29. Crabbe T, Welham J, Ward S. The PI3K inhibitor arsenal: choose your weapon! . *Trends in biochemical sciences*, 2007; 32: 450 – 456.
30. Marone R, Cmiljanovic V, Giese B, Wymann M. Targeting phosphoinositide 3-kinase- Moving towards therapy. *BBA*, 2008; 159 – 185.
31. German S, Aslam M, Saleem S, Raees A, Anum T, Alvi A. Carcinogenesis of PIK3CA. *Hereditary cancer in clinical practice*, 2013; 11:5.
32. Vogt P, Kang S, Elsliger M, Gymnopoulos M. Cancer specific mutations in phosphatidylinositol 3- kinase, *Trends in biochemical sciences*; 32:342 – 349.
33. Cheng P, Roberts T, Zhao J. Targeting the phosphoinositide 3 Kinase (PI3K) pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discovery*, 2009; 8:627 – 644.
34. Akinleye A, Chen Y, Mukhi N, Song Y, Liu D. *Journal of Hematology & Oncology*, 2013; 6:1 -9.
35. Morrow J, Cuny L, Chen L, Meuillet J, Mash E, Powis G, Zhang S. Recent development of anticancer Therapeutics targeting Akt. *Recent patents on anticancer Drug discovery*, 2011, 6: 146 – 159.
36. Burris H. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/ mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013; 71: 829 – 842.
37. Vanhaesebroeck B, Watherfield M. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3 – Kinases. *Exp Cell Research*, 1999; 253: 239 – 254.
38. Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends in biochemical sciences*, 2009; 34: 115 – 127.
39. Huang P, Chuang H, Chien C, Wang H. Vitamin E facilitates the inactivation of the kinase Akt by the phosphatase PHLPP1. *Science signaling*, 2013; 6:1 – 12.
40. Divecha N, Irvine R. Phospholipid signaling. *Cell*. 80:259 – 278.

- 41- Subramaniam K, Tham S, Mohamed Z, Woo Y, Azmi N. Cancer associated fibroblasts promote proliferation of endometrial cancer cells. Plos, 2013; 8: 1 – 16.
42. Bhosie J, Kiakos K, Porter A. Treatment with gefinitib or lapatinib induces drug resistance through down regulation of topoisomerase II α expression. American Association for Cancer Research, 2013; 6: 1 – 31.
43. Deming D, Leystra A, Farhoun M, Nettenkoven L, Clipson L, Albrecht D, Halberg R. mTOR inhibition elicits a dramatic response in PI3K – dependent colon cancers, 2013; 8.
44. Huang C, Ko M, Ko Y. A new functional role for mechanistic/ mammalian target of rapamycin complex I (mTORC 1) in circadian regulation of L – Type voltage – gated calcium channels in avian cone photoreceptors. Plos One, 2013; 8.
45. Kato M. Functional proteomics, human genetics and cancer biology of GIPC family members. Experimental & Molecular Medicine, 2013; 45.
46. Yentrapalli R, Azimzadeh, Sriharshan A, Malinowsky K, Becker K. The PI3K/Akt/mTOR pathway is implicated in the premature senescence of primary human endothelial cells exposed to chronic radiation. PlosOne, 2013; 8.
47. De Marco C, Rinaldo N, Bruni P, Malzoni C, Zullo F, Fabiani F, Giuseppe V. Plos One, 2013; 8.
48. Cervera P, Fléjou J. Changing pathology with changing drugs: Tumors of the gastrointestinal tract. Pathobiology, 2011; 78: 76 – 89.
49. Conleth G, Morris M & P. Recent advances in novel target therapies for Her2 – positive breast cancer, 2012; 23: 765 – 776.
50. Haishan L, Pauza D. Critical roles for Akt kinase controlling HIV envelope – mediated depletion of CD4 T cells. Retrovirology 2013, 10.
51. Mahajan K, Mahajan N. PI3K- independent Akt activation in cancers: A treasure Trove for novel therapeutics. J Cell Physiology, 2012; 227: 3178 – 3184.
52. Jian G, Coppla D, Jin Q. IKBKE protein activates Akt independent of phosphatidylinositol 3- Kinase/PDK1/mTORC2 and the pleckstrin homology domain to sustain malignant transformation. JBC, 2011; 286: 37389 – 37398.
53. Guertin D, Sabatini D. Defining the Role of mTOR in Cancer. Cancer Cell, July 2007; 12: 9 – 22.
54. Nissim H. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. Cancer Cell, 2005; 8: 179 – 183.

55. Chaoquan H, Huang L, Gest C, Xiaodong X. Opposite regulation by PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways of tissue factor expression, cell-associated procoagulant activity and invasiveness in MDA-MB-231 cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 2012; 16: 2 - 10.

56. Zhang K, Wong P, Jiaqi D, Jacobs, Borden E, Bedogni B. An ErbB3/ErbB oncogenic unit plays a key role in NRG1 signaling and melanoma cell growth and survival. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2013; **26**: 408 – 414.