



DOMINIOS FUNCIONALES DE LAS NEUREGULINAS Y SU USO COMO DIANA TERAPÉUTICA

Tesis Doctoral

Ariana Centa

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

CSIC-Universidad de Salamanca

Salamanca, septiembre 2018



D. Atanasio Pandiella Alonso, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y D. Juan Carlos Montero González, Investigador Miguel Servet del Instituto de Salud Carlos III y del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL),

CERTIFICAN,

Que la presente Tesis Doctoral titulada “***Dominios funcionales de las neuregulinas y su uso como diana terapéutica***” presentada por la Dña. Ariana Centa, licenciada en Farmacia, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, centro mixto CSIC-Universidad de Salamanca, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expiden el presente certificado en Salamanca a 19 de julio de 2018.

Fdo: Atanasio Pandiella Alonso

Fdo: Juan Carlos Montero González

A mis padres

A Arthur

*“A gente não pode ter tudo, qual seria a graça do mundo se fosse assim?
Por isso, eu prefiro sorrisos e os presentes que a vida trouxe pra perto de mim.”*

(Trem-bala, Ana Vilela)

Índice

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Introducción	9
1. Cáncer de mama.....	11
1.1. Opciones terapéuticas.....	13
2. Receptores ERBB/HER	13
2.1. Estructura y activación de los receptores HER	14
2.2. Ligandos de la familia del EGF	16
2.3. Señalización por receptores HER	18
2.4. Receptores HER, sus ligandos y cáncer	19
2.4.1. EGFR	20
2.4.2. HER2.....	20
2.4.3. HER3 y HER4	21
2.4.4. Ligandos del EGF.....	21
2.5. Terapias dirigidas contra receptores HER.....	22
2.5.1. Anticuerpos monoclonales (mAbs).....	22
2.5.2. Inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKIs)	23
2.5.3. Anticuerpos conjugados a drogas (ADCs)	24
3. Neuregulinas.....	25
3.1. NRG1 (neuregulina 1)	28
3.1.1. Dominios de la NRG1.....	31
a) N-terminal	31
b) Dominio <i>Kringle</i>	31
c) Dominio inmunoglobulina (Ig)	31
d) Región espaciadora	32
e) Dominio rico en cisteínas (CRD).....	33
f) Dominio EGF	33

g) Región yuxtamembrana	34
h) Dominio transmembrana	34
i) Cola citosólica	34
3.2. Señalización a través de las NRGs	35
3.2.1. Sistema de activación NRG-HER	35
3.2.2. Señalización independiente de receptores HER	38
3 Implicación de las NRGs en cáncer	39
4 Anticuerpos conjugados a drogas (ADCs)	43

Objetivos..... 47

Materiales y métodos..... 51

1. Reactivos	53
2. Anticuerpos	54
2.1. Anticuerpos comerciales	54
2.2. Anticuerpos generados en el laboratorio	55
2.3. Producción de proteínas de fusión	55
2.4. Obtención de péptidos acoplados a KLH	57
2.5. Obtención de antisueros.....	57
2.6. Purificación de anticuerpos	58
3. Cultivos celulares	59
3.1. Condiciones de cultivo.....	62
3.2. Preservación de líneas celulares.....	62
3.3. Transfección y selección de clones estables.....	63
a) Transfección con fosfato cálcico	63
b) Transfección con Lipofectamina™	63
c) Transfección con jetPEI™	64
4. Generación de los mutantes de NRG α 2c de rata.....	64
5. Extracción de proteínas e inmunoprecipitación	66

6. Electroforesis y Western Blot	67
7. Inmunofluorescencia	69
8. Citometría de flujo: marcaje de superficie	70
9. Ensayo de protección de proteasas	70
10. Ensayo de estimulación con PMA.....	71
11. Liberación de NRG soluble	71
12. Ensayo de actividad biológica	72
13. Proliferación celular.....	73
13.1. Metabolización del MTT	73
13.2. Contaje del número de células.....	74
14. Ensayo de internalización	74
15. Conjugación de anticuerpos a SMCC-DM1	75
16. Análisis estadístico.....	75
Resultados	77
1. Identificación de la importancia de los dominios de las NRGs en su actividad biológica.....	79
1.1. Formas moleculares de la NRG α 2c y de sus mutantes	79
1.2. Localización celular y procesamiento de la NRG α 2c	83
1.3. El dominio inmunoglobulina potencia la activación de los receptores HER.....	89
1.4. Respuestas de señalización celular a las formas solubles de NRG α 2c y NRG Δ Ig	94
1.5. Caracterización y actividad biológica de proNRG α 2c y proNRG Δ Ig ..	98
1.6. Células MCF7-NRG α 2c y MCF7-NRG Δ Ig: sensibilidad a terapias anti-HER2	103
1.7. Interacción del dominio inmunoglobulina de la NRG con la matriz extracelular.....	106
Discusión.....	127

Conclusiones.....	143
Bibliografía	147
Financiación	167
Agradecimientos.....	171
Anexos	175
Anexo I.....	175
Anexo II: Artículo científico.....	179

Abreviaturas

Abreviaturas

Abs	<i>Absorbance</i> Absorbancia
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i> Desintegrina y metaloproteasa
ADC	<i>Antibody-drug conjugate</i> Anticuerpo conjugado a fármaco
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AREG	<i>Amphiregulin</i> Anfiregulina
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> Trifosfato de adenosín
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> Ácido bicinconínico
BCL2	<i>B-cell lymphoma-2</i> Linfoma 2 de células B
BRCA1	<i>Breast cancer 1 gene</i> Gen del cáncer de mama 1
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> Albúmina sérica bovina
BTC	<i>Betacellulin</i> Betacelulina
CDK	Cyclin-dependent kinase; Quinasa dependiente de ciclina
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> Ácido desoxiribonucleico complementario
CRD	<i>Cystein-rich domain</i> Dominio rico en cisteínas
CSPG5	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan 5</i> Proteoglicano 5 condroitín sulfato
DAPI	<i>4'-6-diamidino-2-phenylindole</i> Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMA	Dimethylacetamide Dimetilacetamida
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> Medio de Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> Dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> Ácido desoxiribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> Factor de crecimiento epidérmico

EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EPGN	<i>Epigen/epithelial mitogen</i> Mitógeno epitelial
ER	<i>Estrogen receptor</i> Receptor de estrógenos
ErbB	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene B</i> Oncogén viral de la leucemia de eritroblastosis B
EREG	<i>Epiregulin</i> Epiregulina
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase-1/2</i> Quinasa regulada por señales extracelulares -1/2
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> Clasificación celular por fluorescencia
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> Quinasa de adhesiones focales
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> Suero bovino fetal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GGF	<i>Glial growth factor</i> Factor de crecimiento glial
GM130	<i>Golgi matrix protein of 130 kDa</i> Proteína de 130 kDa de la matriz del Golgi
GSK3α/β	<i>Glycogen synthase kinase 3 alpha and beta</i> Enzima glucógeno sintasa cinasa 3 alfa y beta
GST	<i>Glutathion-S-Transferase</i> Glutatió-S-Transferasa
GTP	<i>Guanosine-triphosphate</i> Guanosín trifosfato
HBEGF	<i>Heparin binding EGF like growth factor</i> Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina
HEK	<i>Human embrionary kidney</i> Riñón embrionario humano
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1piperazineethanesulfonic acid</i> Ácido 4-(2-hidroxietil)-1piperazineetanosulfónico
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i> Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> peroxidasa de rábano
IF	<i>Immunofluorescence;</i> Inmunofluorescencia

Ig	<i>Immunoglobulin</i> Inmunoglobulina
IHQ	<i>Immunohistochemistry</i> Inmunohistoquímica
IP	<i>Immunoprecipitation;</i> Inmunoprecipitación
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside</i> Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> Hemocianina de lapa
KRH	<i>Krebs-Ringer-HEPES buffer</i> Tampón Krebs-Ringer-HEPES
LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i> Proteína 1 de membrana asociada a lisosoma
LB	<i>Luria-Bertani medium</i> Medio de Luria-Bertani
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> Anticuerpo monoclonal
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> Proteína quinasa activada por mitógeno
MBS	<i>3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester</i> N-hidroxisuccinimida del ácido m-maleibenzoico
MBS	<i>3-Maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester</i> N-Hidroxisuccinamida del ácido m-maleimidobenzoico
MEK	<i>Meiosis-specific serine/threonine-protein kinase</i> Proteína quinasa de serina/treonina específica de meiosis
MMP13	<i>Matrix metalloproteinase-13</i> Metaloproteasa de matriz-13
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> Ácido ribonucleico mensajero
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> Diana de la rapamicina en mamíferos
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NDF	<i>Neu differentiation factor</i> Factor de diferenciación Neu
NDRG1	<i>N-myc downstream-regulated gene-1</i> gen regulador de la corriente del N-myc
NRG	<i>Neuregulin</i> Neuregulina
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> Carcinoma de pulmón no microcítico
PAK1	<i>p21-activated kinase 1</i> Quinasa activada por p21 -1
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa

PI3K	<i>Phosphatidyl inositol 3-kinase</i> Fosfatidilinositol-3-quinasa
PKC	<i>Protein kinase C</i> Proteína quinasa C
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> 12-miristato 13-acetato de forbol
PMFS	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PR	<i>Progesterone receptor</i> Receptor de progesterona
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> Fosfatasa homóloga a la tensina
pTyr	<i>Phosphorylated tyrosine</i> Tirosina fosforilada
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> Difluoruro de polivinilideno
qRT-PCR	<i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i> Receptor tirosina quinasa
SD	<i>Standard deviation</i> Desviación estándar
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> Sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SMCC	<i>Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate</i> Succinimidil 4- (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato
S MDF	<i>Sensory and motor neuron-derived factor</i> Factor derivado de neuronas sensoriales y motoras
SRC	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase sarcoma</i> Proto-oncogén de la proteína-tirosina quinasa de sarcoma
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> Transductor de señales y activador de transcripción
TACE	<i>Tumor necrosis factor-alfa converting enzyme</i> Enzima conversor del factor de necrosis tumoral alfa
TBS-T	<i>Tris-buffer saline with Tween</i> Tampón Tris salino con Tween
T-DM1	<i>Ado-trastuzumab emtansine</i> Ado-trastuzumab emtansina
TER	<i>Tetracyclin response element</i> Elemento de respuesta a tetraciclina
TGFα	<i>Transforming growth factor alpha</i> Factor de crecimiento y transformación de tipo alfa

TKI	<i>Tyrosine kinase inhibitor</i> Inhibidor de tirosina quinasas
TNBC	<i>Triple negative breast cancer</i> Cáncer de mama triple negative
v-erbB	<i>Erythroblastic leukemia viral oncogene B</i> Oncogén viral de la leucemia de eritroblastosis B
WB	<i>Western blot</i>

Introducción

1. Cáncer de mama

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, existen 1,5 millones de mujeres con cáncer de mama en el mundo, y en 2015 se diagnosticaron 370.000 casos, representando una incidencia de 15% del total de tumores. En 2017 se registraron 26.370 nuevos casos de cáncer de mama en España, siendo considerado el tipo de cáncer más frecuente en mujeres. A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, el cáncer de mama sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres españolas, causando 6.385 fallecimientos en 2016 (Sociedad Española de Oncología Médica, SEOM) (Barnadas *et al.* 2018).

Cuando el cáncer de mama está localizado, la media de supervivencia de las pacientes a 5 años es muy alta (cerca de 90%), pero cuando el tumor está metastatizado, la tasa de supervivencia se reduce al 26% (García-Saenz *et al.* 2015).

Los tumores de mama presentan una gran heterogeneidad en cuanto a alteraciones moleculares, sensibilidad al tratamiento y composición celular. Por lo tanto, resulta difícil establecer un sistema de clasificación sencillo, práctico y fácilmente aplicable que incluya todas las particularidades del cáncer de mama (Bhargava *et al.* 2009). Por ello, el desafío inmediato es aprender cómo utilizar las características moleculares de un individuo y su tumor, permitiendo el diagnóstico temprano y el tratamiento eficaz del cáncer de mama (Perou *et al.* 2000; Dai *et al.* 2005; Olopade *et al.* 2008; MacMillan *et al.* 2014).

Los perfiles de expresión génica utilizados en el análisis de los tumores de mama han permitido identificar características moleculares e histopatológicas, asociadas con diferentes parámetros clínicos. De acuerdo con estas marcas génicas, el cáncer de mama fue clasificado en cinco subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2-positivo, basal-like y normal breast-like (De Laurentiis *et al.* 2010; Prat and Perou 2011).

- *Luminal A y B*: poseen expresión de receptores hormonales, que incluyen al receptor de estrógenos (ER) y de progesterona (PR). El subtipo luminal B presenta

un mayor grado histológico y es más agresivo que el luminal A (Perou *et al.* 2000; Sorlie *et al.* 2006). Además de los dos receptores hormonales citados, estos tumores también expresan EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2) y ciclina E1 (Sorlie *et al.* 2001).

- *HER2 positivo*: presenta sobreexpresión de HER2, son negativos para receptores hormonales, tienen grados histopatológicos bajos y pueden tener también mutaciones en P53 (King *et al.* 1985; Reddy 2011). Entre el 15 y 20% de los cánceres de mama invasivos son HER2 positivos (Burstein *et al.* 2010).

- *Basal-like*: expresan genes que normalmente se encuentran en las células basales del tejido mamario (Lakhani and O'Hare 2001; Jones *et al.* 2004) y se caracterizan principalmente por la pérdida de expresión de los receptores hormonales, así como de HER2, y por la expresión de citoqueratinas CK5/CK6 y EGFR (Rakha *et al.* 2008). Presentan mutaciones en *p53* en más del 85% de los casos y es muy común en portadores de mutaciones en el gen *BRCA1* (gen de cáncer de mama 1). Representa un 15% de todos los cánceres de mama (Carey *et al.* 2006; Rakha *et al.* 2008).

- *Normal breast-like o no clasificados*: se asemejan al subtipo basal-like en el perfil molecular e inmunohistoquímico, siendo negativo para 5 marcadores: ER, PR, HER2, citoqueratina CK5 y EGFR. Son generalmente pequeños y de buen pronóstico, representan el 6 a 10% de los cánceres de mama (Reddy 2011).

A pesar de esta clasificación molecular, en la práctica clínica la clasificación se suele basar en el análisis por inmunohistoquímica de los receptores hormonales y HER2. Así, la clasificación histológica separa los tumores de mama en tres subtipos principales: luminal A, luminal B y HER2 positivos. A los tumores que presentan la pérdida de expresión (o mínima expresión) de ER, PR y HER2, se denomina tumores de cáncer de mama triple negativo (TNBC) (Reddy 2011).

1.1. Opciones terapéuticas

En todos los tipos de cáncer el plan de tratamiento debiera ser personalizado. Para el cáncer de mama la cirugía para retirar el tumor es siempre recomendada y la elección de la terapia neoadyuvante o tras el proceso quirúrgico dependerá de las características del tumor y del paciente (García-Saenz *et al.* 2015). Estas terapias incluyen radiación, quimioterapia, terapia dirigida y/o terapia hormonal (Del Barco *et al.* 2013). En el caso de tumores inoperables, el tratamiento sistémico es la única opción para disminuir el cáncer. La terapia sistémica se distingue en tres categorías: quimioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida (Gavila *et al.* 2015).

Las terapias dirigidas son tratamientos direccionados a proteínas específicas de las células del cáncer, o contra el microambiente tumoral, no generando gran daño a las células sanas, como causa la quimioterapia. En el caso del cáncer de mama, estas terapias se usan en el subtipo HER2 positivo e incluyen los anticuerpos monoclonales trastuzumab (Herceptin®) y pertuzumab (Perjeta®), el anticuerpo trastuzumab conjugado a emtansina (ado-trastuzumab emtansina, T-DM1) (Kadcyla®), los inhibidores de la actividad tirosina quinasa como neratinib (Nerlynx®) y lapatinib (Tykerb®), y los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) CDK4 y CDK6 palbociclib (Ibrance®), ribociclib (Kisqali®) y abemaciclib (Verzenio™).

Actualmente, los receptores HER, sus ligandos y las proteínas involucradas en la ruta de señalización desencadenada por la activación de estos receptores en cáncer de mama y otros tipos de tumores, están siendo ampliamente estudiados como diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos, a fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes con esta enfermedad.

2. Receptores ERBB/HER

La familia de receptores ERBB/HER tiene un papel crucial en el desarrollo, proliferación y diferenciación celular, estando presente en todos los organismos

multicelulares (Citri and Yarden 2006; Tebbutt *et al.* 2013). En condiciones fisiológicas, la activación de los receptores HER está controlada por sus ligandos, que son miembros de la familia del EGF (factor de crecimiento epidérmico) (Hynes and Lane 2005). Una desregulación de la activación de los receptores HER se ha implicado en la oncogénesis y progresión tumoral. De hecho, los componentes de las vías de señalización desencadenadas por estos receptores son importantes dianas terapéuticas en cáncer (Yarden and Sliwkowski 2001; Riese *et al.* 2007; Ocana and Pandiella 2010).

Los receptores HER son proteínas transmembrana glicosiladas que pertenecen a la subclase I de receptores tirosina quinasa (RTKs) (Downward *et al.* 1984; Yarden and Sliwkowski 2001). Los miembros de esta familia de receptores son: EGFR, ERBB1 o HER1; Neu, ERBB2 o HER2; ERBB3 o HER3; y, ERBB4 o HER4.

El EGFR, fue el primer miembro de la familia de receptores HER que se describió. Se identificó como una proteína de membrana que se fosforilaba en presencia de EGF (Carpenter *et al.* 1975; Carpenter *et al.* 1978), promoviendo la proliferación de las células epiteliales (Cohen 1965). El aislamiento y caracterización del cDNA que codifica este receptor permitió relacionarlo con la tumorigénesis, al comprobar que el oncogén aviar v-erbB, correspondía en realidad a una versión truncada del EGFR (Downward *et al.* 1984; Ullrich *et al.* 1984). Un año después, se describió la secuencia de otro posible RTK amplificado en carcinomas mamarios humanos y que presentaba una gran homología con EGFR y v-erbB, el cual se denominó HER2 (Coussens *et al.* 1985; King *et al.* 1985). Además, se determinó que la localización cromosómica de HER2 es idéntica a la del oncogén Neu, implicándolo definitivamente en el proceso de carcinogénesis (Schechter *et al.* 1984). Posteriormente, se describieron ERBB3/HER3 (Kraus *et al.* 1989) y ERBB4/HER4 (Plowman *et al.* 1993), que también se encuentran relacionados con procesos tumorigénicos.

2.1. Estructura y activación de los receptores HER

Los receptores HER, como la mayoría de los RTKs, son glicoproteínas de membrana que presentan una estructura compuesta por tres módulos: una región

extracelular (a la que se une el ligando), una región transmembrana y una larga cola citoplasmática (que contiene el dominio quinasa seguido de secuencias reguladoras no catalíticas con residuos de tirosina fosforilables) (Hynes and Lane 2005).

La región extracelular está compuesta por cuatro subdominios globulares: dos subdominios de homología largos con regiones ricas en leucina (subdominios I y III), y otros dos que contienen múltiples puentes disulfuro entre las cisteínas presentes en su secuencia (subdominios II y IV) (Ward *et al.* 1995). Esta región extracelular está involucrada en la unión al ligando y en la exposición del brazo de dimerización (Burgess *et al.* 2003) (Figura 1).

Se han identificado dos conformaciones diferentes del dominio extracelular de estos receptores: una conformación cerrada y otra abierta o extendida (Cho and Leahy 2002; Ferguson *et al.* 2003; Bouyain *et al.* 2005; Dawson *et al.* 2005). En ausencia de ligando, los receptores EGFR, HER3 y HER4 mantienen la conformación cerrada, donde los subdominios II y IV se encuentran en contacto directo, manteniendo oculto el brazo de dimerización (Cho and Leahy 2002; Ferguson *et al.* 2003). Por otro lado, la unión del ligando a los subdominios I y III del receptor estabiliza su conformación extendida permitiendo que interactúe con otros receptores de la familia (Garrett *et al.* 2002; Burgess *et al.* 2003; Burgess 2008).

A pesar de que presentan la misma estructura general, existen particularidades importantes entre los receptores HER. HER3 no presenta actividad quinasa eficiente, por lo tanto, depende de interacciones con otros receptores HER para la señalización (Carraway *et al.* 1994). Por otro lado, no se ha descrito ningún ligando capaz de unirse con alta afinidad a HER2. Sin embargo, al estar permanentemente en una conformación abierta, funciona como correceptor de los otros tres miembros (Hynes and Lane 2005; Linggi and Carpenter 2006).

La activación de los receptores ERBB se da por dimerización, tras la unión del ligando o por la sobreexpresión del receptor. La dimerización puede ocurrir entre dos receptores idénticos (homodimerización) o entre diferentes miembros de la familia (heterodimerización), particularmente EGFR, HER3 y HER4 con HER2 (Linggi and Carpenter 2006).

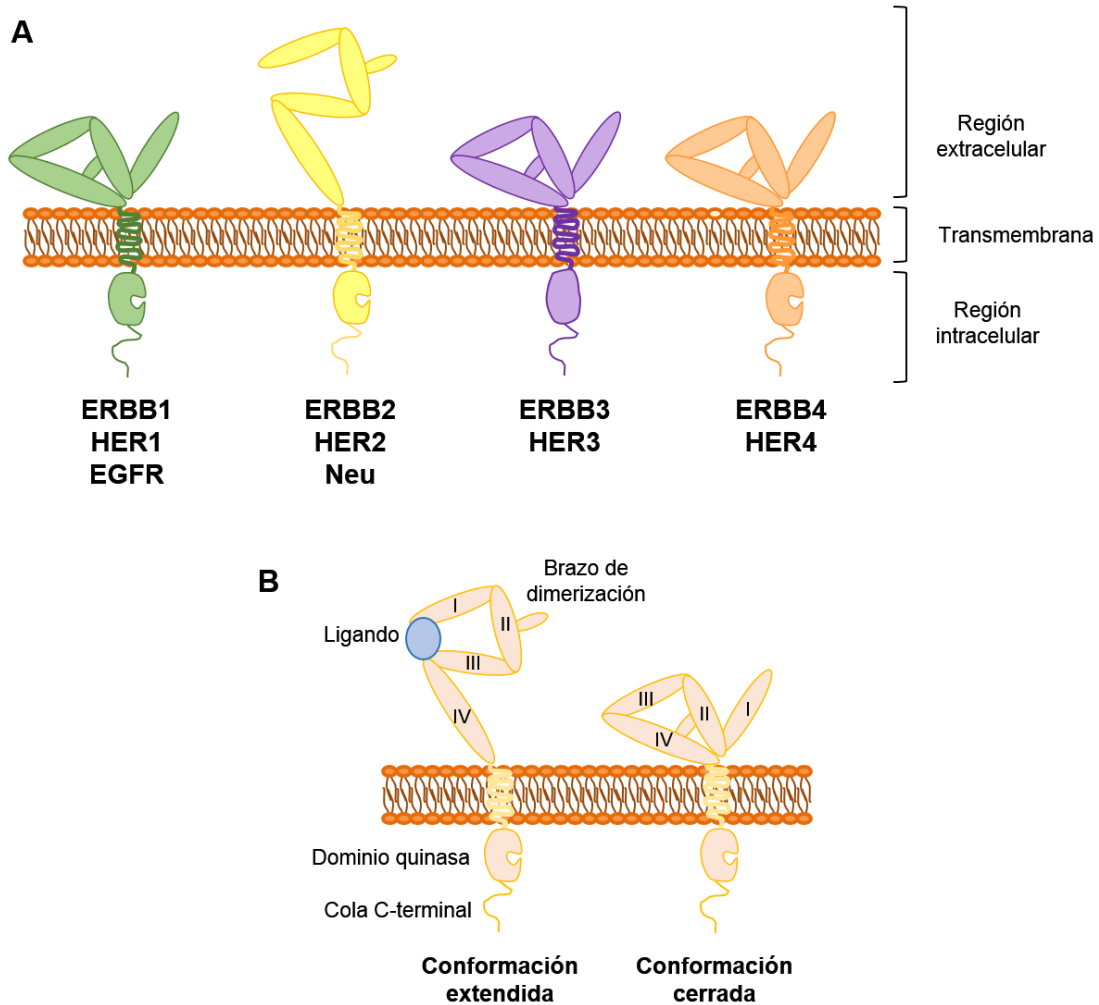


Figura 1. (A) Representación esquemática de los cuatro receptores HER. (B) Activación de los receptores HER por ligando. La unión del ligando a los subdominios I y III estabiliza la conformación extendida de los receptores, permitiendo que el brazo de dimerización quede expuesto y ocurra la formación de dímeros con otros receptores de la familia.

2.2. Ligandos de la familia del EGF

Los ligandos de los receptores HER presentan una región común, denominada dominio EGF, que da nombre a esta familia de ligandos (Massague and Pandiella 1993). El dominio EGF está formado por 40 a 50 aminoácidos, incluyendo seis cisteínas que establecen tres puentes disulfuro entre sí (Holmes *et al.* 1992; Wen *et al.* 1994). Se ha descrito que este dominio sería suficiente para la activación de los receptores HER (Massague and Pandiella 1993; Warren *et al.* 2006).

Además del dominio principal, los miembros de la familia del EGF, suelen presentar un péptido señal en su extremo N-terminal, que los dirige hacia el retículo endoplasmático para ser exportados a la membrana plasmática. Algunos ligandos

también pueden tener otras estructuras situadas a ambos lados del módulo EGF, como dominios de tipo inmunoglobulina o de unión a heparina (Massague and Pandiella 1993; Warren *et al.* 2006).

En mamíferos, se conocen hasta 40 ligandos de la familia del EGF, que se diferencian en función de su afinidad por los distintos receptores HER (Kinugasa *et al.* 2004; Eccles 2011).

Los ligandos EGF, TGF α (factor de crecimiento y transformación de tipo alfa) y AREG (anfiregulina) se unen específicamente a EGFR. La BTC (betacelulina), el HBEGF (factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina), la EREG (epiregulina) y el EPGN (epigen, mitógeno epitelial) muestran afinidad dual por EGFR y HER4. La NRG1 (neuregulina 1) y NRG2 tienen capacidad de unión a HER3 y HER4, en cuanto que la NRG3 y NRG4, se unen a HER4. Específicamente a HER3 se une el ligando CSPG5 (proteoglicano 5 condroitín sulfato) o caleb (Figura 2).

Estos ligandos son glicopéptidos que, tras ser sintetizados, se dirigen a la superficie celular a través de la ruta biosintética de secreción. En la mayoría de los casos, se producen en forma de moléculas transmembrana que pueden ser procesadas, liberando el factor soluble activo, o acumulándose como factores transmembranales (Massague and Pandiella 1993). El procesamiento de los diferentes ligandos de la familia del EGF es un proceso altamente regulado y, a pesar de que no existe una elevada homología de secuencia en la región en que se produce, se sabe que es imprescindible la acción de metaloproteasas, principalmente ADAMs (desintegrina y metaloproteasa) para la liberación del ectodominio al medio extracelular (Montero *et al.* 2000; Fischer and Reh 2003; Lee *et al.* 2003; Linggi and Carpenter 2006). De este modo, los ligandos de la familia de EGF son capaces de estimular la señalización celular tanto en su forma soluble como en su forma transmembrana (Hynes and Lane 2005).

Los distintos ligandos van a promover patrones específicos de fosforilación de los receptores HER, lo que a su vez dicta la duración de la señalización y las respuestas celulares (Hobbs *et al.* 2002; Hynes and Lane 2005; Eccles 2011).

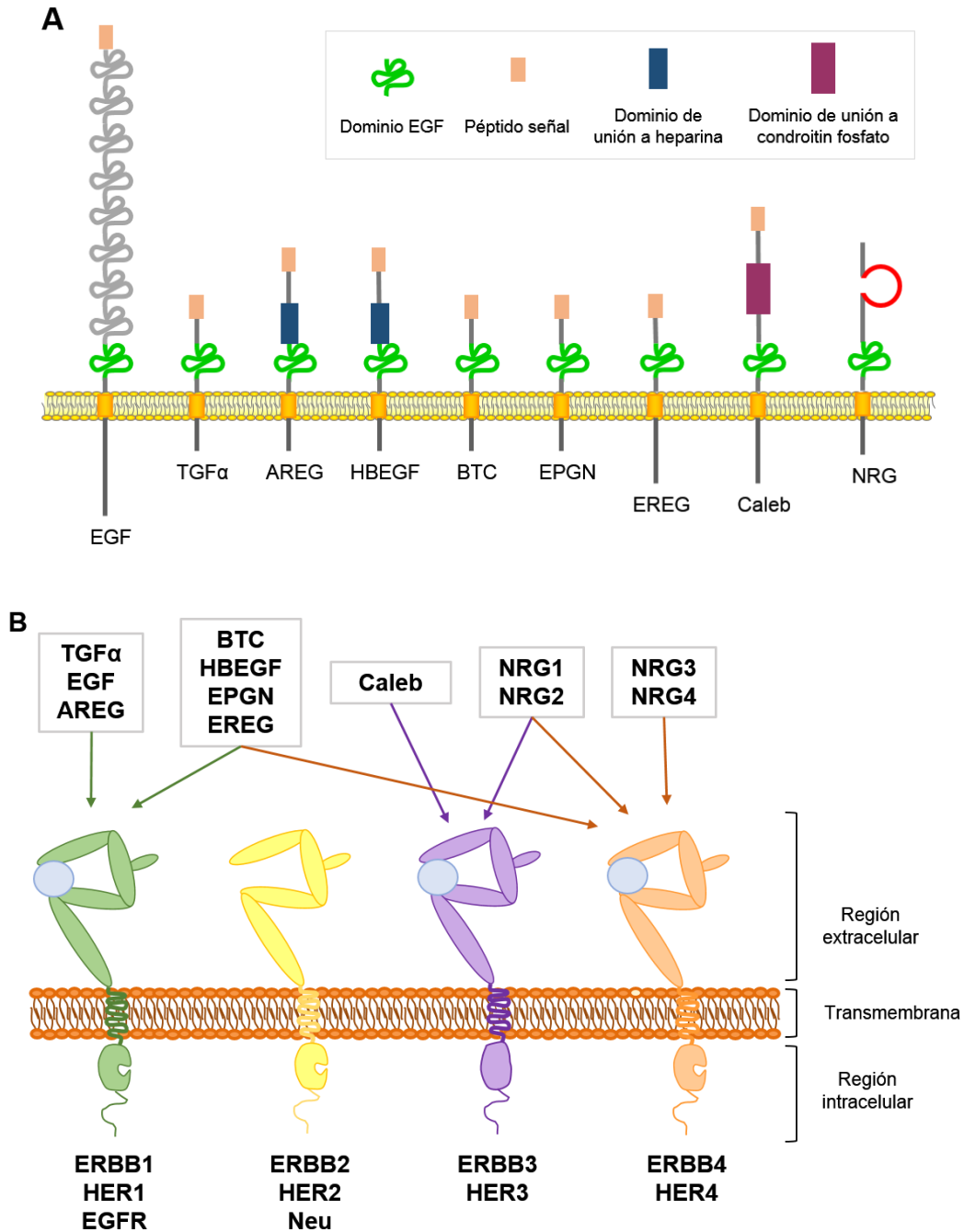


Figura 2. (A) Representación esquemática de los ligandos de la familia del EGF. (B) Representación esquemática de los receptores HER y descripción de los ligandos de la familia del EGF con que interactúan.

2.3. Señalización por receptores HER

La activación de los receptores HER permite su interacción con diferentes moléculas adaptadoras que desencadena una red de cascadas de señalización intracelular (Schlessinger 2000). A pesar de su elevada homología, los receptores

HER no presentan redundancia en lo que se refiere a la señal desencadenada y, aunque comparten algunas vías, cada receptor está acoplado a un grupo distinto de proteínas efectoras de señalización (Yarden and Sliwkowski 2001; Eccles 2011).

Las dos rutas de señalización principales activadas por todos los receptores HER son la vía de PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) y las vías de MAPKs (proteínas quinasa activadas por mitógeno) (Yarden and Sliwkowski 2001; Schlessinger 2004). La vía de Ras y Raf-MAPK es una diana invariable de todos los ligandos de los receptores HER. Por otro lado, PI3K-AKT se encuentra corriente abajo de la mayoría de los dímeros activos de HER. La diferencia en potencia y cinética de la activación de PI3K puede deberse a que PI3K se acopla directamente a HER3 y HER4, pero lo hace de forma indirecta con los receptores EGFR y HER2, a través de moléculas intermediarias de la señalización (Yarden and Sliwkowski 2001).

El receptor HER3 puede reclutar a PI3K, sobre todo cuando se encuentra formando dímeros con HER2. HER3 es activado principalmente por NRG1 y NRG2 y es considerado el principal miembro de la familia encargado de activar la vía de PI3K, ya que posee seis sitios de unión para la subunidad reguladora p85. La ruta de PI3K es un punto principal en la señalización celular (especialmente a través de AKT y mTOR) que regula tamaño celular, metabolismo, supervivencia y proliferación (Waterman *et al.* 1999; Hobbs *et al.* 2002; Eccles 2011).

Las proteínas STAT (transductor de señales y activador de transcripción) y la tirosina quinasa SRC (proto-oncogén de la proteína-tirosina quinasa de sarcoma) también son parte importante de la red de señalización desencadenada por estos receptores y pueden estar involucradas en procesos oncogénicos (Grandis *et al.* 2000; Ishizawar and Parsons 2004; Yu and Jove 2004).

2.4. Receptores HER, sus ligandos y cáncer

La señalización a través de los receptores HER juega un importante papel en múltiples procesos fisiológicos, en especial durante el desarrollo embrionario, y debe ser un proceso altamente regulado, ya que alteraciones en su función pueden desencadenar diferentes tipos de cáncer (Hynes and Lane 2005). Actualmente, la red de señalización y sus posibles alteraciones constituyen un amplio campo de estudio

para comprender las bases moleculares del cáncer, facilitando el desarrollo de nuevas terapias y la identificación de nuevos marcadores predictivos y de pronóstico (Cai *et al.* 2010).

2.4.1. EGFR

La amplificación del EGFR es frecuente en diferentes tipos de tumores y se ha asociado con un mayor grado histológico, incremento de la proliferación y menor supervivencia (Gorgoulis *et al.* 1992a; Gorgoulis *et al.* 1992b; Wong *et al.* 1992; Irish and Bernstein 1993; Yarden and Sliwkowski 2001; Eccles 2011). Se ha descrito que EGFR es importante en el crecimiento tumoral de cánceres como de cabeza y cuello y de colon (Arteaga and Engelman 2014).

Además, se han observado mutaciones oncogénicas en cánceres con niveles normales de EGFR que hacen que el receptor se encuentre activo de forma constitutiva, como las variantes EGFRvIII y EGFRc958 (Wong *et al.* 1992; Garcia de Palazzo *et al.* 1993; Moscatello *et al.* 1995; Frederick *et al.* 2000; Ge *et al.* 2002; Okamoto *et al.* 2003; Sok *et al.* 2006). En cambio, mutaciones somáticas activadoras fueron observadas en tumores de pulmón no microcítico (NSCLC) que respondían mejor a la terapia con inhibidores de la actividad tirosina quinasa que los que expresaban la variante normal del receptor (Paez *et al.* 2004; Pao and Chmielecki 2010; Sequist *et al.* 2013).

2.4.2. HER2

Se ha descrito que HER2 se encuentra amplificado en cáncer de mama, gástrico y esofágico (Arteaga and Engelman 2014). En el caso del cáncer de mama, la amplificación de HER2 ocurre en aproximadamente el 20% de los tumores y se asocia a un mal pronóstico (Slamon *et al.* 1987). Por otro lado, algunos tipos de cáncer de mama solo presentan una copia de HER2, pero muestran dependencia del receptor. En ambos casos, los pacientes con estos tipos de tumores se podrían beneficiar de la terapia anti-HER2 (Lin and Rugo 2007; Paik *et al.* 2008).

Por otro lado, mutaciones somáticas de HER2 en la región extracelular o en el dominio tirosina quinasa, o duplicaciones/inserciones en una porción del exón 20 están asociados a adenocarcinoma de pulmón y cáncer de mama lobular, de vejiga, gástrico y de endometrio (Arteaga and Engelman 2014).

2.4.3. HER3 y HER4

La sobreexpresión de HER3 se asocia a un mal pronóstico en cáncer de mama, de pulmón y de ovario (Witton *et al.* 2003; Ocana *et al.* 2013). Además, se han identificado mutaciones somáticas en el dominio extracelular de este receptor en tumores de mama y gástricos (Jaiswal *et al.* 2013).

Con respecto a HER4, se han identificado mutaciones en melanoma (Prickett *et al.* 2009), adenocarcinoma de pulmón (Ding *et al.* 2008) y meduloblastoma (Gilbertson *et al.* 2001). Por otro lado, la expresión de HER4 está asociada a una reducción de la proliferación celular y se correlaciona con buen pronóstico en cáncer de mama (Barros *et al.* 2010).

2.4.4. Ligandos del EGF

Uno de los mecanismos por los que las células cancerosas consiguen la activación constitutiva de los receptores HER es el aumento de los niveles de ligando. Esta sobreexpresión de los factores de crecimiento de la familia del EGF no parece ser debida a la amplificación génica sino que se produce de forma indirecta gracias a la acción de otras proteínas. De esta manera, las mutaciones en genes como Ras conducen a un aumento de los niveles de ligando contribuyendo así a la transformación producida por este gen (McKay *et al.* 1986). Otros receptores, principalmente los acoplados a proteínas G (GPCR), estimulan la actividad de las metaloproteasas de la familia ADAM que procesan los factores de crecimiento presentes en la superficie celular aumentando la concentración de ligando soluble (Prenzel *et al.* 2001).

Por otro lado, se ha relacionado la presencia de EGF, betacelulina, NRGs y TGF α con la resistencia al tratamiento combinado con quimioterapia y trastuzumab

en tumores de mama que expresan HER2 (Motoyama *et al.* 2002; Menendez *et al.* 2006). Además, varios estudios demuestran que pacientes que expresan niveles normales de HER2 se pueden beneficiar del tratamiento con trastuzumab cuando el tumor expresa NRG transmembrana (Yuste *et al.* 2005; Menendez *et al.* 2006; de Alava *et al.* 2007).

Además de las alteraciones oncogénicas en los receptores HER y sus ligandos, se ha observado persistencia o reactivación de las vías de señalización activadas por estos receptores, sea por amplificación de RTKs alternativos o por mutaciones en moléculas de la vía, como PI3K o PTEN (fosfatasa homóloga a la tensina). Estas alteraciones pueden estar relacionadas con la aparición de resistencias a terapias anti-HER (Brunner-Kubath *et al.* 2011; Arteaga and Engelman 2014).

2.5. Terapias dirigidas contra receptores HER

Se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas dirigidas contra los receptores HER, con el propósito de su utilización en el tratamiento del cáncer (Tabla 1), mejorando el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes (Cai *et al.* 2010).

Los fármacos diseñados para inhibir la cascada de señalización desencadenada por receptores de esta familia se han centrado, principalmente, en EGFR y HER2, y las estrategias con más éxito han sido las basadas en anticuerpos que reconocen el ectodominio de estos receptores y en pequeñas moléculas inhibitoras de su dominio tirosina quinasa (Yarden and Sliwkowski 2001).

2.5.1. Anticuerpos monoclonales (mAb)

Los mAbs pueden actuar de diferentes maneras para desarrollar su acción antitumoral, siendo las principales el bloqueo de la activación de los receptores, la parada del ciclo celular, inducción de apoptosis, inhibición de la angiogénesis y la estimulación de la acción del sistema inmune sobre las células tumorales por mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Wu *et al.* 1996; Lane *et al.* 2000; Grunwald and Hidalgo 2003).

Uno de los mayores éxitos en el desarrollo de terapias dirigidas fue Trastuzumab (Herceptin®). Aprobado en 1998, se trata de una versión humanizada del anticuerpo monoclonal mAb4D5, que reconoce específicamente el dominio IV de HER2, bloqueando la proliferación de las líneas celulares de mama que sobreexpresan este receptor (Hudziak *et al.* 1989; Carter *et al.* 1992). Trastuzumab fue durante casi 15 años, el único anticuerpo dirigido a HER2 disponible y se consideró como el tratamiento estándar para el cáncer de mama HER2 positivo (Perez *et al.* 2017).

Uno de los mecanismos de resistencia más frecuentes es la sobreexpresión de HER3. De hecho, trastuzumab no es eficaz para inhibir la heterodimerización, especialmente HER2-HER3, llevando a la búsqueda y desarrollo de una nueva clase de terapia dirigida a HER2 (Barthelemy *et al.* 2014). Pertuzumab es el primer anticuerpo inhibidor de la dimerización de HER2, uniéndose al dominio II. La unión del fármaco al dominio de dimerización impide la formación de heterodímeros inducida por ligando, siendo un tratamiento complementario al de trastuzumab. Además, la actividad antitumoral de pertuzumab está relacionada con la activación del sistema inmune que actúa contra el tejido tumoral (Swain *et al.* 2014).

2.5.2 Inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKIs)

Estos inhibidores son moléculas sintéticas capaces de competir con el ATP por el sitio de unión en el dominio intracelular de dichos receptores (Levitzki and Gazit 1995). De esta forma, causan la inhibición de su actividad tirosina quinasa, reprimiendo las señales que inician las rutas intracelulares que controlan los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Anderson and Ahmad 2002; Fry 2003). Existen inhibidores de quinasa con alta o baja especificidad de diana, como aquellos capaces de inhibir simultáneamente a receptores HER y quinasas de otras familias.

Las moléculas que actúan específicamente sobre los receptores HER son derivados de quinazolina y se unen al bolsillo de unión a ATP en el dominio quinasa del receptor, actuando de manera reversible o irreversible (Denny 2001; Fry 2003).

2.5.3. Anticuerpos conjugados a drogas (ADCs)

Un ADC está formado por un anticuerpo monoclonal (mAb) recombinante que se encuentra covalentemente unido a un compuesto citotóxico (quimioterápico o toxina), a través de un enlace sintético. Así, el mecanismo de acción de estos fármacos tiene el efecto combinado de la acción del anticuerpo con la de la droga (Junttila *et al.* 2011).

En 2013, Kadcyla® (T-DM1), desarrollado por Genentech, consiguió la aprobación de la FDA para el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo metastásico (Amiri-Kordestani *et al.* 2014). T-DM1 combina el trastuzumab, con un ponente agente antimicrotúbulos, el derivado de la maintansina DM1 (Lambert and Chari 2014).

Este tipo de terapia será detallada en la sección 7 de este apartado.

Tabla 1. Medicamentos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) contra receptores HER.

Nombre genérico	Nombre comercial	Diana	Clase	Uso
Gefitinib	Iressa	EGFR	TKI reversible	NSCLC
Erlotinib	Tarceva	EGFR	TKI reversible	NSCLC metastásico con delección del exón 19 de EGFR o mutación L858R Cáncer de páncreas metastásico/localmente avanzado o no extirpable
Lapatinib	Tykerb	EGFR/HER2	TKI reversible	Cáncer de mama HER2+ metastásico
Neratinib	Nerlynx	EGFR/HER2	TKI irreversible	Cáncer de mama HER2+
Osimertinib	Tagrisso	EGFR	TKI	NSCLC con mutación T790M en EGFR
Vandetanib	Caprelsa	EGFR	TKI	Cáncer de tiroides metastásico/localmente avanzado o no extirpable
Necitumumab	Portrazza	EGFR	mAb	NSCLC escamoso metastásico
Cetuximab	Erbitux	EGFR	mAb	Carcinoma de cabeza y cuello escamoso Cáncer colorrectal EGFR+ sin mutación en K-Ras

Panitumumab	Vectibix	EGFR	mAb	Cáncer colorrectal metastásico
Trastuzumab	Herceptin	HER2	mAb	Cáncer de mama HER2+
Pertuzumab	Perjeta	HER2	mAb	Cáncer de mama HER2+ metastásico
Trastuzumab emtansina	Kadcyla	HER2	ADC	Cáncer de mama HER2+ metastásico

3. Neuregulinas

Las neuregulinas (NRGs) pertenecen al grupo de factores de crecimiento polipeptídicos de la familia del EGF, que participan en diversos procesos fisiológicos como el desarrollo del corazón y del sistema nervioso (Massague and Pandiella 1993; Meyer and Birchmeier 1995; Britsch *et al.* 1998; Falls 2003; Breuleux 2007; Montero *et al.* 2008). Las NRGs actúan uniéndose a la región extracelular de los receptores HER, particularmente HER3 y HER4 (Carraway and Burden 1995; Burden and Yarden 1997). Tras la unión de la NRG, los receptores dimerizan, especialmente con HER2, (Carraway and Burden 1995; Burden and Yarden 1997; Jeong *et al.* 2014), y esto activa una compleja red de señalización intracelular (Esparis-Ogando *et al.* 2016).

Las NRGs se identificaron por primera vez entre los años 1992 y 1993. Dos grupos que trabajaban en la búsqueda de un ligando para HER2 aislaron la NRG del medio de cultivo de células de cáncer de mama, siendo capaz de activar HER2 (Holmes *et al.* 1992; Peles *et al.* 1992; Wen *et al.* 1992). Luego se descubrió que la NRG no era un ligando de HER2, pero promovía su fosforilación tras unirse a HER3 o HER4 (Peles *et al.* 1993; Tzahar *et al.* 1994). En estos mismos años, otros grupos identificaron la NRG como un factor que estimuló la proliferación de células de Schwann (Marchionni *et al.* 1993; Goodearl *et al.* 1995) y que proporciona la estimulación de la síntesis de los receptores de la acetilcolina, principal neurotransmisor en el desarrollo de sinapsis neuromusculares (Falls 2003).

Se han descrito cuatro genes que codifican para NRG, y, a partir de estos, mediante *splicing* alternativo del mRNA se generan más de 32 isoformas diferentes

de esta proteína en mamíferos. Todas las isoformas de las NRGs presentan un dominio EGF capaz de interaccionar con los receptores HER y, la mayoría de ellas, son sintetizadas como formas unidas a la membrana, denominadas genéricamente proNRG (Figura 3) (Falls 2003; Hayes *et al.* 2007; Montero *et al.* 2008).

Además de sus distintas estructuras y secuencias de aminoácidos de cada dominio, las múltiples isoformas de NRG presentan diferencias en su distribución tisular, potencia, especificidad de receptor y función biológica. Las proteínas codificadas por los genes *NRG1* y *NRG2* son capaces de unirse y activar a los receptores HER3 y HER4 (Carraway *et al.* 1997), mientras que las formas codificadas por *NRG3* y *NRG4* actúan únicamente como ligandos del receptor HER4 (Hobbs *et al.* 2002).

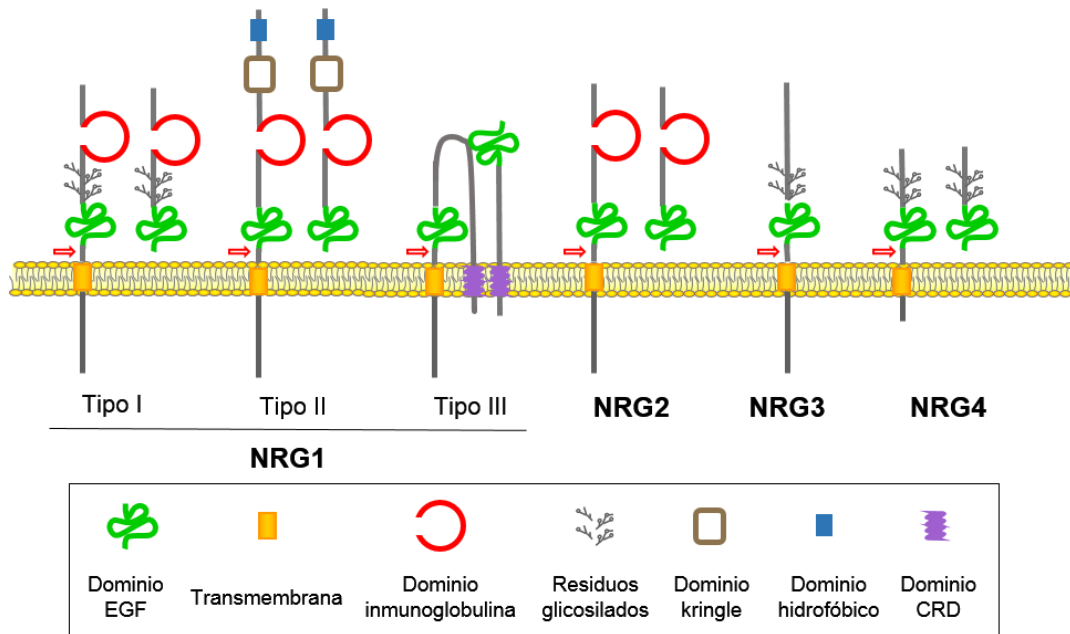


Figura 3. Esquema de las principales isoformas de NRGs. La flecha roja indica la región en la que se produce el procesamiento para liberar el factor soluble al medio.

El gen *NRG1* fue el primero de la familia que se describió, consta de 21 exones localizados en el brazo corto del cromosoma 8 (8p22-p11) (Buonanno and Fischbach 2001; Steinthorsdottir *et al.* 2004). Las isoformas de *NRG1* han sido las más ampliamente estudiadas y caracterizadas debido a su importancia en el correcto desarrollo embrionario y a su implicación en diferentes procesos patológicos (Meyer and Birchmeier 1995; Meyer *et al.* 1997; Britsch *et al.* 1998; Wolpowitz *et al.* 2000; Li

et al. 2002; Wong 2003). Las características estructurales y biológicas de la NRG1 serán detalladas en la sección 3.1 de este apartado.

En la mayoría de los casos, la NRG2 es una proteína transmembrana que se encuentra expresada en neuronas del sistema nervioso central y en el corazón, aunque se han detectado formas solubles (Busfield *et al.* 1997; Carraway *et al.* 1997). Su gen humano consta de 12 exones localizados en el brazo largo del cromosoma 5 (5q23-q33) (Ring *et al.* 1999). Está implicada en la inducción de la proliferación y en el control de la diferenciación celular (Crovello *et al.* 1998; Sweeney *et al.* 2001), pero ya se ha descrito su capacidad de inhibición de células endoteliales a través de un mecanismo independiente del dominio EGF y de receptores HER (Nakano *et al.* 2004). Presentan el dominio inmunoglobulina y, a pesar de tener una estructura básica similar a la NRG1, éstas presentan importantes diferencias en su secuencia de aminoácidos (Breuleux 2007).

El gen que codifica la NRG3 se localiza en la región q22-q23 del cromosoma 10 (Zhang *et al.* 1997). Se han descritos tres isoformas de la NRG3, que presentan poca homología con las demás proteínas de la familia, excepto en la región yuxtamembrana. La NRG3 ha sido implicada en trastornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia y de desarrollos cognitivos (Fallin *et al.* 2003; Morar *et al.* 2011). NRG3 promueve la morfogénesis mamaria temprana y actúa durante la especificación celular, teniendo implicación en el cáncer de mama (Howard 2008). En un estudio reciente en el que analizaron la expresión de NRG3 en 363 tumores de mama observaron que esta se estaba expresando en el 43% de las muestras, encontrando correlaciones significativas de la expresión de NRG3 con receptores HER3 y HER4, pero estaba preferentemente expresada en tumores de mama que expresan conjuntamente EGFR y HER4 (Revillion *et al.* 2008).

La NRG4 es codificada por el gen que se identificó en el brazo corto del cromosoma 15 (15q23-q24) y es la forma menos homóloga cuando se comparan los cuatro genes (Harari *et al.* 1999). Son cinco las variantes conocidas generadas a partir de la NRG4, la mayoría de ellas se sintetizan como moléculas transmembrana procesables, pero la isoforma NRG4- β 1, pierde su secuencia C-terminal y se encuentra localizada en el interior celular (Hayes *et al.* 2007; Hayes and Gullick 2008; Hayes *et al.* 2008). La NRG4 se expresa principalmente en el páncreas adulto (Harari

et al. 1999), donde se ha involucrado en la diferenciación de las células que expresan somatostatina (Huotari *et al.* 2002). Se ha demostrado que el tejido adiposo marrón (BAT) controla la lipogénesis hepática a través de la secreción de NRG4, y que ratones deficientes de NRG4 con alto contenido de grasa corporal, aumentaron aún más su peso, así como exhibieron una exacerbación de la resistencia a la insulina y esteatosis hepática (Wang *et al.* 2014; Pfeifer and Hoffmann 2015). Por otro lado, se ha encontrado expresada en cáncer de mama (Dunn *et al.* 2004) y en carcinoma avanzado de próstata (Hayes *et al.* 2007).

3.1. NRG1 (neuregulina 1)

Por procesamiento alternativo del mRNA se generan, a partir de la secuencia codificante del gen *NRG1*, un mínimo de quince isoformas (Buonanno and Fischbach 2001; Steinthorsdottir *et al.* 2004) que presentan diferente distribución, actividad y afinidad por los receptores HER (Tzahar *et al.* 1994). Debido a esta gran diversidad, las isoformas de NRG1 se clasificaron en tres grupos, de acuerdo con la estructura de su extremo N-terminal, como se representa en la figura 4 (Falls 2003):

a) Tipo I: presentan un dominio con estructura similar a la inmunoglobulina, seguido de una secuencia con múltiples sitios de glicosilación que lo separa del módulo EGF. Aparentemente estas isoformas de NRG1 sólo se expresan en tejidos mesenquimales.

b) Tipo II (o GGF, factor de crecimiento glial): contienen también una estructura similar a la inmunoglobulina precedida por un dominio *Kringle* que parece específico de células neuronales. Las NRGs de este tipo no presentan la secuencia espaciadora susceptible de glicosilación entre el dominio inmunoglobulina y el EGF.

c) Tipo III (o SMDF, factor derivado de neuronas sensoriales y motoras): se llaman también CRD-NRG ya que presentan una secuencia apolar rica en cisteínas (CRD) en su extremo N-terminal.

El único exón presente en todas las isoformas de NRG1 conocidas es el que codifica para las cuatro primeras cisteínas del dominio EGF. El extremo C-terminal de este dominio presenta una secuencia variable que puede generar, en las isoformas

de tipo I, tres estructuras (α , β , γ) con diferente afinidad por los receptores HER (Jones *et al.* 1999). Las isoformas de tipo II y III contienen dominios EGF de tipo β .

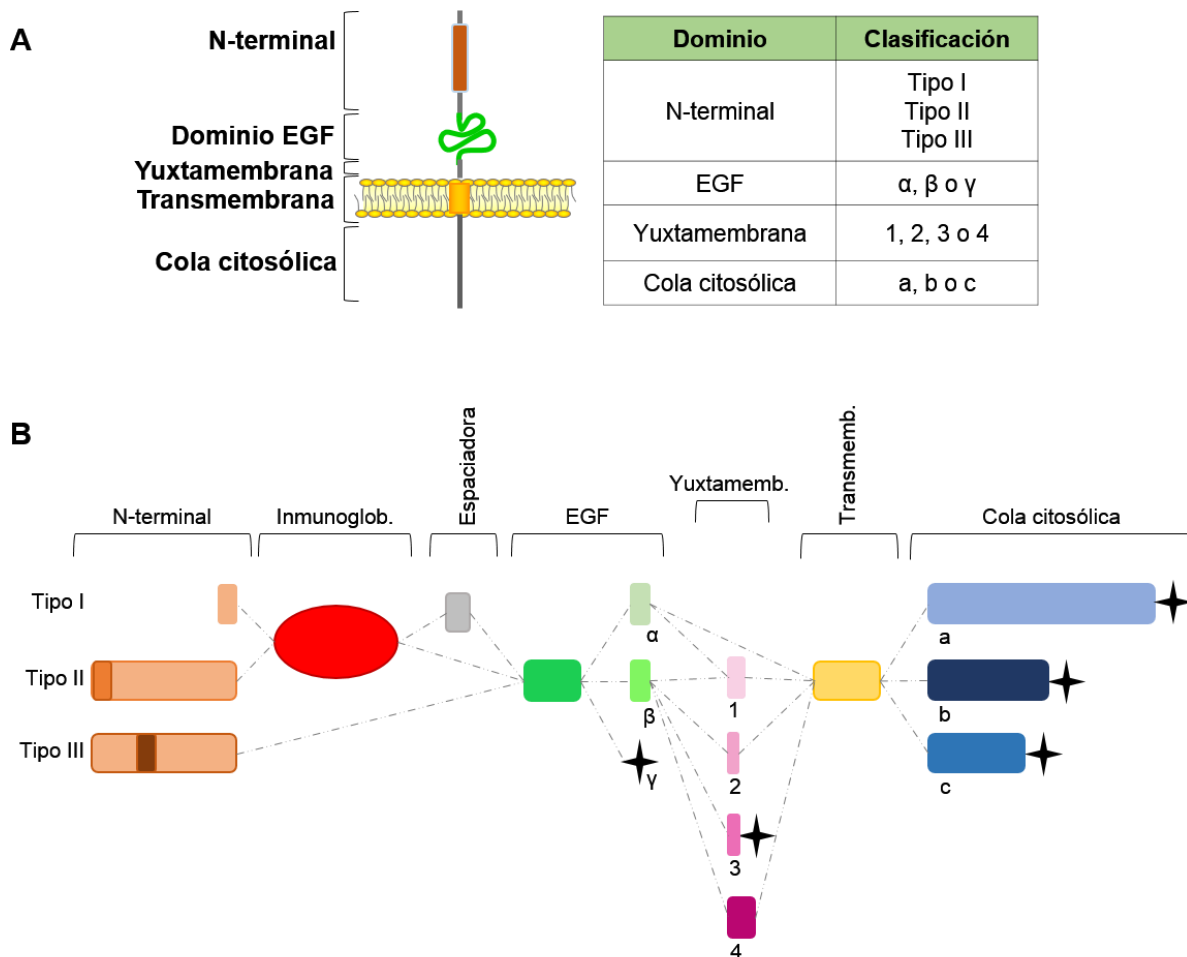


Figura 4. Clasificación de las NRGs en función de su estructura. **(A)** Representación esquemática de los dominios de las NRGs y nomenclatura usada para clasificar cada uno de ellos. **(B)** Esquema de las posibles combinaciones entre los dominios de las NRGs de acuerdo con su estructura. La cruz negra representa el codón de parada.

Debido a su disposición transmembrana, las proNRGs están constituidas por tres regiones principales: el dominio extracelular N-terminal, el dominio transmembrana y la región intracelular C-terminal. El dominio extracelular incluye el módulo de tipo EGF y otras regiones tales como subdominios tipo inmunoglobulina o *kringle* (Wen *et al.* 1994; Falls 2003). El ectodominio de las proNRG está conectado a un dominio hidrofóbico interno que actúa como un dominio transmembrana (Falls 2003). Esta región transmembrana es seguida por un dominio intracelular que varía en longitud entre las diferentes isoformas NRG, pero parece ser necesario para la

localización adecuada de proNRG en la membrana plasmática (Montero *et al.* 2011a).

Estudios con ratones deficientes de la NRG1 o con deleciones de algunos de los dominios de la proteína han sido muy importantes para investigar su función biológica. Ratones que expresaban NRG1 en los que se eliminó el dominio EGF (*pan-NRG1 knock-out*), por lo tanto, sin ninguna forma activa de NRG1, presentan defectos en la morfogénesis cardíaca, y mueren durante el desarrollo, cuando pasan a depender de su propia circulación (Meyer and Birchmeier 1995). Presentan también una gran disminución de las células procedentes de la cresta neural, como las células de Schwann, glía del sistema nervioso periférico, nervios sensoriales craneales y neuronas del sistema simpático. Los ratones a los que se les ha eliminado el dominio inmunoglobulina (*Ig-NRG1 knock-out*) presentaran estas mismas características, con excepción de desarrollar correctamente las células de Schwann (Meyer *et al.* 1997; Britsch *et al.* 1998). Cuando se eliminó el dominio CDR (*CRD-NRG knock-out*), los ratones fueron incapaces de expresar las isoformas de NRG1 de tipo III y se mueren al nacer, ya que no se han formado correctamente las sinapsis neuromusculares y son incapaces de respirar de forma autónoma. Presentan también una disminución de células de Schwann y degeneración de sus neuronas motoras y sensoriales debido a una muerte neuronal anómala (Wolpowitz *et al.* 2000).

Por otro lado, ratones que no presentan las isoformas de NRG1 con un dominio EGF de tipo α , pero expresan normalmente las de tipo β (*NRG1 α knock-out*), tuvieron desarrollo neuronal y cardíaco normal, pero presentaron graves defectos en el desarrollo mamario (Li *et al.* 2002).

La mayoría de las características descritas en estos estudios de deleción de la NRG1 han sido observadas también en algunos ratones deficientes en receptores HER (Wong 2003). El hecho de que la eliminación del gen *NRG1*, o de parte de él, cause un fenotipo tan grave como la eliminación de sus receptores, sugiere que las propiedades asociadas a la deleción de éstos son debidas a la acción de los productos del gen *NRG1* y que su actividad no puede ser sustituida por las isoformas codificadas por los genes *NRG2*, *NRG3* o *NRG4* (Falls 2003).

3.1.1. Dominios de la NRG1

a) N-terminal

A diferencia de otros miembros de la familia del EGF, las NRGs no presentan un péptido señal en su dominio N-terminal, que las introduzca en el retículo endoplasmático para ser dirigidas a la membrana plasmática y liberadas al medio extracelular. A pesar de no presentar una secuencia señal consenso, todas ellas contienen regiones hidrofóbicas que han sido propuestas para realizar esta función: la zona transmembrana de las NRGs de tipo I, el dominio CRD en las de tipo III y una secuencia hidrofóbica presente en las isoformas de tipo II que son generadas como factores solubles (Falls 2003).

En esta región se localizan diferentes secuencias de aminoácidos implicados en la localización nuclear y en el transporte nucleo-citoplasma de algunas isoformas de NRG1, que al estar relacionadas con la síntesis de ribosomas, control transcripcional y el procesamiento alternativo del RNA (Holmes *et al.* 1992; Li *et al.* 1996; Golding *et al.* 2004; Breuleux *et al.* 2006).

b) Dominio Kringle

Los dominios *Kringle* presentan un plegamiento caracterizado por la presencia de grandes bucles estabilizados por tres puentes disulfuro. Se ha descrito la presencia de estos dominios en la región N-terminal de las NRG1 de tipo II, pero todavía se desconoce su función. La presencia de este tipo de plegamiento en otras moléculas se ha relacionado con su capacidad de mediar en la unión con otras proteínas, y en la regulación de la actividad proteolítica (Fujikawa and McMullen 1983; Patthy *et al.* 1984; Atkinson and Williams 1990).

c) Dominio inmunoglobulina (Ig)

Las NRG1 de tipo I y II presentan, en la región N-terminal, dos cisteínas formando un puente disulfuro que da lugar a una estructura inmunoglobulina de tipo C2 (Wen *et al.* 1992; Willem 2016).

Este dominio no interviene directamente en la interacción de las NRGs con los receptores HER (Holmes *et al.* 1992; Wen *et al.* 1994), pero su presencia parece esencial para que esta interacción sea eficiente (Eto *et al.* 2006). Se ha propuesto también que este dominio podría intervenir en el proceso de atenuación de la señalización a través de los receptores HER, promoviendo la internalización y degradación del complejo ligando-receptor (Warren *et al.* 2006).

A pesar del importante papel que parece jugar el dominio inmunoglobulina en la interacción de la NRG con los receptores HER, la mayoría de estudios relacionados con él se centran en su capacidad de unirse a la matriz extracelular. En este aspecto, se describió que el dominio inmunoglobulina favorece la asociación de la NRG con glicosaminoglicanos de la matriz, impidiendo su interacción con los receptores HER hasta que se libere el dominio EGF activo. Este podría ser un mecanismo de control de la actividad biológica de las NRGs, limitando su capacidad de difundir libremente y permitiendo su acumulación en el sitio de acción para poder actuar rápidamente al ser procesadas (Loeb and Fischbach 1995; Loeb *et al.* 1999).

Por otro lado, se ha descrito que las NRGs tienen la capacidad de asociarse con proteínas que no pertenecen a la familia de receptores HER y que podrían formar homodímeros interactuando por sus dominios inmunoglobulina. La formación de homodímeros y la unión a proteínas nucleares parecen implicar a las NRGs en el control transcripcional pero todavía no se ha estudiado en profundidad qué genes se encuentran diferencialmente expresados en presencia de la NRG nuclear (Breuleux *et al.* 2006).

d) Región espaciadora

La secuencia que separa el dominio inmunoglobulina del módulo EGF en las NRG1 de tipo I presenta modificaciones postraduccionales, tales como la adición de azúcares. Se trata de una secuencia de 13 aminoácidos, rica en residuos de serina y treonina, que contiene múltiples secuencias de O- y N-glicosilación (Peles *et al.* 1992). Además, presenta en su extremo N-terminal un dipéptido serina-glicina que podría ser un sitio de unión de glicosaminoglicanos (Goldstein *et al.* 1989).

e) *Dominio rico en cisteínas (CRD)*

Las NRG1 de tipo III presentan, en su extremo N-terminal un dominio rico en cisteína, que contiene una secuencia hidrofóbica, convirtiéndole en un segundo dominio transmembrana, incapaz de interactuar con los receptores HER. Cuando se procesa, se genera una forma de NRG con el extremo N-terminal expuesto en la superficie celular (Schroering and Carey 1998; Wang *et al.* 2001). Además, estas isoformas apenas se liberan al medio y parece que actúan principalmente de forma yuxtacrina, activando a los receptores de células vecinas sin necesidad de ser procesadas. Se ha demostrado la importancia de este tipo de señalización en el crecimiento y diferenciación de las células de Schwann, regulados por las NRGs de tipo III (Morrissey *et al.* 1995).

f) *Dominio EGF*

El dominio EGF es necesario y suficiente para la unión y activación de los receptores HER, como se ha comprobado con la versión recombinante y sintética del mismo (Holmes *et al.* 1992; Wen *et al.* 1994; Barbacci *et al.* 1995).

Se han descrito tres formas del dominio EGF (α , β , γ) que comparten secuencia hasta la cuarta cisteína sugiriendo que esta región es la que les confiere la especificidad por el receptor. La región de unión de las NRGs a los receptores HER se extiende a lo largo de la hoja beta que comprende la secuencia leucina170-lisina211 en la NRG1 (Lu *et al.* 1995; Adler and Thompson 1999), siendo la secuencia comprendida entre los aminoácidos 177 y 226 suficiente para promover la activación de estos (Lu *et al.* 1995). Por otro lado, las isoformas de NRG1 que contienen un dominio EGF de tipo β presentan una potencia hasta 100 veces mayor que las formas α (Wen *et al.* 1994). Los dominios EGF de tipo γ presentan un codón de parada tras la cuarta cisteína y, por tanto, pierden la secuencia transmembrana y la cola C-terminal. Se ha propuesto que estas formas de NRG podrían actuar intracelularmente gracias a la interacción con otras proteínas (Breuleux *et al.* 2006).

g) Región yuxtamembrana

El tipo de secuencia que separa el dominio EGF de la membrana plasmática en las formas transmembrana de NRG es una de las características utilizadas en la clasificación de estas proteínas. Esta región presenta diferencias en longitud y secuencia en las diferentes isoformas de NRG1 de tipo I dando lugar a formas 1 (con una longitud de 28 residuos), formas 2 (con 18 residuos) y formas 4 (con 44 residuos). En las formas 3 esa región es de 19 aminoácidos y codifica un codón de parada al final, por lo tanto, no se generan formas transmembrana sino que son sintetizadas como formas solubles (Fischbach and Rosen 1997; Falls 2003).

En la región yuxtamembrana ocurre el procesamiento proteolítico que libera la forma soluble al medio extracelular (Montero *et al.* 2000; Shirakabe *et al.* 2001; Montero *et al.* 2008). Tal evento proteolítico se lleva a cabo mediante metaloproteasas de membrana de la subfamilia ADAM, especialmente por ADAM17 (también denominado TACE) o ADAM10 (Montero *et al.* 2000; Ebbing *et al.* 2016).

h) Dominio transmembrana

Las NRGs de tipo I y II presentan una única secuencia hidrofóbica que atraviesa la membrana plasmática, dejando expuesto en la superficie el módulo EGF y los otros dominios que se encuentran en posición N-terminal (Holmes *et al.* 1992; Wen *et al.* 1994; Lu *et al.* 1995). Se ha propuesto que la secuencia transmembrana, que contiene aminoácidos básicos, podría actuar como péptido señal dirigiendo su asociación a membranas y entrada en la ruta de secreción ya que, como se ha dicho anteriormente, estas moléculas no disponen de un péptido señal en su extremo N-terminal encargado de realizar esta función (Matlack *et al.* 1998; Ota *et al.* 1998).

i) Cola citosólica

La región intracelular de la NRG1 presenta una secuencia citoplasmática rica en residuos de serina y treonina que se encuentra muy conservada a lo largo de la evolución, hecho que permite atribuirle un importante papel funcional. En las NRG1 de tipo I la cola citosólica tiene una longitud variable dando lugar a isoformas a (con

374 residuos), isoformas b (196 residuos) y isoformas c (157 residuos) obtenidas por procesamiento alternativo del mensajero (Wen *et al.* 1994). En las NRGs de tipo II y III solamente se han identificados isoformas c.

Se ha descrito que esta región es esencial para la correcta localización en la membrana celular (Montero *et al.* 2011a) ya que la cola citosólica de las NRG1 de tipo I y II contiene zonas hidrofóbicas que podrían suplir al péptido señal. Además, las formas $\beta 3$ de las NRGs de tipo I, que presentan un codón de parada antes de la región transmembrana, quedan retenidas en el interior celular implicando la cola intracelular de estas isoformas en su entrada en la ruta secretora (Bao *et al.* 2003; Golding *et al.* 2004; Montero *et al.* 2011a).

3.2. Señalización a través de las NRGs

3.2.1. Sistema de activación NRG-HER

Las NRGs no actúan como ligandos bivalentes capaces de unirse a dos receptores promoviendo su dimerización sino que la agregación es mediada enteramente por los receptores (Garrett *et al.* 2002; Ogiso *et al.* 2002). La interacción de una molécula de NRG con los dominios I y III de los receptores HER3 o HER4 produce un cambio conformacional en estos que pasan a exponer el brazo de dimerización, por el que se asocian a HER2 o a otros receptores de la familia (Burgess *et al.* 2003). A pesar de que se ha determinado *in vitro* que la forma soluble de NRG1 presenta una mayor afinidad por el receptor HER4 (Tzahar *et al.* 1994), la combinación de los receptores HER2 y HER3 es la más estable y la que produce una señal mitogénica más potente (Tzahar *et al.* 1996; Holbro *et al.* 2003). La formación y estabilización de este complejo parece ser facilitada por la acción de la quinasa citoplasmática c-Src (Ishizawar *et al.* 2007) que se encuentra sobreexpresada, junto con HER2 y HER3, en carcinomas de mama humanos con mal pronóstico (Belsches-Jablonski *et al.* 2001).

La señal desencadenada por la unión de las NRGs a los receptores HER puede afectar a procesos celulares muy diferentes como la proliferación, diferenciación, migración, apoptosis y supervivencia celular. Esta diversidad de respuestas se debe a la gran variedad de isoformas de NRG existentes (Riese *et al.*

1995; Tzahar *et al.* 1996) y la capacidad de cada complejo de receptores formado de acoplarse a varias cascadas de señalización tras su activación (Burden and Yarden 1997).

El hecho de que las NRGs se sintetizan como moléculas transmembrana amplía su capacidad de generar respuestas diferentes, a la vez que actúa como mecanismo de control. Así, la NRG puede ser liberada al medio extracelular para actuar sobre los receptores de otras células (señalización paracrina), o sobre sus propios receptores (señalización autocrina), o activar a los receptores HER sin necesidad de ser procesada (señalización yuxtacrina), como representa el esquema de la figura 5 (Salzer *et al.* 1980; Morrissey *et al.* 1995; Aguilar and Slamon 2001; Gilmour *et al.* 2002; Leimeroth *et al.* 2002; Falls 2003; Li *et al.* 2004).

La liberación del factor soluble debe producirse en el momento y el contexto celular apropiados y, por este motivo, el procesamiento de las NRGs es un proceso altamente regulado y sujeto a estrictos controles tanto intra como extracelulares (Montero *et al.* 2008).

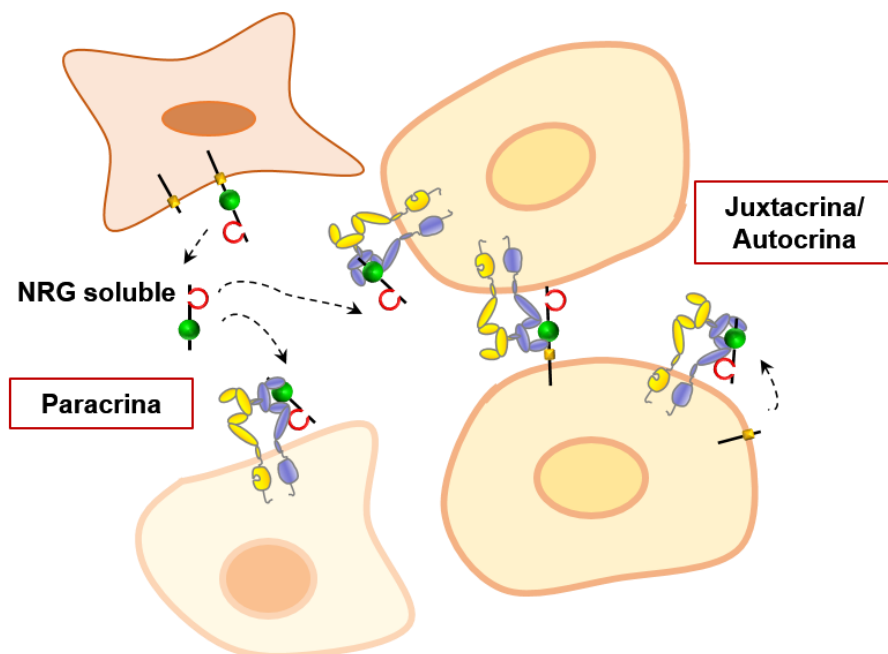


Figura 5. Representación de la comunicación intercelular paracrina y yuxtacrina/autocrina de las NRGs con los receptores HER. Adaptado de (Centa *et al.* 2018).

Tras la unión de las NRGs y formación de los dímeros entre los receptores HER, ocurre la fosforilación del dominio quinasa en diferentes tirosinas de la cola citoplasmática (Heldin 1995; Weiss and Schlessinger 1998). En este punto se produce una gran diversificación de la señal, ya que a los residuos citoplasmáticos fosforilados pueden unirse gran variedad de proteínas que acoplarán el estímulo desencadenado a múltiples cascadas de señalización, de acuerdo con el descrito en la sección 1.6 de este apartado.

La combinación de tirosinas fosforiladas viene determinada por el ligando así como por el complejo de receptores HER que desencadena la señal, y será la que determine qué proteínas adaptadoras se anclan a su región citoplasmática (Olayioye *et al.* 1998; Yarden and Sliwkowski 2001).

La activación de los receptores HER tras la unión con la NRG también tiene efectos sobre la transcripción génica, alterando la expresión de genes relacionados con la progresión tumoral y la metástasis, angiogénesis, invasión y supervivencia celular (Bacus *et al.* 1993; Bagheri-Yarmand *et al.* 2000; Tsai *et al.* 2000; Laughner *et al.* 2001; Mandal *et al.* 2001; Mazumdar *et al.* 2001; Khaleque *et al.* 2005; Breuleux 2007). Por otro lado, se ha observado una disminución de los niveles de los receptores de estrógenos y progesterona (Normanno *et al.* 1995; De Fazio and Gozzo 2000; Raj *et al.* 2001) y la infraexpresión de genes supresores de tumores como BRCA1 (Miralem and Avraham 2003).

La metaloproteinasa de matriz 13 (MMP13 o colagenasa-3) fue identificada como un importante mediador de la diseminación metastásica en células de cáncer de mama en las que la señalización intracelular estaba activada por el sistema NRG-HER (Seoane *et al.* 2016). Los estudios farmacológicos y genéticos demostraron que la ruta RAS/RAF/ERK está involucrada en el control de la producción de MMP13 tras la activación de los receptores HER por las NRGs (Seoane *et al.* 2016). Esta regulación positiva de MMP13 inducida por las NRGs fue restringida con el uso de dasatinib, un medicamento ya aprobado en la clínica de cáncer, que disminuyó los niveles de fosforilación de ERK1/2. La inhibición del sistema prometastático NRG-MMP13 causada por dasatinib sugirió que este fármaco puede ser incorporado al tratamiento de cánceres metastásicos (Orive-Ramos *et al.* 2017).

Además, la estimulación con NRG puede desencadenar la reorganización del citoesqueleto estimulando la motilidad celular e invasión sin producir cambios en la transcripción génica. Varios estudios han demostrado el papel de las NRGs en la regulación de componentes de adhesiones focales, como paxilina y FAK, esenciales en estos procesos y también promoviendo la formación de lamelipodios, ondulaciones de la membrana, fibras de estrés y filopodios, gracias a la activación de PAK1 (quinasa activada por p21 - 1) a través de la vía de PI3K (Adam *et al.* 1998; Vadlamudi *et al.* 1999; Vadlamudi *et al.* 2002).

En este contexto, se ha indicado que las NRGs pueden afectar la actividad de pequeñas proteínas de unión a GTP (guanosín trifosfato), como la GTPasa Rac1, un miembro de la familia Rho que controla el citoesqueleto de actina (Yang *et al.* 2006; Yang *et al.* 2008). Las NRGs controlan la actividad de Rac en células de cáncer de mama al provocar cambios en la fosforilación de P-Rex1, que es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina, que se activa mediante fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato. Además, la fosforilación de P-Rex1 regula la proliferación celular inducida por NRG y la disminución de P-Rex1 inhibe la migración y invasividad de las células de cáncer de mama, así como su potencial tumorigeno *in vivo* (Montero *et al.* 2011b; Montero *et al.* 2016).

3.3 Señalización independiente de receptores HER

Además de la señalización desencadenada por el sistema NRG-HER, las NRGs están implicadas en promover señalizaciones celulares independientes de su unión al receptor HER.

En contraste con los efectos protectores de la apoptosis producidos por las NRGs al activar los receptores HER, se ha descrito también su capacidad de promover la muerte celular en diferentes sistemas. Una sobreexpresión de la cola citoplasmática de células productoras de NRG1 β 2b desencadena, tras su procesamiento, la apoptosis gracias a la disminución de la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Grimm and Leder 1997; Grimm *et al.* 1998; Weinstein *et al.* 1998; Weinstein and Leder 2000). Además, la sobreexpresión constitutiva de NRG1 β 2 en líneas celulares de carcinoma de mama les confiere un marcado

aumento en su sensibilidad al tratamiento con doxorubicina y etopósido (Harris *et al.* 1998).

Por otro lado, la presencia de determinadas formas de NRG en el núcleo celular y su capacidad para interactuar con proteínas de este compartimento, plantea la posibilidad de que estas proteínas participen en el control de la transcripción génica ejerciendo un papel de reguladores (Cress and Seto 2000; Breuleux *et al.* 2006).

4. Implicación de las NRGs en cáncer

La desregulación en la expresión de las NRGs está relacionada con patologías como la esquizofrenia, alteraciones de las arterias coronarias y cáncer. Además, las NRGs participan en la regulación de diversos procesos biológicos como la proliferación celular, diferenciación, migración, apoptosis, supervivencia, angiogénesis y destino celular (Breuleux 2007; Mei and Xiong 2008; Montero *et al.* 2008).

A pesar de la capacidad para inducir la diferenciación de diferentes tejidos, las NRGs son también potentes factores mitogénicos (Lewis *et al.* 1996; Aguilar *et al.* 1999) y protectores frente a la apoptosis, gracias a su capacidad de activar la vía de PI3K/AKT (Pinkas-Kramarski *et al.* 1994; Li *et al.* 2001). Esta característica de las NRGs viene determinada por múltiples factores entre los que se encuentran el tipo celular, la isoforma de NRG implicada, la concentración de ligando, el tipo de receptor con el que interactúa, su combinación con otros y la intensidad y duración del estímulo (Stove and Bracke 2004).

Se han descrito alteraciones en la expresión de NRGs en diferentes tipos de cáncer humano adjudicándoles un notable papel en el desarrollo y progresión de esta patología. En la tabla 2 están descritos algunos de estos estudios que identificaron la expresión de NRG en diferentes tipos de cáncer.

A pesar de que la señalización por NRGs en situación normal es típicamente paracrina, los tumores epiteliales suelen presentar ganancia de expresión activando un bucle autocrino o aumentando su sensibilidad a la señalización paracrina (Breuleux 2007; Montero *et al.* 2008).

El procesamiento de las NRGs permite la activación de los receptores presentes en la célula productora del ligando o en células del mismo tipo. La estimulación de los receptores HER de células de adenocarcinoma de mama humano productoras de NRG con su propio medio condicionado, induce la expresión de NRG y de HER4 (Avila *et al.* 1995). Este fenómeno, denominado bucle autocrino, se ha relacionado con la transformación celular y la progresión tumoral en cáncer de mama, ovario (Gilmour *et al.* 2002) y colon (Venkateswarlu *et al.* 2002), entre otros tejidos.

El papel de las NRGs se ha estudiado principalmente en cáncer de mama, donde se relacionó la expresión de la proteína con un mal pronóstico. Este hecho se debe a las propiedades prooncogénicas de las NRGs, que incluyen la promoción de la proliferación celular, la migración o la diseminación metastásica (Atlas *et al.* 2003; Tsai *et al.* 2003; Yuste *et al.* 2005; Seoane *et al.* 2016).

Estudios *in vivo* con ratones transgénicos que expresan NRG exclusivamente en mama demostraron que la presencia de este ligando es suficiente para la generación de adenocarcinomas (Krane and Leder 1996). Además, trabajos demuestran que ratones transgénicos en los que se expresó un mutante de la NRG1 β 2, constituido de las regiones extracelular y transmembrana de la proteína, provocó carcinomas en la glándula mamaria, indicando que estos dominios por si solos tienen capacidad de generar tumores (Weinstein and Leder 2000).

De la misma manera, la inactivación de la NRG con anticuerpos específicos (Hijazi *et al.* 2000), o la reducción de sus niveles gracias al uso de oligonucleótidos antisentido (Tsai *et al.* 2003), reduce la capacidad tumorigénica e invasiva de las líneas celulares de adenocarcinoma de mama. Por otro lado, la inoculación de células que expresan NRG en la mama de ratones, promueve la generación de tumores y la diseminación metastásica de estas células de forma independiente de estrógenos (Atlas *et al.* 2003).

De hecho, en adenocarcinomas de mama humanos, se ha observado que la expresión de NRG correlaciona inversamente con la del receptor de estrógeno- α y que la presencia de estos ligandos permite el crecimiento del tumor de forma independiente de hormonas, como sucede en carcinomas de mama avanzados (Normanno *et al.* 1995; Aguilar *et al.* 1999; Perez-Tenorio and Stal 2002; Atlas *et al.* 2003). Por este motivo, múltiples estudios sugieren que las NRGs inducen la progresión del cáncer de mama a través de la adquisición de un fenotipo más agresivo, determinado por la independencia hormonal, resistencia a antiestrogénicos, capacidad tumorigénica (Tang *et al.* 1996), invasión (Tsai *et al.* 2000; Mazumdar *et al.* 2001; Yao *et al.* 2001) y metástasis (Meiners *et al.* 1998; Atlas *et al.* 2003; Tsai *et al.* 2003).

Se ha demostrado que la expresión de NRG en tumores de mama es un marcador de sensibilidad al anticuerpo terapéutico anti-HER2 trastuzumab (Meetze *et al.* 2015). Además, las NRGs pueden provocar resistencia a ciertas terapias utilizadas para bloquear HER2 (de Alava *et al.* 2007; Schwarz *et al.* 2017; Yang *et al.* 2017).

Por otro lado, se ha descrito un *loop* autocrino en células de cáncer de ovario que expresan NRG1 y HER3, donde el bloqueo del receptor con anticuerpos inhibió el crecimiento de los tumores *in vivo* (Sheng *et al.* 2010). Un *loop* similar entre NRG1 y HER3 se ha observado también en células de cáncer de cabeza y cuello sin amplificación de HER2, las cuales son particularmente sensibles a la inhibición de EGFR/HER2 con lapatinib (Wilson *et al.* 2011). También, se han encontrado altos niveles de NRG1 y HER4 en células tumorales residuales de NSCLC que permanecieron tras el tratamiento con quimioterapia. En estos tumores, la inhibición de la señalización a través de HER3/HER4 con un anticuerpo bloqueante de NRG1 incrementó la magnitud y duración de la respuesta en modelos *in vivo* (Hegde *et al.* 2013). Estudios clínicos recientes han indicado al sistema NRG-HER como una importante diana terapéutica en pacientes con tumores de pulmón y hígado que contienen reordenamientos del gen *NRG1*, demostrando que estos pacientes pueden beneficiarse a terapias dirigidas a los receptores HER, como el afatinib (Kim *et al.* 2016; Jones *et al.* 2017; Drilon *et al.* 2018). Curiosamente, algunos de estos reordenamientos excluyeron partes de la región N-terminal de los productos génicos

derivados de NRG1, cuya función biológica aún es poco conocida (Eto *et al.* 2006; Kim *et al.* 2016).

Tabla 2: Expresión de NRG descrita en tumores de diferentes tejidos.

Tipo de tumores	Ensayo	Expresión (%)	Referencia
Cáncer de mama	-	4% (n=83) (reordenamiento génico)	(Adelaide <i>et al.</i> 1994)
	WB	25% (n=60)	(Normanno <i>et al.</i> 1995)
	IHQ	38% (n=34), 50% (n=34)	(Visscher <i>et al.</i> 1997)
	IHQ	84% (n=115)	(Raj <i>et al.</i> 2001)
	IHQ	48% (n=35)	(Esteva <i>et al.</i> 2001)
	IHQ, citometría de flujo	ND (n=93)	(Perez-Tenorio and Stal 2002)
	IHQ	35-45% (n=45)	(Dunn <i>et al.</i> 2004)
	IHQ	30-80% (n=60)	(Marshall <i>et al.</i> 2006)
	IHQ	50% (n=151)	(de Alava <i>et al.</i> 2007)
	QRT-PCR	42-96% (n=363)	(Revillion <i>et al.</i> 2008)
	-	-	(Hayes and Gullick 2008)
	IHQ	34% (n=76)	(Seoane <i>et al.</i> 2016)
	IHQ	26% (n=171)	(Haas <i>et al.</i> 2009)
Cáncer de próstata	IHQ	72% (n=50)	(Leung <i>et al.</i> 1997)
	IHQ	100% (n=24)	(Lyne <i>et al.</i> 1997)
	IHQ	100% (n=40)	(Hayes <i>et al.</i> 2007)
	IHQ	Variada de acuerdo con el anticuerpo utilizado (n=40)	(Hayes <i>et al.</i> 2011)
	IHQ	99% - citoplasma, 46% - membrana celular, 54% - núcleo (n=45)	(Grimsley <i>et al.</i> 2011)
Cáncer de colon	RNA microarrays	53% (n=45)	(Eschrich <i>et al.</i> 2005)
	IHQ	ND	(Venkateswarlu <i>et al.</i> 2002)
	IHQ	46% - citoplasma (n=155)	(Mitsui <i>et al.</i> 2014)
	IHQ	76% - estroma (n=54)	(De Boeck <i>et al.</i> 2013)
	IHQ	100% (n=208)	(Stahler <i>et al.</i> 2017)
Cáncer de vejiga	RT-PCR	34 – 53% (n=88)	(Memon <i>et al.</i> 2004)
	RT-PCR	ND (n=73)	(Amsellem-Ouazana <i>et al.</i> 2006)
	RT-PCR	ND (n=59)	(Forster <i>et al.</i> 2011)

Cáncer de ovario	IHQ y RT-PCR	78-87% (n=53) y 83% (n=24)	(Gilmour <i>et al.</i> 2002)
Cáncer de páncreas	IHQ	85% (n=14)	(Kolb <i>et al.</i> 2007)
Cáncer de tiroides	IHQ	78-83% (n=134)	(Fluge <i>et al.</i> 2000)
	IHQ	65.3% (n=196)	(Zhang <i>et al.</i> 2018)
Meduloblastoma	RT-PCR	87% (n=48)	(Gilbertson <i>et al.</i> 1998)
Schwannoma vestibular	IHQ	100% (n=8)	(Hansen and Linthicum 2004)
Cáncer endometrial	IHQ	ND (n=41)	(Srinivasan <i>et al.</i> 1999)
Cáncer gástrico	IHQ	48% (n=26)	(Ebi <i>et al.</i> 2011)
	FISH	33% (n=388)	(Yun <i>et al.</i> 2018)
Cáncer hepático	WB	100% (9)	(Hsieh <i>et al.</i> 2011)
Cáncer de pulmón	FISH	77% (n=96)	(Qian <i>et al.</i> 2015)
	RT-PCR	27% (n=59)	(Shin <i>et al.</i> 2016)
Cáncer de cabeza y cuello	RT-PCR	ND (n=108)	(Fayette <i>et al.</i> 2016)
	RT-PCR	40% - niveles altos (n=127)	(Shames <i>et al.</i> 2013)

Los porcentajes se refieren a la expresión de NRG en el número de casos analizados (n). ND: no determinado; IHQ: inmunohistoquímica; WB: Western Blot; RT-PCR: retrotranscripción y PCR; FISH: hibridación *in situ* fluorescente.

5. Anticuerpos conjugados a drogas (ADCs)

Una de las estrategias que más éxito está teniendo dentro de las terapias dirigidas es el uso de ADCs, gracias a su capacidad para conducir agentes citotóxicos potentes de manera específica a las células tumorales que expresan la diana terapéutica del anticuerpo (Vezina *et al.* 2017).

Un ADC está formado por tres componentes unidos entre sí: un anticuerpo unido covalentemente a un compuesto citotóxico, a través de un enlace o *linker* sintético. La unión de estos tres componentes del fármaco debe ser estable en la circulación plasmática hasta la correcta liberación del agente citotóxico, por ello, el diseño adecuado de un ADC resulta crucial para su éxito en clínica (Figura 6) (Diamantis and Banerji 2016; Beck *et al.* 2017).

Para ejercer su acción antitumoral, el ADC tiene que alcanzar y unirse a una célula que exprese el antígeno reconocido por el anticuerpo. A continuación, requiere la internalización y el procesamiento lisosomal para liberar el fármaco, que difunde a través de la membrana del lisosoma para acceder a su diana molecular, induciendo en última instancia la muerte celular (Beck *et al.* 2017; Vezina *et al.* 2017).

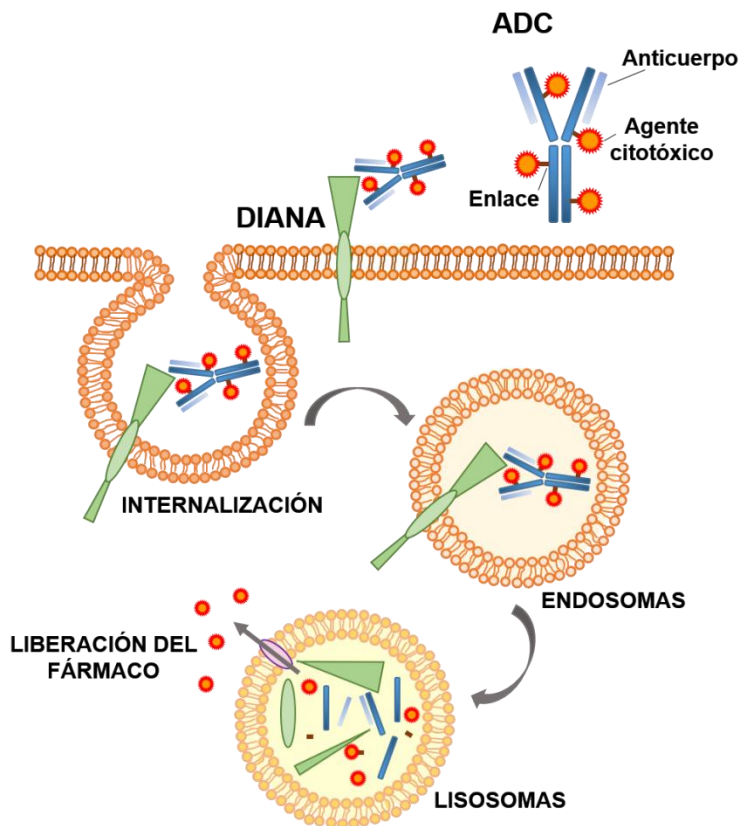


Figura 6. Representación de los componentes de un ADC y su ruta endocítica básica. Tras unirse a su antígeno, debe ocurrir la internalización a través de endosomas y sufrir procesamiento lisosomal, para liberar el agente citotóxico en el interior de la célula.

El T-DM1 fue aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo metastásico en 2013 (Amiri-Kordestani *et al.* 2014; Lambert and Chari 2014). Además del T-DM1, existen solamente tres ADCs aprobados, pero hay más de 60 en ensayos clínico (Beck *et al.* 2017; Garcia-Alonso *et al.* 2018).

El T-DM1 es un ADC formado por el trastuzumab unido a un derivado de la maintansina (el DM-1) a través de un enlace covalente no procesable (Lewis Phillips *et al.* 2008; Amiri-Kordestani *et al.* 2014). Los maitansinoides son agentes antimicrotúbulos muy potentes que se unen a tubulina β , impidiendo su polimerización (Cassady *et al.* 2004). El trastuzumab, por su parte, es un anticuerpo monoclonal humanizado diseñado contra HER2, por lo tanto, el hecho de que este

receptor se sobreexpresa en ciertos tumores confiere selectividad a T-DM1, restringiendo la toxicidad en otros tejidos (Amiri-Kordestani *et al.* 2014).

En pacientes con cáncer de mama HER2 positivo metastásico, el uso de T-DM1 en segunda y tercera línea de tratamiento demostró una mayor supervivencia global (Lewis Phillips *et al.* 2008; Verma *et al.* 2012; Amiri-Kordestani *et al.* 2014; Krop *et al.* 2017). Por otro lado, estudios han sugerido que la presencia de ligandos como las NRGs, que se unen a HER3 y HER4, puede dificultar la eficacia de T-DM1, causando resistencia a este fármaco (Phillips *et al.* 2014).

Objetivos

Las NRGs son factores de crecimiento que, en su mayoría, son sintetizadas como formas transmembrana, que pueden ser procesadas, liberándose las formas solubles activas. Estas proteínas actúan uniéndose a los receptores HER, desencadenando la activación de diversas vías de señalización intracelular.

La expresión de las NRGs se ha relacionado con importantes procesos patológicos, como el cáncer. De hecho, varios estudios sugieren que las NRGs presentan propiedades prooncogénicas, estando involucradas en proliferación, migración, invasión, mantenimiento, metástasis y resistencias tumorales. Los cánceres que expresan NRG tienen un comportamiento más agresivo y presentan un mal pronóstico.

Por lo tanto, las NRGs podrían ser buenas dianas terapéuticas en aquellos pacientes con tumores que expresan la proteína. De hecho, estudios utilizando anticuerpos bloqueantes dirigidos a la NRG han demostrado buenos resultados, pero todavía no se ha explorado la utilización de esta proteína como una diana contra la que desarrollar ADCs.

Para el desarrollo adecuado de terapias anti-NRG, resulta imprescindible un mejor conocimiento de las propiedades biológicas de los diferentes dominios de la proteína.

Objetivos

Considerando estos datos, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Identificar los dominios de las NRGs que son esenciales para su localización en la superficie celular.
2. Evaluar la importancia del dominio inmunoglobulina en el procesamiento de las NRGs y si la ausencia de este dominio influye en su actividad biológica.
3. Estudiar si la NRG1 puede ser utilizada como diana terapéutica contra la cual dirigir un ADC.
4. Explorar la expresión de la NRG1 en diferentes líneas tumorales.

Materiales y métodos

1. Reactivos

Los medios de cultivo, suero bovino fetal (FBS), tripsina, penicilina y estreptomycin fueron comprados a GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, Estados Unidos). La Proteína-A Sefarosa, proteinasa K, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), doxiciclina, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), puromicina, glutatión reducido y éster de N-hidroxisuccinimida del ácido m-maleibenzoico (MBS) se compraron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, Estados Unidos). La membrana de transferencia Immobilon®-P (PVDF), membranas Immobilon®-FL y filtros Ultra Centrifugal Amicon® fueron comprados a Merck Millipore Corp. (Darmstadt, Alemania).

La Neuregulina-1 humana recombinante se adquirió a través de ProSpec Protein Specialists (Rehovot, Israel). La Geneticina (G418) y Lipofectamine™ se compraron a Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, Estados Unidos). El jetPEI™ fue comprado de Polyplus transfection® (Illkirch, Francia). Las columnas de glutatión-sefarosa y sefarosa CL-4B fueron comercializadas por GE Healthcare (Uppsala, Suecia). Los péptidos utilizados para la generación de anticuerpos fueron sintetizados por Chiron Technologies Pty. Ltd. (Clayton, VIC 3168, Australia). La hemocianina de lapa (KLH) fue distribuida por Calbiochem (Darmstadt, Alemania), el adyuvante completo de Freund utilizado es de Thermo Scientific Pierce Protein Biology (Rockford, IL, Estados Unidos) y el adyuvante incompleto de Freund se compró a Sigma-Aldrich.

Las enzimas de restricción y tampones empleados en las digestiones de DNA, así como la ligasa T4 de DNA, fueron comprados a Fermentas Life Sciences (Burlington, Canadá). La enzima DNA polimerasa y su tampón de reacción eran de Biotools (B&M Labs; Madrid, España) y los oligonucleótidos fueron sintetizados por Isogen Biosciences (Maarssen, Holanda). El sistema de regulación de la expresión basado en el transactivador de la tetraciclina (RevTet-Off™ System) fue adquirido a Clontech Laboratories (Palo Alto, CA, Estados Unidos).

Los fármacos T-DM1 y trastuzumab, ambos de Hoffmann-La Roche (Basilea, suiza), fueron adquiridos a través de una farmacia local o donados por Genentech (South San Francisco, CA, Estados Unidos), y cetuximab, de Merck.

Los anticuerpos utilizados en este trabajo y sus respectivas casas comerciales se detallan en las Tabla 3, 4 y 5 del apartado 2 de esta sección. Otros productos químicos genéricos se compraron en Sigma-Aldrich, Roche Biochemicals o Merck.

Los conejos inmunizados para obtener anticuerpos eran de la raza *New Zealand* y fueron adquiridos a Granja San Bernardo (Tulebras, Navarra, España).

2. Anticuerpos

2.1. Anticuerpos comerciales

Tabla 3: Anticuerpos primarios comerciales.

Antígeno*	Especie	Casa comercial
AKT (fosfo Ser473)	Ratón (monoclonal)	BD Pharmingen™
AKT 1/2/3	Conejo (policlonal)	Cell Signaling Technologies
ERK1/2 (C-terminal)	Conejo (policlonal)	Santa Cruz Biotechnnology
ERK1/2 (fosfo Thr204/Tyr206)	Ratón (monoclonal)	Cell Signaling Technologies
GAPDH	Ratón (monoclonal)	Santa Cruz Biotechnnology
GAPDH	Conejo (policlonal)	Santa Cruz Biotechnnology
GM130 (C-terminal)	Ratón (monoclonal)	BD Tranduction Laboratories
GSK3- α/β (fosfo Ser 21/9)	Conejo (policlonal)	Cell Signaling Technologies
HER2 (Ab3)	Ratón (monoclonal)	Calbiochem Behring Corp.
HER2 (ectodominio) (Herceptin®/Trastuzumab)	Humano (monoclonal)	Roche
HER2 (fosfo Tyr1221/1222)	Conejo (policlonal)	Cell Signaling Technologies
HER2 (fosfo Tyr877)	Conejo (policlonal)	Cell Signaling Technologies
HER3 (fosfo Tyr1289)	Conejo (monoclonal)	Cell Signaling Technologies
LAMP-1	Conejo (monoclonal)	Cell Signaling Technologies
MEK1/2	Conejo (policlonal)	Cell Signaling Technologies
MEK1/2 (fosfo Ser217/221)	Conejo (policlonal)	Cell Signaling Technologies
NDRG1 (fosfo Thr346)	Conejo (policlonal)	Cell Signaling Technologies
NRG-1 humana (NRG1-h)	Ratón (monoclonal)	Santa Cruz Biotechnnology
NRG1 humana (YW538) - dominio EGF (NRG-h (YW538))	Humano (monoclonal)	Genentech
S6 proteína ribosomal	Conejo (monoclonal)	Cell Signaling Technologies
S6 proteína ribosomal (fosfo Ser240/244)	Conejo (policlonal)	Cell Signaling Technologies
Tirosina fosforilada (pY99)	Ratón (monoclonal)	Santa Cruz Biotechnnology

*En rojo se representa como denominamos el anticuerpo en este trabajo.

Tabla 4: Anticuerpos secundarios.

Especie	Molécula conjugada	Antígeno	Casa comercial
Conejo	HRP	IgG (H+L)	Bio-Rad Laboratories
Conejo	HRP	IgG (L)	Jackson Inmuno-Research Laborat.
Conejo	HRP	IgG (Conform.)	Cell Signaling Technologies
Conejo	FITC	IgG (H+L)	Cappel
Conejo	Cy2	IgG (H+L)	Jackson Inmuno-Research Laborat.
Conejo	Cy3	IgG (H+L)	Jackson Inmuno-Research Laborat.
Conejo	Dylight™ 800	IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific
Ratón	HRP	IgG (H+L)	GE Healthcare Life Sciences
Ratón	Cy2	IgG (H+L)	Jackson Inmuno-Research Laborat.
Ratón	Dylight™ 680	IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific
Humano	Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Invitrogen

H: cadena pesada de la inmunoglobulina

L: cadena ligera de la inmunoglobulina

2.2. Anticuerpos generados en el laboratorio

Tabla 5: Anticuerpos primarios generados en el laboratorio.

Antígeno*	Referencia
NRG de rata endodominio** (NRG endo)	(Montero <i>et al.</i> 2000)
NRG de rata – ectodominio (NRG ecto)	(Montero <i>et al.</i> 2007)
NRG1 humana (EGF)** (NRG-h (EGF))	-
DM-1	-
HER2 (fosfo Tyr1139)	-
HER3 (endodominio)	(Sanchez-Martin and Pandiella 2012)
HER4 (endodominio)	(Sanchez-Martin and Pandiella 2012)

*En rojo se representa como denominamos el anticuerpo en este trabajo.

**Reconoce la NRG1 de rata y la humana.

2.3. Producción de proteínas de fusión

La región contra la cual se quería generar el anticuerpo se clonó en el vector pKG (Guan and Dixon 1991). Este vector es inducible por isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) y está diseñado para expresar una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST) en el amino terminal. Las secuencias contra los antígenos se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con

oligos específicos para cada anticuerpo y, posteriormente, se clonaron. Con estas construcciones se transformaron bacterias competentes *E.coli* DH5 α , que produjeron una proteína de fusión de la GST y el fragmento de interés que está amplificado.

Una colonia procedente de la transformación se creció en 100 ml de medio de cultivo Luria-Bertani (LB), formado por 0,5% extracto de levadura, 1,0% triptona, 1,0% NaCl, con ampicilina (100 μ g/ml). Cuando la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm fue de una unidad, se añadió IPTG (0,2 mM) y se incubó en agitación durante 2 horas a 37°C para inducir la expresión de la proteína de fusión. Después, se centrifugaron las muestras con bacterias y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM). A continuación se resuspendieron en este mismo tampón al que se añadió EDTA (ácido etilendiaminotetraacético 10 mM) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (0,2 mM), y se lisaron por seis ciclos de sonicación (Vibra Cell™, Sonics&Materials Inc., Newtown, CT, Estados Unidos). Para eliminar los restos celulares, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante fue recogido. Para solubilizar las proteínas se añadió Tritón X-100 a una concentración final del 1% y el extracto se incubó en una columna de glutatión-sefarosa durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez unida la proteína a la matriz, la columna se lavó tres veces con PBS frío. Se eluyó la proteína de fusión por competición, incubándola en agitación fuerte con 2 ml de tampón Tris-HCl (50 mM) que contenía glutatión reducido (10 mM). La elución se repitió hasta que la proteína fue completamente separada de la matriz. La proteína de fusión obtenida en cada fracción se cuantificó comparándola con cantidades conocidas de albumina de suero bovino (BSA) en geles de poliacrilamida teñidos con solución de Coomassie (0,8% azul Coomassie en 50% metanol y 10% ácido acético).

Para la generación del anticuerpo anti-NRG ecto, la proteína de fusión fue digerida cuando estaba unida a la matriz con trombina, que corta la proteína de fusión tras la GST, purificando así únicamente el péptido correspondiente a la NRG. Para ello, una vez unida la proteína a la columna de glutatión-sefarosa, esta se lavó con tampón para la digestión con trombina (NaCl 150 mM; CaCl₂ 2,5 mM; 0,1% β -mercaptoetanol; Tris 50 mM pH 8,0). Posteriormente, se incubó con 10 μ g de trombina durante 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente se recogió el eluyente

y se comprobó la cantidad y la calidad de la proteína en un gel de poliacrilamida que fue teñido con solución de Coomassie.

2.4. Obtención de péptidos acoplados a KLH

Para producir sueros, el péptido correspondiente a la secuencia de aminoácidos de interés fue acoplado a KLH antes de inmunizar los conejos, evitando así su eliminación, como descrito por Sambrook (Sambrook *et al.* 1989). A 1 ml de KLH diluida en PBS (pH 6,0) a una concentración final de 10 mg/ml, se le añadieron 50 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) que contenían 1,5 mg de MBS. Se agitó esta mezcla durante 30 minutos y se pasó por una columna de Sephadex G-25 para obtener el complejo diluido en PBS pH 7,4, separando el KLH unido a MBS del no unido. Se identificaron las fracciones que contenían KLH-MBS, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, y se juntaron todas las que presentaban un valor mayor de 0,5. Paralelamente, se disolvieron 5 mg de péptido sintético en el mínimo volumen posible de PBS pH 7,4, hasta un volumen máximo de 500 μ l. El péptido disuelto se mezcló con la solución de KLH-MBS y se mantuvo en agitación moderada durante 1 hora a temperatura ambiente para promover su acoplamiento.

2.5. Obtención de antisueros

Para inducir la producción de antisueros policlonales se siguió un protocolo de inmunización en conejos de raza *New Zealand* a los que se inyectaron la proteína de fusión o el péptido de interés. Para la primera inoculación se mezcló 1 mg de péptido acoplado a KLH o 400 μ g de proteína de fusión con un volumen equivalente de adyuvante de Freund completo añadido en fracciones de 100 μ l, mientras se agitaba vigorosamente. La suspensión fue sonicada hasta conseguir una emulsión que se inyectó en los conejos siguiendo un protocolo de inmunización intradérmica, para lo que se repartió en varios puntos dorsales (aproximadamente 0,2 ml por punto). A los 21 días de la primera inoculación, se administró una dosis de recuerdo consistente en la inyección de una emulsión de 500 μ g de péptido o 200 μ g de proteína de fusión con adyuvante incompleto de Freund, que se emulsionó de la misma manera y se

inyectó de forma subcutánea en las axilas de las patas delanteras del animal. Diez días más tarde se les extrajo sangre por canulación de la arteria central de la oreja. La sangre se dejó coagular, se centrifugó a baja velocidad y el suero se conservó a -20°C o se utilizó para purificar los anticuerpos de interés mediante cromatografía de afinidad. A partir de la primera extracción se realizaron sangrados a cada diez días, hasta que disminuyó el título del anticuerpo.

2.6. Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando una columna a la que se había acoplado el péptido o la proteína de fusión que reconocían. Para prepararla se utilizó una matriz de Sefarosa CL-4B activada con bromuro de cianógeno que se incubó con ácido clorhídrico (HCl) 1 mM durante 15 minutos siguiendo las indicaciones de la casa comercial, lavando la matriz y preservando los sitios activos. Transcurrido este tiempo se equilibró con tampón de acoplamiento (NaCl 0,5 M; NaOH 0,1 M pH 8,2), se añadió la proteína de fusión o el péptido previamente acoplado a BSA (preparado de igual forma que el KLH-MBS-péptido) y se incubó a 4°C durante toda la noche en agitación. Tras lavarla con tampón de acoplamiento, para eliminar la proteína de fusión o el péptido que no se han acoplado, se bloquearon los sitios activos libres de la resina con Tris 0,1 M pH 8,0 durante 2 horas. A continuación se sometió la columna a tres ciclos alternativos de pH haciendo pasar tampón acetato 0,1 M pH 4,0, conteniendo NaCl 0,5 M y tampón Tris 0,1 M pH 8,0 conteniendo NaCl 0,5 M. Finalmente la columna se lavó con PBS y se conservó en este mismo tampón conteniendo 0,05% de azida sódica como preservante.

Para purificar el anticuerpo se incubó con la columna de afinidad 10-30 ml del suero correspondiente durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación. Transcurrido este tiempo se recogió el sobrenadante y se lavó la columna con Tris 10 mM pH 8,0 y NaCl 0,5 M hasta que la absorbancia a 280 nm del eluyente fue inferior a 0,01. En ese momento se procedió a la elución del anticuerpo con glicina 0,1 M pH 2,6 recogándose fracciones de 1 ml que fueron rápidamente neutralizadas con 100 µl de Tris pH 8,0 cada una. Para determinar qué fracciones contenían el anticuerpo se midió su absorbancia a 280 nm, se juntaron y se

conservaron aquellas en las que la absorbancia era mayor. Para obtener una cuantificación más precisa se comparó la cantidad de anticuerpo con diferentes cantidades de otro anticuerpo de concentración conocida o de BSA en un gel de poliacrilamida teñido con solución de Coomassie o en el NanoDrop™. Una vez purificado el anticuerpo, se determinó la cantidad óptima para su uso en inmunoprecipitación, Western Blot o inmunofluorescencia.

3. Cultivos celulares

Todas las líneas celulares empleadas en este trabajo son humanas y se detallan en la tabla 6.

Tabla 6: Líneas celulares utilizadas.

Tejido	Descripción	Línea celular	Medio de cultivo
Cabeza y cuello	Carcinoma de célula escamosa	SCC24B	DMEM+10%FBS
		SCC29	DMEM+10%FBS
		SCC34	DMEM+10%FBS
		SCC38	DMEM+10%FBS
		SCC40	DMEM+10%FBS
		SCC42B	DMEM+10%FBS
		SCC8	DMEM+10%FBS
		SCC2	DMEM+10%FBS
		SCC9	DMEM+10%FBS
Cerebro	Neuroblastoma	IMR32	DMEM+10%FBS
		IMR5	RPMI+10%FBS
		NB69	RPMI+10%FBS
		SKNBE	DMEM+10%FBS
		SKNMC	DMEM+10%FBS
	Glioblastoma multiforme	T98G	DMEM+10%FBS
	Glioblastoma	U138	DMEM+10%FBS
Cervix	Adenocarcinoma	HeLa	DMEM+5%FBS
Colon	Carcinoma colorectal	HCT116	DMEM+10%FBS
	Adenocarcinoma colorectal	HT29	DMEM+10%FBS
Hígado	Carcinoma	HepG2	DMEM+10%FBS
		Huh7	DMEM+10%FBS

Dominios funcionales de las NRGs y su uso como diana terapéutica

Mama	ER/PR	Adenocarcinoma	MCF7	DMEM+10%FBS
		Carcinoma ductal	T47D	RPMI+10%FBS
	HER2+	Carcinoma ductal	BT474	DMEM+10%FBS
		Carcinoma ductar primario	HCC1419	RPMI+10%FBS
		Carcinoma metaplástico	HCC1569	RPMI+10%FBS
		Carcinoma ductal	HCC1954	RPMI+10%FBS
		Carcinoma ductal invasivo	HCC202	RPMI+10%FBS
		Carcinoma ductal primario	HCC2157	DMEM+10%FBS
		Carcinoma ductal primario	HCC2218	RPMI+10%FBS
		Carcinoma ductal	MDAMB175	DMEM+10%FBS
		Adenocarcinoma	MDAMB361	DMEM+10%FBS
		Adenocarcinoma	SKBR3	DMEM+10%FBS
	TNBC	Carcinoma ductal	BT549	RPMI+10%FBS
		Carcinoma ductal primario	HCC1187	RPMI+10%FBS
		Carcinoma ductal primario	HCC1937	RPMI+10%FBS
		Carcinoma ductal	HCC3153	RPMI+10%FBS
		Carcinoma ductal primario	HCC70	RPMI+10%FBS
		Carcinoma	HS578T	DMEM+10%FBS
		Adenocarcinoma	MDAMB231	DMEM+10%FBS
Adenocarcinoma		MDAMB468	DMEM+10%FBS	
Ovario	Carcinoma	A2780	RPMI+10%FBS	
	Adenocarcinoma endometroide	IGROV1	RPMI+10%FBS	
	Adenocarcinoma	OVCAR3	RPMI+10%FBS	
	Adenocarcinoma seroso	OVCAR8	DMEM+10%FBS	
	Adenocarcinoma	SKOV3	DMEM+10%FBS	
Páncreas	Adenocarcinoma	CAPAN1	DMEM+10%FBS	
	Adenocarcinoma	IMIM-PC1	DMEM+10%FBS	
	Adenocarcinoma	IMIM-PC2	DMEM+10%FBS	
	Carcinoma	NP18	RPMI+10%FBS	
	Carcinoma	NP29	DMEM+10%FBS	
	Carcinoma	NP31	DMEM+10%FBS	
	Carcinoma	NP9	DMEM+10%FBS	
	Carcinoma epitelioides	PANC1	DMEM+10%FBS	
	Adenocarcinoma	SKPC1	DMEM+10%FBS	
Piel	Melanoma	A2085	DMEM+10%FBS	
	Carcinoma epidermoide vulvar	A431	DMEM+10%FBS	
	Melanoma	SKMEL2	DMEM+10%FBS	
	Melanoma	WM115	DMEM+10%FBS	
Próstata	Carcinoma	DU145	DMEM+10%FBS	

	Adenocarcinoma	PC3	DMEM+10%FBS
Pulmón	Adenocarcinoma alveolar basal	A549	DMEM+10%FBS
	Carcinoma de célula pequeña	DMS92	RPMI+10%FBS
	Carcinoma de célula pequeña	GLC8	RPMI+10%FBS
	Adenocarcinoma NSCLC	H1299	RPMI+10%FBS
	Adenocarcinoma NSCLC	H1975	RPMI+10%FBS
	Adenocarcinoma NSCLC	H23	RPMI+10%FBS
	Adenocarcinoma Papilar NSCLC	H441	DMEM+10%FBS
	Carcinoma de célula grande NSCLC	H460	DMEM+10%FBS
	Adenocarcinoma bronco-alveolar NSCLC	H727	DMEM+10%FBS
	Adenocarcinoma Papilar NSCLC	H820	DMEM+10%FBS
	Carcinoma de células alveolares	SW1573	DMEM+10%FBS
Riñón	Adenocarcinoma	769P	RPMI+10%FBS
	Adenocarcinoma	786O	RPMI+10%FBS
	Carcinoma	A498	DMEM+10%FBS
	Adenocarcinoma	ACHN	DMEM+10%FBS
	Carcinoma de células claras	Caki2	DMEM+10%FBS
	Fibroblasto embrionario	HEK-293	DMEM+10%FBS
Tejido conectivo	Fibrosarcoma	HT1080	DMEM+10%FBS

Algunos de los ensayos de proliferación celular y de los estudios de la actividad biológica de mutantes de NRG se realizaron en una variante de las células MCF7 que permite regular la expresión de estos. La línea MCF7, transfectada con el vector pRevTet-Off, expresa de forma estable una proteína activadora del elemento de respuesta a la tetraciclina (TRE). Las secuencias codificantes para las proteínas proNRG α 2c y proNRG^{Alg} se clonaron en el vector retroviral pRevTRE bajo el control del TRE y las células PT67 productoras de virus fueron transfectadas con estas construcciones. El medio de cultivo de estas células, en el que se encuentran los retrovirus, fue recogido y filtrado 48 horas más tarde para infectar con él las células MCF7^{tetoff}. Se aislaron clones y estos fueron testados para analizar cuál de ellos

expresaba las proteínas de interés. En presencia de doxíciclina, un análogo de la tetraciclina, la expresión de las formas de NRG transfectadas eran inhibidas ya que la proteína activadora TetR no puede unirse al elemento de respuesta a la tetraciclina.

3.1 Condiciones de cultivo

Las células se cultivaron de acuerdo con sus necesidades de crecimiento (tabla 5) en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) conteniendo 4,5 g/l de glucosa, 4 mM de L-Glutamina y 5 mM de piruvato, o RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 L-glutamina, y fueron suplementados con suero bovino fetal (FBS) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 mg/ml). Las líneas celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda y en presencia de 5% de CO₂, en condiciones de esterilidad.

Para subcultivar las células, o para sembrarlas a la densidad requerida en los experimentos, se partió de monocapas de células creciendo aproximadamente al 80% de confluencia. Tras aspirar el medio de cultivo, las células adheridas a la placa se lavaron con PBS estéril para eliminar los restos de medio de cultivo y se incubaron con una solución 0,25% de tripsina y 0,38 g/l de EDTA, para que las células se despegasen de la placa. El efecto de la tripsina se neutralizó con medio de cultivo fresco. La suspensión de células se transfirió a nuevas placas de cultivo o fueron contadas, realizando la dilución adecuada para cada línea celular y/o experimento.

3.2 Preservación de las líneas celulares

Para conservar las líneas celulares, estas se tripsinizaron en la fase de crecimiento exponencial y la suspensión de células fue centrifugada a 1.200 rpm durante 3 minutos. Se eliminó el medio de cultivo junto con la tripsina-EDTA y el precipitado celular se resuspendió en 1,5 ml de medio de congelación con 10% de DMSO, utilizado como agente crioprotector. Los crioviales se mantuvieron 24 horas a -80°C y, posteriormente, se transfirieron a tanques de nitrógeno líquido donde se almacenaron.

3.3. Transfección y selección de clones estables

La expresión de las diferentes formas de proNRG en las distintas líneas celulares se consiguió por transfección de la secuencia de DNA codificante correspondiente, utilizando la técnica de transfección con fosfato cálcico, liposomas catiónicos o mediante el reactivo jetPEI™.

La selección de clones con expresión constitutiva de las proteínas se realizó añadiendo al medio de cultivo geneticina (G418, 500 µg/ml) o puomicina (3 µg/ml) según el gen de resistencia codificado por el vector de expresión.

3.3.1. Transfección con fosfato cálcico

Para realizar esa transfección se siguió el protocolo descrito por Sambrook (Sambrook *et al.* 1989). Las células se sembraron a una concentración de 10.000 a 20.000 células/cm² en placas de 100 mm. Al día siguiente se mezclaron 10 µg del plásmido en un volumen de 500 µl con un volumen equivalente de tampón 2x HBS (NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, glucosa 12 mM, HEPES 50 mM pH 7,05) y con 62 µl de CaCl₂ 2 M añadidos gota a gota a la vez que se burbujeaba con una pipeta Pasteur durante 20 a 30 segundos.

Trascurridos 30 minutos se añadió esta mezcla a las células y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Seis horas más tarde se realizó un choque osmótico para aumentar la eficiencia de la técnica incubando las células transfectadas con una solución de glicerol 10% en medio de cultivo durante tres minutos. Las placas fueron lavadas dos veces con PBS estéril antes de añadir el medio de cultivo correspondiente a cada línea celular.

3.3.2. Transfección con Lipofectamine™

Se siguió el protocolo recomendado por Invitrogen Life Technologies para la transfección con liposomas catiónicos. Las células se sembraron en placas de 35 mm en medio de cultivo sin antibióticos de manera que, en el momento de la transfección,

la confluencia fuera del 80-90%. Se mezcló 1 µg del plásmido con el cDNA de la proteína de interés diluido en medio de cultivo sin suero y sin antibióticos, con 12 µl de Lipofectamine™ diluida en otros 100 µl del mismo medio. Tras incubar la mezcla 30 minutos a temperatura ambiente, esta se añadió a las placas de células que contenían 0,8 ml de medio de cultivo. Seis horas más tarde se reemplazó el medio de la transfección por medio de cultivo completo.

3.3.3. Transfección con jetPEI™

Para la transfección con jetPEI™ se siguió el protocolo recomendado por el fabricante Polyplus-transfection. Se sembraron las células en placas de 100 mm en una dilución para que las mismas tuviesen una confluencia de 40-50% al día siguiente para la transfección. Por un lado se mezcló 20 µg del plásmido con el cDNA de la proteína de interés con NaCl, a un volumen final de 250 µl. Por otro lado 40 µl de jetPEI fueron mezclados con 210 µl de NaCl. Luego, se añadió la solución de jetPEI sobre la solución de DNA y se homogeneizó durante 15 segundos, incubándose 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, la solución fue añadida a las células. Si se observa toxicidad, el medio de las células transfectadas debe ser cambiado por medio de cultivo fresco. Tras 72 horas se analizó la expresión de la proteína de interés.

4. Generación de los mutantes de NRGα2c de rata

Todos los mutantes de NRG utilizados en este trabajo se generaron usando como molde la secuencia codificante para la isoforma α2c de la NRG1 de rata. Esta secuencia se aisló a partir del vector pJT-2/NDF cedido por el Dr. Duanhzi Wen (Wen *et al.* 1992).

El cDNA completo de la NRGα2c, así como los mutantes generados, fueron subclonados en el vector pcDNA3 (Invitrogen) para su expresión en la línea celular HEK-293 o MCF7. La construcción que contiene la secuencia codificante para la forma completa de la proteína (pcDNA3-NRGα2c), se generó por digestión doble con las enzimas de restricción *KpnI* y *NotI* del vector pBlueScript KS- en el que se había

introducido la secuencia original. El fragmento correspondiente al inserto fue purificado por electroforesis en gel de agarosa. En paralelo se digirió con las mismas enzimas el vector pcDNA3, que posteriormente se desfosforiló usando 3 unidades de fosfatasa alcalina para evitar su recircularización. La ligación del vector desfosforilado con el inserto se llevó a cabo en presencia de 1 unidad de la ligasa de DNA T4, durante dos horas a temperatura ambiente.

El mutante de NRG α 2c carente del dominio inmunoglobulina (NRG Δ Ig), se generó por digestión con *Bam*HI de la construcción pcDNA3-NRG α 2c ya que la secuencia correspondiente a este dominio se encuentra flanqueada por sitios de reconocimiento para esta enzima de restricción. El corte generó una construcción cuya secuencia de aminoácidos mantiene la fase de lectura que, tras ser purificada, se religó como se ha descrito anteriormente.

El resto de mutantes se generaron amplificando el fragmento de interés mediante PCR a partir del cDNA de la NRG α 2c. Para ello se utilizaron los pares de oligonucleótidos descritos en la tabla 7, que contienen en su extremo la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Hind*III, *Eco*RI o *Xba*I. El fragmento amplificado fue digerido con las enzimas correspondientes y ligado en el vector pcDNA3 como se ha descrito anteriormente.

Tabla 7: Oligonucleótidos utilizados para amplificar la secuencia de cada mutante

Oligonucleótido	Secuencia*	
NRG Δ intra	Sentido:	5'- AAGCTT ATGTCTGAGCGCAAAGAAGG -3'
	Antisentido:	5'- GCCGATC AAGCTTTT ACCGCTGCTTCTTGG -3'
NRG β 3símil	Sentido:	5'- AAGCTT ATGTCTGAGCGCAAAGAAGG -3'
	Antisentido:	5'- CC AAGCTTTT AGTAGAGTTCCTCCGCTTTTTTC -3'
NRG Δ extra	Sentido:	5' - AG GAA TCGTGCTGACAATTA CTG - 3'
	Antisentido:	5' - TAT CTAGATT ACCTTTCGCTATGAGG -3'
pcDNA3	Sentido:	5'- TCT GGGTCGAC GCTAGCCCCACTGCTTACTTT -3'
	Antisentido:	5'- TAGAA ATCGAT GTTCGAGGCTGATCAGCGA -3'

*En verde se destacan los codones de parada. El sitio de reconocimiento para los diferentes enzimas de restricción se indica en rojo (*Hind*III), azul (*Eco*RI), rosa (*Xba*I), naranja (*Sal*I) o morado (*Cl*aI).

Para conseguir la expresión regulable de las diferentes formas de NRG, las construcciones fueron subclonadas en el vector retroviral pRevTRE. Las secuencias

insertadas en el vector pcDNA3 fueron amplificadas por PCR y digeridas con las enzimas de restricción correspondientes para poder ser ligadas en el vector retroviral. Para copiar la NRG α 2c y la forma NRG β 3 se utilizaron cebadores que se unían al del vector pcDNA3 en posición 5' y 3' del inserto y que contenían la secuencia de reconocimiento para los enzimas *SaI* (pcDNA3 sentido) y *Cl**I* (pcDNA3 antisentido) respectivamente. La forma NRG Δ intra se amplificó usando el mismo oligonucleótido para el extremo 5' (pcDNA3 sentido) y el que contenía la secuencia de reconocimiento para *Hind*III en 3' (oligonucleótido NRG Δ intra antisentido).

5. Extracción de proteínas e inmunoprecipitación

Para preparar los extractos proteicos, las células fueron lavadas dos veces con PBS y a partir de ese punto tanto las placas como el material utilizado se mantuvieron en frío. Posteriormente, estas fueron incubadas durante 10 minutos con tampón de lisis (NaCl 140 mM, EDTA 10 mM, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, Tris 20 mM pH 8,0) al que se le añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasa (1 mM ortovanadato sódico; 10 mM β -glicerol fosfato; 10 mM fluoruro sódico; 10 μ g/ml aprotinina; 10 μ g/ml leupeptina; 0.5 μ g/ml pepstatina; 1 mM PMSF (Cabrera *et al.* 1996). Los extractos celulares se centrifugaron a 4°C a 12.000 rpm durante 10 minutos y las proteínas contenidas en los sobrenadantes resultantes se cuantificaron con el kit Pierce™ BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific™), siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

La detección de las proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Western blot, directamente en extracto o, en caso de que fuera necesario enriquecer la muestra en una proteína, los extractos fueron inmunoprecipitados. Cuando se utilizó directamente el extracto, se mezcló la cantidad de proteína necesaria con tampón de carga (sodio dodecil sulfato - SDS 4%, azul de bromofenol 0,05%, glicerina 20% y β -mercaptoetanol 2% en Tris-HCl 100 mM, pH 6,8). Para las inmunoprecipitaciones, una vez determinada cantidad de extracto, se incubó con el anticuerpo correspondiente (conforme Tabla 8) y 60 μ l de proteína A-sefarosa® o GammaBind G-sefarosa® en agitación a 4°C durante al menos 2 horas. Los inmunocomplejos fueron lavados tres veces con 1 ml de tampón de lisis frío, mezclándose finalmente con 30 μ l de tampón de carga.

Las muestras se hirvieron durante 7 minutos a 100 °C y finalmente, fueron sometidas a electroforesis.

Tabla 8: Condiciones para la inmunoprecipitación de proteínas

Proteína	Cantidad anticuerpo	Cantidad proteína
NRG endo	1 µg	250 - 1.000 µg
NRG ecto	1 µg	250 - 1.000 µg
NRG1-h	1 µg	1.000 µg
NRG-h (YW538)	1 µg	1.000 µg
NRG-h (EGF)	1 µg	1.000 µg
HER2	1 µg	500 - 1.000 µg
HER3	1 µg	500 - 1.000 µg
HER4	1 µg	1.000 µg

6. Electroforesis y Western Blot

La separación de las proteínas presentes en las muestras se realizó por electroforesis en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli 1970) y se llevó a cabo en cubetas Mini-PROTEAN®3 (BioRad, Madrid, España) o en cubetas grandes de tipo *Sturdier*. Las proteínas se separaron en función de su peso molecular en geles de diferente porcentaje de acrilamida a un voltaje constante de 120 V, en el caso de geles pequeños, o 200 V para geles grandes, en tampón de electroforesis (Tris-HCl 20 mM, Glicina 192 mM, y 1% de SDS).

Una vez finalizada la separación de las proteínas, éstas se transfirieron a una membrana de PVDF. Para ello se utilizó el sistema Trans-Blot de BioRad (transferencia húmeda) en tampón de transferencia (Tris-HCl 20 mM, Glicina 192 mM) a 500 mA constantes durante un intervalo de tiempo fijado en función del porcentaje de acrilamida del gel utilizado y sus dimensiones (entre 70 minutos y 3 horas), o 14 horas a 20 V de voltaje constante.

Las condiciones para la electroforesis y para la transferencia de proteínas esta detallada en la tabla 9.

Tabla 9: Condiciones establecidas para el Western Blot

Proteína	Peso molecular (kDa)	Acrilamida (%)	Tiempo de transferencia (500 mA)	Dilución	Anticuerpo secundario*
NRG de rata**	80	8	1h 20 min	NRG endo 1:5.000	Anti-conejo
				NRG ecto 1:2.500	Anti-conejo
NRG humana	120	8	1h 20 min	NRG1-h 1:2.500	Anti-ratón
EGFR	185	6	1 h 10 min	1:2.000	Anti-conejo
HER2 fosforilado	185	6	1 h 10 min	1:2.000	Anti-conejo
HER2	185	6	1 h 10 min	1:10.000	Anti-ratón
HER3 fosforilado	185	6	1 h 10 min	1:2.000	Anti-conejo
HER3	185	6	1 h 10 min	1:5.000	Anti-conejo
HER4	185	6	1 h 10 min	1:2.500	Anti-conejo
AKT fosforilado	60	8	1h 20 min	1:5.000	Anti-ratón
AKT	60	8	1h 20 min	1:5.000	Anti-conejo
ERK1/2 fosforilado	44/42	8	1h 20 min	1:1.000	Anti-ratón
ERK1/2	44/42	8	1h 20 min	1:10.000	Anti-conejo
MEK1/2 fosforilado	40-45	10	1h 30 min	1:5.000	Anti-conejo
MEK1/2	40-45	10	1h 30 min	1:5.000	Anti-conejo
S6 fosforilado	32	12	1 h 45 min	1:10.000	Anti-conejo
S6	32	12	1 h 45 min	1:10.000	Anti-conejo
GAPDH	37	12	1 h 45 min	1:20.000	Anti-conejo
GAPDH	37	12	1 h 45 min	1:10.000	Anti-ratón
NDRG1 fosforilado	46 - 48	10	1h 30 min	1:1.000	Anti-conejo
GSK3- α/β fosforilado	46	10	1h 30 min	1:3.000	Anti-conejo
Tirosina fosforilada	-	-	-	1:10.000	Anti-ratón

*Anti-conejo (1:20.000) y anti-ratón (1:10.000); para protocolos con leche, se utilizó el doble de la concentración.

**Para análisis de las formas de NRG de peso molecular más pequeño, como algunos mutantes y los fragmentos de la cola citosólica, se utilizó un gel a 12% de acrilamida.

A continuación las membranas se bloquearon en agitación durante al menos una hora con 1% de BSA o 5% de leche desnatada en polvo en tampón TBS-T (NaCl 140 mM, 0,05% Tween, Tris 10 mM pH 7,5) y se incubaron en agitación con el anticuerpo correspondiente disuelto en el mismo tampón utilizado para el bloqueo o TBS-T. El tiempo de incubación del anticuerpo primario fue de al menos una hora a

temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T, durante 7 minutos cada vez, y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron nuevamente. Las proteínas se visualizaron usando un sistema de detección basado en la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno y potenciado con yodofenol (Ausubel and Gitler 1987; Cabrera *et al.* 1996). Para ello, las membranas se incubaron durante 1 minuto en tampón de revelado (luminol 0,08%, p-iodofenol 0,02%, Tris-HCl 0,1 M pH 9,3) al que previamente se le añadió H₂O₂ 0,44 mM. Por otro lado, en el caso de que se usaran absorbancias fluorescentes, tras los lavados, las proteínas fueron visualizadas mediante el sistema de análisis de imágenes Odyssey (LI-COR, Lincoln, NE, EE. UU.).

7. Inmunofluorescencia

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos hasta que obtuvieron una confluencia y morfología adecuadas. Tras lavarlas dos veces con PBS que contenía CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ 0,5 mM (PBS Ca/Mg) se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS Ca/Mg durante 30 minutos. A continuación se lavaron dos veces con PBS Ca/Mg y se quelaron los restos de paraformaldehído con NH₄Cl 50 mM durante 10 minutos. Las células se permeabilizaron tres veces durante 10 minutos cada una, con PBS Ca/Mg suplementado con 0,1% de Triton X-100. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon realizando tres lavados con 0,2% de BSA en PBS Ca/Mg.

Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 10) en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados durante 10 minutos cada uno en PBS con 0,2% de BSA, los cubreobjetos se incubaron con anticuerpo secundario, diluido en ese mismo tampón durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces. Las células inmunomarcadas se tiñeron con DAPI (1 g/ml - diluido en agua) para detectar núcleos celulares y luego se montaron sobre los portaobjetos, fijando los cubreobjetos con Gelvatol (12% Mowiol, 30% glicerol, Tris 0,12 M pH 8,5). Las células se analizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia usando un

sistema confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Barcelona, España) o un sistema de epifluorescencia Zeiss Axiophot2 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood, NY, Estados Unidos).

Tabla 10: Condiciones establecidas para inmunofluorescencia

Proteína	Dilución/ Concentración	Anticuerpo secundario (dilución)	λ excitación	λ emisión
NRG rata endo	1:500	Anti-conejo Cy3 (1:1.000)	552 nm	565 nm
NRG rata ecto	1:500 / 50 nM	Anti-conejo Cy3 (1:1.000)	552 nm	565 nm
NRG1 humana	NRG1-h 50 nM	Anti-ratón Cy3 (1:500)	552 nm	565 nm
HER2	50 nM	Anti-humano Alexa 488 (1:100)	495 nm	520 nm
GM130	1:500	Anti-conejo Cy2 (1:800)	495 nm	520 nm
LAMP1	1:100	Anti-conejo Cy2 (1:800)	495 nm	520 nm

8. Citometría de flujo: marcaje de superficie

La exposición en superficie de los diferentes mutantes de NRG se determinó, entre otras técnicas, por marcaje con anticuerpos específicos que se cuantificó por citometría de flujo. Se lavaron las células con PBS y se recogieron en tubos de 1,5 ml utilizando un rascador. Se realizó otro lavado con PBS centrifugándolas a 2.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 1 ml de PBS que contenía 2% de BSA y el anticuerpo anti-NRG (ectodominio) diluido 1:500. Tras incubarlas en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, se realizaron dos lavados más con PBS y se resuspendieron en PBS/BSA que contenía el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo) conjugado a FITC. Se incubaron en agitación, protegidas de la luz durante media hora y se repitieron los lavados resuspendiéndolas finalmente en 1 ml de PBS. La intensidad media de fluorescencia se cuantificó utilizando la aplicación CellQuest en un citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences).

9. Ensayo de protección de proteasas

Células 293 y MCF7 que expresan la proNRG α 2c y el mutante proNRG Δ Ig fueron tratadas con 200 μ g/ml de proteinasa K, que es capaz de degradar las

proteínas expuestas al medio, pero no las que quedan protegidas en el interior de la célula, verificando que la NRG está realmente localizada en la membrana celular.

Las células fueron lavadas dos veces con tampón KRH (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, glucosa 6 mM, hepes 25 mM pH 7,4) y se incubaron con ese mismo tampón al que se le había añadido proteinasa K 200 µg/ml, durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. Transcurrido ese tiempo, las células se recogieron en tubos de 1,5 ml y se lavaron tres veces, centrifugando a 2.000 rpm durante 2 minutos cada vez, con PBS que contenía PMSF 2 mM con objetivo de inactivar la proteinasa K. Finalmente, las células fueron lisadas como se ha descrito anteriormente y se analizaron los fragmentos resultantes por Western Blot, utilizando anticuerpos que reconocían el endodominio de las proteínas.

10. Ensayo de estimulación con PMA

Las células 293-NRGα2c and 293-NRG^{Δlg} fueron incubadas con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) 1 mM por 5, 15 y 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, las células fueron lavadas dos veces con PBS y lisadas. La expresión de NRG en los extractos celulares y en el medio de cultivo fue verificada por Western blot usando anticuerpos contra el dominio intracelular y extracelular de la proteína, respectivamente.

11. Liberación de NRG soluble

Las células 293 y MCF7 que expresan la proNRGα2c de tipo silvestre y los diferentes mutantes se cultivaron en placas de 100 mm en DMEM con un 10% de FBS hasta que alcanzaron un 80% de confluencia. El medio de esas células fue cambiado por DMEM sin FBS y se incubó durante 30 minutos. Este proceso fue repetido tres veces. Más tarde, las células se incubaron con 5 ml de DMEM sin FBS durante 24 horas. El medio fue recogido y centrifugado a 1.200 rpm durante 3 minutos, para eliminar los restos celulares. El sobrenadante (el medio condicionado que contiene las proteínas liberadas) se concentró 10 veces (5 ml fue concentrado

hasta un volumen de 500 μ l) por ultrafiltración usando filtros Ultra Centrifugal 3k de Amicon®. Los niveles de NRG liberadas en el medio condicionado se detectaron mediante Western blot usando el anticuerpo anti-NRG ectodominio.

12. Ensayos de actividad biológica

La actividad biológica de la NRG fue evaluada en su forma soluble y transmembrana.

Para analizar la actividad de la forma soluble de la NRG, células MCF7 se cultivaron en DMEM con 10% FBS hasta una confluencia de 80%. Posteriormente, el medio fue sustituido por DMEM sin suero durante toda la noche. Al día siguiente, el medio de estas células fue sustituido por medio condicionado de células 293 que expresan proNRG, durante 15 minutos. Se usó como control positivo células MCF7 estimuladas con NRG-1 humana recombinante (10 nM) y como control negativo el medio condicionado de células 293 no expresas de NRG.

Por otro lado, los clones de MCF7^{tetoff} que expresan proNRG α 2c y proNRG Δ lg fueron cultivados en DMEM con 10% de FBS hasta el 40% de confluencia, después las células fueron privadas de suero (DMEM sin FBS) y se trataron con doxiciclina (10 ng/ml) durante 48 horas, con el fin de reprimir la expresión de la proNRG en las células tratadas. Posteriormente, las células fueron estimuladas con NRG-1 humana recombinante (10 nM) durante 15 minutos, como control positivo. Además, en esas mismas condiciones experimentales, tras el tratamiento con doxiciclina, las células MCF7-NRG α 2c y MCF7-NRG Δ lg fueron tratadas con trastuzumab (10 nM) durante 24 horas.

En ambos experimentos, se lisaron las células y se analizó el estado de fosforilación de los receptores HER2 y HER3, y las proteínas de señalización activadas por estos receptores por Western Blot usando anticuerpos específicos como se describió anteriormente.

13. Proliferación celular

13.1. Metabolización del MTT

Para estudiar la proliferación celular se utilizó el método indirecto de metabolización de MTT (Mosmann 1983). El ensayo se basa en la capacidad de las mitocondrias para reducir el compuesto MTT, de color amarillo y soluble en agua, dando lugar a un compuesto morado que precipita en forma de cristales insolubles en agua (formazán). La medición de la densidad óptica permite estimar la tasa de proliferación de las células.

Las células MCF7 fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 15.000 células/pocillo y se cultivaron durante la noche en DMEM con 10% de FBS. Al día siguiente, el medio fue substituido por medios condicionados de células 293, 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ lg. La proliferación celular se analizó a los 5 días.

Por otro lado, las células MCF7^{tetoff} que expresan proNRG α 2c y proNRG Δ lg fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 15.000 células/pocillo y fueron cultivadas durante toda la noche en DMEM con 10% de FBS. Al día siguiente, las células fueron tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 48 horas, para reprimir la expresión de las NRGs. Posteriormente, las células se privaron de suero y se mantuvieron con doxiciclina (10 ng/ml) y se trataron con NRG-1 recombinante humana (10 nM). Después de 5 días, se realizó el ensayo de captación de MTT.

Para medir la capacidad reductora de las mitocondrias se adicionó MTT al medio con las células a una concentración final de 500 μ g/ml, y se incubó durante una hora a 37°C. A continuación se retiró el medio y se añadió 500 μ l/pocillo de DMSO para lisar las células y disolver los cristales de formazán (MTT reducido). Se incubó 10 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente y en agitación, y se midió la absorbancia a 570 nm. Los resultados mostrados para cada condición representan en la media \pm la desviación estándar de tres réplicas por condición.

El ensayo de metabolización del MTT también se utilizó para evaluar el efecto en la proliferación celular causado por ADCs en las líneas celulares BT474, BT549, OVCAR8 y SKOV3.

13.2. Contaje del número de células

Los clones de MCF7^{tetoff} que expresan proNRG α 2c y proNRG Δ lg fueron sembrados en placas de 6 pocillos a una densidad de 30.000 células/pocillo. En el día siguiente, para reprimir la expresión de las NRG en ambas líneas, las células fueron tratadas con doxiciclina (10 ng/ml) durante 48 horas. Posteriormente, el medio se reemplazó por DMEM con 1% de FBS, manteniendo el tratamiento con doxiciclina (10 ng/ml) y se trataron con trastuzumab (10 nM) durante 5 días. Como control positivo se utilizó el tratamiento con la NRG-1 humana recombinante (10 nM).

Al final del tiempo de incubación, las células fueron lavadas con 2 ml de PBS, se tripsinizaron, se diluyeron en 2 ml de medio de cultivo y fueron contadas en el contador de partículas Z1TM Coulter Particle Counter® (Beckman CoulterTM Life Sciences, Indianápolis, Estados Unidos). El aparato cuenta partículas entre 8 a 24 μ m por ml, que son consideradas células viables. El número de células por pocillo se calcula multiplicando el número de células que se obtienen por el volumen final (en ml) en que se han resuspendido.

14. Ensayo de internalización

Para estudiar la internalización de la NRG ha sido utilizado el ensayo de inmunofluorescencia. Para ello, las células se cultivaron en DMEM con 10% FBS sobre cubreobjetos hasta que obtuviesen una confluencia y morfología adecuadas. Posteriormente, las células fueron incubadas con cloroquina a 50 μ M en DMEM con 10% FBS durante una hora y, transcurrido este tiempo, se añadió el anticuerpo primario durante 30 minutos a una concentración de 50 nM. Ese tiempo ha sido utilizado como control de la localización de la proteína en la superficie celular. Para verificar la internalización de la misma, se cambió el medio a DMEM con 10% FBS durante 24 horas.

Tras los tiempos de incubación, se procedió al ensayo de inmunofluorescencia sin la etapa de incubación con el anticuerpo primario (ya que este ha sido añadido a las células *in vivo*).

15. Conjugación de anticuerpos a SMCC-DM1

16. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación se representan como la media \pm SD (desviación estándar) de los triplicados de un experimento representativo que se repitió al menos tres veces. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando los valores fueron $p < 0.05$. La cuantificación de las bandas obtenidas a partir de los experimentos de Western Blot se realizó utilizando el software ImageJ 1.44 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos) o el Odyssey Infrared Imaging System V.3.0 (LI-COR). La intensidad de cada una de las diferentes bandas se calculó con respecto al control, y los datos se representan como el % del valor máximo obtenido para cada experimento.

Resultados

1. Identificación de la importancia de los dominios de las NRGs en su actividad biológica

Se han descrito alteraciones en la expresión de NRGs en diferentes tipos de cáncer humano, principalmente en el de mama. Estudios demuestran que pacientes con tumores que expresan la NRG presentan mal pronóstico, que puede estar relacionado con sus propiedades prooncogénicas, que incluyen la proliferación celular, la migración o la diseminación metastásica (Atlas *et al.* 2003; Tsai *et al.* 2003; Yuste *et al.* 2005; Seoane *et al.* 2016). Además, la expresión de NRG está relacionada a la respuesta a tratamientos antitumorales (Menendez *et al.* 2006; de Alava *et al.* 2007) y está implicada en la resistencia a terapias anti-HER2 (Schwarz *et al.* 2017; Yang *et al.* 2017). Estas evidencias indican que la NRG podría ser una nueva diana terapéutica en cáncer y, por lo tanto, es importante conocer y estudiar las características estructurales y funcionales de los diferentes dominios de la NRG, a fin de estudiar y desarrollar estrategias anti-NRG adecuadas.

1.1. Formas moleculares de la NRG α 2c y de sus mutantes

Para estudiar la importancia de cada uno de los dominios de las NRGs, se utilizó como modelo la isoforma α 2c de la NRG1 de rata, que se denominó NRG α 2c. Esta NRG es una proteína transmembrana de tipo I que presenta distintos dominios, aquí descritos en orden, desde su región N-terminal hasta la región C-terminal: dominio inmunoglobulina, región de glicosilación, dominio EGF (o NRG), región yuxtmembrana (donde se lleva a cabo el procesamiento de la proteína), dominio transmembrana y cola citosólica (Figura 7A).

El DNA codificante para la NRG α 2c se transfectó en células HEK-293 (células HEK-293). A estas células las hemos denominado 293-NRG α 2c.

Para analizar la expresión de la NRG se generaron dos anticuerpos, uno contra la cola citosólica (anti-NRG endo) y otro contra el dominio extracelular de la NRG (anti-NRG ecto) (Figura 7A).

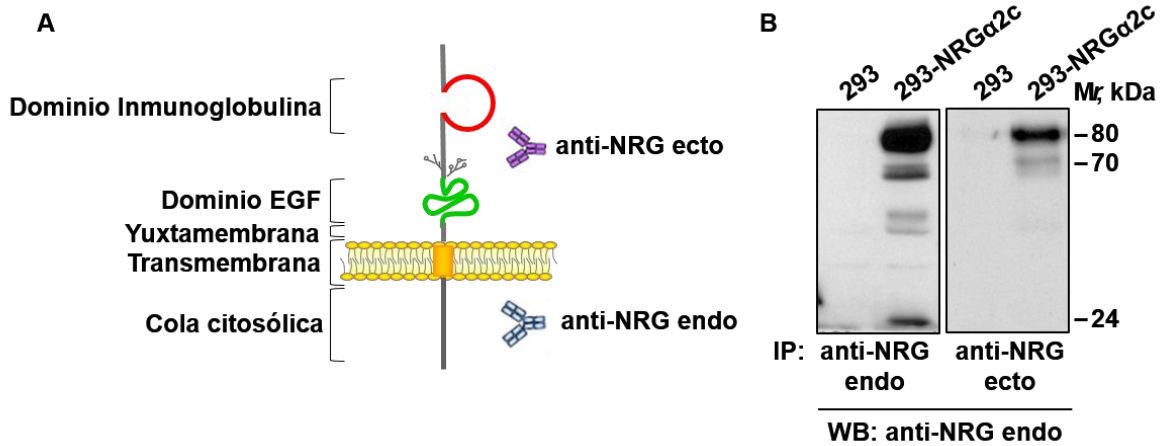


Figura 7. (A) Representación esquemática de los dominios de la NRGα2c, indicando los sitios reconocidos por los anticuerpos anti-NRG ecto y anti-NRG endo. (B) Expresión de la NRGα2c en células 293. Las células 293 y 293-NRGα2c fueron lisadas y los extractos fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-NRG endo o con el anti-NRG ecto. La expresión de la NRG se analizó mediante Western Blot utilizando el anticuerpo anti-NRG endo.

En la figura 7B puede observarse que los dos anticuerpos generados reconocieron las diferentes formas moleculares de la NRGα2c en las células 293-NRGα2c. La banda mayoritaria que reconoce el anticuerpo anti-NRG tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kDa, además reconoce otras dos bandas minoritarias de peso molecular menor, 70 y 72 kDa. El anticuerpo anti-NRG endo reconoció a una banda de bajo peso molecular (aproximadamente 24 kDa), que corresponde a los fragmentos de la cola de la NRGα2c que quedan anclados a la membrana plasmática tras su procesamiento en la región yuxtamembrana. Esos fragmentos no fueron reconocidos por el anticuerpo anti-NRG ecto, debido a que la zona que reconoce este anticuerpo no está presente en estos fragmentos.

Las bandas reconocidas por los anticuerpos corresponden a la NRGα2c, debido a que estas bandas no se observaron en los carriles correspondientes a las células 293, que no fueron transfectadas con el cDNA de la NRGα2c. La especificidad de la señal detectada se confirmó con experimentos de competición con el péptido o la proteína de fusión utilizados para la producción de estos anticuerpos (datos no mostrados).

Para estudiar la relevancia de cada uno de los dominios de la NRGα2c en su localización subcelular, procesamiento y actividad biológica, se generaron diferentes

mutantes a los cuales se les eliminaron distintas regiones del ectodominio o de la porción intracelular de la proteína (Figura 8). Los mutantes que se generaron a partir del DNA de la forma silvestre son los siguientes: uno en el que se eliminó el dominio inmunoglobulina ($\text{NRG}^{\Delta\text{Ig}}$), uno sin el ectodominio ($\text{NRG}^{\Delta\text{extra}}$), una NRG a la cual se le eliminó la cola citosólica ($\text{NRG}^{\Delta\text{intra}}$) y un mutante que no contiene las regiones transmembrana e intracelular y que es similar a la $\text{NRG}^{\beta 3}$ ($\text{NRG}^{\beta 3}$).

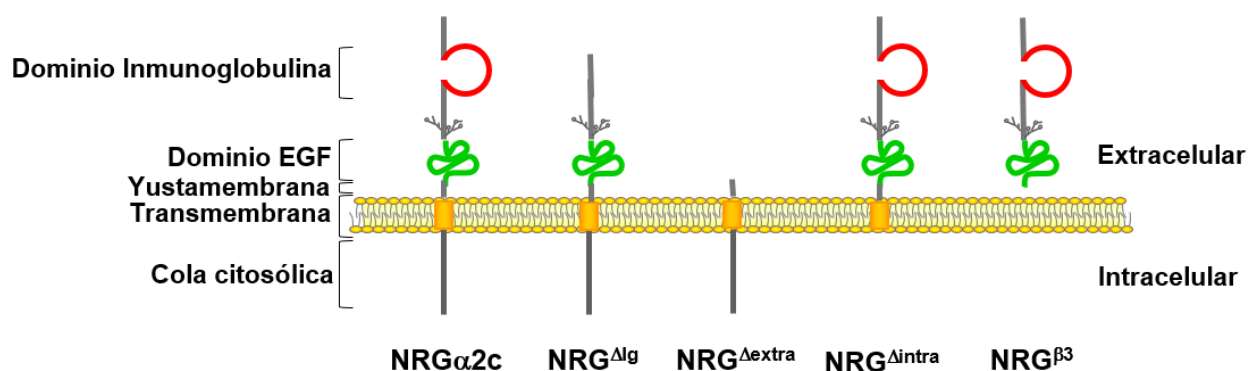


Figura 8. Representación esquemática de los mutantes de la $\text{NRG}^{\alpha 2c}$.

Los diferentes mutantes fueron transfectados en células 293 y su expresión se analizó mediante Western Blot. El anticuerpo anti-NRG ecto reconoció todas las formas transfectadas excepto la $\text{NRG}^{\Delta\text{extra}}$ (Figura 9A). En cambio, el anticuerpo anti-NRG endo solamente reconoció, además de la NRG silvestre, a los mutantes $\text{NRG}^{\Delta\text{extra}}$ y $\text{NRG}^{\Delta\text{Ig}}$. Los otros dos mutantes, $\text{NRG}^{\Delta\text{intra}}$ y $\text{NRG}^{\beta 3}$, no se detectaron debido a que no tienen la cola citosólica, que es la zona reconocida por el anticuerpo (Figura 9B).

Para cada mutante se detectaron diferentes bandas específicas, así como para la NRG de tipo silvestre. La $\text{NRG}^{\Delta\text{Ig}}$ presentó el mismo patrón de bandas que la $\text{NRG}^{\alpha 2c}$, una banda mayoritaria y dos bandas minoritarias de menor peso molecular. El mutante $\text{NRG}^{\Delta\text{extra}}$ se detectó como una banda mayoritaria de aproximadamente 30 kDa, idéntico al peso correspondiente a los fragmentos de la cola citoplasmática tras el procesamiento de la NRG. Las formas $\text{NRG}^{\Delta\text{intra}}$ y $\text{NRG}^{\beta 3}$, se presentaron como varias bandas de peso molecular próximo a los 50 kDa, lo que puede deberse a alteraciones en el peso molecular de la molécula por diferentes modificaciones

postraduccionales o al procesamiento de la molécula por distintas secuencias del ectodominio (Montero *et al.* 2007).

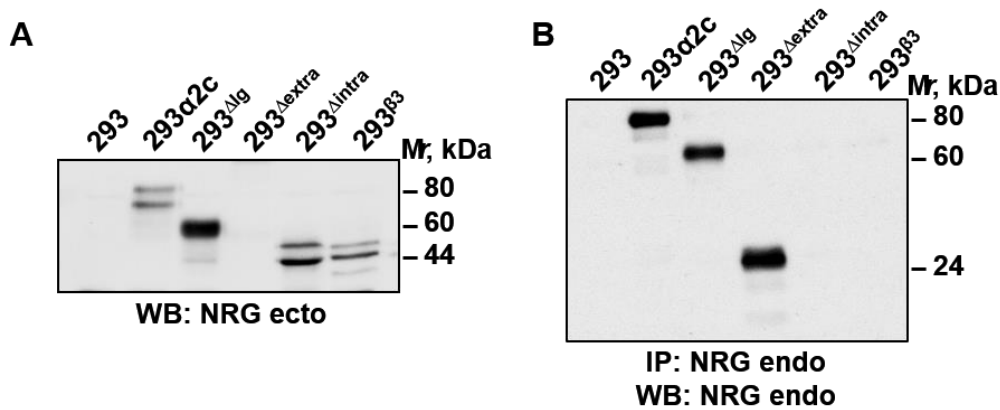


Figura 9. Expresión de la NRG α 2c y de los mutantes en células 293. Las células transfectadas con el DNA de la NRG de tipo silvestre o de cada mutante se lisaron y la expresión de la NRG se observó mediante Western Blot, utilizando el anticuerpo anti-NRG endo (A) o el anti-NRG ecto (B).

La mayoría de las isoformas de NRG se presentan como proteínas transmembrana, que pueden ser procesadas y liberadas al medio como una molécula soluble activa. Para determinar si los diferentes mutantes de NRG alcanzan la membrana plasmática y si se secretan, se recogieron los medios de cultivo de las células 293 en las que se expresaron las diferentes formas de NRGs. Esos medios se concentraron y la presencia de la NRG soluble se analizó por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-NRG ecto (Figura 10).

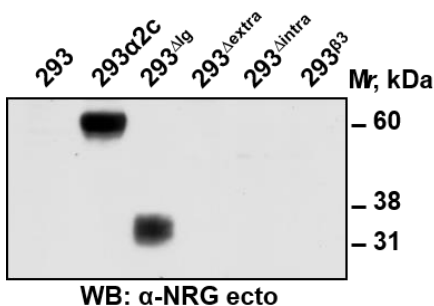


Figura 10. Liberación de la NRG soluble al medio de cultivo. El medio condicionado de células 293 transfectadas con el DNA de la NRG α 2c y de los mutantes se recogió, se centrifugó y se concentró. Las formas solubles de NRG presentes en esos medios condicionados se analizaron por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-NRG ecto.

Se detectaron formas solubles de NRG en el medio condicionado de las células 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ Ig. La diferencia entre los pesos moleculares de las bandas que representan la NRG α 2c (60 kDa) y la NRG Δ Ig (38 kDa) solubles es debido a que el mutante NRG Δ Ig carece del dominio inmunoglobulina y coincide con la diferencia en el peso molecular que se observó en la detección de ambas formas de proNRG en los extractos celulares (Figura 9). En los medios de las células en que

se expresaron los demás mutantes no se detectó la presencia de NRG, lo que era previsible para las células 293-NRG^{Δextra}, dado que ese mutante no presenta el dominio extracelular reconocido por el anticuerpo utilizado.

1.2. Localización celular y procesamiento de la NRG

Además, para observar la localización subcelular de la NRG α 2c y de los distintos mutantes en las células 293 se realizó un ensayo de inmunofluorescencia, utilizando el anticuerpo anti-NRG adecuado para cada forma de NRG (Figura 11). Esto permitió confirmar que la isoforma de tipo silvestre se dirige correctamente hacia la superficie celular, así como el mutante NRG^{Δlg}. En estas células también se observó un acúmulo perinuclear de la proteína, probablemente correspondiente al aparato de Golgi (Montero *et al.* 2007). En las células 293-NRG^{Δextra} y 293-NRG^{Δintra} se visualizó un acúmulo perinuclear de la proteína y no presentó un claro marcaje de membrana, sugiriendo que esas formas se quedaron retenidas en el interior de la célula. Por otro lado, para el mutante NRG^{β3} se observó una colocalización con el marcador DAPI, indicando que esa forma se encuentra localizada principalmente en el núcleo de las células.

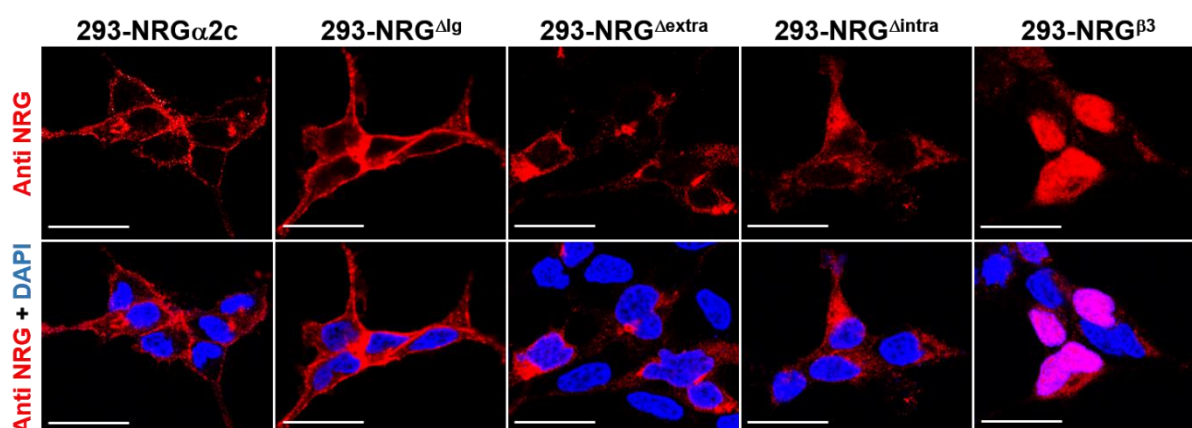


Figura 11. Localización subcelular de la NRG. Células 293 que expresan la NRG α 2c y los diferentes mutantes se plaquearon sobre cubreobjetos de vidrio y la localización de la NRG se estudió por inmunofluorescencia. El anticuerpo anti-NRG endo se utilizó para el marcaje de NRG α 2c, NRG^{Δlg} y NRG^{Δextra}, y el anti-NRG ecto se utilizó para visualizar NRG^{Δintra} y NRG^{β3}. La localización de las NRGs se observó en rojo, tras el uso del anticuerpo secundario Cy3, y los núcleos celulares se observaron en azul, marcados con DAPI. Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Leica TCS SP5. La barra corresponde a una distancia de 25 μ m.

Estos experimentos revelaron que la presencia del dominio extracelular y de la región intracelular de la NRG α 2c son determinantes para su transporte correcto hacia la membrana plasmática.

Se conoce poco sobre la importancia del dominio inmunoglobulina de las NRGs y considerando los resultados anteriores, en el presente estudio hemos evaluado si la ausencia de este dominio afecta a las características funcionales de la NRG α 2c.

Para confirmar que la NRG α 2c y la NRG Δ lg alcanzaban correctamente la superficie celular se realizó un ensayo de protección de proteasas. En este ensayo las células son tratadas con proteinasa K, que tiene la capacidad de degradar la zona de la proteína que queda expuesta en la parte extracelular, pero no consigue degradar la zona de la proteína que está en la membrana o en el interior celular.

Como se muestra en la figura 12, se observó que la banda mayoritaria de 80 kDa de la NRG de tipo silvestre desapareció al incubar las células con proteinasa K, mientras que las formas de 70 y 72 kDa se mantuvieron. Además, ese efecto se acompañó del aumento en la banda de bajo peso molecular, que corresponde a los fragmentos de la cola citoplasmática. De igual manera, en las células 293-NRG Δ lg la banda que corresponde con la forma de mayor peso molecular desapareció tras el tratamiento con proteinasa K, y además, incrementó en la intensidad de la banda que corresponde con los fragmentos de la cola. Este experimento está indicando que la banda mayoritaria de 80 kDa es una forma de NRG que está expuesta en la membrana plasmática. Por otro lado, las bandas de 70 y 72 kDa de la NRG α 2c y las correspondientes bandas de la NRG Δ lg no cambiaron tras el tratamiento con proteinasa K, debido a que estas formas no están expuestas en la superficie celular. Corresponden con formas inmaduras que están en tránsito hacia la membrana plasmática (Montero *et al.* 2007; Montero *et al.* 2008) y tienen diferentes pesos moleculares porque sufren diversas modificaciones postraduccionales.

Como la mayoría de las proteínas transmembrana, las NRGs entran en la ruta secretora para su transporte hacia la superficie celular. En este transporte atraviesan varios compartimientos y sufren modificaciones postraduccionales hasta tener la conformación adecuada para ser una proteína funcional y alcanzar la membrana

plasmática (Kleizen and Braakman 2004; Montero *et al.* 2007). Por este motivo, cuando se analizó la expresión de la NRG α 2c y del mutante NRG Δ lg, se observó que las bandas de peso molecular de 70 y 72 kDa no sufrieron acción de la proteinasa K (Figura 12). Esas formas de NRG son formas que no están expuestas a la membrana plasmática, siendo llamadas inmaduras, pues están en el proceso de maduración y están en el camino para su localización hacia la membrana plasmática.

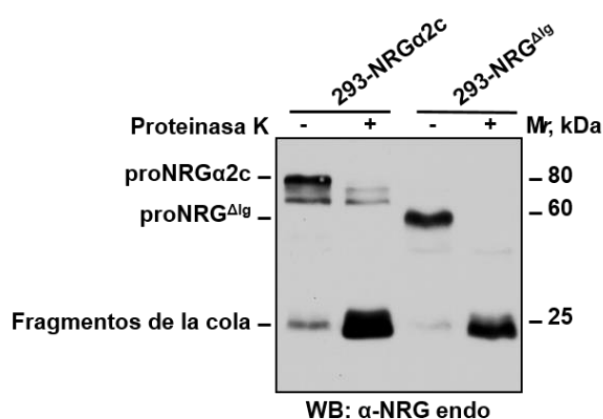


Figura 12. Ensayo de protección de proteasas. Las células 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ lg se trataron con proteinasa K (200 μ g/ml) durante 30 minutos y se lisaron. La expresión de NRG se analizó mediante Western Blot usando el anticuerpo anti-NRG endo.

La localización en membrana de la NRG α 2c y del mutante NRG Δ lg ya fue visualizada por inmunofluorescencia en los experimentos anteriores (Figura 11), que también mostraron un acúmulo en la región perinuclear, que en el caso de la NRG silvestre corresponde al aparato de Golgi (Montero *et al.* 2007; Montero *et al.* 2008). Para determinar que la ausencia del dominio inmunoglobulina no altera la ruta secretora de la NRG y confirmar que las formas inmaduras de la proteína se localizan en el aparato de Golgi, las células 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ lg se incubaron simultáneamente con el anticuerpo anti-NRG endo y con un anticuerpo específico de este compartimento celular. Para visualizar el aparato de Golgi, se utilizó como marcador la proteína GM130 (*Golgi Matrix Protein of 130 kDa*), presente en las primeras vesículas del aparato (*cis*-Golgi).

Como se observa en las figuras 13 y 14, la localización de la NRG intracelular (señal roja) coincidió con la localización de GM130 (señal verde) y la colocalización se confirmó cuando las imágenes se superpusieron y la señal de los marcadores se visualizó con un color amarillo en ambas líneas celulares.

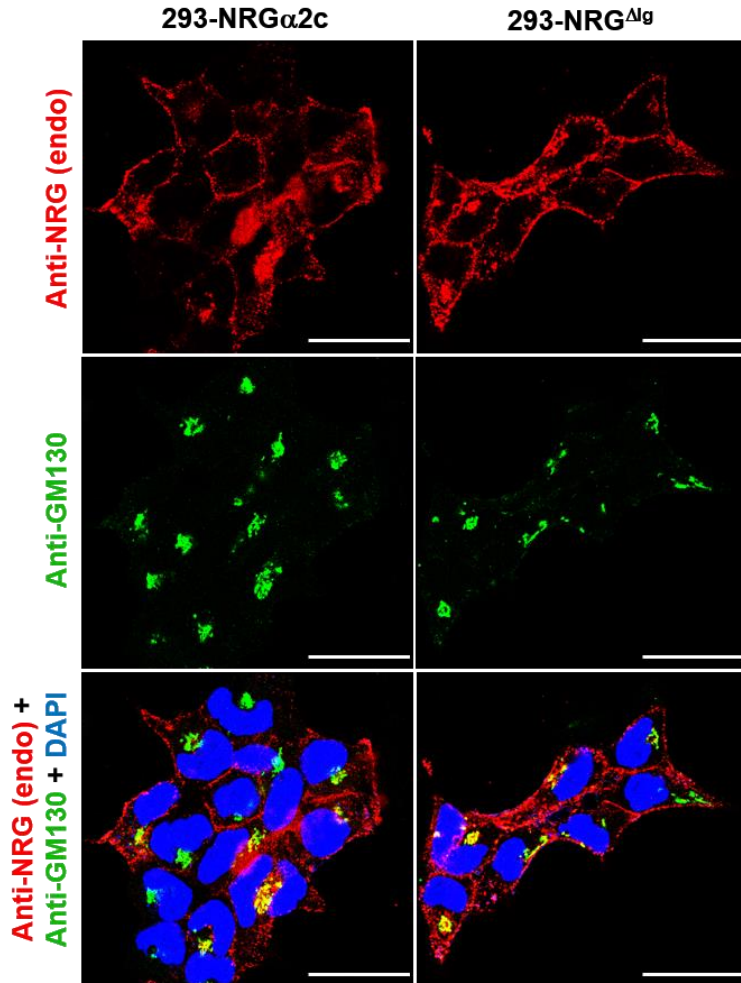


Figura 13. Localización subcelular de NRG α 2c y NRG Δ lg. Células 293 que expresan la NRG silvestre y el mutante NRG Δ lg se plaquearon sobre cubreobjetos de vidrio y la localización de la proteína se observó por inmunofluorescencia con el anti-NRG endo que se detectó con anticuerpo conjugado a Cy3 (rojo). Como marcador para el aparato de Golgi se utilizó la proteína GM130 que se visualizó con el anticuerpo conjugado a Cy2 (verde). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Leica TCS SP5. La barra corresponde a una distancia de 25 μ m.

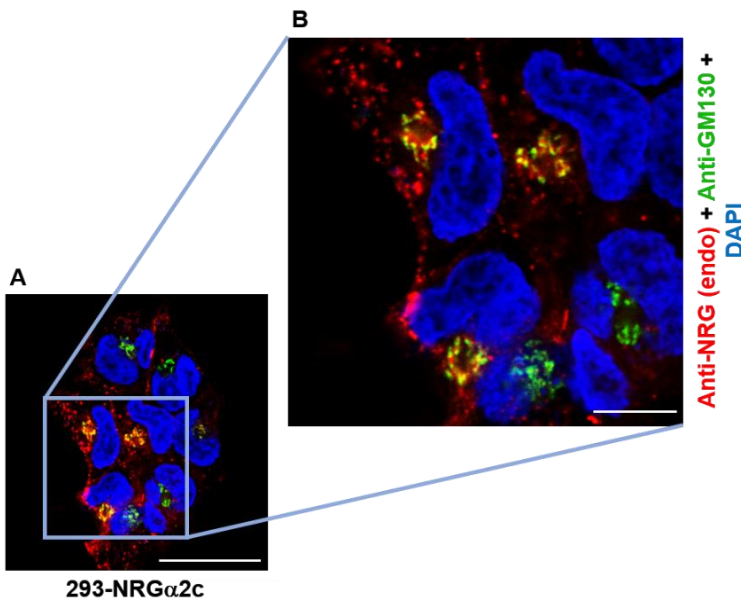


Figura 14. Localización de la NRG α 2c en el aparato de Golgi. Células 293 que expresan la NRG se plaquearon sobre cubreobjetos de vidrio y la localización de la proteína se observó por inmunofluorescencia con el anti-NRG endo que se detectó con anticuerpo conjugado a Cy3 (rojo). Como marcador para el aparato de Golgi se utilizó la proteína GM130 que se visualizó con el anticuerpo conjugado a Cy2 (verde). El color amarillo representa la colocalización entre la NRG y la GM130. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Leica TCS SP5. La barra corresponde a una distancia de 25 μ m (A) y 7,5 μ m (B).

La localización subcelular de la NRG se confirmó por marcaje de superficie con el anticuerpo anti-NRG ecto, que se cuantificó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo secundario conjugado a Cy3. Los histogramas de la figura 15 representan el número de eventos detectados para cada intensidad de fluorescencia, cuando se incubaron las células íntegras sólo con el anticuerpo secundario (pico sombreado azul) o con el anticuerpo primario seguido del secundario (pico rojo). El desplazamiento del pico en las líneas 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ Ig indicó que la NRG expresada en esas células se presenta en la superficie celular, confirmando los datos que se observaron en los experimentos de protección de proteasas y inmunofluorescencia. Por otro lado, en las células 293 no se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia, confirmando que esas células no expresan la NRG reconocida por el anticuerpo utilizado.

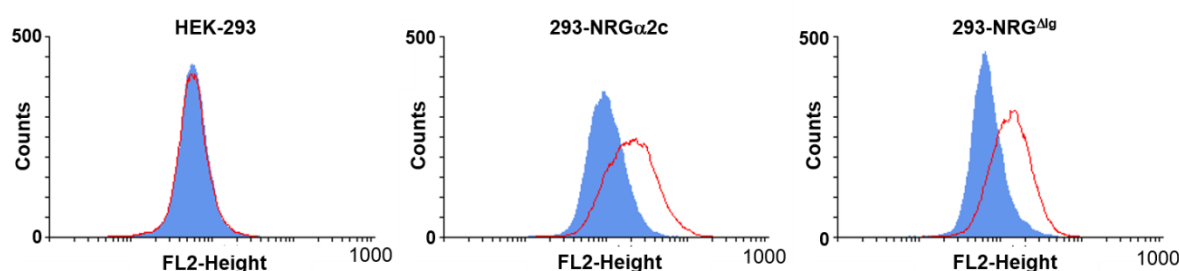


Figura 15. Análisis de la exposición en superficie de la NRG α 2c y de la NRG Δ Ig por citometría de flujo. Las células se incubaron con el anti-NRG ecto y, una vez lavadas, con un anticuerpo secundario conjugado a FITC. La intensidad de fluorescencia se midió en un citómetro FACSCalibur. Los histogramas representan el número de eventos detectados por cada intensidad. El pico sombreado azul corresponde a la señal emitida cuando se incubaron las células sólo con el anticuerpo secundario, indicando la fluorescencia basal. El pico rojo representa el incremento de fluorescencia debido a la expresión de la NRG.

Una vez que se comprobó que el dominio inmunoglobulina no es esencial para la correcta localización de la NRG en la superficie celular y que la ruta secretora parece ser la misma para ambas formas de la proteína, se analizó si la ausencia de este dominio podría influir en el procesamiento de la NRG α 2c.

La regulación del procesamiento de factores de crecimiento anclados a la membrana, como las NRGs, puede ocurrir por la activación de varias vías de señalización, incluida la ruta de la proteína quinasa C (PKC) (Montero *et al.* 2002). Para estudiar este procesamiento, se utilizó un activador de PKC, denominado PMA.

Las células 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ lg se trataron con PMA durante 5, 15 y 30 minutos y la expresión de la NRG se analizó en los extractos celulares y en el medio de cultivo mediante Western Blot (Figura 16). El PMA provocó una disminución en la NRG asociada a la membrana plasmática tras 5 minutos de tratamiento, en cambio, las bandas de 70 y 72 kDa se mantuvieron intactas en ambas líneas celulares. Además, se observó un aumento en los fragmentos de la cola citosólica tras 5 minutos de tratamiento con PMA, los cuales fueron disminuyendo a lo largo del tratamiento, indicando una posible degradación intracelular de la NRG. En paralelo, tras el tratamiento con PMA, se detectó las formas solubles de NRG α 2c y NRG Δ lg en los medios condicionados de las células que expresaban tanto la forma silvestre como el mutante.

Con estos datos se demuestra que el dominio inmunoglobulina no es esencial para que la NRG α 2c sea correctamente procesada, liberando su factor soluble activo al medio de cultivo.

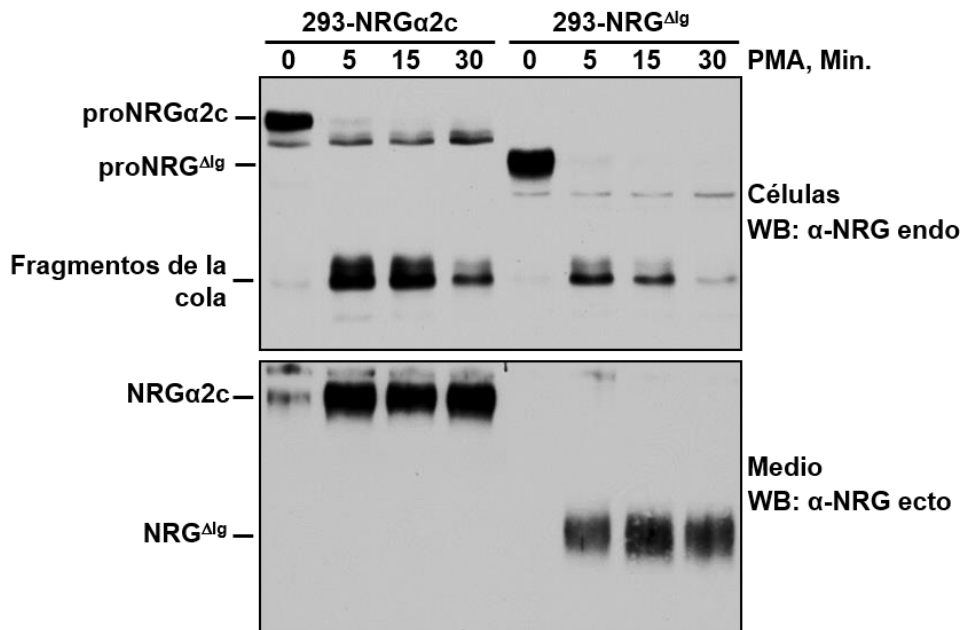


Figura 16. Efecto del PMA en el procesamiento de la NRG. Las células 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ lg se trataron con PMA en los tiempos indicados. La expresión de NRG en el extracto celular (panel superior) o en el medio condicionado (panel inferior) se realizó mediante Western Blot utilizando anticuerpos anti-NRG endo y anti-NRG ecto, respectivamente.

1.3. El dominio inmunoglobulina potencia la activación de los receptores HER

Tras observar que tanto la forma silvestre como el mutante sin el dominio inmunoglobulina se localizaban correctamente en la membrana celular y que, además, ambos se liberaban al medio de cultivo, nos planteamos estudiar la capacidad de activación de los receptores HER por la forma soluble de la NRG con y sin el dominio inmunoglobulina.

Para explorar la activación paracrina de los receptores HER, se seleccionaron clones de células 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ Ig en los que se observaron niveles iguales de expresión de NRG en el extracto celular (Figura 17, panel superior) mediante Western Blot utilizando el anticuerpo anti-NRG endo. El medio condicionado de esas células se recogió (tras 24 horas de cultivo), se concentró 10 veces y la expresión de la NRG soluble se analizó por Western Blot utilizando el anticuerpo anti-NRG ecto (Figura 17, panel inferior). Así se comprobó que los clones que expresaban el mismo nivel de NRG en el extracto celular también mostraban cantidades similares de la proteína liberada al medio en su forma soluble.

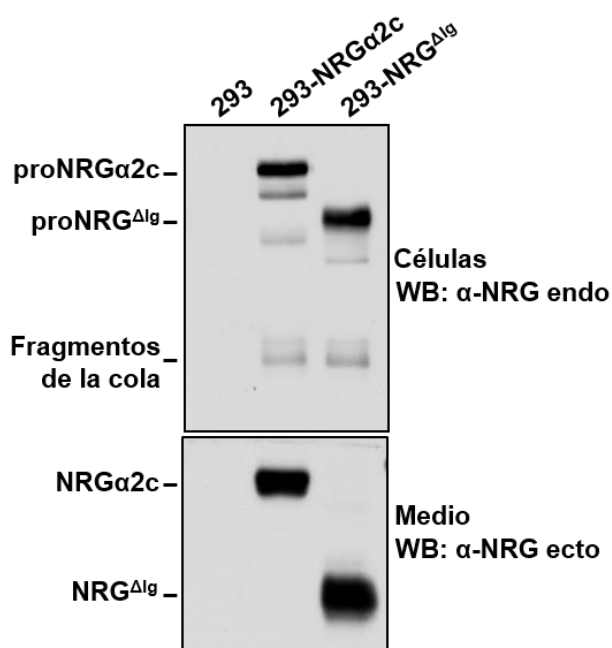


Figura 17. Expresión de la NRG α 2c y NRG Δ Ig. El medio condicionado de células 293 transfectadas con la forma silvestre y el mutante sin el dominio inmunoglobulina se recogió y las células se lisaron. La expresión de la NRG en el extracto celular y en el medio condicionado se analizó mediante Western Blot utilizando los anticuerpos anti-NRG endo y anti-NRG ecto, respectivamente.

El estudio de la actividad biológica de la NRG soluble se llevó a cabo utilizando células MCF7. Esta línea celular proviene de un adenocarcinoma de mama y presenta niveles de receptores HER análogos a los del epitelio de mama

normal. Las células MCF7 presentan receptores HER3 que pueden oligomerizar con otros receptores HER, especialmente con los receptores HER2, facilitando la transfosforilación de HER3 y HER2, tras la estimulación con factores de crecimiento.

Los medios condicionados concentrados de las células 293 que expresan la NRG α 2c y el mutante NRG Δ lg se utilizaron para estimular células MCF7 y se analizó la capacidad de la NRG soluble de activar los receptores HER. Para esto, las células MCF7 se incubaron con los medios condicionados concentrados que contenían las formas solubles de la NRG durante diferentes tiempos (5, 15, 30, 60 y 120 minutos). Como control negativo se utilizó el medio condicionado de células 293, los cuales no expresan NRG.

Como puede verse en las figuras 18A y 18B, el medio condicionado de las células 293-NRG α 2c provocó la fosforilación en tirosina de HER2. Sin embargo, la fosforilación de HER2 fue menos eficiente cuando se utilizó el medio condicionado de las células 293-NRG Δ lg.

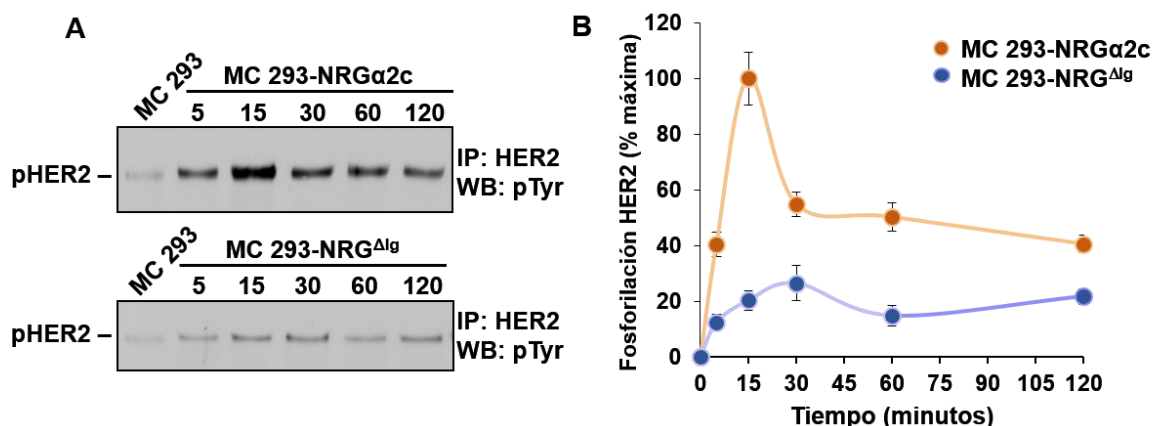


Figura 18. (A) Efecto del medio condicionado de las células la 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ lg sobre la fosforilación de HER2 en células MCF7. Las células MCF7 se estimularon con los medios condicionados a diferentes tiempos (5, 15, 30, 60 y 120 minutos) y se lisaron. Los extractos celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HER2 y los niveles de fosforilación de HER2 fueron analizados mediante Western Blot usando el anticuerpo anti-fosfo tirosina. El medio condicionado de las células 293 se utilizó como control negativo. (B) Representación gráfica de la medición cuantitativa de la fosforilación de HER2. Los datos se relativizaron con la fosforilación máxima obtenida y se expresaron como la media \pm SD de dos experimentos independientes que se realizaron como se ha descrito en A.

De acuerdo con estos datos, para los experimentos siguientes en los que se estudió la fosforilación de los receptores HER, se eligió el tiempo de incubación de 15

minutos, debido a que es el tiempo donde ocurre el pico de máxima activación de HER2 por la estimulación con la NRG soluble.

Para demostrar que la menor eficacia de fosforilación en tirosina de los receptores HER de la forma soluble de la NRG^{Δlg} en comparación con la forma soluble de NRGα2c no se debió a cantidades más bajas del mutante en el medio condicionado, se realizaron experimentos de titulación con los medios que se recogieron de las células 293-NRGα2c y 293-NRG^{Δlg} (Figura 19). Con los resultados que se observaron y para garantizar siempre una mayor cantidad de la forma soluble del mutante sin el dominio inmunoglobulina, en los experimentos siguientes se utilizó 0,5 veces más cantidad de la forma soluble del mutante NRG^{Δlg} que de la forma soluble de la NRGα2c. Así, en todas las estimulaciones de células MCF7 con medios de cultivo condicionados, se utilizó una cantidad de NRG soluble liberada por 5 y 7,5 mg de proteínas de células 293-NRGα2c y 293-NRG^{Δlg}, respectivamente (células que expresaron cantidades equivalentes de NRG).

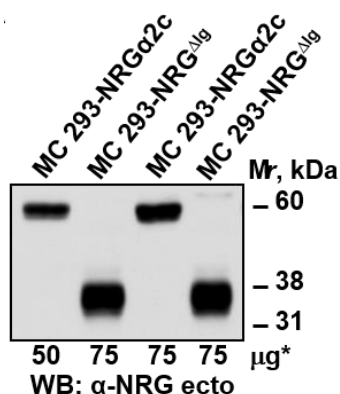


Figura 19. Liberación de la NRG soluble. El medio condicionado de las células la 293-NRGα2c y 293-NRG^{Δlg} se recogió y se concentró. Las muestras se analizaron por Western Blot con el anti-NRG ecto, donde se observó la cantidad de NRG soluble liberada por la cantidad de proteína celular indicada. *El volumen de medio condicionado cargado en el gel es proporcional al volumen de extracto celular que contiene la cantidad de proteína indicada (μg).

A continuación, se analizó si las formas solubles de NRG de la forma silvestre y de los mutantes eran capaces de interactuar con los receptores HER promoviendo su fosforilación. Cabe resaltar que en los resultados anteriores, presentados en la figura 10 de la sección 1.1 de este apartado, sólo se detectó la NRG soluble en los medios condicionados de las células 293-NRGα2c y 293-NRG^{Δlg}. Aun así, decidimos analizar si el medio condicionado de los demás mutantes era capaz de activar los receptores HER. Debido a esto, en este ensayo se utilizaron los medios condicionados de todas las formas de NRG estudiadas. Para determinar la actividad biológica de la NRG soluble, el medio condicionado de los diferentes clones

se utilizó para estimular células MCF7 en las condiciones ya establecidas anteriormente.

Como presenta la figura 20A, tras 15 minutos de estimulación, solamente se observó fosforilación en tirosina de HER2 y HER3 cuando las células se incubaron con los medios que contenían las formas solubles de NRG silvestre y de NRG^{Δlg}. Este resultado era esperado, dado que en experimentos anteriores no se detectó la presencia de las formas solubles de NRG^{Δextra}, NRG^{Δintra} y NRG^{β3}, confirmando así que esas formas de NRG no alcanzan la membrana celular, lo que imposibilita su procesamiento y liberación al medio. Cuando se comparó la capacidad de activación de los receptores, la NRG soluble de la forma silvestre fosforiló HER2 y HER3 de una manera mucho más eficiente y significativa que la forma en la que se eliminó el dominio inmunoglobulina (Figura 20A y 20B), lo que podría indicar que esta región de la NRG es importante para su actividad biológica.

Además, se observó una mayor fosforilación en tirosina de los receptores HER3 en comparación con los receptores HER2, cuando las células se estimularon con la forma soluble de la NRGα2c, siendo esa una diferencia estadísticamente significativa (Figura 20B).

Dado que estos experimentos se realizaron utilizando un anticuerpo anti-pY (detecta todos los residuos de tirosina fosforilados), se contempló la posibilidad de que la señal de la fosforilación en tirosina no se debiera exclusivamente a HER2 o HER3 en sus respectivos inmunoprecipitados. Esto puede ocurrir debido a la coprecipitación de heterodímeros HER2/HER3, por lo tanto, cuando se inmunoprecipita uno de los receptores podemos estar arrastrando el otro y, de esta manera, se detecta la fosforilación en tirosina de ambos receptores. Para explorar el efecto de las formas solubles de NRGα2c y NRG^{Δlg} a nivel de activación específica de los receptores HER, se lisaron células MCF7 que fueron incubadas con medios condicionados recogidos de ambas líneas celulares y se analizaron por Western Blot utilizando anticuerpos específicos para residuos de fosfotirosina presentes en HER2 o HER3.

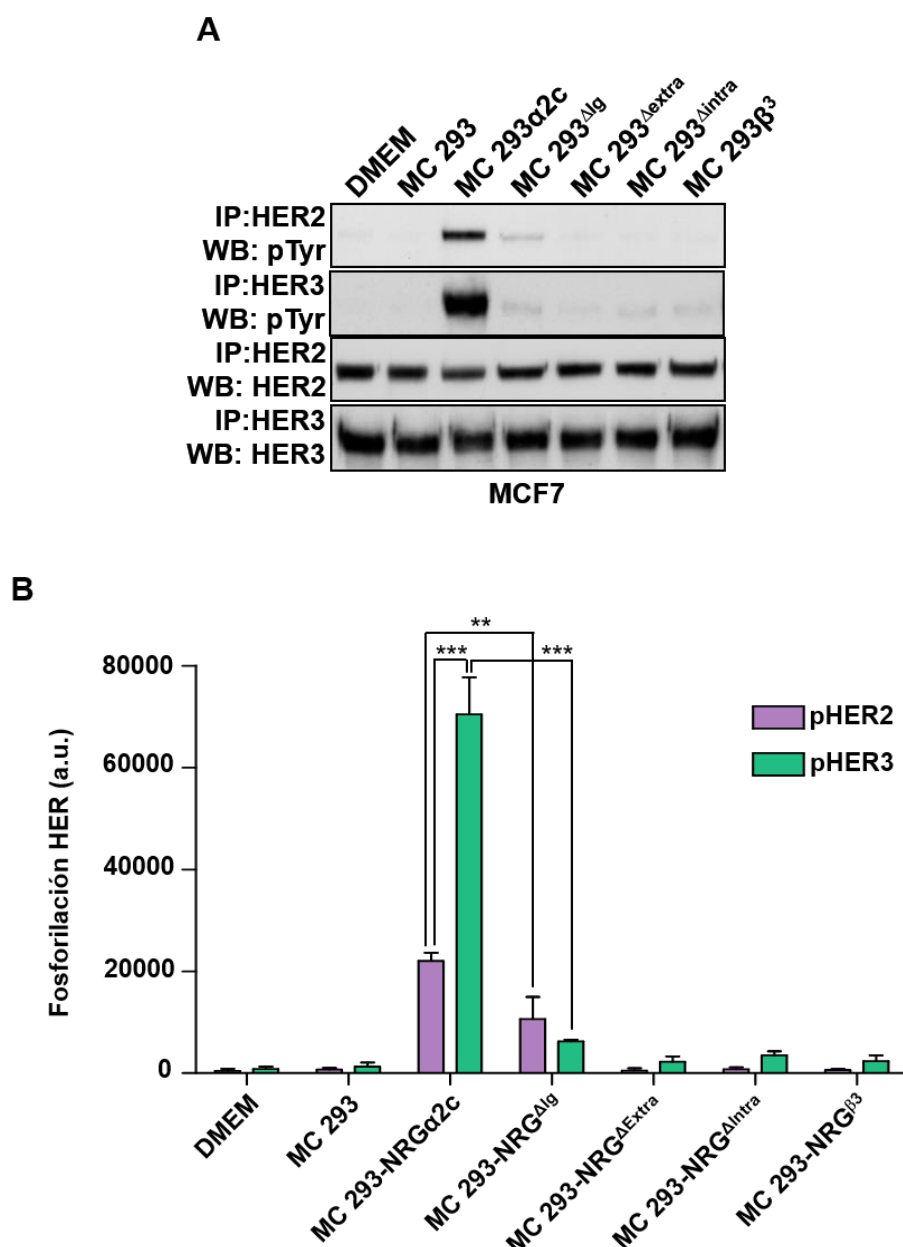


Figura 20. (A) Efecto del medio condicionado sobre la activación de los receptores HER. Se lisaron células MCF7 estimuladas con el medio condicionado de células 293 que expresan NRGα2c y los diferentes mutantes. Se utilizó 1 mg de extracto para inmunoprecipitar HER2 y HER3 y su fosforilación en tirosina y los niveles totales se detectaron mediante Western Blot. El medio de cultivo DMEM (sin FBS) y el medio condicionado de células 293 se utilizaron como controles negativos. (B) Cuantificación de la fosforilación de HER2 y HER3 en células MCF7. Los datos se presentaron como la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados como en (A). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Como se muestra en la figura 21, la inmunoprecipitación con anti-HER2, seguida de Western Blot con anticuerpos que reconocen pY1221-1222, pY1139 o pY877 en HER2 presentaron señales débiles de fosforilación en tirosina. Por otro lado, se observó una señal mucho más alta cuando se inmunoprecipitó HER3 y se

realizó el Western con un anticuerpo pY1289 anti-pHER3. Este dato evidenció las diferencias de activación que se observaron tras la estimulación con la forma soluble de la NRG silvestre en comparación con la forma soluble del mutante sin el dominio inmunoglobulina.

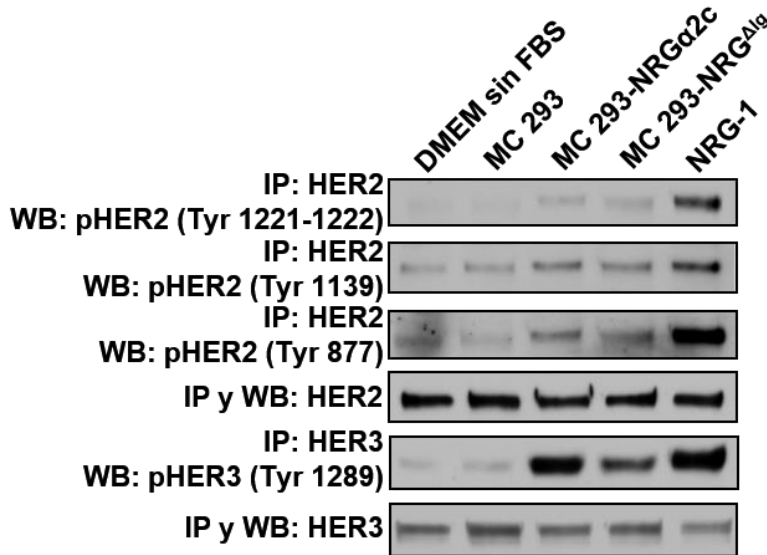


Figura 21. HER2 y HER3 en células MCF7 estimuladas con el medio condicionado de células 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ Ig durante 15 minutos. Se utilizó 1 mg de extracto para inmunoprecipitar HER2 y HER3 y la fosforilación en residuos específicos de tirosina de cada uno de esos receptores HER se evaluó por Western Blot usando anticuerpos fosfoespecíficos como se indica. El medio de cultivo DMEM (sin FBS) y el medio condicionado de células 293 se utilizaron como controles negativos. La estimulación con NRG-1 humana recombinante (10 nm) durante 15 minutos se utilizó como control positivo.

1.4. Respuestas de señalización celular a las formas solubles de NRG α 2c y NRG Δ Ig

Teniendo en cuenta las diferencias en la fosforilación en tirosina de HER2 y HER3 por la forma soluble de la NRG α 2c o por el mutante NRG Δ Ig, nos planteamos estudiar si la ausencia del dominio inmunoglobulina podría influir en la señalización celular activada por estos receptores.

Para explorar si la activación diferencial en los receptores HER por la forma soluble de la NRG silvestre y del mutante NRG Δ Ig se traducía en diferencias en la señalización, las células MCF7 se incubaron durante 15 minutos con el medio concentrado que se recogió de las células 293 transfectadas con NRG α 2c y NRG Δ Ig.

Tras la estimulación de las células MCF7 con la NRG soluble, se analizaron los niveles de expresión y fosforilación de los receptores HER2, HER3 y HER4 y de las proteínas de señalización intracelular que son activadas por estos receptores

(Figura 22). En este experimento se confirmó que la fosforilación de HER2 y HER3 con medio condicionado de células 293 que expresaban NRG α 2c activó de una forma mucho más potente a los receptores que el medio condicionado de células que expresaban NRG Δ lg. Por otro lado, se observó un resultado similar para HER4, detectándose una fosforilación muy baja, menor que HER2 y HER3.

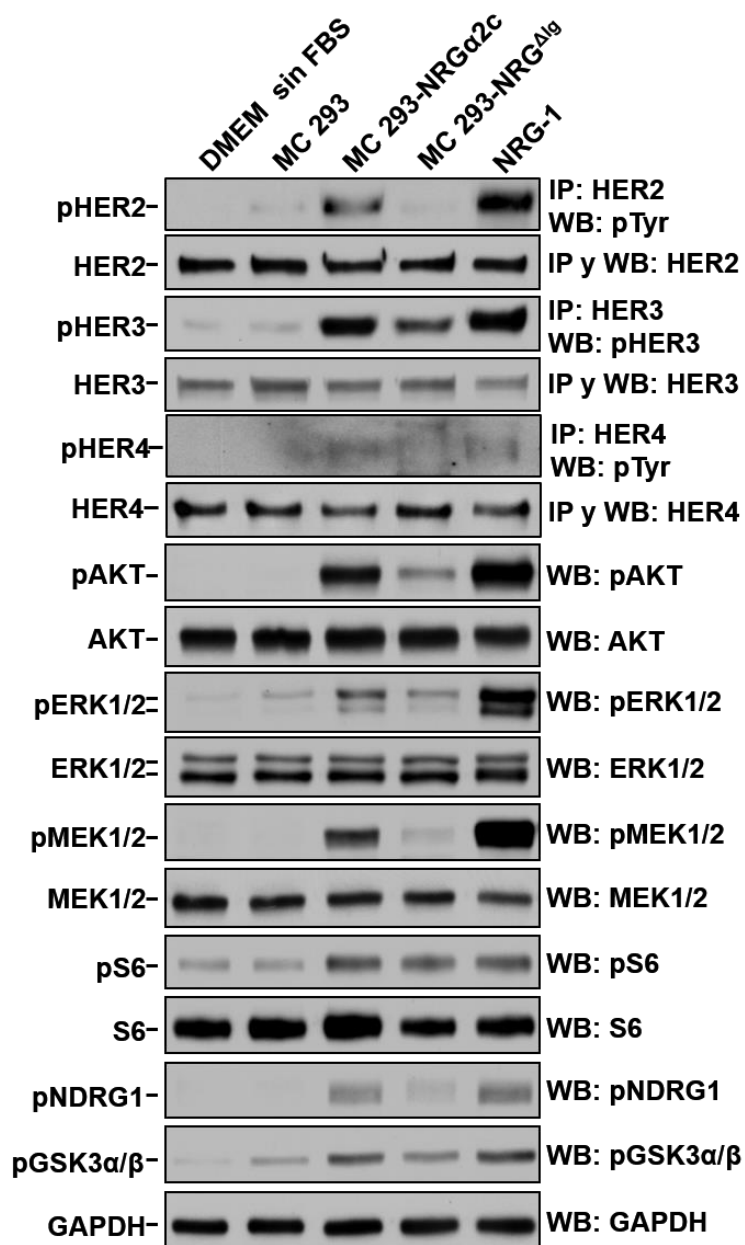


Figura 22. Efecto del medio condicionado de las células 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ lg en la señalización de los receptores HER. Células MCF7 se incubaron durante 15 minutos con los medios condicionados y la fosforilación de HER2, HER3 y HER4 y la activación de proteínas que actúan en la señalización de HER se evaluaron mediante Western Blot con los anticuerpos indicados. El medio de cultivo DMEM (sin FBS) y el medio condicionado de células 293 se utilizaron como controles negativos. La estimulación con NRG-1 humana recombinante (10 nm) durante 15 minutos se utilizó como control positivo.

El análisis de las proteínas que actúan en la señalización activada por los receptores HER demostró que la presencia del dominio inmunoglobulina favoreció la señal estimulada por la NRG. Todas las proteínas evaluadas se activaron por ambas

formas de NRG, pero se observó una mayor fosforilación después de la incubación con el medio que contenía la NRG α 2c, en comparación con el medio de las células 293-NRG Δ lg. Entre las proteínas evaluadas la mayor diferencia se observó en la activación de AKT, MEK1/2 y NDRG1, corroborando los datos de una mayor fosforilación en HER3.

Con esos resultados se demuestra que la activación biológica de los receptores HER, mediante comunicación intercelular paracrina de NRG-Receptores, es más eficiente con la presencia de la región inmunoglobulina de esta proteína.

La señalización por los receptores HER puede darse por la formación de homodímeros o heterodímeros de esos receptores. Con el fin de detectar la activación dada por la formación de heterocomplejos entre receptores HER por la estimulación con la NRG soluble se realizaron coinmunoprecipitaciones de HER2 y HER3. Para ello, las células MCF7 se incubaron con medio condicionado de células 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ lg, durante 15 minutos.

Como se puede observar en la figura 23, en condiciones basales o tras la estimulación con el medio de las células 293 no se observó fosforilación en tirosina de HER2 o HER3 debida a la formación de heterodimeros entre esos receptores. Cuando se incubaron las células con el medio que contenía la forma soluble de la NRG silvestre se observó la formación de complejos HER2/3, detectándose una señal mucho más evidente cuando se inmunoprecipitó HER2 y se procedió al análisis mediante Western Blot utilizando el anticuerpo pHER3, en comparación con el experimento realizado al revés. Esto también se observó cuando las células se estimularon con el medio que contenía la forma soluble del mutante carente del dominio inmunoglobulina, pero la señal de fosforilación fue más débil, manteniendo el patrón de los experimentos anteriores. La formación de heterodímeros se comprobó en ambas condiciones experimentales cuando se estimuló a las células MCF7 con la NRG-1 humana recombinante. Así, se puede deducir que la señalización celular paracrina de la NRG soluble se debió a la formación de homodímeros o heterodímeros entre los receptores HER2 y HER3, activando su fosforilación.

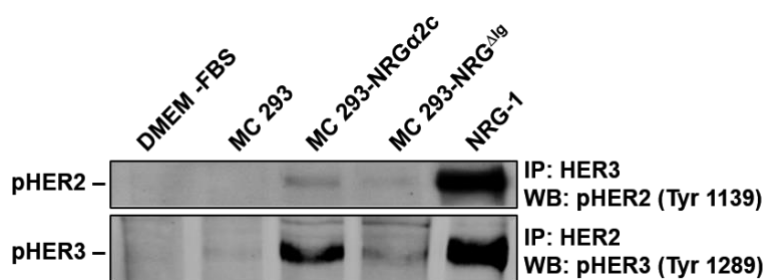


Figura 23. Efecto de la NRG soluble en la activación de HER2 o HER3 por la formación de complejos HER2/3. Las células MCF7 se incubaron durante 15 minutos con los medios condicionados de las células 293-NRG α 2c y 293-NRG Δ lg. Se utilizó 1 mg de extracto para coimmunoprecipitar HER2 y HER3 y la fosforilación en residuos específicos de tirosina de esos receptores se evaluó mediante Western Blot usando anticuerpos fosfoespecíficos como se indica. El medio de cultivo DMEM (sin FBS) y el medio condicionado de células 293 se utilizaron como controles negativos. La estimulación con NRG-1 humana recombinante (10 nm) por 15 minutos se utilizó como control positivo.

Además de analizar la señalización celular desencadenada por la interacción de la NRG soluble con los receptores HER se estudió el efecto de esa activación sobre la proliferación celular. Este estudio consistió en la adición de medios condicionados de células 293 que expresan NRG α 2c o NRG Δ lg a células MCF7, ya que estas células responden mitogénicamente a la NRG (Esparis-Ogando *et al.* 2002). Como se muestra en la figura 24, tras 5 días de estimulación, la incubación con los medios condicionados de células 293-NRG α 2c provocó un aumento en la proliferación de células MCF7. En contraste, cuando estas se incubaron con los medios condicionados de células 293-NRG Δ lg el crecimiento fue mucho menor, pero fueron ligeramente más altos que los incubados con los medios de células 293 parentales (control). El aumento de la proliferación celular que se generó tras la estimulación con la NRG α 2c soluble fue estadísticamente significativo cuando se comparó con el control o con el efecto de la forma soluble del mutante NRG Δ lg.

Estos datos indicaron que la acción paracrina de NRG α 2c en términos de estimulación de la proliferación celular resultó ser superior a la de NRG Δ lg, lo que concuerda con todos los resultados que se presentaron anteriormente en este estudio. De esta forma, se puede decir que el dominio inmunoglobulina es esencial para una mayor acción biológica de la NRG soluble.

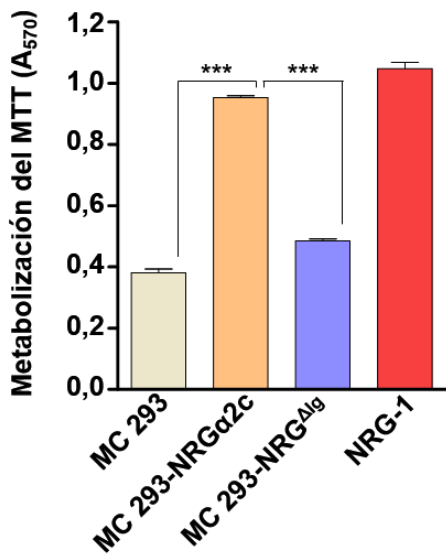


Figura 24. Efecto del medio condicionado de células 293, 293-NRGα2c y 293-NRG^{Δlg} en la proliferación celular. Las células MCF7 se estimularon con los medios condicionados que contenían las diferentes formas de la NRG soluble durante 5 días. El medio condicionado de células 293 se utilizó como control negativo y la estimulación con NRG-1 humana recombinante (10 nM) se utilizó como el control positivo. La densidad óptica tras solubilizar el formazán se midió en cada condición y los datos se representaron como la media ± SD de los triplicados de un experimento que se repitió tres veces. *** $p < 0,001$.

1.5. Caracterización y actividad biológica de proNRGα2c y proNRG^{Δlg}

El segundo modelo que se utilizó para demostrar la relevancia del dominio inmunoglobulina en la actividad biológica de las NRG, consistió en células MCF7tetoff en las que se expresó cada una de las dos formas transmembrana de la NRG (proNRGα2c o proNRG^{Δlg}). Este modelo es complementario al sistema 293-MCF7, con el cual se estudió la comunicación paracrina entre el ligando y los receptores HER, ya que consiste en una sola línea celular que produce el factor de crecimiento transmembrana, así como toda la maquinaria para la transducción de señales proliferativas. Por lo tanto, nos permite evaluar las propiedades autocrinas y yuxtacrinas de las proNRG.

Para estos experimentos, las células MCF7tetoff fueron transfectadas con el cDNA que codifica la proNRGα2c o el mutante proNRG^{Δlg}, subclonados en el vector de expresión de mamífero pRevTRE. Este sistema permite la expresión regulada de proteínas bajo el control del transactivador de tetraciclina. Se aislaron varios clones de células MCF7-NRGα2c y MCF7-NRG^{Δlg}, y en la figura 25A se muestra el nivel de expresión de proNRGα2c y proNRG^{Δlg} que se observó en los clones utilizados para esto estudio. Tras el tratamiento con doxiciclina se verificó la represión de la expresión de la NRG en ambos clones. Además, en el medio condicionado de las células MCF7-NRGα2c y MCF7-NRG^{Δlg} se detectó la presencia de la forma soluble de la proteína (Figura 25B).

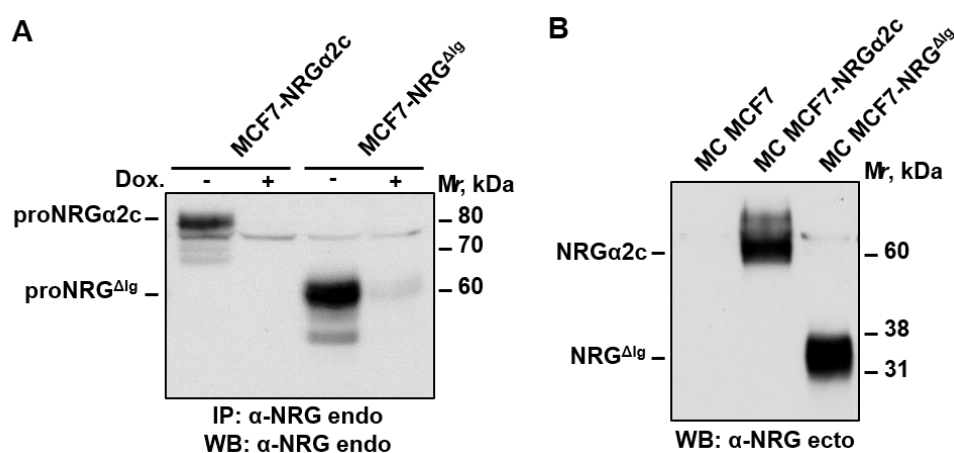


Figura 25. Expresión de NRGα2c y NRG^{Δlg} en células MCF7tetoff. **(A)** Los clones de MCF7tetoff en los que se expresaron NRGα2c y NRG^{Δlg} (MCF7-NRGα2c y MCF7-NRG^{Δlg}) se cultivaron con o sin doxiciclina (Dox., 10 ng/ml) durante 2 días y se lisaron. Las muestras se inmunoprecipitaron y se analizaron mediante Western Blot con el anticuerpo anti- NRG endo. **(B)** Los niveles de liberación de NRG en el medio condicionado de las células MCF7-NRGα2c y MCF7-NRG^{Δlg} se analizaron mediante Western Blot con el anticuerpo anti-NRG ecto.

Para caracterizar los clones que se utilizaron en este modelo de estudio, se observó la localización subcelular de la NRG mediante un ensayo de inmunofluorescencia. La NRG de forma silvestre y el mutante NRG^{Δlg} se localizaron en la membrana plasmática de las células MCF7 (Figura 26).

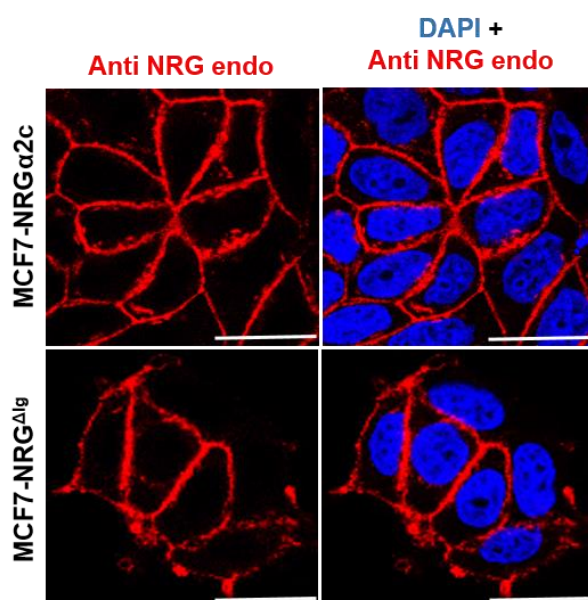


Figura 26. Distribución subcelular de NRGα2c y NRG^{Δlg} en células MCF7. Las células MCF7 que expresaban la NRG se plaquearon sobre cubreobjetos de vidrio y la localización de la proteína se observó por inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-NRG endo que se detectó con el anticuerpo secundario conjugado a Cy3 (rojo). La tinción nuclear se realizó con DAPI. Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Leica TCS SP5. La barra corresponde a una distancia de 25 μm.

Del mismo modo, para confirmar la correcta localización en la membrana celular de la NRGα2c y del mutante NRG^{Δlg} en células MCF7 se realizó un experimento de protección de proteasas. Cuando las células se incubaron con

proteínasa K, la banda mayoritaria de la NRG fue degradada proteolíticamente, indicando que esta forma de NRG está expuesta en la superficie celular (Figura 27), y se acompañó de un aumento en la cantidad de fragmentos de la cola citoplasmática. Además, las bandas minoritarias de peso molecular menor se mantuvieron intactas tras el procesamiento con proteínasa K, indicando que son formas de NRG que están en el interior celular. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en las células 293 (Figura 12), y esto demostró que la forma silvestre NRG α 2c y el mutante NRG Δ lg expresados en las células MCF7 alcanzan la membrana plasmática y pueden ser procesados para generar las formas solubles de esta proteína.

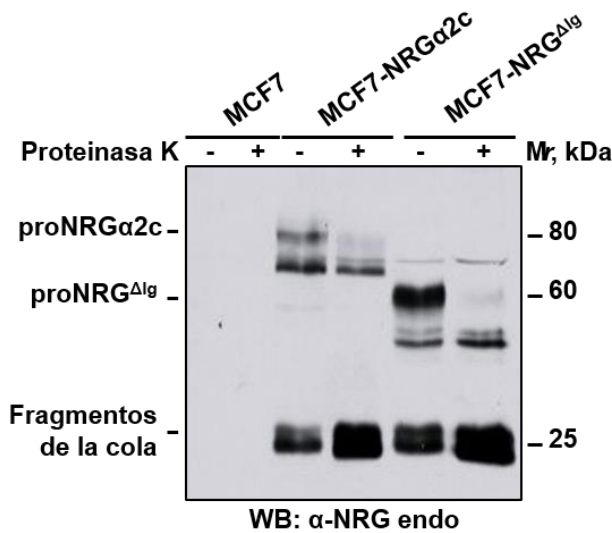


Figura 27. Ensayo de protección con proteasa. Las células MCF7-NRG α 2c y MCF7-NRG Δ lg se trataron con proteínasa K (200 μ g/ml) durante 30 minutos y se lisaron. Las muestras se analizaron mediante Western Blot usando el anticuerpo anti-NRG endo.

A continuación, se analizó la capacidad de señalización de la NRG α 2c y del mutante NRG Δ lg expresados en células MCF7. Los niveles obtenidos de pHER2, pHER3, pAKT y pS6 fueron mayores en las células MCF7-NRG α 2c que en las células MCF7-NRG Δ lg (Figura 28). El estado de fosforilación de todas estas proteínas disminuyó cuando la expresión de la NRG fue reprimida, especialmente en las células MCF7-NRG α 2c. Ambas líneas celulares respondieron cuando se adicionó NRG exógena durante 15 minutos, lo que indica que las células preservaron las respuestas de señalización al factor de crecimiento añadido.

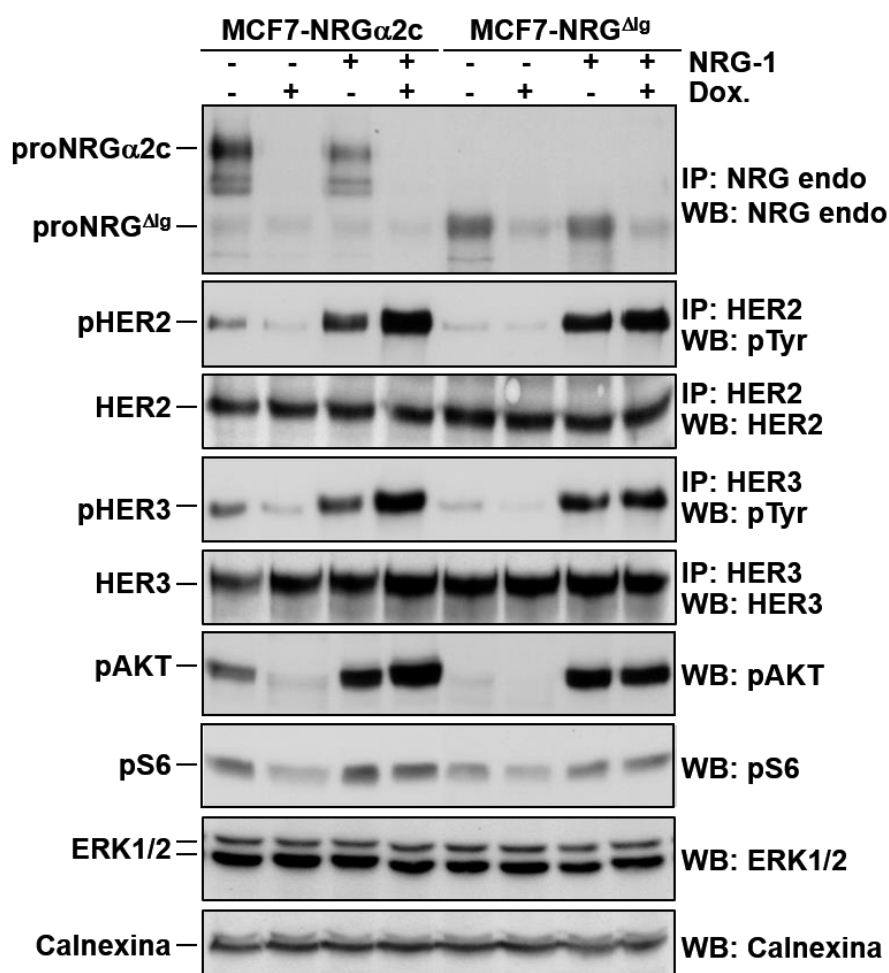


Figura 28. Señalización celular por la NRG. Se lisaron células MCF7-NRG α 2c y MCF7-NRG Δ lg cultivadas en presencia o ausencia de doxiciclina (10 ng/ml) durante 48 horas y tratadas con NRG-1 humana recombinante (10 nM) durante 15 minutos. La inmunoprecipitación (cuando necesaria) y el Western Blot se realizaron con los anticuerpos indicados para cada proteína.

Tras observar que la comunicación autocrina/yustacrina de la NRG con los receptores HER desencadenó la activación de las vías de señalización en las células MCF7 que expresan el ligando, se estudió la fosforilación de HER2 y HER3 tras la formación de heterodímeros entre esos receptores en las células MCF7, MCF7-NRG α 2c y MCF7-NRG Δ lg. Como se puede ver en la figura 29, en condiciones basales, en las células MCF7 no se detectó fosforilación debida a la formación de complejos HER2/3. En contraste, en las células que expresaban NRG silvestre se observó la formación de complejos HER2/3, de manera que la señal que se detectó fue mayor cuando se inmunoprecipitó HER2 y se analizó la fosforilación en HER3 mediante Western Blot, en comparación con el experimento realizado al revés, donde se inmunoprecipitó HER3 y se analizó la fosforilación en HER2. En las células MCF7-

NRG^{Δlg} sólo se observó la heterodimerización cuando se evaluó la activación de HER3 tras la inmunoprecipitación de HER2, pero la señal obtenida fue menor que en las células MCF7-NRGα2c.

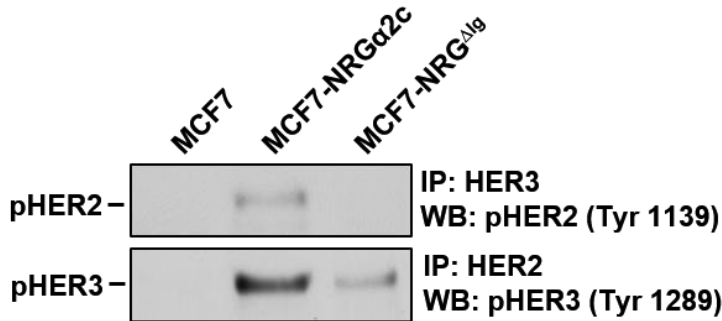


Figura 29. Formación de heterodímeros HER2/3 en células MCF7, MCF7-NRGα2c y MCF7-NRG^{Δlg}. Las células se lisaron y se utilizó 1 mg de extracto para coimmunoprecipitar HER2 y HER3. La fosforilación en residuos específicos de tirosina de estos receptores se evaluó por Western Blot usando anticuerpos fosfoespecíficos.

Posteriormente, se estudió si las tasas del crecimiento de las células MCF7 se alteraban tras la transfección con las diferentes formas de proNRG. La expresión de la NRG de tipo silvestre favoreció la proliferación de células MCF7-NRGα2c de manera significativa, y dicho efecto fue sensible a la represión de la expresión de proNRGα2c mediante la adición de doxiciclina (Figura 30). La proliferación de las células MCF7-NRGα2c tratadas con doxiciclina fue similar a la de las células MCF7 parentales no transfectadas. Las células MCF7-NRG^{Δlg} proliferaron menos que las células MCF7-NRGα2c, y esa proliferación fue insensible a la adición de doxiciclina.

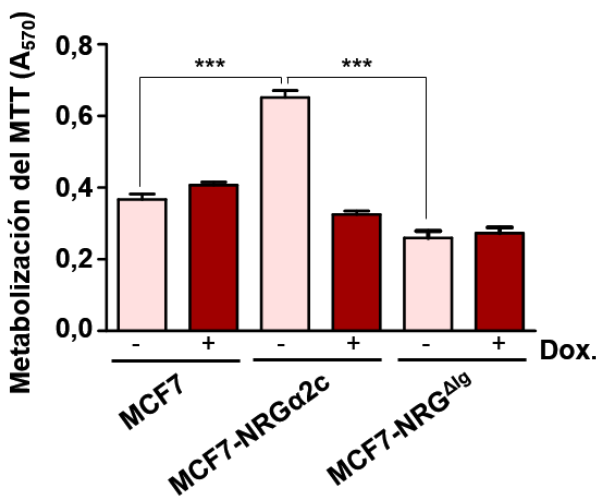


Figura 30. Proliferación de células MCF7, MCF7-NRGα2c y MCF7-NRG^{Δlg}. Estas células se cultivaron durante 5 días en presencia o ausencia de doxiciclina (10 ng/ml) y, tras el período de tratamiento, se midió la metabolización del MTT. Los resultados se presentaron como la media ± SD de los triplicados de un experimento que se repitió tres veces. ****p*<0,001.

Por otro lado, se evaluó si la estimulación con la NRG-1 humana recombinante influenciaba la proliferación de las células MCF7 que expresan la proNRG. Las células MCF7-NRGα2c y MCF7-NRG^{Δlg} proliferaron de forma similar en respuesta a

la adición de NRG exógena (Figura 31), dato que demostró que las diferencias en la proliferación celular encontradas entre las líneas celulares no se debían a diferencias en sus capacidades proliferativas.

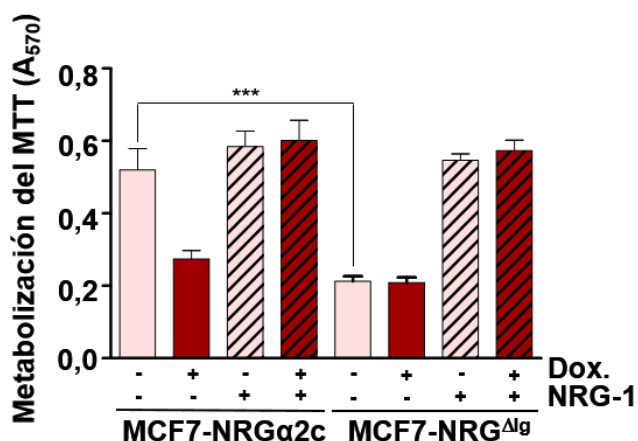


Figura 31. Proliferación de MCF7-NRGα2c y MCF7-NRGΔlg. Las células cultivadas en presencia o ausencia de doxiciclina (10 ng/ml) y fueron tratadas con o sin NRG-1 humana recombinante (10 nM) y la metabolización de MTT se midió 5 días después de los tratamientos. *** $p < 0,001$.

Esos resultados indican que la mayor proliferación que demostraron las células MCF7-NRGα2c en comparación con las MCF7-NRGΔlg se debió a la presencia del dominio inmunoglobulina en la proteína. Así, se puede decir que la región inmunoglobulina de la NRG facilita la proliferación celular desencadenada por las vías de señalización que se activan por la comunicación yustacrina/autocrina de ese ligando con los receptores HER.

1.6. Células MCF7-NRGα2c y MCF7-NRGΔlg: sensibilidad a terapias anti-HER2

Se ha descrito que el trastuzumab (anticuerpo terapéutico anti-HER2) ejerce una potente inhibición de la proliferación de células que expresan NRG (Yuste *et al.* 2005). Además, se ha demostrado que las respuestas clínicas al trastuzumab se correlacionan con la expresión de NRG en tumores de cáncer de mama que no sobreexpresan HER2 (de Alava *et al.* 2007).

Debido a esos datos se decidió explorar el efecto del trastuzumab en la señalización celular estimulada por la NRG en las células MCF7-NRGα2c y MCF7-NRGΔlg. Como se puede observar en la figura 32, el trastuzumab inhibió el grado de activación constitutiva de HER3 y AKT presentes en las células MCF-NRGα2c. Por otro lado, los niveles de pHER2 se mostraron poco afectados por el trastuzumab en esas células. En las células MCF7-NRGΔlg, el trastuzumab también disminuyó los

niveles de pHER3. Sin embargo, la acción de trastuzumab sobre el estado de activación de las otras proteínas analizadas (pHER2 y pAKT) no pudo interpretarse adecuadamente ya que su grado de activación fue muy bajo. Los niveles de pERK1/2 fueron bajos en ambas líneas celulares y no se observaron claramente efectos del tratamiento con trastuzumab o doxiciclina. Por otro lado, la adición de la NRG exógena en ambas líneas celulares estimuló la fosforilación de HER2, HER3, AKT y ERK1/2, demostrando que las células MCF7 mantenían su capacidad parental de respuesta a ese estímulo.

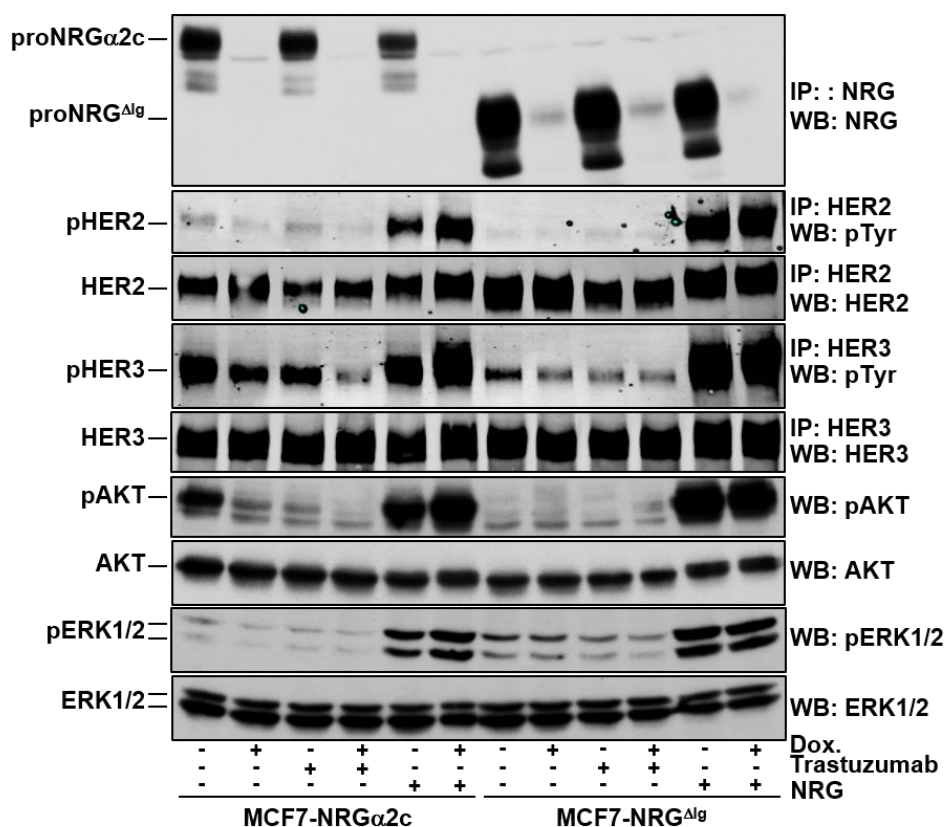


Figura 32. Sensibilidad al trastuzumab en la señalización celular estimulada por la NRG. Se lisaron células MCF7-NRG α 2c y MCF7-NRG Δ lg cultivadas en presencia o ausencia de doxiciclina (10 ng/ml) durante 48 horas y tratadas o no con trastuzumab (50 nM) durante 24 horas. Tras el tratamiento, las células se estimularon o no con NRG (10 nM) durante 15 minutos. La inmunoprecipitación y el Western Blot se realizaron con los anticuerpos indicados para cada proteína.

Tras analizar la inhibición de la señalización por NRG tras el tratamiento con trastuzumab, se decidió estudiar la sensibilidad a nivel de proliferación celular de las células MCF7-NRG α 2c y MCF7-NRG Δ lg a ese anticuerpo terapéutico.

El trastuzumab disminuyó sustancialmente la proliferación de células MCF7-NRG α 2c (Figura 33). Tal disminución en la proliferación celular fue mayor que la obtenida cuando se reprimió la expresión de NRG α 2c con doxiciclina. Además, la combinación del tratamiento con trastuzumab y la represión de la expresión de NRG α 2c no aumentaron la inhibición de la proliferación celular que causó el trastuzumab solo.

En las células MCF7-NRG Δ g el trastuzumab disminuyó ligeramente la proliferación celular. La adición de doxiciclina o la combinación de esta última con trastuzumab no cambió sustancialmente la proliferación de estas células cuando se comparó con la de las células MCF7-NRG Δ g no tratadas.

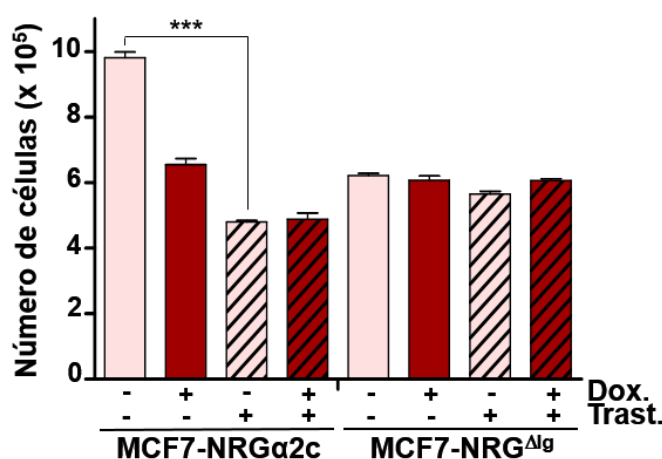


Figura 33. Efecto de trastuzumab en la proliferación de MCF7-NRG α 2c y MCF7-NRG Δ g. Las células cultivadas en presencia o ausencia de doxiciclina (10 ng/ml) se trataron con o sin trastuzumab (50 nM) y se contó el número de células 5 días después del tratamiento con el anticuerpo terapéutico. *** p <0,001.

Además del trastuzumab, también hemos evaluado la acción del pertuzumab, un anticuerpo que inhibe la heterodimerización de HER2 dependiente de ligando (Agus *et al.* 2002). Como se observa en la Figura 34, en estos experimentos tuvimos resultados similares a los obtenidos con trastuzumab. Sin embargo, se debe tener en cuenta que pertuzumab disminuyó los niveles de pHER2 en células MCF7-NRG α 2c.

Estos datos demostraron que el uso de terapias anti-HER2 (trastuzumab y pertuzumab) inhiben la activación de las vías de señalización desencadenadas por la fosforilación de receptores HER. Por lo tanto, este tipo de terapia dirigida puede disminuir la proliferación de células que expresan NRG, siendo una posible opción para el tratamiento de pacientes con tumores positivos para NRG.

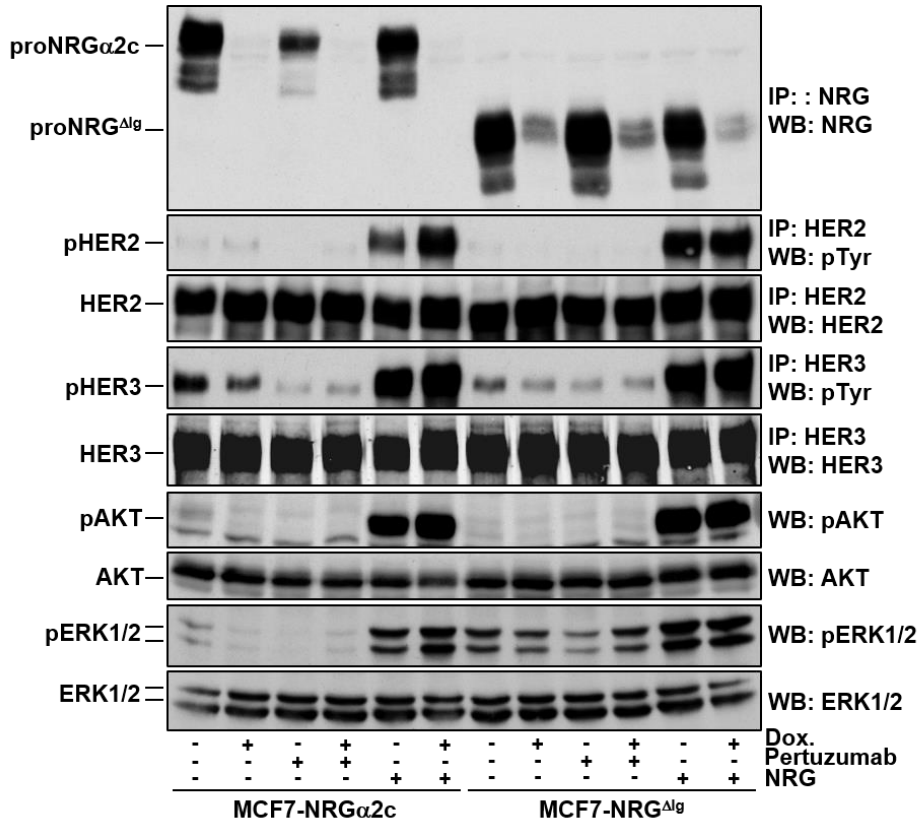


Figura 34. Sensibilidad al pertuzumab en la señalización celular estimulada por la NRG. Se lisaron células MCF7-NRG α 2c y MCF7-NRG Δ Ig cultivadas en presencia o ausencia de doxiciclina (10 ng/ml) durante 48 horas y tratadas o no con pertuzumab (50 nM) durante 24 horas. Tras el tratamiento, las células se estimularon o no con NRG (10 nM) durante 15 minutos. La inmunoprecipitación y el Western Blot se realizaron con los anticuerpos indicados para cada proteína.

1.7. Interacción del dominio inmunoglobulina de la NRG con la matriz extracelular

Los resultados anteriores demostraron que el dominio inmunoglobulina de las NRGs es muy importante para su actividad biológica, pero poco se conoce sobre cómo o porque ocurre esa mayor activación de los receptores tirosina quinasa. La presencia del dominio inmunoglobulina en algunas isoformas de NRGs puede no intervenir directamente en la interacción con los receptores HER, pero parece esencial para que esa interacción sea eficiente. A pesar de eso, la mayoría de los estudios relacionados con él, se centran en su capacidad de unirse a la matriz extracelular, siendo un regulador de la actividad biológica de las NRGs (Loeb and Fischbach 1995; Loeb *et al.* 1999; Eto *et al.* 2006).

Para estudiar si el dominio inmunoglobulina influye en la interacción de las NRGs con la matriz extracelular, se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia. Para ello, se incubaron células 293 y MCF7 en las que se expresó la forma silvestre y el mutante NRG^{ΔIg} durante 30 minutos con el anticuerpo anti-NRG ecto, que se une a la parte extracelular de la proteína.

En los resultados obtenidos por epifluorescencia se observó una “capa” que cubre las células que expresan la NRG α 2c, dificultando su visualización en la membrana celular, mientras que las células que expresan la NRG^{ΔIg}, no se observó esa capa, observando solamente el marcaje en la membrana celular (Figura 35). En las células 293 y MCF7 no transfectadas, no se observó ninguna señal, demostrando que el anticuerpo es específico para la NRG. Por lo tanto, el dominio inmunoglobulina presente en la NRG silvestre puede interaccionar con la matriz extracelular tras su procesamiento, en cambio, esto no ocurre en el caso del mutante carente de este dominio.

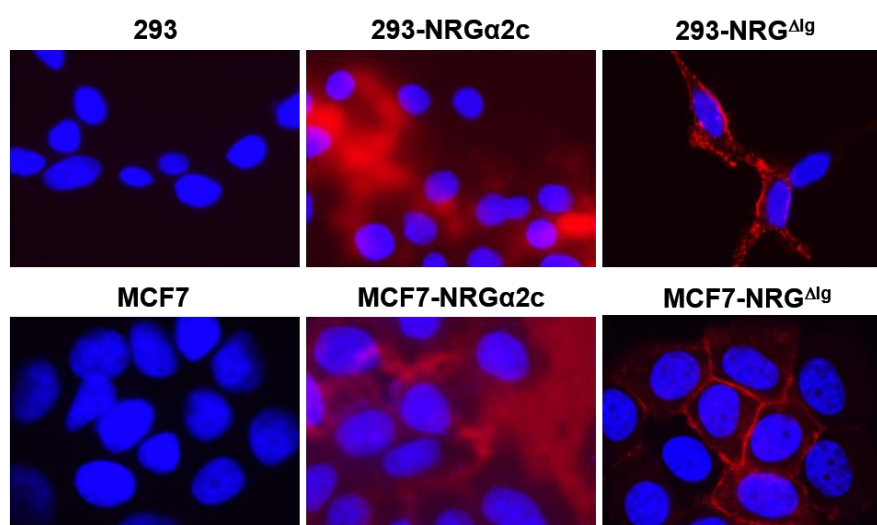


Figura 35. Localización de la NRG en el cultivo celular. Células 293 y MCF7 que expresan la NRG α 2c y la NRG^{ΔIg} se plaquearon sobre cubreobjetos de vidrio y la localización de la NRG se estudió por inmunofluorescencia, tras la incubación durante 30 minutos con el anticuerpo anti-NRG ecto. La localización de las NRGs se observó en rojo, marcado con el anticuerpo secundario Cy3, y los núcleos celulares se observaron en azul, marcados con DAPI. Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot2, (aumento 63x).

Posteriormente, se evaluó a través de microscopía confocal donde estaba la señal observada para cada forma de NRG. Se realizaron diferentes cortes en zeta de las células fijadas en el cubre, siendo un corte basal, el más cerca del cubre (A), uno

en el medio (B) y un apical, más lejos del cobre (C). Como en los resultados anteriores, en las células 293-NRG α 2c se visualizó una “capa” correspondiente a NRG que puede estar unida a matriz extracelular en el corte basal, en cuanto que en corte mediano se observó su localización en la membrana (Figura 36).

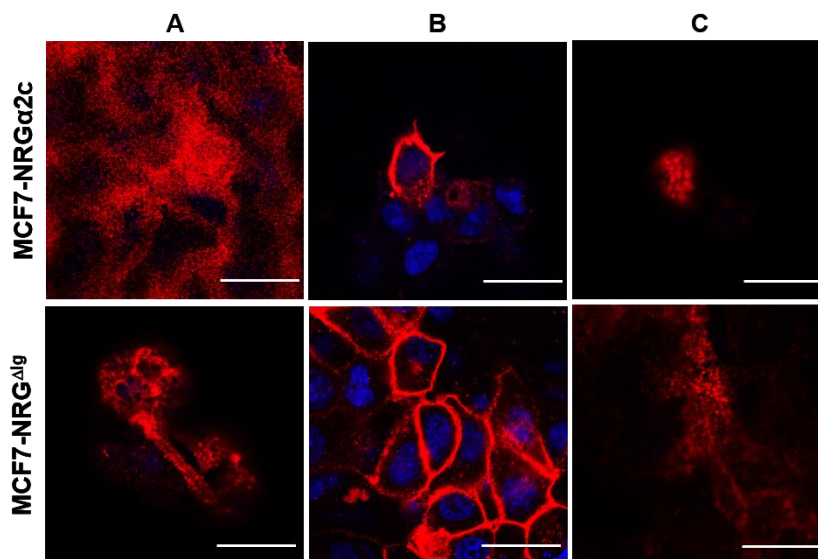


Figura 36. Localización de la NRG en el cultivo celular en diferentes cortes horizontales. Células 293 que expresan la NRG α 2c y la NRG Δ Ig se plaquearon sobre cubreobjetos de vidrio y la localización de la NRG se estudió por inmunofluorescencia, tras la incubación con el anticuerpo anti-NRG ecto. La localización de las NRGs se observó en rojo (anticuerpo secundario Cy3), y los núcleos celulares se observaron en azul (DAPI). Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Leica TCS SP5, donde se hicieron diferentes cortes horizontales en la camada de células fijadas: A, región basal; B, corte mediano; y C, región apical. La barra corresponde a una distancia de 25 μ m.

Además, teniendo en cuenta el punto donde se visualizó la localización en membrana de la NRG, se evaluaron cortes verticales de las células. En las imágenes presentadas en la figura 37, se puede observar que en las células 293-NRG α 2c, siempre se visualiza una señal roja indicativa de la presencia de NRG en la parte más cerca al cobre, aunque se trate de una zona que no contiene células. En las células 293-NRG Δ Ig se observó la señal roja solamente donde hay presencia de NRG en la membrana celular.

Los datos obtenidos mediante inmunofluorescencia indican que la forma soluble de la NRG α 2c se une a la matriz extracelular tras ser procesada, en cambio, esto no ocurre con el mutante carente del dominio inmunoglobulina. Así, se puede decir que el dominio inmunoglobulina es responsable de la interacción de la NRG con la matriz extracelular. Además, esta característica puede ser relevante cuando se

evaluó la acción biológica de la NRG en las células que la expresan, ya que puede ser responsable de la regulación de la actividad de esta proteína.

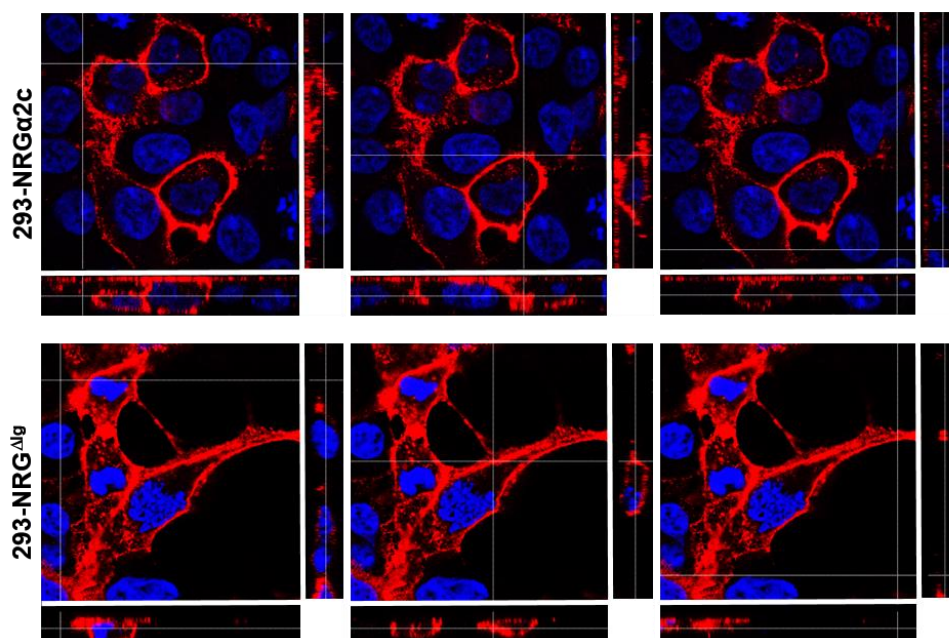


Figura 37. Localización de la NRG en el cultivo celular en cortes verticales. Las células 293 que expresan la NRG α 2c y la NRG Δ lg se plaquearon sobre cubreobjetos de vidrio y se incubaron con el anticuerpo anti-NRG ecto. La localización de las NRGs se estudió por inmunofluorescencia, siendo marcadas con el anticuerpo secundario Cy3 (señal roja). El núcleo celular se marcó con DAPI (señal azul). Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Leica TCS SP5. Las líneas blancas finas indican los puntos donde se realizaron las imágenes verticales, que están representadas al lado y debajo de la imagen en corte zeta.

Es importante resaltar que los resultados obtenidos en el estudio de las características funcionales de los dominios de la NRG, pueden tener un impacto traslacional. La identificación de que el dominio inmunoglobulina de las NRGs favorece sus propiedades de activación de los receptores HER indica que se pueden desarrollar fármacos dirigidos a ese dominio con el fin de neutralizar la acción de la proteína y mejorar la efectividad de terapias anti-NRG. Debido a la capacidad de NRG para promover la proliferación de células que expresan los receptores HER, el bloqueo de la actividad de este ligando puede representar un enfoque atractivo, considerando la NRG una nueva diana terapéutica en cáncer.

Discusión

Es cada vez mayor el número de estudios que correlacionan las NRGs con cáncer y el mal pronóstico de esta enfermedad. Líneas celulares que expresan NRG presentan un fenotipo más agresivo, estando involucradas con proliferación, migración, invasividad, capacidad de generar metástasis, inhibición de la apoptosis e independencia de estrógenos (Lupu *et al.* 1996). Debido a esto es muy importante conocer las características estructurales y biológicas de esta proteína, con el objetivo de identificar como la NRG podría ser utilizada terapéuticamente. De hecho, algunos informes ya se han acercado a esta última posibilidad, mostrando el beneficio terapéutico de actuar sobre el sistema NRG-HER (Jones *et al.* 2017).

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron el papel de los diferentes dominios en la localización celular de las NRGs y su procesamiento (Montero *et al.* 2000; Montero *et al.* 2002; Montero *et al.* 2007; Montero *et al.* 2011a), pero no se ha explorado el impacto de la eliminación de los diferentes dominios sobre su actividad biológica. Teniendo esto en cuenta, se utilizaron diferentes mutantes de la NRG α 2c de rata, a cual se eliminaron diferentes dominios, posibilitando el estudio de cómo cada región de la proteína influye en la regulación de la señalización a través de los receptores HER y en las respuestas de proliferación celular.

La mayoría de las isoformas de NRG son proteínas transmembrana, que pueden ser procesadas y liberadas al medio como una molécula soluble activa (Montero *et al.* 2000; Montero *et al.* 2002; Montero *et al.* 2007). Inicialmente analizamos la localización celular de la proNRG silvestre y de los mutantes que fueron expresados en células 293 mediante ensayos de inmunofluorescencia. Estos experimentos confirmaron que la proNRG α 2c se dirige correctamente hacia la superficie celular, así como el mutante NRG Δ lg, presentándose también como un acúmulo intracelular, principalmente en el aparato de Golgi, en tránsito hacia la membrana (Montero *et al.* 2007). En las células 293-NRG Δ extra y 293-NRG Δ intra solamente se observó un acúmulo perinuclear de la proteína, sugiriendo que esas formas se quedaron retenidas en el interior de la célula. Por otro lado, para el mutante NRG β 3 colocalizó con el marcador DAPI, indicando que esa forma se encuentra localizada principalmente en el núcleo de las células.

En contraste con otras familias de ligandos del EGF, las proNRGs carecen de una secuencia hidrofóbica N-terminal que puede actuar como un péptido señal. En cambio, el péptido señal en las proNRGs se encuentra en una región hidrofóbica en el medio de la secuencia, que también actúa como el dominio transmembrana (Falls 2003). En el caso de la proNRG^{Δintra}, dicha región está presente, mientras que en el caso de proNRG^{β3} está ausente. Aunque proNRG^{Δintra} contiene la secuencia hidrofóbica interna, no se transporta correctamente a la membrana plasmática, ya que se requiere el dominio intracelular para una localización adecuada en la superficie celular (Montero *et al.* 2007; Montero *et al.* 2011a). Diversos estudios han descrito que la isoforma de NRG1-β3 humana se transloca al núcleo cuando se añade al medio de cultivo o al ser transfectada en células de cáncer de mama, estando relacionadas con vías de señalización intranucleares (Li *et al.* 1996; Golding *et al.* 2004; Breuleux *et al.* 2006; Wang *et al.* 2011).

Las NRGs, como la mayoría de proteínas que se encuentran en la superficie celular, sufren modificaciones postraduccionales a lo largo de la ruta biosintética y secretora. La NRG1 contiene una secuencia rica en residuos de serina y treonina susceptible de O- y N-glicosilación, localizada entre el dominio inmunoglobulina y el módulo EGF (Peles *et al.* 1992; Montero *et al.* 2007). Además presentan, en su extremo N-terminal, un dipéptido Ser-Gly que podría ser un sitio de unión de glicosaminoglicanos. La síntesis y modificación postraduccional de algunas de las isoformas han sido descritas en estudios previos, donde se concluía que las NRGs sufren N-glicosilación, por lo menos, en dos residuos de asparragina de su ectodominio, mientras que la unión de cadenas de carbohidratos en posición O- se da en múltiples residuos de serina y treonina (Goldstein *et al.* 1989; Burgess *et al.* 1995; Lu *et al.* 1995; Montero *et al.* 2007).

La correcta síntesis, plegamiento y modificación de las proteínas es un proceso altamente regulado ya que es imprescindible que no se produzcan errores en ningún paso para que éstas sean funcionales. Para evitar que un polipéptido inadecuado o alterado llegue a la superficie celular existen distintos puntos de control a lo largo de la ruta secretora. Los mejor conocidos son la salida del retículo endoplasmático (Kappeler *et al.* 1997; Nishimura and Balch 1997; Kleizen and Braakman 2004), el transporte retrógrado del aparato de Golgi al retículo y el paso

desde las últimas cisternas de este orgánulo a los lisosomas (Appenzeller-Herzog and Hauri 2006). A partir del aparato de Golgi deben partir las proteínas hacia la membrana plasmática, los endosomas, gránulos de secreción y gránulos especializados (De Matteis and Luini 2008) y en él también se producen las últimas modificaciones postraduccionales, convirtiéndole en el gran centro organizador de la ruta biosintética-secretora.

Teniendo en cuenta estos datos, el acúmulo de la forma silvestre de la NRG y del mutante NRG^{ΔIg} en el aparato de Golgi, además de su localización en la superficie celular, puede estar relacionados a que las células 293, en las cuales se expresó la proteína, no poseen una maquinaria intracelular que consiga conducir la proteína hacia la membrana de manera directa tras su síntesis, generando este acúmulo perinuclear. Una posibilidad es que la sobreexpresión hace que la maquinaria de transporte hacia la membrana se atasque en el aparato de Golgi.

Estos experimentos revelaron que la presencia del dominio extracelular completo y de la región intracelular de la proNRG α 2c son esenciales para su transporte correcto hacia la membrana plasmática. Estos resultados también fueron confirmados a través del análisis de la presencia de NRG soluble en el medio condicionado de células 293 que expresan la forma silvestre y los mutantes de NRG, una vez que solamente se detectó la forma soluble de la proteína en el medio de las células 293-NRG α 2c y 293-NRG^{ΔIg}. De hecho, observamos que la eliminación del dominio inmunoglobulina no afectó al transporte y a la acumulación del mutante proNRG^{ΔIg} en la superficie celular, como se demostró mediante experimentos de inmunofluorescencia, protección con proteinasa K y marcaje de superficie.

El procesamiento de las NRGs es un proceso controlado, así que la liberación del factor soluble debe producirse en el momento y el contexto celular apropiados (Montero *et al.* 2008). Este procesamiento proteolítico, que se produce exclusivamente en la superficie celular (Montero *et al.* 2007), no se vio afectado por la eliminación del dominio Ig, lo que indica que dicho dominio no es determinante para la liberación de la fracción soluble de la proteína. El hecho de que el transporte hacia la membrana y el procesamiento ocurriera de manera similar al de la proteína de tipo silvestre también fue sugerido por la acumulación de la forma soluble del

mutante NRG^{Δlg} en los medios de cultivo, en cantidades similares a las observadas en los medios de las células que expresan proNRGα2c.

Con respecto al dominio inmunoglobulina de las NRGs, se conoce poco sobre su relevancia en la acción biológica de esta proteína. Por ello, hemos evaluado si la ausencia de este dominio afectaría a las características funcionales de dicha proteína.

Nuestros estudios demuestran que la eliminación del dominio inmunoglobulina de la NRG afecta fuertemente a su actividad biológica, tanto en su forma soluble como en su forma anclada a la membrana.

La señalización paracrina de las NRGs sobre los receptores HER ocurre tras el procesamiento y la liberación de la proteína al medio extracelular (Aguilar and Slamon 2001; Li *et al.* 2004; Montero *et al.* 2007). Este tipo de señalización desencadenado por las NRGs es el más estudiado y se ha propuesto como el más frecuente en las de tipo I y II, que poseen el dominio inmunoglobulina en su región extracelular (Falls 2003).

Inicialmente, fue sorprendente el hecho de que los medios condicionados de las células 293 que expresan proNRG^{Δlg} fueran mucho menos eficientes en inducir a fosforilación en tirosina de los receptores HER, en comparación con la forma soluble de la NRG de tipo silvestre. Tal efecto fue acompañado por una menor fosforilación disminuida de varias proteínas que participan en las vías de señalización activada por la unión de NRGs a los receptores HER. Como consecuencia final, la débil activación de la señalización paracrina en este sistema NRG-HER se tradujo en una menor estimulación de la proliferación celular por la NRG^{Δlg} con respecto a la NRGα2c.

Para evaluar las propiedades autocrinas y yuxtacrinas de las proNRG y demostrar la relevancia del dominio inmunoglobulina en este tipo de señalización celular de la NRG, se utilizaron las células MCF7tetoff, que expresan niveles normales de HER2 y HER3, en las que se expresó las formas transmembrana de la proNRGα2c y del mutante proNRG^{Δlg}. La capacidad de señalización de la NRGα2c fue mayor que la del mutante NRG^{Δlg}, demostrando niveles de pHER2, pHER3, pAKT y pS6 mayores en las células MCF7-NRGα2c que en las células MCF7-NRG^{Δlg}.

Además, el aumento de la proliferación fue mayor en las células que expresan la forma silvestre que el mutante NRG^{ΔIg}, la región inmunoglobulina de la NRG facilita de la proliferación celular desencadenada por las vías de señalización activadas por el sistema NRG-HER.

Se desconoce cuál es la razón por el que el mutante NRG^{ΔIg} es incapaz de activar eficientemente HER2 y HER3, tanto en su forma soluble como transmembrana, cuando este se compara con la forma silvestre. Estudios previos indicaban que el dominio inmunoglobulina es necesario para la interacción eficiente del dominio de EGF de las NRGs con los receptores HER (Eto *et al.* 2006). Tal fenómeno puede deberse a una acción directa de este dominio sobre la unión de la NRG al receptor o a un cambio más global en la estructura que afecta a la región de tipo EGF, alterando la interacción con los receptores. Nuestros resultados corroboran a un estudio en el que describen que la interacción con el receptor HER4 de un mutante de NRG1β2, al que se eliminó el dominio inmunoglobulina es mil veces menor que la de la forma completa de la proteína (Eto *et al.* 2006).

Es importante mencionar que otros factores de crecimiento que pertenecen a la familia de EGF, como proTGFα, carecen de dominio inmunoglobulina y su forma soluble es biológicamente activa (Massague and Pandiella 1993). También es interesante decir que la mayoría de las formas de NRG-1 recombinante humana disponibles no presentan el dominio Ig y son activas. Es posible que las cantidades utilizadas sean mucho más altas que las cantidades que utilizamos en los medios de cultivo y que pueden explicar las propiedades de estimulación débil de los medios de las células transfectadas con NRG^{ΔIg} en comparación con el tipo silvestre o con la NRG-1 recombinante humana, utilizada como control positivo en nuestros experimentos.

Por otro lado, algunos ligandos de los receptores tirosina quinasa forman dímeros, como es el caso de los ligandos de c-KIT. Las estructuras diméricas de ligandos tienen un papel en la activación de estos receptores mediante la dimerización de los mismos, que es esencial para su activación (Blume-Jensen *et al.* 1991; Roskoski 2005). Sin embargo, los estudios estructurales han demostrado que la activación de receptores de HER por ligandos de la familia del EGF no incluye la formación de dímeros de ligandos, en contraste con lo que se conoce para otros

factores de crecimiento de polipéptidos tales como los ligandos de c-KIT mencionados anteriormente. En el caso de los ligandos de la familia del EGF, la interacción de un único ligando con el receptor desencadena la exposición del brazo de dimerización de los receptores, que es responsable de la creación de dímeros de receptor. Este tipo de mecanismo de dimerización en el sistema "receptor-receptor" deja a los ligandos separados unos de otros e incapaces de formar dímeros. Tal mecanismo de activación excluye la formación de dímeros como un paso crítico en la activación de los receptores HER (Massague and Pandiella 1993).

A pesar de lo que ya está descrito en la literatura, hemos realizado varios intentos para analizar si la NRG de tipo silvestre forma dímeros y para evaluar si la eliminación del dominio inmunoglobulina podría afectar a una posible dimerización de estos ligandos. Para ello, se realizaron varios experimentos usando medios de cultivo condicionados de células 293 que expresan NRG α 2c y NRG Δ lg y probamos diferentes protocolos para detectar las NRGs solubles: (i) condiciones no desnaturizantes con SDS, (ii) condiciones no desnaturizantes sin SDS (ni en el tampón de muestra ni en el tampón de carrera), (iii) SDS-PAGE en condiciones normales. En ninguna de estas condiciones, pudimos detectar la formación de dímeros de NRG.

En las células MCF7, observamos que HER3 se fosforila más fuertemente que HER2 tras la estimulación con NRG. Tal acción diferencial puede deberse a varias circunstancias. Se ha demostrado que la fosforilación en tirosina de los receptores HER se produce de forma asimétrica, en la que un receptor donante fosforila los residuos de tirosina de un receptor aceptor adyacente (Zhang *et al.* 2007). En el caso de los dímeros de receptores HER2-HER3, y debido a la actividad deficiente de la quinasa de HER3 (Shi *et al.* 2010), se espera que este último actúe principalmente como el receptor aceptor, siendo HER2 el donante quinasa. La actividad quinasa restringida de HER3 puede muy bien explicar la fosforilación débil en tirosina de HER2, como se ha observado en los experimentos de Western Blot con anticuerpos anti-HER2 fosfoespecíficos. Además, resultados previamente publicados (Sanchez-Martin and Pandiella 2012) ya han demostrado que la señal fosfotirosina obtenida en Western Blot en la que HER2 se inmunoprecipitó después de la estimulación con NRG podría deberse a la fosforilación de HER3 que fue coprecipitado con HER2.

Estudios demostraron que la proliferación de células MCF7 es insensible a la acción de trastuzumab (Agus *et al.* 2002; Yuste *et al.* 2005), así que, es importante el hecho de que este fármaco tenga un efecto sobre la proliferación de las células MCF7-NRG α 2c. El efecto de trastuzumab sobre la proliferación de las células que expresan la NRG de tipo silvestre ya fue descrito (Yuste *et al.* 2005; de Alava *et al.* 2007), indicando que esta terapia también es efectiva en los casos en los que el aumento de la proliferación celular es debido a la sobreexpresión del ligando en líneas celulares que presentan niveles normales de receptores HER. Curiosamente, los niveles de fosforilación de HER2 en células MCF7-NRG α 2c fue poco afectado por trastuzumab, lo que coincide con los datos publicados utilizando NRG soluble para estimular los receptores HER2 (Agus *et al.* 2002). Por el contrario, trastuzumab tiene un efecto sustancial sobre la fosforilación de tirosina de HER3 y sobre el estado de activación de AKT. Estos resultados observados son relevantes, dado el importante papel de la ruta de señalización HER3-PI3K en la proliferación de células de cáncer de mama (Chakrabarty *et al.* 2012). Nuestros resultados, junto con los datos disponibles en la literatura, nos indican que la acción antiproliferativa de trastuzumab en células MCF7-NRG α 2c puede ocurrir indirectamente, al disminuir la fosforilación de tirosina mediada por HER2 y HER3, que a su vez afecta a la señalización aguas abajo dependiente de HER3.

En esto mismo contexto, hemos evaluado como el uso del anticuerpo terapéutico pertuzumab podría afectar el efecto de la estimulación de la NRG con y sin el dominio inmunoglobulina. Los resultados obtenidos con pertuzumab son muy similares a los obtenidos con trastuzumab, pero cabe resaltar que pertuzumab afectó más los niveles de fosforilación de HER2 que trastuzumab, lo que era esperado debido al mecanismo de acción de este fármaco. Pertuzumab inhibe la heterodimerización de HER2 dependiente de ligando (Agus *et al.* 2002).

Nuestros resultados indican que el uso de terapias anti-HER2 puede inhibir la activación de las vías de señalización desencadenadas por la fosforilación de receptores HER en células que expresan NRG. Por lo tanto, los fármacos dirigidos a HER2 son una posible opción para el tratamiento de pacientes con tumores positivos para NRG. Por otro lado, el desarrollo de terapias dirigidas a NRG sería una buena opción en los casos de pacientes con resistencia a las terapias anti-HER2.

Como ya he mencionado, para desarrollar nuevos fármacos es imprescindible el adecuado conocimiento de la diana terapéutica. En este contexto, resulta importante conocer como el dominio inmunoglobulina influye en la mayor actividad biológica de las NRGs de tipo silvestre.

La interacción de las NRGs con los receptores HER no es dependiente de la presencia del dominio inmunoglobulina, pero esta unión parece más eficiente cuando la isoforma de NRG presenta esta región (Holmes *et al.* 1992; Wen *et al.* 1994; Eto *et al.* 2006). Estos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que somos capaces de observar la señal desencadenada tras la unión de la NRG^{Alg} con los receptores HER, aunque esta es más débil cuando se compara con la señal de la NRG α 2c.

Esta mayor eficiencia de la NRG de tipo silvestre puede estar relacionada a la capacidad de unirse a la matriz extracelular descrita para el dominio inmunoglobulina, limitando su capacidad de difundir libremente y permitiendo su acumulación en el sitio de acción para poder actuar rápidamente al ser procesadas (Loeb and Fischbach 1995; Loeb *et al.* 1999). El dominio inmunoglobulina presente en la NRG silvestre puede interactuar con la matriz extracelular tras su procesamiento, en cambio, esto no ocurre en el caso del mutante carente de este dominio, siendo un mecanismo de control de la actividad biológica de estas proteínas.

Es importante resaltar que nuestros resultados pueden tener un impacto traslacional, pues el descubrimiento de que el dominio inmunoglobulina de las NRGs favorece sus propiedades de activación de receptores HER abre la posibilidad de que este dominio pueda ser utilizado para mejorar la efectividad de las terapias anti-NRG. Debido a la capacidad incuestionable de las NRGs de promover la proliferación de células que expresan receptores HER, la neutralización de la actividad de las NRGs puede representar un enfoque terapéutico atractivo (Yuste *et al.* 2005; Montero *et al.* 2007; Montero *et al.* 2011b; Jones *et al.* 2017).

La expresión de NRG en tejidos tumorales puede ofrecer nuevas posibilidades terapéuticas, algunas de ellas basadas en sus propiedades estructurales y biológicas. Por lo tanto, el hecho de que las NRG se expongan en la superficie celular ofrece la posibilidad de generar anticuerpos que reconocen la región extracelular de las NRGs. Estos anticuerpos pueden neutralizar las propiedades proocogénicas de la NRG y también pueden servir para generar respuestas inmunes

contra el tumor, de forma similar a las que se generan contra las terapias que se dirigen a los receptores HER (Clynes *et al.* 2000).

Además, teniendo en cuenta que las proNRGs podrían conservar propiedades similares a las de otras proteínas transmembrana, como los receptores HER, incluida la internalización y el reciclaje (Sorkin and Goh 2009). Dado el hecho de que algunos tratamientos eficaces dirigidos a esos receptores incluyen el uso de ADCs, que internalizan y llevan al interior de la célula un fármaco citotóxico, la posibilidad de utilizar un enfoque similar para las células tumorales que expresan NRG parece atractiva y muy importante.

Resultados como estos instigan a profundizar la investigación acerca del uso de las NRGs como una forma adicional para impedir el fracaso terapéutico en el tratamientos de determinados tipos de cáncer que promueven la progresión tumoral, la invasión y la resistencia a las quimioterapias. Además, al igual que ocurre con la quimioterapia convencional, que a menudo es más eficaz en combinación, las combinaciones racionales de terapias dirigidas tienen más probabilidades de resultar más potentes (Baselga and Tabernero 2007).

En este contexto, la activación de HER3 tras la unión con la NRG1 es uno de los factores que induce a la resistencia primaria al trastuzumab en células de cáncer de mama HER2 positivas. Esta resistencia puede ser revertida por el uso de anticuerpos anti-HER3, visto que disminuye significativamente la activación de HER3 dependiente de la NRG1. Debido a la diversidad y complejidad de la señalización desencadenada por los receptores HER, la combinación de terapias dirigidas puede ser una buena opción para el tratamiento de tumores resistentes a una u otra terapia (Yang *et al.* 2017). De igual manera que se utilizó una terapia anti-HER3 en este estudio, un fármaco dirigido a la NRG podría ser de similar eficacia, una vez que la NRG no se uniría a su receptor, inhibiendo la formación de heterodímeros HER2/HER3.

Estudios de esta naturaleza también fueron llevados a cabo en otros tipos de tumores, destacando las posibles combinaciones de terapias dirigidas a los receptores HER y sus vías de señalización (Ben-Kasus *et al.* 2009; Ferraro *et al.* 2013; Dienstmann *et al.* 2014; Curley *et al.* 2015; Gaborit *et al.* 2015; Yarar *et al.* 2015; Okazaki *et al.* 2016; Tamaskovic *et al.* 2016).

Por otro lado, el uso de las NRGs como biomarcadores tumorales también se está explorando. Estudios han sugerido que tumores con altos niveles de NRG podrían responder bien al tratamiento con terapias anti-HER3 (Sliwkowski *et al.* 1994; Meetze *et al.* 2015; Ocana *et al.* 2016).

Considerando estos datos, el uso terapéutico de la NRG1 podría ser interesante para diversos tipos de cáncer. Puede que la ausencia de tratamientos específicos contra la NRG ocurra debido a la gran heterogeneidad de diferentes isoformas del ligando, lo que dificulta su evaluación clínica. Por este hecho, estudios involucrados en elucidar las características estructurales y funcionales de las diferentes isoformas de las NRGs capaces de ser atacadas por fármacos son de extrema importancia. Además, el papel de la NRG en la proliferación, mantenimiento y metástasis tumoral es relevante, indicando que esta proteína es una potencial diana terapéutica para el tratamiento del cáncer.

Conclusiones

Conclusiones

1. La presencia del dominio extracelular y de la región intracelular de la NRG α 2c es necesario para su transporte y localización en la membrana plasmática. Además, la secuencia transmembrana parece imprescindible para la translocación de la proteína a las membranas intracelulares.
2. El dominio inmunoglobulina no es esencial para la correcta localización de la NRG α 2c en la superficie celular y para su procesamiento, siendo el factor soluble de ambas formas de NRG liberado al medio de cultivo de manera similar.
3. Las formas solubles y transmembrana de la NRG α 2c activan más fuertemente a los receptores HER y sus vías de señalización do que el mutante NRG Δ Ig. Por lo tanto, la región inmunoglobulina de la NRG potencia la proliferación celular desencadenada por estas vías de señalización.
4. Terapias anti-HER2, como trastuzumab y pertuzumab, inhiben las vías de señalización activadas por receptores HER, disminuyendo la proliferación de células que expresan NRG.
5. El dominio inmunoglobulina de la NRG α 2c es el responsable de su interacción con la matriz extracelular., siendo un regulador la actividad de esta proteína.

Bibliografía

Bibliografía

- Adam, L., R. Vadlamudi, S. B. Kondapaka, J. Chernoff, J. Mendelsohn and R. Kumar (1998). "Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase." J Biol Chem **273**(43): 28238-28246.
- Adelaide, J., F. Penault-Llorca, A. Dib, Y. Yarden, J. Jacquemier and D. Birnbaum (1994). "The Heregulin gene can be included in the 8p12 amplification unit in human breast cancer." Genes Chromosomes Cancer **11**(1): 66-69.
- Adler, M. and S. A. Thompson (1999). "The solution structure of heregulin-alpha and a N-terminal mutant with suppressed activity." Biochem Biophys Res Commun **256**(1): 156-161.
- Aguilar, Z., R. W. Akita, R. S. Finn, B. L. Ramos, M. D. Pegram, F. F. Kabbinavar, R. J. Pietras, P. Pisacane, M. X. Sliwkowski and D. J. Slamon (1999). "Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells." Oncogene **18**(44): 6050-6062.
- Aguilar, Z. and D. J. Slamon (2001). "The transmembrane heregulin precursor is functionally active." J Biol Chem **276**(47): 44099-44107.
- Agus, D. B., R. W. Akita, W. D. Fox, G. D. Lewis, B. Higgins, P. I. Pisacane, J. A. Lofgren, C. Tindell, D. P. Evans, K. Maiese, *et al.* (2002). "Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth." Cancer Cell **2**(2): 127-137.
- Amiri-Kordestani, L., G. M. Blumenthal, Q. C. Xu, L. Zhang, S. W. Tang, L. Ha, W. C. Weinberg, B. Chi, R. Candau-Chacon, P. Hughes, *et al.* (2014). "FDA approval: ado-trastuzumab emtansine for the treatment of patients with HER2-positive metastatic breast cancer." Clin Cancer Res **20**(17): 4436-4441.
- Amsellem-Ouazana, D., I. Bieche, S. Tozlu, H. Botto, B. Debre and R. Lidereau (2006). "Gene expression profiling of ERBB receptors and ligands in human transitional cell carcinoma of the bladder." J Urol **175**(3 Pt 1): 1127-1132.
- Anderson, N. G. and T. Ahmad (2002). "ErbB receptor tyrosine kinase inhibitors as therapeutic agents." Front Biosci **7**: d1926-1940.
- Appenzeller-Herzog, C. and H. P. Hauri (2006). "The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function." J Cell Sci **119**(Pt 11): 2173-2183.
- Arteaga, C. L. and J. A. Engelman (2014). "ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics." Cancer Cell **25**(3): 282-303.
- Atkinson, R. A. and R. J. Williams (1990). "Solution structure of the kringle 4 domain from human plasminogen by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy and distance geometry." J Mol Biol **212**(3): 541-552.
- Atlas, E., M. Cardillo, I. Mehmi, H. Zahedkargaran, C. Tang and R. Lupu (2003). "Heregulin is sufficient for the promotion of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells in vivo." Mol Cancer Res **1**(3): 165-175.
- Ausubel, K. and B. Gitler (1987). "Swallow syncope in an otherwise healthy young man." Am Heart J **113**(3): 831-832.
- Avila, M. A., J. A. Velasco, C. Cho, R. Lupu, D. Wen and V. Notario (1995). "Hyperactive autocrine loop mediated by a NDF-related factor in neoplastic hamster embryo fibroblasts expressing an activated cph oncogene." Oncogene **10**(5): 963-971.
- Bacus, S. S., A. V. Gudkov, C. R. Zelnick, D. Chin, R. Stern, I. Stancovski, E. Peles, N. Ben-Baruch, H. Farbstein, R. Lupu, *et al.* (1993). "Neu differentiation factor (heregulin) induces expression of intercellular adhesion molecule 1: implications for mammary tumors." Cancer Res **53**(21): 5251-5261.
- Bagheri-Yarmand, R., R. K. Vadlamudi, R. A. Wang, J. Mendelsohn and R. Kumar (2000). "Vascular endothelial growth factor up-regulation via p21-activated kinase-1 signaling regulates heregulin-beta1-mediated angiogenesis." J Biol Chem **275**(50): 39451-39457.

- Bao, J., D. Wolpowitz, L. W. Role and D. A. Talmage (2003). "Back signaling by the Nrg-1 intracellular domain." *J Cell Biol* **161**(6): 1133-1141.
- Barbacci, E. G., B. C. Guarino, J. G. Stroh, D. H. Singleton, K. J. Rosnack, J. D. Moyer and G. C. Andrews (1995). "The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding." *J Biol Chem* **270**(16): 9585-9589.
- Barnadas, A., M. Algara, O. Cordoba, A. Casas, M. Gonzalez, M. Marzo, A. Montero, M. Munoz, A. Ruiz, F. Santolaya, *et al.* (2018). "Recommendations for the follow-up care of female breast cancer survivors: a guideline of the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM), Spanish Society of General Medicine (SEMERGEN), Spanish Society for Family and Community Medicine (SEMFC), Spanish Society for General and Family Physicians (SEMG), Spanish Society of Obstetrics and Gynecology (SEGO), Spanish Society of Radiation Oncology (SEOR), Spanish Society of Senology and Breast Pathology (SESPM), and Spanish Society of Cardiology (SEC)." *Clin Transl Oncol* **20**(6): 687-694.
- Barok, M., H. Joensuu and J. Isola (2014). "Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance." *Breast Cancer Res* **16**(2): 209.
- Barok, M., M. Tanner, K. Koninki and J. Isola (2011). "Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab-resistant breast cancer cells in vivo." *Breast Cancer Res* **13**(2): R46.
- Barros, F. F., D. G. Powe, I. O. Ellis and A. R. Green (2010). "Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments." *Histopathology* **56**(5): 560-572.
- Barthelemy, P., J. Leblanc, V. Goldberg, F. Wendling and J. E. Kurtz (2014). "Pertuzumab: development beyond breast cancer." *Anticancer Res* **34**(4): 1483-1491.
- Baselga, J. and J. Tabernero (2007). "Combined antiangiogenesis and antiepidermal growth factor receptor targeting in the treatment of cancer: hold back, we are not there yet." *J Clin Oncol* **25**(29): 4516-4518.
- Beck, A., L. Goetsch, C. Dumontet and N. Corvaia (2017). "Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates." *Nat Rev Drug Discov* **16**(5): 315-337.
- Belsches-Jablonski, A. P., J. S. Biscardi, D. R. Peavy, D. A. Tice, D. A. Romney and S. J. Parsons (2001). "Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival." *Oncogene* **20**(12): 1465-1475.
- Ben-Kasus, T., B. Schechter, S. Lavi, Y. Yarden and M. Sela (2009). "Persistent elimination of ErbB-2/HER2-overexpressing tumors using combinations of monoclonal antibodies: relevance of receptor endocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9): 3294-3299.
- Bhargava, R., J. Striebel, S. Beriwal, J. C. Flickinger, A. Onisko, G. Ahrendt and D. J. Dabbs (2009). "Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers." *Int J Clin Exp Pathol* **2**(5): 444-455.
- Blume-Jensen, P., L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, K. M. Zsebo, B. Westermark and C. H. Heldin (1991). "Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis." *Embo j* **10**(13): 4121-4128.
- Bouyain, S., P. A. Longo, S. Li, K. M. Ferguson and D. J. Leahy (2005). "The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(42): 15024-15029.
- Breuleux, M. (2007). "Role of heregulin in human cancer." *Cell Mol Life Sci* **64**(18): 2358-2377.
- Breuleux, M., F. Schoumacher, D. Rehn, W. Kung, H. Mueller and U. Eppenberger (2006). "Heregulins implicated in cellular functions other than receptor activation." *Mol Cancer Res* **4**(1): 27-37.
- Britsch, S., L. Li, S. Kirchhoff, F. Theuring, V. Brinkmann, C. Birchmeier and D. Riethmacher (1998). "The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system." *Genes Dev* **12**(12): 1825-1836.
- Brunner-Kubath, C., W. Shabbir, V. Saferding, R. Wagner, C. F. Singer, P. Valent, W. Berger, B. Marian, C. C. Zielinski, M. Grusch, *et al.* (2011). "The PI3 kinase/mTOR blocker NVP-BEZ235 overrides resistance against irreversible ErbB inhibitors in breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* **129**(2): 387-400.

- Buonanno, A. and G. D. Fischbach (2001). "Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system." Curr Opin Neurobiol **11**(3): 287-296.
- Burden, S. and Y. Yarden (1997). "Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis." Neuron **18**(6): 847-855.
- Burgess, A. W. (2008). "EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets." Growth Factors **26**(5): 263-274.
- Burgess, A. W., H. S. Cho, C. Eigenbrot, K. M. Ferguson, T. P. Garrett, D. J. Leahy, M. A. Lemmon, M. X. Sliwkowski, C. W. Ward and S. Yokoyama (2003). "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." Mol Cell **12**(3): 541-552.
- Burgess, T. L., S. L. Ross, Y. X. Qian, D. Brankow and S. Hu (1995). "Biosynthetic processing of neu differentiation factor. Glycosylation trafficking, and regulated cleavage from the cell surface." J Biol Chem **270**(32): 19188-19196.
- Burstein, H. J., Y. Sun, L. Y. Dirix, Z. Jiang, R. Paridaens, A. R. Tan, A. Awada, A. Ranade, S. Jiao, G. Schwartz, *et al.* (2010). "Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer." J Clin Oncol **28**(8): 1301-1307.
- Busfield, S. J., D. A. Michnick, T. W. Chickering, T. L. Revett, J. Ma, E. A. Woolf, C. A. Comrack, B. J. Dussault, J. Woolf, A. D. Goodearl, *et al.* (1997). "Characterization of a neuregulin-related gene, Don-1, that is highly expressed in restricted regions of the cerebellum and hippocampus." Mol Cell Biol **17**(7): 4007-4014.
- Cabrera, N., E. Diaz-Rodriguez, E. Becker, D. Martin-Zanca and A. Pandiella (1996). "TrkA receptor ectodomain cleavage generates a tyrosine-phosphorylated cell-associated fragment." J Cell Biol **132**(3): 427-436.
- Cai, Z., H. Zhang, J. Liu, A. Berezov, R. Murali, Q. Wang and M. I. Greene (2010). "Targeting erbB receptors." Semin Cell Dev Biol **21**(9): 961-966.
- Carey, L. A., C. M. Perou, C. A. Livasy, L. G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, G. Karaca, M. A. Troester, C. K. Tse, S. Edmiston, *et al.* (2006). "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study." Jama **295**(21): 2492-2502.
- Carpenter, G., L. King, Jr. and S. Cohen (1978). "Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro." Nature **276**(5686): 409-410.
- Carpenter, G., K. J. Lembach, M. M. Morrison and S. Cohen (1975). "Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts." J Biol Chem **250**(11): 4297-4304.
- Carraway, K. L., 3rd and S. J. Burden (1995). "Neuregulins and their receptors." Curr Opin Neurobiol **5**(5): 606-612.
- Carraway, K. L., 3rd, M. X. Sliwkowski, R. Akita, J. V. Platko, P. M. Guy, A. Nuijens, A. J. Diamonti, R. L. Vandlen, L. C. Cantley and R. A. Cerione (1994). "The erbB3 gene product is a receptor for heregulin." J Biol Chem **269**(19): 14303-14306.
- Carraway, K. L., 3rd, J. L. Weber, M. J. Unger, J. Ledesma, N. Yu, M. Gassmann and C. Lai (1997). "Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases." Nature **387**(6632): 512-516.
- Carter, P., L. Presta, C. M. Gorman, J. B. Ridgway, D. Henner, W. L. Wong, A. M. Rowland, C. Kotts, M. E. Carver and H. M. Shepard (1992). "Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4285-4289.
- Cassady, J. M., K. K. Chan, H. G. Floss and E. Leistner (2004). "Recent developments in the maytansinoid antitumor agents." Chem Pharm Bull (Tokyo) **52**(1): 1-26.
- Centa, A., R. Rodriguez-Barrueco, J. C. Montero and A. Pandiella (2018). "The immunoglobulin-like domain of neuregulins potentiates ErbB3/HER3 activation and cellular proliferation." Mol Oncol.
- Chakrabarty, A., V. Sanchez, M. G. Kuba, C. Rinehart and C. L. Arteaga (2012). "Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(8): 2718-2723.
- Chalouni, C. and S. Doll (2018). "Fate of Antibody-Drug Conjugates in Cancer Cells." J Exp Clin Cancer Res **37**(1): 20.

Cho, H. S. and D. J. Leahy (2002). "Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether." Science **297**(5585): 1330-1333.

Citri, A. and Y. Yarden (2006). "EGF-ERBB signalling: towards the systems level." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 505-516.

Clynes, R. A., T. L. Towers, L. G. Presta and J. V. Ravetch (2000). "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets." Nat Med **6**(4): 443-446.

Cohen, S. (1965). "The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF)." Dev Biol **12**(3): 394-407.

Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature **422**(6927): 37-44.

Coussens, L., T. L. Yang-Feng, Y. C. Liao, E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P. H. Seeburg, T. A. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke, *et al.* (1985). "Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene." Science **230**(4730): 1132-1139.

Cress, W. D. and E. Seto (2000). "Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer." J Cell Physiol **184**(1): 1-16.

Crovello, C. S., C. Lai, L. C. Cantley and K. L. Carraway, 3rd (1998). "Differential signaling by the epidermal growth factor-like growth factors neuregulin-1 and neuregulin-2." J Biol Chem **273**(41): 26954-26961.

Curley, M. D., G. J. Sabnis, L. Wille, B. S. Adiwijaya, G. Garcia, V. Moyo, A. A. Kazi, A. Brodie and G. MacBeath (2015). "Seribantumab, an Anti-ERBB3 Antibody, Delays the Onset of Resistance and Restores Sensitivity to Letrozole in an Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Model." Mol Cancer Ther **14**(11): 2642-2652.

Dai, H., L. van't Veer, J. Lamb, Y. D. He, M. Mao, B. M. Fine, R. Bernards, M. van de Vijver, P. Deutsch, A. Sachs, *et al.* (2005). "A cell proliferation signature is a marker of extremely poor outcome in a subpopulation of breast cancer patients." Cancer Res **65**(10): 4059-4066.

Dawson, J. P., M. B. Berger, C. C. Lin, J. Schlessinger, M. A. Lemmon and K. M. Ferguson (2005). "Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface." Mol Cell Biol **25**(17): 7734-7742.

de Alava, E., A. Ocana, M. Abad, J. C. Montero, A. Esparis-Ogando, C. A. Rodriguez, A. P. Otero, T. Hernandez, J. J. Cruz and A. Pandiella (2007). "Neuregulin expression modulates clinical response to trastuzumab in patients with metastatic breast cancer." J Clin Oncol **25**(19): 2656-2663.

De Boeck, A., P. Pauwels, K. Hensen, J. L. Rummens, W. Westbroek, A. Hendrix, D. Maynard, H. Denys, K. Lambein, G. Braems, *et al.* (2013). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling." Gut **62**(4): 550-560.

De Fazio, S. R. and J. J. Gozzo (2000). "Role of graft interleukin-10 expression in the tolerogenicity of neonatal skin allografts." Transplantation **70**(9): 1371-1377.

De Laurentiis, M., D. Cianniello, R. Caputo, B. Stanzione, G. Arpino, S. Cinieri, V. Lorusso and S. De Placido (2010). "Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives." Cancer Treat Rev **36 Suppl 3**: S80-86.

De Matteis, M. A. and A. Luini (2008). "Exiting the Golgi complex." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(4): 273-284.

Del Barco, S., E. Ciruelos, I. Tusquets, M. Ruiz and A. Barnadas (2013). "SEOM clinical guidelines for the systemic treatment of early breast cancer 2013." Clin Transl Oncol **15**(12): 1011-1017.

Denny, W. A. (2001). "The 4-anilinoquinazoline class of inhibitors of the erbB family of receptor tyrosine kinases." Farmacologia **56**(1-2): 51-56.

Diamantis, N. and U. Banerji (2016). "Antibody-drug conjugates--an emerging class of cancer treatment." Br J Cancer **114**(4): 362-367.

Dienstmann, R., J. Rodon, V. Serra and J. Tabernero (2014). "Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors." Mol Cancer Ther **13**(5): 1021-1031.

- Ding, L., G. Getz, D. A. Wheeler, E. R. Mardis, M. D. McLellan, K. Cibulskis, C. Sougnez, H. Greulich, D. M. Muzny, M. B. Morgan, *et al.* (2008). "Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma." *Nature* **455**(7216): 1069-1075.
- Downward, J., Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger and M. D. Waterfield (1984). "Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences." *Nature* **307**(5951): 521-527.
- Drilon, A., R. Somwar, B. P. Mangatt, H. Edgren, P. Desmeules, A. Ruusulehto, R. S. Smith, L. Delasos, M. Vojnic, A. J. Plodkowski, *et al.* (2018). "Response to ERBB3-Directed Targeted Therapy in NRG1-Rearranged Cancers." *Cancer Discov* **8**(6): 686-695.
- Dunn, M., P. Sinha, R. Campbell, E. Blackburn, N. Levinson, R. Rampaul, T. Bates, S. Humphreys and W. J. Gullick (2004). "Co-expression of neuregulins 1, 2, 3 and 4 in human breast cancer." *J Pathol* **203**(2): 672-680.
- Ebbing, E. A., J. P. Medema, H. Damhofer, S. L. Meijer, K. K. Krishnadath, M. I. van Berge Henegouwen, M. F. Bijlsma and H. W. van Laarhoven (2016). "ADAM10-mediated release of heregulin confers resistance to trastuzumab by activating HER3." *Oncotarget* **7**(9): 10243-10254.
- Ebi, M., H. Kataoka, T. Shimura, Y. Hirata, T. Mizushima, T. Mizoshita, M. Tanaka, H. Tsukamoto, K. Ozeki, S. Tanida, *et al.* (2011). "The role of neuregulin4 and HER4 in gastrointestinal malignant lymphoma." *Mol Med Rep* **4**(6): 1151-1155.
- Eccles, S. A. (2011). "The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology." *Int J Dev Biol* **55**(7-9): 685-696.
- El-Sayed, A., S. Futaki and H. Harashima (2009). "Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment." *Aaps j* **11**(1): 13-22.
- Eschrich, S., I. Yang, G. Bloom, K. Y. Kwong, D. Boulware, A. Cantor, D. Coppola, M. Kruhoffer, L. Aaltonen, T. F. Orntoft, *et al.* (2005). "Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients." *J Clin Oncol* **23**(15): 3526-3535.
- Esparis-Ogando, A., E. Diaz-Rodriguez, J. C. Montero, L. Yuste, P. Crespo and A. Pandiella (2002). "Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2." *Mol Cell Biol* **22**(1): 270-285.
- Esparis-Ogando, A., J. C. Montero, J. Arribas, A. Ocana and A. Pandiella (2016). "Targeting the EGF/HER Ligand-Receptor System in Cancer." *Curr Pharm Des* **22**(39): 5887-5898.
- Esteva, F. J., G. N. Hortobagyi, A. A. Sahin, T. L. Smith, D. M. Chin, S. Y. Liang, L. Pusztai, A. U. Buzdar and S. S. Bacus (2001). "Expression of erbB/HER receptors, heregulin and P38 in primary breast cancer using quantitative immunohistochemistry." *Pathol Oncol Res* **7**(3): 171-177.
- Eto, K., K. Eda, S. Kanemoto and S. Abe (2006). "The immunoglobulin-like domain is involved in interaction of Neuregulin1 with ErbB." *Biochem Biophys Res Commun* **350**(2): 263-271.
- Fallin, M. D., V. K. Lasseter, P. S. Wolyniec, J. A. McGrath, G. Nestadt, D. Valle, K. Y. Liang and A. E. Pulver (2003). "Genomewide linkage scan for schizophrenia susceptibility loci among Ashkenazi Jewish families shows evidence of linkage on chromosome 10q22." *Am J Hum Genet* **73**(3): 601-611.
- Falls, D. L. (2003). "Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies." *Exp Cell Res* **284**(1): 14-30.
- Fayette, J., L. Wirth, C. Oprean, A. Udrea, A. Jimeno, D. Rischin, C. Nutting, P. M. Harari, T. Csozsi, D. Cernea, *et al.* (2016). "Randomized Phase II Study of Duligotuzumab (MEHD7945A) vs. Cetuximab in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (MEHGAN Study)." *Front Oncol* **6**: 232.
- Ferguson, K. M., M. B. Berger, J. M. Mendrola, H. S. Cho, D. J. Leahy and M. A. Lemmon (2003). "EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization." *Mol Cell* **11**(2): 507-517.
- Ferraro, D. A., N. Gaborit, R. Maron, H. Cohen-Dvashi, Z. Porat, F. Pareja, S. Lavi, M. Lindzen, N. Ben-Chetrit, M. Sela, *et al.* (2013). "Inhibition of triple-negative breast cancer models by combinations of antibodies to EGFR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(5): 1815-1820.

Fischbach, G. D. and K. M. Rosen (1997). "ARIA: a neuromuscular junction neuregulin." Annu Rev Neurosci **20**: 429-458.

Fischer, A. J. and T. A. Reh (2003). "Growth factors induce neurogenesis in the ciliary body." Dev Biol **259**(2): 225-240.

Fluge, O., L. A. Akslen, D. R. Haugen, J. E. Varhaug and J. R. Lillehaug (2000). "Expression of heregulins and associations with the ErbB family of tyrosine kinase receptors in papillary thyroid carcinomas." Int J Cancer **87**(6): 763-770.

Forster, J. A., A. B. Paul, P. Harnden and M. A. Knowles (2011). "Expression of NRG1 and its receptors in human bladder cancer." Br J Cancer **104**(7): 1135-1143.

Frederick, L., X. Y. Wang, G. Eley and C. D. James (2000). "Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas." Cancer Res **60**(5): 1383-1387.

Fry, D. W. (2003). "Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors." Exp Cell Res **284**(1): 131-139.

Fujikawa, K. and B. A. McMullen (1983). "Amino acid sequence of human beta-factor XIIa." J Biol Chem **258**(18): 10924-10933.

Gaborit, N., A. Abdul-Hai, M. Mancini, M. Lindzen, S. Lavi, O. Leitner, L. Mounier, M. Chentouf, S. Dunoyer, M. Ghosh, *et al.* (2015). "Examination of HER3 targeting in cancer using monoclonal antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(3): 839-844.

Garcia-Alonso, S., A. Ocana and A. Pandiella (2018). "Resistance to Antibody-Drug Conjugates." Cancer Res **78**(9): 2159-2165.

Garcia-Saenz, J. A., B. Bermejo, L. G. Estevez, A. G. Palomo, X. Gonzalez-Farre, M. Margeli, S. Pernas, S. Servitja, C. A. Rodriguez and E. Ciruelos (2015). "SEOM clinical guidelines in early-stage breast cancer 2015." Clin Transl Oncol **17**(12): 939-945.

Garcia de Palazzo, I. E., G. P. Adams, P. Sundareshan, A. J. Wong, J. R. Testa, D. D. Bigner and L. M. Weiner (1993). "Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas." Cancer Res **53**(14): 3217-3220.

Garrett, T. P., N. M. McKern, M. Lou, T. C. Elleman, T. E. Adams, G. O. Lovrecz, H. J. Zhu, F. Walker, M. J. Frenkel, P. A. Hoyne, *et al.* (2002). "Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha." Cell **110**(6): 763-773.

Gavila, J., S. Lopez-Tarruella, C. Saura, M. Munoz, M. Oliveira, L. De la Cruz-Merino, S. Morales, I. Alvarez, J. A. Virizueta and M. Martin (2015). "SEOM clinical guidelines in metastatic breast cancer 2015." Clin Transl Oncol **17**(12): 946-955.

Ge, H., X. Gong and C. K. Tang (2002). "Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis." Int J Cancer **98**(3): 357-361.

Gilbertson, R., R. Hernan, T. Pietsch, L. Pinto, P. Scotting, R. Allibone, D. Ellison, R. Perry, A. Pearson and J. Lunec (2001). "Novel ERBB4 juxtamembrane splice variants are frequently expressed in childhood medulloblastoma." Genes Chromosomes Cancer **31**(3): 288-294.

Gilbertson, R. J., S. C. Clifford, W. MacMeekin, W. Meekin, C. Wright, R. H. Perry, P. Kelly, A. D. Pearson and J. Lunec (1998). "Expression of the ErbB-neuregulin signaling network during human cerebellar development: implications for the biology of medulloblastoma." Cancer Res **58**(17): 3932-3941.

Gilmour, L. M., K. G. Macleod, A. McCaig, J. M. Sewell, W. J. Gullick, J. F. Smyth and S. P. Langdon (2002). "Neuregulin expression, function, and signaling in human ovarian cancer cells." Clin Cancer Res **8**(12): 3933-3942.

Golding, M., C. Ruhrberg, J. Sandle and W. J. Gullick (2004). "Mapping nucleolar and spliceosome localization sequences of neuregulin1-beta3." Exp Cell Res **299**(1): 110-118.

Goldstein, L. A., D. F. Zhou, L. J. Picker, C. N. Minty, R. F. Bargatze, J. F. Ding and E. C. Butcher (1989). "A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins." Cell **56**(6): 1063-1072.

- Goodearl, A. D., A. G. Yee, A. W. Sandrock, Jr., G. Corfas and G. D. Fischbach (1995). "ARIA is concentrated in the synaptic basal lamina of the developing chick neuromuscular junction." J Cell Biol **130**(6): 1423-1434.
- Gorgoulis, V., D. Aninos, P. Mikou, P. Kanavaros, A. Karameris, J. Joordanoglou, A. Rasidakis, M. Veslemes, B. Ozanne and D. A. Spandidos (1992a). "Expression of EGF, TGF-alpha and EGFR in squamous cell lung carcinomas." Anticancer Res **12**(4): 1183-1187.
- Gorgoulis, V., D. Aninos, C. Priftis, C. Evagelopoulou, A. Karameris, P. Kanavaros and D. A. Spandidos (1992b). "Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in thyroid tumors." In Vivo **6**(3): 291-296.
- Grandis, J. R., S. D. Drenning, Q. Zeng, S. C. Watkins, M. F. Melhem, S. Endo, D. E. Johnson, L. Huang, Y. He and J. D. Kim (2000). "Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4227-4232.
- Grimm, S. and P. Leder (1997). "An apoptosis-inducing isoform of neu differentiation factor (NDF) identified using a novel screen for dominant, apoptosis-inducing genes." J Exp Med **185**(6): 1137-1142.
- Grimm, S., E. J. Weinstein, I. M. Krane and P. Leder (1998). "Neu differentiation factor (NDF), a dominant oncogene, causes apoptosis in vitro and in vivo." J Exp Med **188**(8): 1535-1539.
- Grimsley, S. J., S. Shini, M. A. Underwood and J. Edwards (2011). "Heregulin expression and prognosis in prostate adenocarcinoma." Urol Int **87**(3): 363-368.
- Grunwald, V. and M. Hidalgo (2003). "Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment." J Natl Cancer Inst **95**(12): 851-867.
- Guan, K. L. and J. E. Dixon (1991). "Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase." Anal Biochem **192**(2): 262-267.
- Haas, S., H. Gevensleben, S. Rabstein, V. Harth, B. Pesch, T. Bruning, C. Justenhoven, H. Brauch, U. Hamann, Y. D. Ko, *et al.* (2009). "Expression of heregulin, phosphorylated HER-2, HER-3 and HER-4 in HER-2 negative breast cancers." Oncol Rep **21**(2): 299-304.
- Hansen, M. R. and F. H. Linthicum, Jr. (2004). "Expression of neuregulin and activation of erbB receptors in vestibular schwannomas: possible autocrine loop stimulation." Otol Neurotol **25**(2): 155-159.
- Harari, D., E. Tzahar, J. Romano, M. Shelly, J. H. Pierce, G. C. Andrews and Y. Yarden (1999). "Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase." Oncogene **18**(17): 2681-2689.
- Harris, L. N., L. Yang, C. Tang, D. Yang and R. Lupu (1998). "Induction of sensitivity to doxorubicin and etoposide by transfection of MCF-7 breast cancer cells with heregulin beta-2." Clin Cancer Res **4**(4): 1005-1012.
- Hayes, N. V., E. Blackburn, M. M. Boyle, G. A. Russell, T. M. Frost, B. J. Morgan and W. J. Gullick (2011). "Expression of neuregulin 4 splice variants in normal human tissues and prostate cancer and their effects on cell motility." Endocr Relat Cancer **18**(1): 39-49.
- Hayes, N. V., E. Blackburn, L. V. Smart, M. M. Boyle, G. A. Russell, T. M. Frost, B. J. Morgan, A. J. Baines and W. J. Gullick (2007). "Identification and characterization of novel spliced variants of neuregulin 4 in prostate cancer." Clin Cancer Res **13**(11): 3147-3155.
- Hayes, N. V. and W. J. Gullick (2008). "The neuregulin family of genes and their multiple splice variants in breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia **13**(2): 205-214.
- Hayes, N. V., R. J. Newsam, A. J. Baines and W. J. Gullick (2008). "Characterization of the cell membrane-associated products of the Neuregulin 4 gene." Oncogene **27**(5): 715-720.
- Hegde, G. V., C. C. de la Cruz, C. Chiu, N. Alag, G. Schaefer, L. Crocker, S. Ross, D. Goldenberg, M. Merchant, J. Tien, *et al.* (2013). "Blocking NRG1 and other ligand-mediated Her4 signaling enhances the magnitude and duration of the chemotherapeutic response of non-small cell lung cancer." Sci Transl Med **5**(171): 171ra118.
- Heldin, C. H. (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." Cell **80**(2): 213-223.

- Hijazi, M. M., E. W. Thompson, C. Tang, P. Coopman, J. A. Torri, D. Yang, S. C. Mueller and R. Lupu (2000). "Heregulin regulates the actin cytoskeleton and promotes invasive properties in breast cancer cell lines." Int J Oncol **17**(4): 629-641.
- Hobbs, S. S., S. L. Coffing, A. T. Le, E. M. Cameron, E. E. Williams, M. Andrew, E. N. Blommel, R. P. Hammer, H. Chang and D. J. Riese, 2nd (2002). "Neuregulin isoforms exhibit distinct patterns of ErbB family receptor activation." Oncogene **21**(55): 8442-8452.
- Holbro, T., R. R. Beerli, F. Maurer, M. Koziczak, C. F. Barbás, 3rd and N. E. Hynes (2003). "The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8933-8938.
- Holmes, W. E., M. X. Sliwkowski, R. W. Akita, W. J. Henzel, J. Lee, J. W. Park, D. Yansura, N. Abadi, H. Raab, G. D. Lewis, *et al.* (1992). "Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2." Science **256**(5060): 1205-1210.
- Howard, B. A. (2008). "The role of NRG3 in mammary development." J Mammary Gland Biol Neoplasia **13**(2): 195-203.
- Hsieh, S. Y., J. R. He, C. Y. Hsu, W. J. Chen, R. Bera, K. Y. Lin, T. C. Shih, M. C. Yu, Y. J. Lin, C. J. Chang, *et al.* (2011). "Neuregulin/erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 autocrine loop contributes to invasion and early recurrence of human hepatoma." Hepatology **53**(2): 504-516.
- Hudziak, R. M., G. D. Lewis, M. Winget, B. M. Fendly, H. M. Shepard and A. Ullrich (1989). "p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor." Mol Cell Biol **9**(3): 1165-1172.
- Huotari, M. A., P. J. Miettinen, J. Palgi, T. Koivisto, J. Ustinov, D. Harari, Y. Yarden and T. Otonkoski (2002). "ErbB signaling regulates lineage determination of developing pancreatic islet cells in embryonic organ culture." Endocrinology **143**(11): 4437-4446.
- Hynes, N. E. and H. A. Lane (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." Nat Rev Cancer **5**(5): 341-354.
- Irish, J. C. and A. Bernstein (1993). "Oncogenes in head and neck cancer." Laryngoscope **103**(1 Pt 1): 42-52.
- Ishizawar, R. and S. J. Parsons (2004). "c-*Src* and cooperating partners in human cancer." Cancer Cell **6**(3): 209-214.
- Ishizawar, R. C., T. Miyake and S. J. Parsons (2007). "c-*Src* modulates ErbB2 and ErbB3 heterocomplex formation and function." Oncogene **26**(24): 3503-3510.
- Jaiswal, B. S., N. M. Kljavin, E. W. Stawiski, E. Chan, C. Parikh, S. Durinck, S. Chaudhuri, K. Pujara, J. Guillory, K. A. Edgar, *et al.* (2013). "Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers." Cancer Cell **23**(5): 603-617.
- Jeong, H., J. Kim, Y. Lee, J. H. Seo, S. R. Hong and A. Kim (2014). "Neuregulin-1 induces cancer stem cell characteristics in breast cancer cell lines." Oncol Rep **32**(3): 1218-1224.
- Jones, C., A. Mackay, A. Grigoriadis, A. Cossu, J. S. Reis-Filho, L. Fulford, T. Dexter, S. Davies, K. Bulmer, E. Ford, *et al.* (2004). "Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer." Cancer Res **64**(9): 3037-3045.
- Jones, J. T., R. W. Akita and M. X. Sliwkowski (1999). "Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors." FEBS Lett **447**(2-3): 227-231.
- Jones, M. R., H. Lim, Y. Shen, E. Pleasance, C. Ch'ng, C. Reisle, S. Leelakumari, C. Zhao, S. Yip, J. Ho, *et al.* (2017). "Successful targeting of the NRG1 pathway indicates novel treatment strategy for metastatic cancer." Ann Oncol **28**(12): 3092-3097.
- Junttila, T. T., G. Li, K. Parsons, G. L. Phillips and M. X. Sliwkowski (2011). "Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer." Breast Cancer Res Treat **128**(2): 347-356.
- Kalim, M., J. Chen, S. Wang, C. Lin, S. Ullah, K. Liang, Q. Ding, S. Chen and J. Zhan (2017). "Intracellular trafficking of new anticancer therapeutics: antibody-drug conjugates." Drug Des Devel Ther **11**: 2265-2276.

- Kappeler, F., D. R. Klopfenstein, M. Foguet, J. P. Paccaud and H. P. Hauri (1997). "The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII." J Biol Chem **272**(50): 31801-31808.
- Khaleque, M. A., A. Bharti, D. Sawyer, J. Gong, I. J. Benjamin, M. A. Stevenson and S. K. Calderwood (2005). "Induction of heat shock proteins by heregulin beta1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth." Oncogene **24**(43): 6564-6573.
- Kim, J., S. J. Jang, C. M. Choi and J. Y. Ro (2016). "Correlation of Histologic Subtypes and Molecular Alterations in Pulmonary Adenocarcinoma: Therapeutic and Prognostic Implications." Adv Anat Pathol **23**(5): 330-338.
- King, C. R., M. H. Kraus and S. A. Aaronson (1985). "Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma." Science **229**(4717): 974-976.
- Kinugasa, Y., H. Ishiguro, Y. Tokita, A. Oohira, H. Ohmoto and S. Higashiyama (2004). "Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family." Biochem Biophys Res Commun **321**(4): 1045-1049.
- Kleizen, B. and I. Braakman (2004). "Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum." Curr Opin Cell Biol **16**(4): 343-349.
- Kolb, A., J. Kleeff, N. Arnold, N. A. Giese, T. Giese, M. Korc and H. Friess (2007). "Expression and differential signaling of heregulins in pancreatic cancer cells." Int J Cancer **120**(3): 514-523.
- Krane, I. M. and P. Leder (1996). "NDF/heregulin induces persistence of terminal end buds and adenocarcinomas in the mammary glands of transgenic mice." Oncogene **12**(8): 1781-1788.
- Kraus, M. H., W. Issing, T. Miki, N. C. Popescu and S. A. Aaronson (1989). "Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9193-9197.
- Krop, I. E., S. B. Kim, A. G. Martin, P. M. LoRusso, J. M. Ferrero, T. Badovinac-Crnjevic, S. Hoersch, M. Smitt and H. Wildiers (2017). "Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice in patients with previously treated HER2-positive metastatic breast cancer (TH3RESA): final overall survival results from a randomised open-label phase 3 trial." Lancet Oncol **18**(6): 743-754.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lakhani, S. R. and M. J. O'Hare (2001). "The mammary myoepithelial cell--Cinderella or ugly sister?" Breast Cancer Res **3**(1): 1-4.
- Lambert, J. M. and R. V. Chari (2014). "Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): an antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer." J Med Chem **57**(16): 6949-6964.
- Lambert, J. M. and C. Q. Morris (2017). "Antibody-Drug Conjugates (ADCs) for Personalized Treatment of Solid Tumors: A Review." Adv Ther **34**(5): 1015-1035.
- Lane, H. A., I. Beuvink, A. B. Motoyama, J. M. Daly, R. M. Neve and N. E. Hynes (2000). "ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency." Mol Cell Biol **20**(9): 3210-3223.
- Laughner, E., P. Taghavi, K. Chiles, P. C. Mahon and G. L. Semenza (2001). "HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression." Mol Cell Biol **21**(12): 3995-4004.
- Lee, D. C., S. W. Sunnarborg, C. L. Hinkle, T. J. Myers, M. Y. Stevenson, W. E. Russell, B. J. Castner, M. J. Gerhart, R. J. Paxton, R. A. Black, *et al.* (2003). "TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase." Ann N Y Acad Sci **995**: 22-38.
- Leimeroth, R., C. Lobsiger, A. Lussi, V. Taylor, U. Suter and L. Sommer (2002). "Membrane-bound neuregulin1 type III actively promotes Schwann cell differentiation of multipotent Progenitor cells." Dev Biol **246**(2): 245-258.
- Leung, H. Y., J. Weston, W. J. Gullick and G. Williams (1997). "A potential autocrine loop between heregulin-alpha and erbB-3 receptor in human prostatic adenocarcinoma." Br J Urol **79**(2): 212-216.

- Levitzki, A. and A. Gazit (1995). "Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development." Science **267**(5205): 1782-1788.
- Lewis, G. D., J. A. Lofgren, A. E. McMurtrey, A. Nuijens, B. M. Fendly, K. D. Bauer and M. X. Sliwkowski (1996). "Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: Evidence for the requirement of ErbB2 as a critical component in mediating heregulin responsiveness." Cancer Res **56**(6): 1457-1465.
- Lewis Phillips, G. D., G. Li, D. L. Dugger, L. M. Crocker, K. L. Parsons, E. Mai, W. A. Blattler, J. M. Lambert, R. V. Chari, R. J. Lutz, *et al.* (2008). "Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate." Cancer Res **68**(22): 9280-9290.
- Li, L., S. Cleary, M. A. Mandarano, W. Long, C. Birchmeier and F. E. Jones (2002). "The breast proto-oncogene, HRGalpha regulates epithelial proliferation and lobuloalveolar development in the mouse mammary gland." Oncogene **21**(32): 4900-4907.
- Li, Q., S. Ahmed and J. A. Loeb (2004). "Development of an autocrine neuregulin signaling loop with malignant transformation of human breast epithelial cells." Cancer Res **64**(19): 7078-7085.
- Li, W., J. W. Park, A. Nuijens, M. X. Sliwkowski and G. A. Keller (1996). "Heregulin is rapidly translocated to the nucleus and its transport is correlated with c-myc induction in breast cancer cells." Oncogene **12**(11): 2473-2477.
- Li, Y., G. I. Tennekoon, M. Birnbaum, M. A. Marchionni and J. L. Rutkowski (2001). "Neuregulin signaling through a PI3K/Akt/Bad pathway in Schwann cell survival." Mol Cell Neurosci **17**(4): 761-767.
- Lin, A. and H. S. Rugo (2007). "The role of trastuzumab in early stage breast cancer: current data and treatment recommendations." Curr Treat Options Oncol **8**(1): 47-60.
- Linggi, B. and G. Carpenter (2006). "ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology." Trends Cell Biol **16**(12): 649-656.
- Loeb, J. A. and G. D. Fischbach (1995). "ARIA can be released from extracellular matrix through cleavage of a heparin-binding domain." J Cell Biol **130**(1): 127-135.
- Loeb, J. A., T. S. Khurana, J. T. Robbins, A. G. Yee and G. D. Fischbach (1999). "Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development." Development **126**(4): 781-791.
- Lu, H. S., D. Chang, J. S. Philo, K. Zhang, L. O. Narhi, N. Liu, M. Zhang, J. Sun, J. Wen, D. Yanagihara, *et al.* (1995). "Studies on the structure and function of glycosylated and nonglycosylated neu differentiation factors. Similarities and differences of the alpha and beta isoforms." J Biol Chem **270**(9): 4784-4791.
- Lupu, R., M. Cardillo, C. Cho, L. Harris, M. Hijazi, C. Perez, K. Rosenberg, D. Yang and C. Tang (1996). "The significance of heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance." Breast Cancer Res Treat **38**(1): 57-66.
- Lyne, J. C., M. F. Melhem, G. G. Finley, D. Wen, N. Liu, D. H. Deng and R. Salup (1997). "Tissue expression of neu differentiation factor/hergulin and its receptor complex in prostate cancer and its biologic effects on prostate cancer cells in vitro." Cancer J Sci Am **3**(1): 21-30.
- Mack, F., M. Ritchie and P. Sapra (2014). "The next generation of antibody drug conjugates." Semin Oncol **41**(5): 637-652.
- MacMillan, C. D., H. S. Leong, D. W. Dales, A. E. Robertson, J. D. Lewis, A. F. Chambers and A. B. Tuck (2014). "Stage of breast cancer progression influences cellular response to activation of the WNT/planar cell polarity pathway." Sci Rep **4**: 6315.
- Mandal, M., R. Vadlamudi, D. Nguyen, R. A. Wang, L. Costa, R. Bagheri-Yarmand, J. Mendelsohn and R. Kumar (2001). "Growth factors regulate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K expression and function." J Biol Chem **276**(13): 9699-9704.
- Marchionni, M. A., A. D. Goodearl, M. S. Chen, O. Bermingham-McDonogh, C. Kirk, M. Hendricks, F. Danehy, D. Misumi, J. Sudhalter, K. Kobayashi, *et al.* (1993). "Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system." Nature **362**(6418): 312-318.

- Marshall, C., E. Blackburn, M. Clark, S. Humphreys and W. J. Gullick (2006). "Neuregulins 1-4 are expressed in the cytoplasm or nuclei of ductal carcinoma (in situ) of the human breast." Breast Cancer Res Treat **96**(2): 163-168.
- Massague, J. and A. Pandiella (1993). "Membrane-anchored growth factors." Annu Rev Biochem **62**: 515-541.
- Matlack, K. E., W. Mothes and T. A. Rapoport (1998). "Protein translocation: tunnel vision." Cell **92**(3): 381-390.
- Mazumdar, A., L. Adam, D. Boyd and R. Kumar (2001). "Heregulin regulation of urokinase plasminogen activator and its receptor: human breast epithelial cell invasion." Cancer Res **61**(1): 400-405.
- McKay, I. A., H. Paterson, R. Brown, D. Toksoz, C. J. Marshall and A. Hall (1986). "N-ras and human cancer." Anticancer Res **6**(3 Pt B): 483-490.
- Meetze, K., S. Vincent, S. Tyler, E. K. Mazsa, A. R. Delpero, S. Bottega, D. McIntosh, R. Nicoletti, W. M. Winston, S. Weiler, *et al.* (2015). "Neuregulin 1 expression is a predictive biomarker for response to AV-203, an ERBB3 inhibitory antibody, in human tumor models." Clin Cancer Res **21**(5): 1106-1114.
- Mei, L. and W. C. Xiong (2008). "Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia." Nat Rev Neurosci **9**(6): 437-452.
- Meiners, S., V. Brinkmann, H. Naundorf and W. Birchmeier (1998). "Role of morphogenetic factors in metastasis of mammary carcinoma cells." Oncogene **16**(1): 9-20.
- Memon, A. A., B. S. Sorensen, P. Melgard, L. Fokdal, T. Thykjaer and E. Nexø (2004). "Expression of HER3, HER4 and their ligand heregulin-4 is associated with better survival in bladder cancer patients." Br J Cancer **91**(12): 2034-2041.
- Menendez, J. A., I. Mehmi and R. Lupu (2006). "Trastuzumab in combination with heregulin-activated Her-2 (erbB-2) triggers a receptor-enhanced chemosensitivity effect in the absence of Her-2 overexpression." J Clin Oncol **24**(23): 3735-3746.
- Meyer, D. and C. Birchmeier (1995). "Multiple essential functions of neuregulin in development." Nature **378**(6555): 386-390.
- Meyer, D., T. Yamaai, A. Garratt, E. Riethmacher-Sonnenberg, D. Kane, L. E. Theill and C. Birchmeier (1997). "Isoform-specific expression and function of neuregulin." Development **124**(18): 3575-3586.
- Miralem, T. and H. K. Avraham (2003). "Extracellular matrix enhances heregulin-dependent BRCA1 phosphorylation and suppresses BRCA1 expression through its C terminus." Mol Cell Biol **23**(2): 579-593.
- Mitsui, K., M. Yonezawa, A. Tatsuguchi, S. Shinji, K. Gudis, S. Tanaka, S. Fujimori and C. Sakamoto (2014). "Localization of phosphorylated ErbB1-4 and heregulin in colorectal cancer." BMC Cancer **14**: 863.
- Montero, J. C., R. Rodriguez-Barrueco, A. Ocana, E. Diaz-Rodriguez, A. Esparis-Ogando and A. Pandiella (2008). "Neuregulins and cancer." Clin Cancer Res **14**(11): 3237-3241.
- Montero, J. C., R. Rodriguez-Barrueco and A. Pandiella (2011a). "Transautocrine signaling by membrane neuregulins requires cell surface targeting, which is controlled by multiple domains." J Biol Chem **286**(27): 24350-24363.
- Montero, J. C., R. Rodriguez-Barrueco, L. Yuste, P. P. Juanes, J. Borges, A. Esparis-Ogando and A. Pandiella (2007). "The extracellular linker of pro-neuregulin- α 2c is required for efficient sorting and juxtacrine function." Mol Biol Cell **18**(2): 380-393.
- Montero, J. C., S. Seoane, S. Garcia-Alonso and A. Pandiella (2016). "Multisite phosphorylation of P-Rex1 by protein kinase C." Oncotarget **7**(47): 77937-77949.
- Montero, J. C., S. Seoane, A. Ocana and A. Pandiella (2011b). "P-Rex1 participates in Neuregulin-ErbB signal transduction and its expression correlates with patient outcome in breast cancer." Oncogene **30**(9): 1059-1071.

Montero, J. C., L. Yuste, E. Diaz-Rodriguez, A. Esparis-Ogando and A. Pandiella (2000). "Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." Mol Cell Neurosci **16**(5): 631-648.

Montero, J. C., L. Yuste, E. Diaz-Rodriguez, A. Esparis-Ogando and A. Pandiella (2002). "Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent routes control shedding of transmembrane growth factors through multiple secretases." Biochem J **363**(Pt 2): 211-221.

Morar, B., M. Dragovic, F. A. Waters, D. Chandler, L. Kalaydjieva and A. Jablensky (2011). "Neuregulin 3 (NRG3) as a susceptibility gene in a schizophrenia subtype with florid delusions and relatively spared cognition." Mol Psychiatry **16**(8): 860-866.

Morrissey, T. K., N. Kleitman and R. P. Bunge (1995). "Human Schwann cells in vitro. II. Myelination of sensory axons following extensive purification and heregulin-induced expansion." J Neurobiol **28**(2): 190-201.

Moscatello, D. K., M. Holgado-Madruga, A. K. Godwin, G. Ramirez, G. Gunn, P. W. Zoltick, J. A. Biegel, R. L. Hayes and A. J. Wong (1995). "Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors." Cancer Res **55**(23): 5536-5539.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.

Motoyama, A. B., N. E. Hynes and H. A. Lane (2002). "The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides." Cancer Res **62**(11): 3151-3158.

Nakano, N., S. Higashiyama, H. Ohmoto, H. Ishiguro, N. Taniguchi and Y. Wada (2004). "The N-terminal region of NTAK/neuregulin-2 isoforms has an inhibitory activity on angiogenesis." J Biol Chem **279**(12): 11465-11470.

Nishimura, N. and W. E. Balch (1997). "A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum." Science **277**(5325): 556-558.

Normanno, N., N. Kim, D. Wen, K. Smith, A. L. Harris, G. Plowman, G. Colletta, F. Ciardiello and D. S. Salomon (1995). "Expression of messenger RNA for amphiregulin, heregulin, and cripto-1, three new members of the epidermal growth factor family, in human breast carcinomas." Breast Cancer Res Treat **35**(3): 293-297.

Ocana, A., L. Diez-Gonzalez, A. Esparis-Ogando, J. C. Montero, E. Amir and A. Pandiella (2016). "Neuregulin expression in solid tumors: prognostic value and predictive role to anti-HER3 therapies." Oncotarget **7**(29): 45042-45051.

Ocana, A. and A. Pandiella (2010). "Personalized therapies in the cancer "omics" era." Mol Cancer **9**: 202.

Ocana, A. and A. Pandiella (2013). "Targeting HER receptors in cancer." Curr Pharm Des **19**(5): 808-817.

Ocana, A., F. Vera-Badillo, B. Seruga, A. Templeton, A. Pandiella and E. Amir (2013). "HER3 overexpression and survival in solid tumors: a meta-analysis." J Natl Cancer Inst **105**(4): 266-273.

Ogier, C., P. E. Colombo, C. Bousquet, L. Canterel-Thouennon, P. Sicard, V. Garambois, G. Thomas, N. Gaborit, M. Jarlier, N. Piro, *et al.* (2018). "Targeting the NRG1/HER3 pathway in tumor cells and cancer-associated fibroblasts with an anti-neuregulin 1 antibody inhibits tumor growth in pre-clinical models of pancreatic cancer." Cancer Lett **432**: 227-236.

Ogiso, H., R. Ishitani, O. Nureki, S. Fukai, M. Yamanaka, J. H. Kim, K. Saito, A. Sakamoto, M. Inoue, M. Shirouzu, *et al.* (2002). "Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains." Cell **110**(6): 775-787.

Okamoto, I., L. C. Kenyon, D. R. Emlet, T. Mori, J. Sasaki, S. Hirotsako, Y. Ichikawa, H. Kishi, A. K. Godwin, M. Yoshioka, *et al.* (2003). "Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer." Cancer Sci **94**(1): 50-56.

Okazaki, S., F. Nakatani, K. Masuko, K. Tsuchihashi, S. Ueda, T. Masuko, H. Saya and O. Nagano (2016). "Development of an ErbB4 monoclonal antibody that blocks neuregulin-1-induced ErbB4 activation in cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **470**(1): 239-244.

- Olayioye, M. A., D. Graus-Porta, R. R. Beerli, J. Rohrer, B. Gay and N. E. Hynes (1998). "ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner." Mol Cell Biol **18**(9): 5042-5051.
- Olopade, O. I., T. A. Grushko, R. Nanda and D. Huo (2008). "Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine." Clin Cancer Res **14**(24): 7988-7999.
- Orive-Ramos, A., S. Seoane, A. Ocana, A. Pandiella and J. C. Montero (2017). "Regulation of the prometastatic neuregulin-MMP13 axis by SRC family kinases: therapeutic implications." Mol Oncol **11**(12): 1788-1805.
- Ota, K., M. Sakaguchi, G. von Heijne, N. Hamasaki and K. Mihara (1998). "Forced transmembrane orientation of hydrophilic polypeptide segments in multispinning membrane proteins." Mol Cell **2**(4): 495-503.
- Paez, J. G., P. A. Janne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, *et al.* (2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." Science **304**(5676): 1497-1500.
- Paik, S., C. Kim and N. Wolmark (2008). "HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer." N Engl J Med **358**(13): 1409-1411.
- Pao, W. and J. Chmielecki (2010). "Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer." Nat Rev Cancer **10**(11): 760-774.
- Patthy, L., M. Trexler, Z. Vali, L. Banyai and A. Varadi (1984). "Kringles: modules specialized for protein binding. Homology of the gelatin-binding region of fibronectin with the kringle structures of proteases." FEBS Lett **171**(1): 131-136.
- Peles, E., S. S. Bacus, R. A. Koski, H. S. Lu, D. Wen, S. G. Ogden, R. B. Levy and Y. Yarden (1992). "Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells." Cell **69**(1): 205-216.
- Peles, E., R. Ben-Levy, E. Tzahar, N. Liu, D. Wen and Y. Yarden (1993). "Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/hergulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships." Embo j **12**(3): 961-971.
- Perez-Tenorio, G. and O. Stal (2002). "Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients." Br J Cancer **86**(4): 540-545.
- Perez, E. A., C. Barrios, W. Eiermann, M. Toi, Y. H. Im, P. Conte, M. Martin, T. Pienkowski, X. Pivot, H. Burris, 3rd, *et al.* (2017). "Trastuzumab Emtansine With or Without Pertuzumab Versus Trastuzumab Plus Taxane for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive, Advanced Breast Cancer: Primary Results From the Phase III MARIANNE Study." J Clin Oncol **35**(2): 141-148.
- Perez, H. L., P. M. Cardarelli, S. Deshpande, S. Gangwar, G. M. Schroeder, G. D. Vite and R. M. Borzilleri (2014). "Antibody-drug conjugates: current status and future directions." Drug Discov Today **19**(7): 869-881.
- Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslén, *et al.* (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature **406**(6797): 747-752.
- Pfeifer, A. and L. S. Hoffmann (2015). "Brown, beige, and white: the new color code of fat and its pharmacological implications." Annu Rev Pharmacol Toxicol **55**: 207-227.
- Phillips, G. D., C. T. Fields, G. Li, D. Dowbenko, G. Schaefer, K. Miller, F. Andre, H. A. Burris, 3rd, K. S. Albain, N. Harbeck, *et al.* (2014). "Dual targeting of HER2-positive cancer with trastuzumab emtansine and pertuzumab: critical role for neuregulin blockade in antitumor response to combination therapy." Clin Cancer Res **20**(2): 456-468.
- Pinkas-Kramarski, R., R. Eilam, O. Spiegler, S. Lavi, N. Liu, D. Chang, D. Wen, M. Schwartz and Y. Yarden (1994). "Brain neurons and glial cells express Neu differentiation factor/hergulin: a survival factor for astrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9387-9391.
- Plowman, G. D., J. M. Culouscou, G. S. Whitney, J. M. Green, G. W. Carlton, L. Foy, M. G. Neubauer and M. Shoyab (1993). "Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 1746-1750.

Prat, A. and C. M. Perou (2011). "Deconstructing the molecular portraits of breast cancer." Mol Oncol **5**(1): 5-23.

Prenzel, N., O. M. Fischer, S. Streit, S. Hart and A. Ullrich (2001). "The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification." Endocr Relat Cancer **8**(1): 11-31.

Prickett, T. D., N. S. Agrawal, X. Wei, K. E. Yates, J. C. Lin, J. R. Wunderlich, J. C. Cronin, P. Cruz, S. A. Rosenberg and Y. Samuels (2009). "Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4." Nat Genet **41**(10): 1127-1132.

Qian, G., N. Jiang, D. Wang, S. Newman, S. Kim, Z. Chen, G. Garcia, G. MacBeath, D. M. Shin, F. R. Khuri, *et al.* (2015). "Heregulin and HER3 are prognostic biomarkers in oropharyngeal squamous cell carcinoma." Cancer **121**(20): 3600-3611.

Raj, E. H., A. Skinner, U. Mahji, K. N. Nirmala, K. Ravichandran, V. Shanta, H. C. Hurst, W. J. Gullick and T. Rajkumar (2001). "Neuregulin 1-alpha expression in locally advanced breast cancer." Breast **10**(1): 41-45.

Rakha, E. A., M. E. El-Sayed, J. S. Reis-Filho and I. O. Ellis (2008). "Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer." Histopathology **52**(1): 67-81.

Reddy, K. B. (2011). "Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options." Curr Oncol **18**(4): e173-179.

Revillion, F., V. Lhotellier, L. Hornez, J. Bonnetterre and J. P. Peyrat (2008). "ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis." Ann Oncol **19**(1): 73-80.

Riese, D. J., 2nd, R. M. Gallo and J. Settleman (2007). "Mutational activation of ErbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis." Bioessays **29**(6): 558-565.

Riese, D. J., 2nd, T. M. van Raaij, G. D. Plowman, G. C. Andrews and D. F. Stern (1995). "The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family." Mol Cell Biol **15**(10): 5770-5776.

Ring, H. Z., H. Chang, A. Guilbot, A. Brice, E. LeGuern and U. Francke (1999). "The human neuregulin-2 (NRG2) gene: cloning, mapping and evaluation as a candidate for the autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease linked to 5q." Hum Genet **104**(4): 326-332.

Rios-Luci, C., S. Garcia-Alonso, E. Diaz-Rodriguez, M. Nadal-Serrano, J. Arribas, A. Ocana and A. Pandiella (2017). "Resistance to the Antibody-Drug Conjugate T-DM1 Is Based in a Reduction in Lysosomal Proteolytic Activity." Cancer Res **77**(17): 4639-4651.

Ritchie, M., L. Tchistiakova and N. Scott (2013). "Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates." MAbs **5**(1): 13-21.

Roskoski, R., Jr. (2005). "Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor." Biochem Biophys Res Commun **337**(1): 1-13.

Salzer, J. L., R. P. Bunge and L. Glaser (1980). "Studies of Schwann cell proliferation. III. Evidence for the surface localization of the neurite mitogen." J Cell Biol **84**(3): 767-778.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez-Martin, M. and A. Pandiella (2012). "Differential action of small molecule HER kinase inhibitors on receptor heterodimerization: therapeutic implications." Int J Cancer **131**(1): 244-252.

Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-225.

Schlessinger, J. (2004). "Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors." Science **306**(5701): 1506-1507.

Schroering, A. and D. J. Carey (1998). "Sensory and motor neuron-derived factor is a transmembrane heregulin that is expressed on the plasma membrane with the active domain exposed to the extracellular environment." J Biol Chem **273**(46): 30643-30650.

- Schwarz, L. J., K. E. Hutchinson, B. N. Rexer, M. V. Estrada, P. I. Gonzalez Ericsson, M. E. Sanders, T. C. Dugger, L. Formisano, A. Guerrero-Zotano, M. Red-Brewer, *et al.* (2017). "An ERBB1-3 Neutralizing Antibody Mixture With High Activity Against Drug-Resistant HER2+ Breast Cancers With ERBB Ligand Overexpression." *J Natl Cancer Inst* **109**(11).
- Seoane, S., J. C. Montero, A. Ocana and A. Pandiella (2016). "Breast cancer dissemination promoted by a neuregulin-collagenase 3 signalling node." *Oncogene* **35**(21): 2756-2765.
- Sequist, L. V., J. C. Yang, N. Yamamoto, K. O'Byrne, V. Hirsh, T. Mok, S. L. Geater, S. Orlov, C. M. Tsai, M. Boyer, *et al.* (2013). "Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations." *J Clin Oncol* **31**(27): 3327-3334.
- Shames, D. S., J. Carbon, K. Walter, A. M. Jubb, C. Kozlowski, T. Januario, A. Do, L. Fu, Y. Xiao, R. Raja, *et al.* (2013). "High heregulin expression is associated with activated HER3 and may define an actionable biomarker in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck." *PLoS One* **8**(2): e56765.
- Sheng, Q., X. Liu, E. Fleming, K. Yuan, H. Piao, J. Chen, Z. Moustafa, R. K. Thomas, H. Greulich, A. Schinzel, *et al.* (2010). "An activated ErbB3/NRG1 autocrine loop supports in vivo proliferation in ovarian cancer cells." *Cancer Cell* **17**(3): 298-310.
- Shi, F., S. E. Telesco, Y. Liu, R. Radhakrishnan and M. A. Lemmon (2010). "ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(17): 7692-7697.
- Shin, D. H., D. Lee, D. W. Hong, S. H. Hong, J. A. Hwang, B. I. Lee, H. J. You, G. K. Lee, I. H. Kim, Y. S. Lee, *et al.* (2016). "Oncogenic function and clinical implications of SLC3A2-*NRG1* fusion in invasive mucinous adenocarcinoma of the lung." *Oncotarget* **7**(43): 69450-69465.
- Shirakabe, K., S. Wakatsuki, T. Kurisaki and A. Fujisawa-Sehara (2001). "Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin." *J Biol Chem* **276**(12): 9352-9358.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich and W. L. McGuire (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene." *Science* **235**(4785): 177-182.
- Sliwkowski, M. X., G. Schaefer, R. W. Akita, J. A. Lofgren, V. D. Fitzpatrick, A. Nuijens, B. M. Fendly, R. A. Cerione, R. L. Vandlen and K. L. Carraway, 3rd (1994). "Coexpression of *erbB2* and *erbB3* proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin." *J Biol Chem* **269**(20): 14661-14665.
- Sok, J. C., F. M. Coppelli, S. M. Thomas, M. N. Lango, S. Xi, J. L. Hunt, M. L. Freilino, M. W. Graner, C. J. Wikstrand, D. D. Bigner, *et al.* (2006). "Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting." *Clin Cancer Res* **12**(17): 5064-5073.
- Sorkin, A. and L. K. Goh (2009). "Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs." *Exp Cell Res* **315**(4): 683-696.
- Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, *et al.* (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10869-10874.
- Sorlie, T., Y. Wang, C. Xiao, H. Johnsen, B. Naume, R. R. Samaha and A. L. Borresen-Dale (2006). "Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms." *BMC Genomics* **7**: 127.
- Srinivasan, R., E. Benton, F. McCormick, H. Thomas and W. J. Gullick (1999). "Expression of the c-*erbB-3*/*HER-3* and c-*erbB-4*/*HER-4* growth factor receptors and their ligands, neuregulin-1 alpha, neuregulin-1 beta, and betacellulin, in normal endometrium and endometrial cancer." *Clin Cancer Res* **5**(10): 2877-2883.
- Stahler, A., V. Heinemann, J. Neumann, A. Crispin, A. Schalhorn, S. Stintzing, C. Giessen-Jung, L. Fischer von Weikersthal, U. Vehling-Kaiser, M. Stauch, *et al.* (2017). "Prevalence and influence on outcome of HER2/*neu*, HER3 and NRG1 expression in patients with metastatic colorectal cancer." *Anticancer Drugs* **28**(7): 717-722.

Steinthorsdottir, V., H. Stefansson, S. Ghosh, B. Birgisdottir, S. Bjornsdottir, A. C. Fasquel, O. Olafsson, K. Stefansson and J. R. Gulcher (2004). "Multiple novel transcription initiation sites for NRG1." *Gene* **342**(1): 97-105.

Stove, C. and M. Bracke (2004). "Roles for neuregulins in human cancer." *Clin Exp Metastasis* **21**(8): 665-684.

Sung, M., X. Tan, B. Lu, J. Golas, C. Hosselet, F. Wang, L. Tylaska, L. King, D. Zhou, R. Dushin, *et al.* (2018). "Caveolae-Mediated Endocytosis as a Novel Mechanism of Resistance to Trastuzumab Emtansine (T-DM1)." *Mol Cancer Ther* **17**(1): 243-253.

Swain, S. M., Y. H. Im, S. A. Im, V. Chan, D. Miles, A. Knott, E. Clark, G. Ross and J. Baselga (2014). "Safety profile of Pertuzumab with Trastuzumab and Docetaxel in patients from Asia with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: results from the phase III trial CLEOPATRA." *Oncologist* **19**(7): 693-701.

Sweeney, C., D. Fambrough, C. Huard, A. J. Diamonti, E. S. Lander, L. C. Cantley and K. L. Carraway, 3rd (2001). "Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors." *J Biol Chem* **276**(25): 22685-22698.

Tamaskovic, R., M. Schwill, G. Nagy-Davidescu, C. Jost, D. C. Schaefer, W. P. Verdurmen, J. V. Schaefer, A. Honegger and A. Pluckthun (2016). "Intermolecular biparatopic trapping of ErbB2 prevents compensatory activation of PI3K/AKT via RAS-p110 crosstalk." *Nat Commun* **7**: 11672.

Tang, C. K., C. Perez, T. Grunt, C. Waibel, C. Cho and R. Lupu (1996). "Involvement of heregulin-beta2 in the acquisition of the hormone-independent phenotype of breast cancer cells." *Cancer Res* **56**(14): 3350-3358.

Tebbutt, N., M. W. Pedersen and T. G. Johns (2013). "Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy." *Nat Rev Cancer* **13**(9): 663-673.

Tsai, M. S., L. A. Shamon-Taylor, I. Mehmi, C. K. Tang and R. Lupu (2003). "Blockage of heregulin expression inhibits tumorigenicity and metastasis of breast cancer." *Oncogene* **22**(5): 761-768.

Tsai, Y. J., R. K. Lee, S. P. Lin and Y. H. Chen (2000). "Identification of a novel platelet-derived growth factor-like gene, fallotein, in the human reproductive tract." *Biochim Biophys Acta* **1492**(1): 196-202.

Tzahar, E., G. Levkowitz, D. Karunakaran, L. Yi, E. Peles, S. Lavi, D. Chang, N. Liu, A. Yayon, D. Wen, *et al.* (1994). "ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/hergulin isoforms." *J Biol Chem* **269**(40): 25226-25233.

Tzahar, E., H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunakaran, S. Lavi, B. J. Ratzkin and Y. Yarden (1996). "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5276-5287.

Ullrich, A., L. Coussens, J. S. Hayflick, T. J. Dull, A. Gray, A. W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T. A. Libermann, J. Schlessinger, *et al.* (1984). "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells." *Nature* **309**(5967): 418-425.

Vadlamudi, R., L. Adam, A. Talukder, J. Mendelsohn and R. Kumar (1999). "Serine phosphorylation of paxillin by heregulin-beta1: role of p38 mitogen activated protein kinase." *Oncogene* **18**(51): 7253-7264.

Vadlamudi, R. K., L. Adam, D. Nguyen, M. Santos and R. Kumar (2002). "Differential regulation of components of the focal adhesion complex by heregulin: role of phosphatase SHP-2." *J Cell Physiol* **190**(2): 189-199.

Venkateswarlu, S., D. M. Dawson, P. St Clair, A. Gupta, J. K. Willson and M. G. Brattain (2002). "Autocrine heregulin generates growth factor independence and blocks apoptosis in colon cancer cells." *Oncogene* **21**(1): 78-86.

Verma, S., D. Miles, L. Gianni, I. E. Krop, M. Welslau, J. Baselga, M. Pegram, D. Y. Oh, V. Dieras, E. Guardino, *et al.* (2012). "Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer." *N Engl J Med* **367**(19): 1783-1791.

Vezina, H. E., M. Cotreau, T. H. Han and M. Gupta (2017). "Antibody-Drug Conjugates as Cancer Therapeutics: Past, Present, and Future." *J Clin Pharmacol* **57** Suppl 10: S11-s25.

- Visscher, D. W., F. H. Sarkar, T. C. Kasunic and K. B. Reddy (1997). "Clinicopathologic analysis of amphiregulin and heregulin immunostaining in breast neoplasia." Breast Cancer Res Treat **45**(1): 75-80.
- Wang, G. X., X. Y. Zhao, Z. X. Meng, M. Kern, A. Dietrich, Z. Chen, Z. Cozacov, D. Zhou, A. L. Okunade, X. Su, *et al.* (2014). "The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis." Nat Med **20**(12): 1436-1443.
- Wang, J. Y., S. J. Miller and D. L. Falls (2001). "The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain." J Biol Chem **276**(4): 2841-2851.
- Wang, M., C. M. Trim and W. J. Gullick (2011). "Localisation of Neuregulin 1-beta3 to different sub-nuclear structures alters gene expression." Exp Cell Res **317**(4): 423-432.
- Ward, C. W., P. A. Hoyne and R. H. Flegg (1995). "Insulin and epidermal growth factor receptors contain the cysteine repeat motif found in the tumor necrosis factor receptor." Proteins **22**(2): 141-153.
- Warren, C. M., K. Kani and R. Landgraf (2006). "The N-terminal domains of neuregulin 1 confer signal attenuation." J Biol Chem **281**(37): 27306-27316.
- Waterman, H., I. Alroy, S. Strano, R. Seger and Y. Yarden (1999). "The C-terminus of the kinase-defective neuregulin receptor ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing." Embo j **18**(12): 3348-3358.
- Weinstein, E. J., S. Grimm and P. Leder (1998). "The oncogene heregulin induces apoptosis in breast epithelial cells and tumors." Oncogene **17**(16): 2107-2113.
- Weinstein, E. J. and P. Leder (2000). "The extracellular region of heregulin is sufficient to promote mammary gland proliferation and tumorigenesis but not apoptosis." Cancer Res **60**(14): 3856-3861.
- Weiss, A. and J. Schlessinger (1998). "Switching signals on or off by receptor dimerization." Cell **94**(3): 277-280.
- Wen, D., E. Peles, R. Cupples, S. V. Suggs, S. S. Bacus, Y. Luo, G. Trail, S. Hu, S. M. Silbiger, R. B. Levy, *et al.* (1992). "Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit." Cell **69**(3): 559-572.
- Wen, D., S. V. Suggs, D. Karunagaran, N. Liu, R. L. Cupples, Y. Luo, A. M. Janssen, N. Ben-Baruch, D. B. Trollinger, V. L. Jacobsen, *et al.* (1994). "Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors." Mol Cell Biol **14**(3): 1909-1919.
- Willem, M. (2016). "Proteolytic processing of Neuregulin-1." Brain Res Bull **126**(Pt 2): 178-182.
- Wilson, T. R., D. Y. Lee, L. Berry, D. S. Shames and J. Settleman (2011). "Neuregulin-1-mediated autocrine signaling underlies sensitivity to HER2 kinase inhibitors in a subset of human cancers." Cancer Cell **20**(2): 158-172.
- Witton, C. J., J. R. Reeves, J. J. Going, T. G. Cooke and J. M. Bartlett (2003). "Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer." J Pathol **200**(3): 290-297.
- Wolpowitz, D., T. B. Mason, P. Dietrich, M. Mendelsohn, D. A. Talmage and L. W. Role (2000). "Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses." Neuron **25**(1): 79-91.
- Wong, A. J., J. M. Ruppert, S. H. Bigner, C. H. Grzeschik, P. A. Humphrey, D. S. Bigner and B. Vogelstein (1992). "Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2965-2969.
- Wong, R. W. (2003). "Transgenic and knock-out mice for deciphering the roles of EGFR ligands." Cell Mol Life Sci **60**(1): 113-118.
- Wu, X., M. Rubin, Z. Fan, T. DeBlasio, T. Soos, A. Koff and J. Mendelsohn (1996). "Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody." Oncogene **12**(7): 1397-1403.
- Yang, C., E. A. Klein, R. K. Assoian and M. G. Kazanietz (2008). "Heregulin beta1 promotes breast cancer cell proliferation through Rac/ERK-dependent induction of cyclin D1 and p21Cip1." Biochem J **410**(1): 167-175.

- Yang, C., Y. Liu, M. A. Lemmon and M. G. Kazanietz (2006). "Essential role for Rac in heregulin beta1 mitogenic signaling: a mechanism that involves epidermal growth factor receptor and is independent of ErbB4." Mol Cell Biol **26**(3): 831-842.
- Yang, L., Y. Li, E. Shen, F. Cao, L. Li, X. Li, X. Wang, S. Kariminia, B. Chang, H. Li, *et al.* (2017). "NRG1-dependent activation of HER3 induces primary resistance to trastuzumab in HER2-overexpressing breast cancer cells." Int J Oncol **51**(5): 1553-1562.
- Yao, J., S. Xiong, K. Klos, N. Nguyen, R. Grijalva, P. Li and D. Yu (2001). "Multiple signaling pathways involved in activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by heregulin-beta1 in human breast cancer cells." Oncogene **20**(56): 8066-8074.
- Yarar, D., J. Lahdenranta, W. Kubasek, U. B. Nielsen and G. MacBeath (2015). "Heregulin-ErbB3-Driven Tumor Growth Persists in PI3 Kinase Mutant Cancer Cells." Mol Cancer Ther **14**(9): 2072-2080.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-137.
- Yu, H. and R. Jove (2004). "The STATs of cancer--new molecular targets come of age." Nat Rev Cancer **4**(2): 97-105.
- Yun, S., J. Koh, S. K. Nam, J. O. Park, S. M. Lee, K. Lee, K. S. Lee, S. H. Ahn, D. J. Park, H. H. Kim, *et al.* (2018). "Clinical significance of overexpression of NRG1 and its receptors, HER3 and HER4, in gastric cancer patients." Gastric Cancer **21**(2): 225-236.
- Yuste, L., J. C. Montero, A. Esparis-Ogando and A. Pandiella (2005). "Activation of ErbB2 by overexpression or by transmembrane neuregulin results in differential signaling and sensitivity to herceptin." Cancer Res **65**(15): 6801-6810.
- Zhang, D., M. X. Sliwkowski, M. Mark, G. Frantz, R. Akita, Y. Sun, K. Hillan, C. Crowley, J. Brush and P. J. Godowski (1997). "Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9562-9567.
- Zhang, J., S. Kalyankrishna, M. Wislez, N. Thilaganathan, B. Saigal, W. Wei, L. Ma, Wistuba, II, F. M. Johnson and J. M. Kurie (2007). "SRC-family kinases are activated in non-small cell lung cancer and promote the survival of epidermal growth factor receptor-dependent cell lines." Am J Pathol **170**(1): 366-376.
- Zhang, T. T., N. Qu, G. H. Sun, L. Zhang, Y. J. Wang, X. M. Mu, W. J. Wei, Y. L. Wang, Y. Wang, Q. H. Ji, *et al.* (2018). "NRG1 regulates redox homeostasis via NRF2 in papillary thyroid cancer." Int J Oncol **53**(2): 685-693.

Financiación

Financiación

El presente trabajo de Tesis Doctoral titulado “**Dominios funcionales de las neuregulinas y su uso como diana terapéutica**” ha sido realizado por Ariana Centa en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad de Salamanca (USAL).

La autora del trabajo ha sido beneficiaria de una beca predoctoral de CAPES (del portugués, *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior*), a través del programa brasileño de becas internacionales *Ciências sem Fronteiras*, del Ministerio de Educación de Brasil.

Durante los últimos 5 meses, Ariana Centa fue contratada a través de un proyecto de investigación financiado por la Fundación de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca (FICUS).

El trabajo realizado está asociado a proyectos de investigación concedidos al Dr. Atanasio Pandiella por el MINECO (BFU2012-39151, BFU2015-71371-R y PI15/00684) y al Dr. Juan Carlos Montero por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). También han colaborado en este trabajo el Instituto de Biomedicina de Salamanca (IBSAL), el Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC), la Junta de Castilla y León, y la Fundación CRIS. El trabajo desarrollado en el laboratorio del Dr. Atanasio Pandiella recibe apoyo adicional de la Comunidad Europea, a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Agradecimientos


Agradecimientos

Anexo I:

ANEXO

Anexo II:
Artículo científico

The immunoglobulin-like domain of neuregulins potentiates ErbB3/HER3 activation and cellular proliferation

Ariana Centa, Ruth Rodríguez-Barrueco[†], Juan Carlos Montero[‡]  and Atanasio Pandiella[‡]

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, IBSAL, CSIC and CIBERONC, Salamanca, Spain

Keywords

breast cancer; HER receptors; Ig-like domain; neuregulins

Correspondence

A. Pandiella, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer-CIC, IBSAL, CSIC and CIBERONC, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain
Fax: +34923294815
Tel: +34923294815
E-mail: atanasio@usal.es

[†]Present address

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

[‡]Equal contributors.

(Received 26 January 2018, revised 4 April 2018, accepted 9 April 2018, available online 14 May 2018)

doi:10.1002/1878-0261.12310

The neuregulins (NRGs) represent a large family of membrane-anchored growth factors, whose deregulation may contribute to the pathogenesis of several tumors. In fact, targeting of NRG-activated pathways has demonstrated clinical benefit. To improve the efficacy of anti-NRG therapies, it is essential to gain insights into the regions of NRGs that favor their pro-oncogenic properties. Here, we have addressed the protumorigenic impact of different NRG domains. To do this, deletion mutants affecting different NRG domains were expressed in 293 and MCF7 cells. Of the five forms studied, only the wild-type and a mutant lacking the Ig-like domain (NRG^{ΔIg}) were properly sorted to the plasma membrane. Both forms were released as soluble forms to the culture media. However, the mutant NRG^{ΔIg} failed to efficiently activate HER2 and HER3 receptors, signaling pathways, and cell proliferation when compared to wild-type NRG. Treatment with trastuzumab, a humanized antibody used in the breast cancer clinic, inhibited the constitutive activation of HER2, HER3, and downstream signaling in MCF7 cells constitutively expressing wild-type NRG. In contrast, this treatment had a marginal effect on MCF7-NRG^{ΔIg} cells. This study demonstrates that the Ig-like region of NRGs exerts an important role in their capability to activate ErbB/HER receptors and mitogenic responses. Strategies aimed at targeting NRGs should consider that fact to improve neutralization of the pro-oncogenic properties of NRGs.

1. Introduction

The neuregulins (NRGs) are a group of polypeptide growth factors of the epidermal growth factor (EGF) family which participate in various physiological processes such as heart and peripheral nervous system development (Breuleux, 2007; Britsch *et al.*, 1998; Falls, 2003;

Massague and Pandiella, 1993; Meyer and Birchmeier, 1995; Montero *et al.*, 2008). The NRGs act by binding to the extracellular region of the ErbB/HER transmembrane tyrosine kinases, particularly HER3 and HER4 (Burden and Yarden, 1997; Carraway and Burden, 1995). Upon binding of NRGs to their extracellular region, the receptors dimerize, especially with HER2

Abbreviations

ADAM, a disintegrin and metalloprotease; AKT, protein kinase B (PKB); EGF, epidermal growth factor; ERK1/2, extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GSK3- α/β , glycogen synthase kinase-3 alpha and beta; HER/ ErbB, human epidermal growth factor receptor; MEK1/2, dual specificity mitogen-activated protein kinase 1 and 2 (MAP2K1); NDRG1, N-myc downstream regulated 1; NRG, neuregulin; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; S6, ribosomal protein S6; TACE, tumor necrosis factor- α -converting enzyme; TGF α , transforming growth factor- α .

(Burden and Yarden, 1997; Carraway and Burden, 1995; Jeong *et al.*, 2014), and this leads to activation of a complex network of downstream signaling events (Esparis-Ogando *et al.*, 2016).

Four different NRG genes code for more than 30 different isoforms, most of them synthesized as membrane-bound forms, generically termed proNRGs (Falls, 2003; Hayes *et al.*, 2007; Montero *et al.*, 2008). Because of their transmembrane disposition, the proNRGs are constituted by three blocks: the N-terminal extracellular domain, the transmembrane domain, and the C-terminal intracellular region. The N-terminal extracellular block includes the EGF-like module, together with other regions such as Ig-like or the kringle-like subdomains (Falls, 2003; Wen *et al.*, 1994). The EGF-like domain is critical for HER receptor binding and activation (Holmes *et al.*, 1992; Wen *et al.*, 1994), while the Ig-like domain appears to favor interaction with extracellular matrix components (Loeb and Fischbach, 1995; Loeb *et al.*, 1999). The role of the Ig-like domain in regulating the interaction of NRGs with their receptors is controversial. In fact, while some studies have indicated that the Ig-like region may promote the interaction of soluble NRGs with their receptors, favoring activation of the latter (Eto *et al.*, 2006), other studies suggested that such domain conferred signal attenuation by inducing downregulation of ErbB/HER receptors (Warren *et al.*, 2006). The ectodomain of the proNRGs is connected to an internal hydrophobic domain that acts as both a transmembrane domain and a signal sequence (Falls, 2003). That transmembrane region is followed by an intracellular domain which varies in length among the different NRG isoforms, but appears to be required for the adequate sorting of proNRGs to the plasma membrane (Montero *et al.*, 2011).

The membrane-bound proNRG forms may undergo proteolytic processing to generate soluble forms of the factor (Falls, 2003; Montero *et al.*, 2000). Such process is slow under resting conditions, but may accelerate under situations in which intracellular signaling pathways are stimulated (Montero *et al.*, 2000, 2002). In fact, activation of routes that increase phosphorylation of cellular proteins provokes ectodomain cleavage of proNRGs, generating soluble NRGs (Montero *et al.*, 2000, 2002). Such proteolytic event is accomplished by membrane metalloproteases of the ADAM subfamily, especially by ADAM17 (also termed TACE) or ADAM10 (Ebbing *et al.*, 2016; Montero *et al.*, 2000).

Deregulation of NRGs has been linked to important pathological processes such as cancer or schizophrenia (Breuleux, 2007; Mei and Xiong, 2008; Montero *et al.*, 2008). In fact, several studies suggested that NRGs play a role in the genesis or progression of breast tumors.

Thus, expression of NRGs in the mammary gland of mice provoked the appearance of breast adenocarcinomas (Krane and Leder, 1996). Moreover, increased expression of NRGs has been described in up to 50% of human breast tumors, and such increased expression has been linked to poor patient outcome (de Alava *et al.*, 2007). That negative impact on the clinical evolution of patients bearing NRG+ tumors may be related to the pro-oncogenic properties of NRGs, which include promotion of cell proliferation, migration, or metastatic dissemination (Atlas *et al.*, 2003; Seoane *et al.*, 2016; Tsai *et al.*, 2003; Yuste *et al.*, 2005). Moreover, some reports have linked NRG expression to the effectiveness of certain antitumoral therapeutics (de Alava *et al.*, 2007). Thus, NRG expression in breast tumors has been shown to biomark sensitivity to the anti-HER2 therapeutic antibody trastuzumab (Meetze *et al.*, 2015). In addition, NRGs may provoke resistance to certain therapies used to target HER2 (Schwarz *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017).

Those evidences raise the possibility that NRG targeting may be therapeutically useful in situations in which NRGs play a pro-oncogenic role favoring tumor growth or dissemination. In fact, and in addition to the above-mentioned evidences obtained in breast cancer, a recent report has demonstrated the clinical value of targeting NRG–HER system in patients with tumors containing *NRG1* gene rearrangements (Jones *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2016). Interestingly, some of these rearrangements excluded parts of the N-terminal region of *NRG1*-derived gene products whose biological function (s) are still poorly known (Eto *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2016). Reasonably, a better knowledge of the biological properties of the different proNRG domains may help in designing adequate anti-NRG strategies. Considering this, and to gain additional insights into the relevance of different proNRG domains in their biological action, we prepared several deletion mutants and explored their role in regulating proNRG signaling. We show that elimination of the Ig-like domain of proNRGs strongly affected the HER receptor activating properties of soluble and membrane-anchored proNRGs, which translated into poor biological activity of NRG forms that lack the Ig-like region.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and immunochemicals

Culture media, fetal bovine serum, trypsin, penicillin, and streptomycin were from GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, USA). Protein A-Sepharose, proteinase K, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), doxycycline,

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Immobilon[®]-P (PVDF) transfer membrane, Immobilon[®]-FL membranes, and Amicon[®] Ultra Centrifugal Filters were from Merck Millipore Corp. (Darmstadt, Germany). Human recombinant neuregulin-1 was from ProSpec Protein Specialists (Rehovot, Israel). Other generic chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Roche Biochemicals (Barcelona, Spain), or Merck (Darmstadt, Germany).

The rabbit anti-NRG endodomain and ectodomain antibodies as well as the anti-HER3 and anti-HER4 antibodies have been formerly described (Montero *et al.*, 2000, 2007; Sanchez-Martin and Pandiella, 2012). Trastuzumab and pertuzumab were purchased from a local pharmacy. The rabbit polyclonal antibodies to phospho-HER2 (Tyr1221/1222), AKT, phospho-MEK1/2 (Ser217/221), MEK1/2, phospho-S6 ribosomal protein (Ser240/244), phospho-NDRG1 (Thr346), and phospho-GSK3- α/β (Ser 21/9) and the rabbit monoclonal antibodies to phospho-HER3 (Tyr1289) and S6 ribosomal protein were obtained from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA, USA). The mouse monoclonal anti-phospho-ERK1/2 (Tyr204), anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), anti-phospho-tyrosine (PY99) and the rabbit polyclonal anti-ERK1/2 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The mouse monoclonal anti-HER2 (clone Ab-3) was from Calbiochem-Behring Corp. (San Diego, CA, USA). The mouse monoclonal anti-phospho-AKT (Ser473) was from BD Pharmingen (Palo Alto, CA, USA). The rabbit polyclonal anti-calnexin was from Stressgen Bioreagents (Victoria, BC, Canada). The secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies, anti-rabbit, anti-rabbit light chain, anti-rabbit conformation-specific, and anti-mouse, were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA), Cell Signaling Technologies, and GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, USA). The Cy3-conjugated secondary antibody was from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). The anti-mouse DyLight[™] 680-conjugated and anti-rabbit DyLight[™] 800-conjugated antibodies were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

2.2. Cell culture and transfections

MCF7 and 293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), containing high glucose (4500 mg·L⁻¹) and antibiotics (penicillin 100 U·mL⁻¹,

streptomycin 100 mg·mL⁻¹). Cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere in the presence of 5% CO₂ and 95% air.

The plasmids coding for rat proNRG α 2c and the proNRG^{ΔIg}, proNRG^{Δintra}, proNRG^{Δextra}, and NRG^{β3} mutants were transfected into 293 or MCF7 cells by calcium phosphate or using Lipofectamine (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), respectively. Clones expressing these constructions were selected by G418 resistance and their NRG expression analyzed by western blotting (Montero *et al.*, 2000, 2007, 2011).

2.3. Protein extraction, immunoprecipitation, and western blotting

Detailed procedures for the extraction, quantitation, and immunoprecipitation of proteins and western blotting can be consulted in Montero *et al.* (2011).

2.4. Production of soluble NRG

293 and MCF7 cells expressing the wild-type proNRG α 2c and the different mutants were plated in 100-mm dishes and cultured in DMEM with 10% FBS up to 80% confluency. The medium of the cells was replaced with DMEM without FBS and incubated for 30 min. This process was repeated three times. Then, cells were incubated with 5 mL of DMEM without FBS for 24 h. Conditioned medium was 10× concentrated by ultrafiltration using Amicon[®] 3K Ultra Centrifugal Filters (Merck Millipore Corp.).

2.5. Proteinase protection experiments

293 and MCF7 cells expressing the proNRG α 2c or proNRG^{ΔIg} were washed once with Krebs/Ringer/Hepes buffer (containing, in mmol·L⁻¹: NaCl, 140; KCl, 5; CaCl₂, 2; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; glucose, 6; and Hepes, 25, pH 7.4) and then incubated in this buffer supplemented with 200 μg·mL⁻¹ proteinase K for 30 min at room temperature. Cells were then washed three times with PBS containing 2 mM PMSF and lysed in 1 mL of lysis buffer with protease and phosphatase inhibitors.

2.6. Bioactivity assays

The conditioned media of 293 cells expressing proNRGs were used to stimulate monolayers of MCF7 cells for 15 min. On the other hand, clones of MCF7^{tetoff} expressing proNRG α 2c and proNRG^{ΔIg} were cultured in DMEM with 10% FBS for up to 40% confluency, after the cells were serum-starved and

treated with or without doxycycline ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 48 h. MCF7^{tetoff} cells expressing proNRG $\alpha 2c$ and proNRG^{ΔIg} were plated in 24-well plates to a density of 15 000 cells/well and cultured overnight in DMEM with 10% FBS. The next day, cells were treated with or without $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ doxycycline for 48 h. Later, cells were serum-starved and maintained with or without doxycycline ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) and treated with or without NRG-1 human recombinant (10 nM). After 5 days, the MTT uptake assay was performed (Esparis-Ogando *et al.*, 2002). MCF7 cells were plated in 24-well plates to a density of 15 000 cells/well and cultured overnight in DMEM + 10% FBS. The next day, the medium was replaced with DMEM without FBS containing conditioned media of 293, 293-NRG $\alpha 2c$, and 293-NRG^{ΔIg} cells. Cell proliferation was analyzed at 5 days by an MTT-based assay (Esparis-Ogando *et al.*, 2002). On the other hand, clones of MCF7^{tetoff} expressing proNRG $\alpha 2c$ and proNRG^{ΔIg} were plated in 6-well plates to a density of 30 000 cells/well and were cultured in DMEM with 10% FBS with or without doxycycline ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 48 h. Later, the medium was replaced by DMEM with 1% FBS and treated with or without doxycycline ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) and trastuzumab (10 nM) for 5 days. At the end of incubation, the cells were counted in Z1TM Coulter Particle Counter[®] (Beckman CoulterTM Life Sciences, Indianapolis, IN, USA).

2.7. Immunofluorescence

The immunofluorescence protocol has been described (Esparis-Ogando *et al.*, 2002). Dilutions of the anti-NRG endodomain or ectodomain antibodies were 1 : 500.

2.8. Quantitative and statistical analyses

Quantitation of the bands obtained from western blotting experiments was performed using the IMAGEJ 1.44

software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) or the ODYSSEY INFRARED IMAGING SYSTEM V.3.0 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). The intensity of each of the different bands was calculated with respect to the control, and the data are represented as the percentage of the maximum value obtained for each experiment.

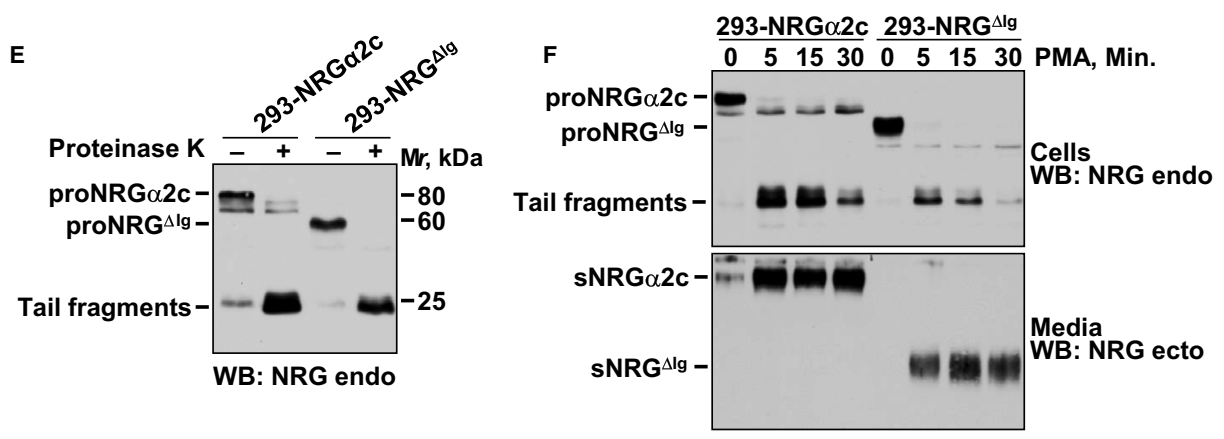
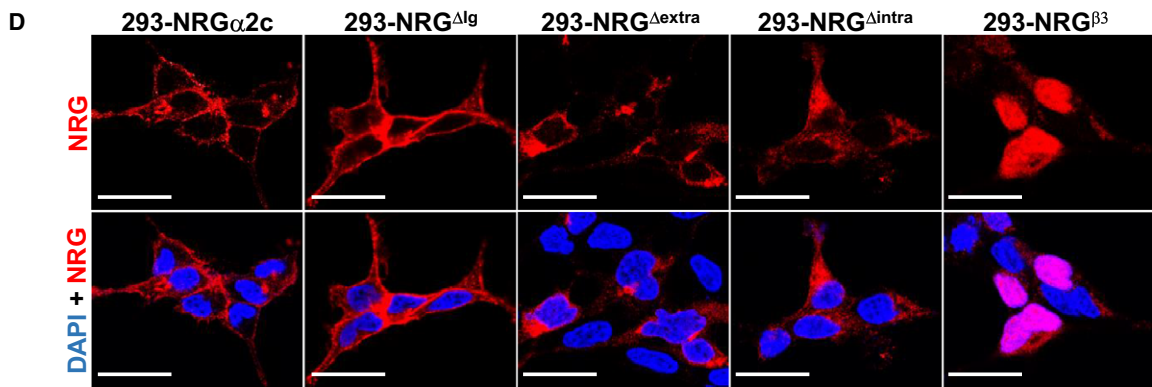
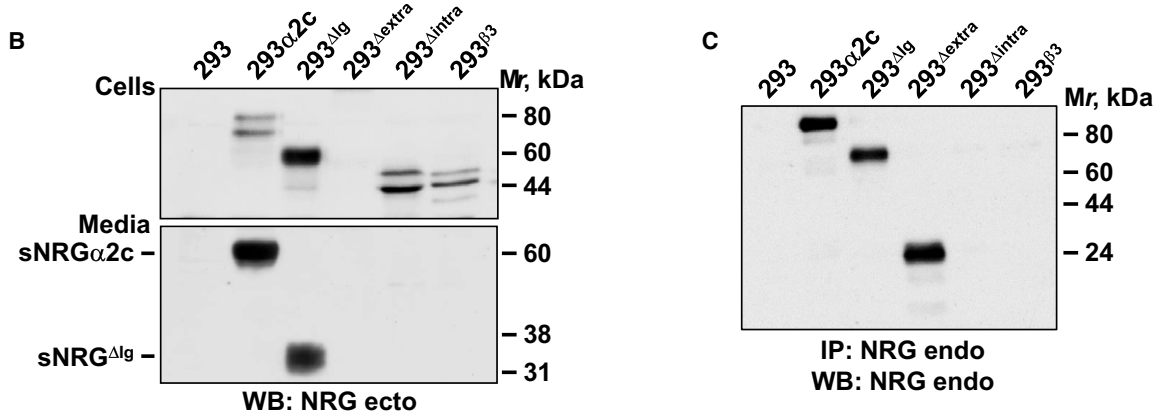
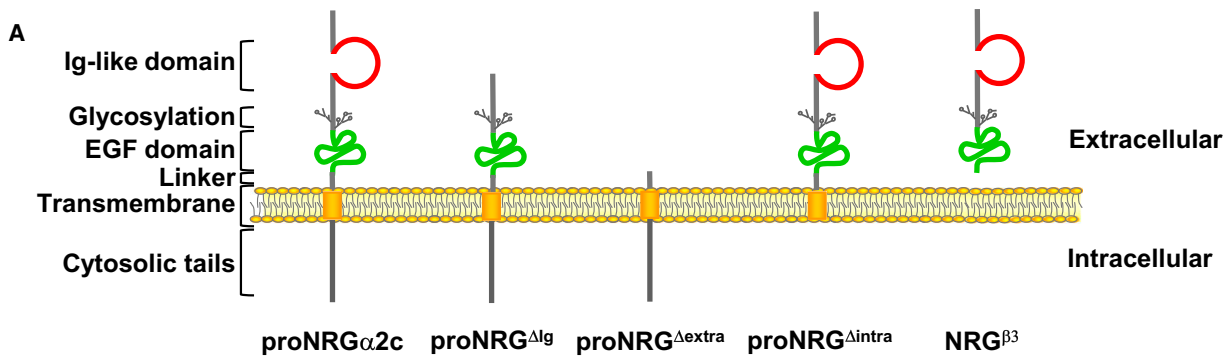
Results obtained in the proliferation experiments are represented as the mean \pm standard deviation (SD) of triplicates of a representative experiment that was repeated at least three times using IBM SPSS STATISTICS 24 (Madrid, Spain), and differences were tested for significance using Student's *t*-test. Significance was considered when *P* values were < 0.05 .

3. Results

3.1. Impact of different proNRG domains on the production of soluble NRG

To explore the relevance of different domains of proNRGs in their biological action, distinct deletion mutants of the isoform proNRG $\alpha 2c$, derived from the *NRG1* gene, were prepared (Fig. 1A). Such isoform was chosen as it has been extensively used to analyze biological characteristics of proNRGs (Montero *et al.*, 2007, 2011). The proNRG $\alpha 2c$ mutants constructed included deletions in (a) the Ig-like domain (proNRG^{ΔIg}), (b) the ectodomain (proNRG^{Δextra}), (c) the endodomain (proNRG^{Δintra}), and (d) the transmembrane and intracellular domains, generating a form that mimics NRG^{β3}. Wild-type proNRG $\alpha 2c$ and the different mutants were transfected into 293 cells, and their expression was evaluated by western blotting. In cell lysates, and using an antibody raised to the NRG/EGF-like region of the ectodomain, that antibody recognized wild-type proNRG $\alpha 2c$, proNRG^{ΔIg}, proNRG^{Δintra}, and NRG^{β3} (Fig. 1B, top panel). The antibody failed to recognize the proNRG^{Δextra} form that lacks the extracellular region. Expression of proNRG^{Δextra} form was

Fig. 1. Subcellular localization of NRG $\alpha 2c$ and different mutants. (A) Schematic representation of domains of proNRG $\alpha 2c$ and distinct deletion mutants of the isoform wild-type. (B, C) Expression of proNRG $\alpha 2c$ and different mutants in 293 cells. 293 cells expressing these proteins were lysed, and the expression of NRG analyzed by western blotting using the antibody that recognizes the intracellular domain (anti-NRG endo) (C) or extracellular domain (anti-NRG ecto) (B, top panel). The conditioned medium of these cells was collected, and the expression of sNRG was analyzed by western blotting using the anti-NRG ecto (B, bottom panel). (D) Immunofluorescence analysis of the subcellular distribution of proNRG $\alpha 2c$ and the different mutants in 293 cells. The localization of proNRG $\alpha 2c$, proNRG^{ΔIg}, and proNRG^{Δextra} was assessed with the anti-NRG endo antibody and the distribution of proNRG^{Δintra} and NRG^{β3} was analyzed with the anti-NRG ecto antibody as described in Materials and methods. Images were captured using a Leica TCS SP5 confocal microscope (Barcelona, Spain). Bar, 25 μm . (E) Protease protection experiments of the 293-NRG $\alpha 2c$ and 293-NRG^{ΔIg} cells. These cells were treated with or without proteinase K ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 30 min, and the expression of NRG was analyzed by western blotting using anti-NRG endo antibody. (F) Effect of PMA in the cleavage of proNRG. 293-NRG $\alpha 2c$ and 293-NRG^{ΔIg} cells were treated with PMA at the indicated times. The expression of NRG in cells extract (top panel) or conditioned medium (bottom panel) was analyzed by western blotting with the specified antibodies.



detected using an antibody that recognizes the intracellular region of proNRG α 2c (Fig. 1C).

To assess the production of soluble forms of NRGs (sNRG), culture media were harvested and concentrated and NRG analyzed by western blotting using the anti-NRG ectodomain antibody. These experiments demonstrated that proNRG α 2c and proNRG^{ΔIg} were able to release soluble forms to the culture media (Fig. 1B, bottom panel). The molecular weights of the two soluble forms differed because of the deletion of the Ig-like region in sNRG^{ΔIg}. Soluble NRG forms derived from proNRG^{Δintra} or from NRG^{β3} were undetectable in the culture media. As expected, soluble NRG was not detected in the proNRG^{Δextra} as this mutant lacks the NRG/EGF-like domain that contains the epitope recognized by the antibody.

3.2. proNRG α 2c and proNRG^{ΔIg} are properly sorted to the plasma membrane and processed

The different capability of 293 cells expressing the distinct NRG forms to generate soluble forms of NRGs led us to explore the reason for such differences. Immunofluorescence studies indicated that the failure of cells expressing proNRG^{Δintra} or NRG^{β3} to release sNRG to their culture media was likely due to their entrapment in intracellular compartments (Fig. 1D). ProNRG^{Δintra} accumulated in a perinuclear intracellular region, while NRG^{β3} colocalized with the nuclear stain DAPI, in agreement with previously reported results. ProNRG^{Δextra} also accumulated intracellularly, especially in a perinuclear region. The lack of cell surface staining in the case of proNRG^{Δextra} and proNRG^{Δintra} confirms that these domains are required for transport of proNRGs to the plasma membrane (Montero *et al.*, 2011).

These immunofluorescence studies showed cell surface staining of proNRG α 2c and proNRG^{ΔIg}, suggesting that proNRG^{ΔIg} reached the cell surface as well as wild-type proNRG α 2c. To verify that proNRG^{ΔIg}

reached the plasma membrane correctly, protease protection experiments were carried out. 293-NRG α 2c and 293-NRG^{ΔIg} cells were treated with proteinase K, and then, cell extracts were analyzed by western blotting using the anti-endodomain antibody. As shown in Fig. 1E, treatment of intact cells with proteinase K caused a profound decrease in transmembrane, cell-bound proNRG α 2c. That effect was accompanied by the concomitant generation of fragments with molecular weights of \approx 25 kDa. The latter represent cell-bound truncated fragments of proNRGs which include the transmembrane and cytosolic domains. In the case of 293-NRG^{ΔIg} cells, the slow-migrating mature form was sensitive to treatment with proteinase K, and treatment with the protease resulted in generation of the 25-kDa tail fragments. The above results indicate that the presence of the immunoglobulin domain is not essential for proNRGs to be transported to the cell membrane.

We also analyzed the relevance of the Ig-like domain on the cleavage of transmembrane proNRG^{ΔIg}. Regulated cleavage of membrane-anchored growth factors may occur by activation of several signaling pathways, including the protein kinase C (PKC) route (Montero *et al.*, 2002). Treatment with the PKC activator PMA caused a decrease in cell-associated NRG and a concomitant increase in membrane-associated tail fragments in both 293-NRG α 2c cells and 293-NRG^{ΔIg} cells (Fig. 1F). Parallel analyses of culture media showed accumulation of soluble NRG α 2c and NRG^{ΔIg} in cells treated with PMA.

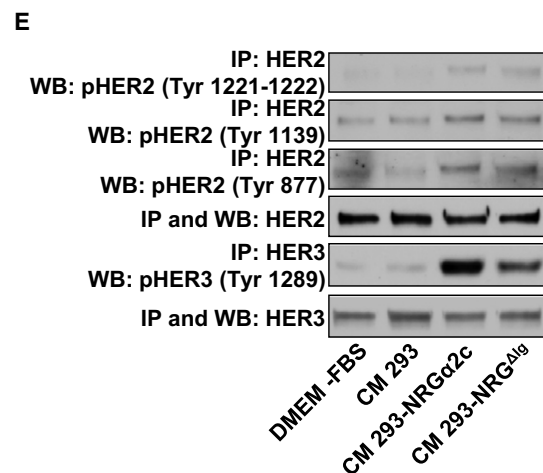
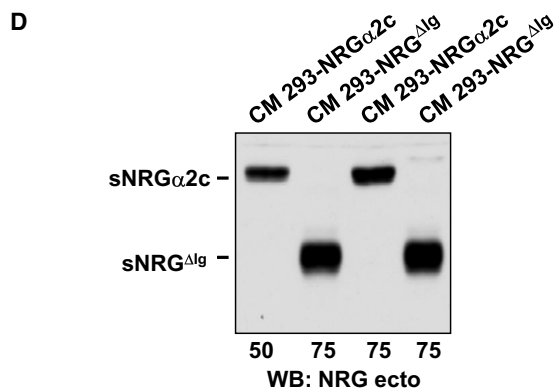
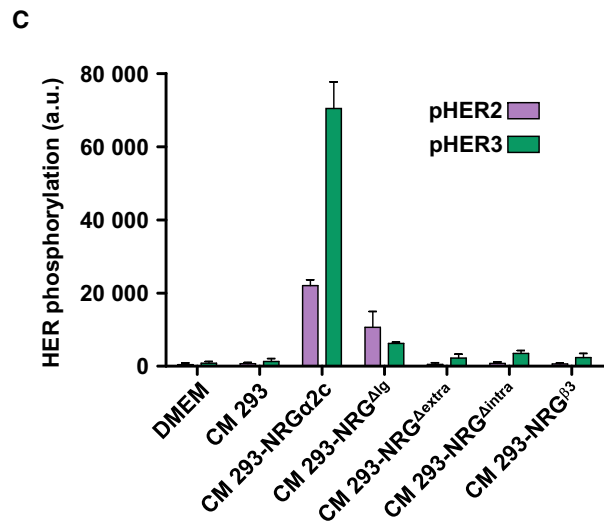
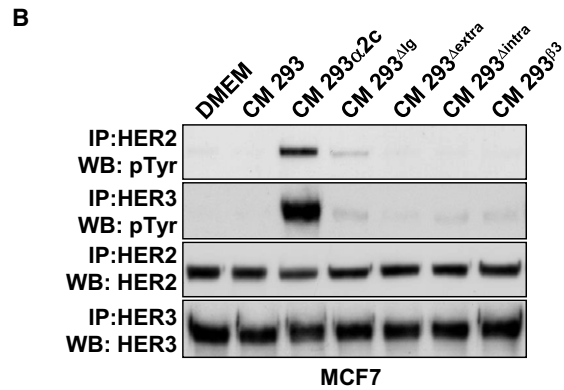
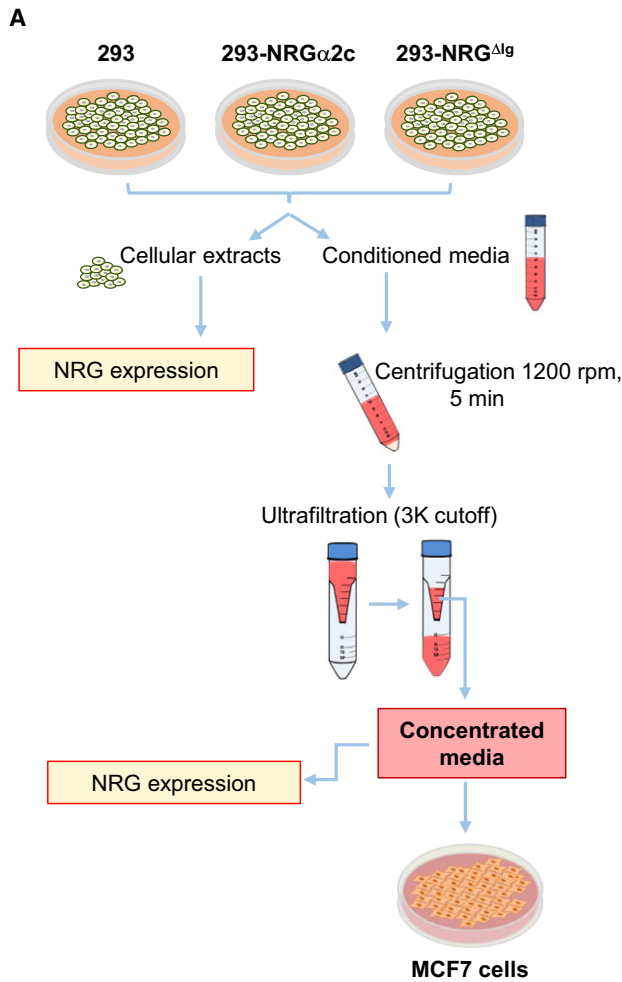
3.3. The Ig-like domain of NRGs facilitates activation of HER receptors

The HER-activating capability of the culture media from cells expressing the different NRG forms was then evaluated. For these experiments, 293 cells were cultured for 24 h in their growth media, which was then harvested and after concentration was added to

Fig. 2. Effect of soluble NRG on activation of HER receptors. (A) Schematic representation of bioactivity assay of the soluble NRG. The conditioned medium of the 293 cells expressing NRG α 2c and NRG^{ΔIg} was collected and concentrated. The levels of NRG in cell extracts or released into the medium were detected by western blotting. This conditioned medium was used for stimulated the MCF7 cells. (B) Effect of conditioned medium on activation of HER receptors. MCF7 cells stimulated with the conditioned medium of 293 cells expressing the NRG α 2c and different mutants for 15 min were lysed. One milligram of extract was used to immunoprecipitated HER2 and HER3 and their tyrosine phosphorylation and total levels were detected by western blotting. The conditioned medium of 293 cells was used as a negative control. (C) Bar graph representing the quantification of HER2 and HER3 phosphorylation in MCF7 cells stimulated with the conditioned medium of the 293 cells expressing different mutants of NRG. Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments performed as in (B). (D) The levels of sNRG released into the medium of 293-NRG α 2c and 293-NRG^{ΔIg} cells were analyzed by western blotting using anti-NRG ectodomain. The volume of conditioned medium load in the gel is equivalent to the amount in micrograms of cellular extracts (indicated in the bottom of panel). (E) HER2 and HER3 phosphorylation in MCF7 cells stimulated with the conditioned medium of 293-NRG α 2c and 293-NRG^{ΔIg} cells. The phosphorylation of HER2 and HER3 in tyrosine-specific residues was evaluated by western blotting using phosphospecific antibodies.

monolayers of MCF7 cells (Fig. 2A). MCF7 cells express the NRG receptors HER3 and HER4 which may oligomerize with other HER receptors, especially HER2, facilitating transphosphorylation of HER3,

HER4, and HER2. This binary cellular system has been used to explore paracrine signaling by soluble NRGs. Media derived from 293 cells expressing wild-type proNRG α 2c caused phosphorylation of HER2



and HER3 (Fig. 2B). Quantitative analyses indicated higher tyrosine phosphorylation of HER3 receptors as compared to HER2 receptors (Fig. 2C). Phosphorylation of HER4 was difficult to detect due to the low level of expression of this receptor in MCF7 cells (data not shown). Media harvested from cells expressing the proNRG^{ΔIg} were much less efficient in their capability to induce HER2 and HER3 phosphorylation (Fig. 2B, C). Media recovered from proNRG^{Δintra} or from NRG^{B3} cells failed to activate HER2 or HER3 (Fig. 2B,C), in line with the failure to detect sNRG in the culture media harvested from 293 cells transfected with these mutants (Fig. 1B). Titration experiments demonstrated that the lower HER receptor tyrosine phosphorylation efficiency of conditioned media from cells expressing proNRG^{ΔIg} was not due to lower amounts of sNRG^{ΔIg} being collected from the culture media (Fig. 2D).

As these western blotting experiments were performed with a generic anti-pY antibody, the possibility that the pY signal detected in the western blots was not exclusively due to HER2 or HER3 in their respective immunoprecipitates was contemplated. In fact, coprecipitation of HER2 and HER3 has been reported in MCF7 cells, particularly when treated with NRG (Sanchez-Martin and Pandiella, 2012). To explore the effect of the conditioned media from 293 cells expressing proNRG^{Δ2c} and proNRG^{ΔIg} on pHER2 and pHER3, lysates from MCF7 cells incubated with conditioned media harvested from both cell lines were analyzed by western blotting using antibodies specific for phosphotyrosine residues present in HER2 or HER3. As shown in Fig. 2E, immunoprecipitation with anti-HER2, followed by western blotting with antibodies that recognize pY1221–1222, pY1139, or pY877 in HER2, gave weak tyrosine phosphorylation signals. A much higher signal was observed when HER3 was immunoprecipitated and western blots were probed with an anti-pHER3 pY1289 antibody. Together, these results indicate that soluble NRGs derived from the conditioned media of cells expressing proNRG^{Δ2c} or proNRG^{ΔIg} principally upregulate tyrosine phosphorylation of HER3 in MCF7 cells.

3.4. Signaling responses to soluble NRG^{Δ2c} and NRG^{ΔIg}

Considering the differences found in the tyrosine phosphorylation of HER2 and HER3 by sNRG^{Δ2c} or sNRG^{ΔIg}, how the presence of the Ig-like domain could influence signaling by these receptors was analyzed. For these experiments, clones of cells expressing similar protein levels in their transmembrane form and

which released similar amounts of sNRG^{Δ2c} or sNRG^{ΔIg} were selected (Fig. 3A). Time-course experiments were performed to obtain information about the incubation times to reach maximum HER receptor activation. These studies showed that tyrosine phosphorylation of HER2 receptors caused by conditioned media containing sNRG^{Δ2c} or sNRG^{ΔIg} followed analogous time courses (Fig. 3B,C), even though HER2 phosphorylation in response to addition of sNRG^{ΔIg} conditioned media was lower than that of wild-type NRG^{Δ2c} (Fig. 3B,C). Maximum HER2 phosphorylation was reached within 15 min of incubation with the conditioned media.

To explore whether the differential activation of HER receptors by sNRG^{Δ2c} and sNRG^{ΔIg} translated into differences in signaling, MCF7 cells were incubated for 15 min with the concentrated medium collected from 293 cells transfected with proNRG^{Δ2c} and proNRG^{ΔIg}. The levels of expression and phosphorylation of HER2 and HER3 receptors and proteins that serve as readouts of pathway activation were analyzed (Fig. 3D). These studies confirmed that the phosphorylation of HER2 and HER3 by conditioned media from 293 cells expressing proNRG^{Δ2c} was much more potent than their activation by conditioned media from cells expressing proNRG^{ΔIg}. Analyses of proteins that act in HER signaling demonstrated that the presence of the Ig-like domain favored the signaling activity of sNRG. All evaluated proteins were activated by both forms of sNRG, but had a higher phosphorylation after incubation with the medium from 293-NRG^{Δ2c} cells as compared to the medium from 293-NRG^{ΔIg} cells.

3.5. Biological activity of proNRG^{Δ2c} and proNRG^{ΔIg}

The effect of NRG^{Δ2c} or NRG^{ΔIg} on cell proliferation was investigated using different experimental settings aimed at exploring paracrine, juxtacrine and autocrine modes of intercellular communication (Fig. 4A). The paracrine model consisted in the addition to MCF7 cells of conditioned media from 293 cells expressing proNRG^{Δ2c} or proNRG^{ΔIg}. The negative control for these experiments was conditioned medium from 293 cells that do not express NRGs. As shown in Fig. 4B, conditioned media from 293 cells expressing proNRG^{Δ2c} provoked an increase in the proliferation of MCF7 cells, measured using MTT metabolization assays. In contrast, MCF7 cells incubated with conditioned media from 293 cells expressing proNRG^{ΔIg} grew much less, with their MTT values slightly higher than those of MCF7 cells incubated with the media from parental 293 cells. These results indicate that the

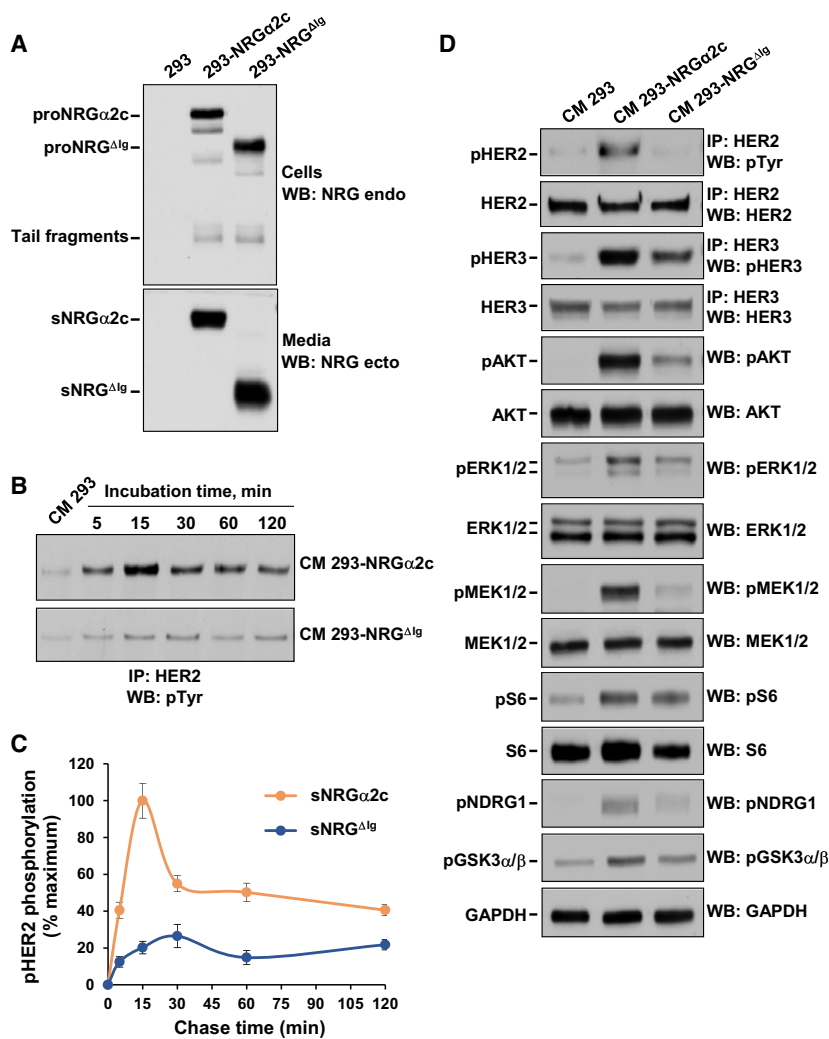


Fig. 3. Relevance of the Ig-like domain in the signaling of HER receptors. (A) Expression of the NRG in cell extract (top panel) and conditioned medium (bottom panel) of the 293, 293-NRGα2c, and 293-NRGΔIg cells analyzed by western blotting. (B) Time course of the effect of conditioned medium of 293-NRGα2c and 293-NRGΔIg cells on HER2 phosphorylation in MCF7 cells. The conditioned medium of 293 cells was used as a negative control. (C) Quantification of HER2 phosphorylation in MCF7 cells stimulated with conditioned medium of 293-NRGα2c and 293-NRGΔIg cells. Data were relativized to maximal phosphorylation obtained and are represented as the mean ± SD of two independent experiments performed as in (B). (D) Effect of conditioned medium of 293-NRGα2c and 293-NRGΔIg cells in the signaling of HER receptors. HER2 and HER3 phosphorylation and the activation of proteins in HER signaling pathway were evaluated by western blotting with the antibodies indicated in the left side of figure.

paracrine action of sNRGα2c in terms of stimulation of cell proliferation is superior to that of sNRGΔIg.

The second model used consisted in MCF7 cells expressing proNRGα2c or proNRGΔIg. Such model consists of a single cell type that produces the transmembrane growth factor as well as the whole machinery for the transduction of proliferative signals. It therefore allows the assessment of autocrine/paracrine as well as juxtacrine properties of proNRGs (Fig. 4A). For these experiments, MCF7^{tetoff} cells were transfected with the cDNA coding for wild-type proNRGα2c or proNRGΔIg, subcloned into the pRevTRE mammalian expression vector. This system allows the regulated expression of proteins under the control the tetracycline transactivator. Several clones of MCF7-NRGα2c and MCF7-NRGΔIg cells were isolated, and Fig. 4C shows the level of expression of proNRGα2c and proNRGΔIg and their repression by doxycycline in

two clones selected for their analogous expression of both proNRGs. These clones released similar amounts of sNRGα2c or sNRGΔIg to the culture media (Fig. 4D). Immunofluorescence experiments showed that proNRGα2c and proNRGΔIg were located at the plasma membrane of MCF7 cells (Fig. 4E) and colocalized with HER2 and HER3 (data not shown). Likewise, when the MCF7-NRGα2c and MCF7-NRGΔIg cells were incubated with proteinase K, the slowest mobility band of each form, which represents the mature cell surface-exposed proNRG, was proteolytically processed (Fig. 4F), and this was accompanied by an increase in the amount of the cell-bound truncated tail fragments. These results are similar to those obtained in 293 cells (Fig. 1) and demonstrate that wild-type proNRGα2c and proNRGΔIg reach the plasma membrane and are cleaved to generate soluble forms of the factor.

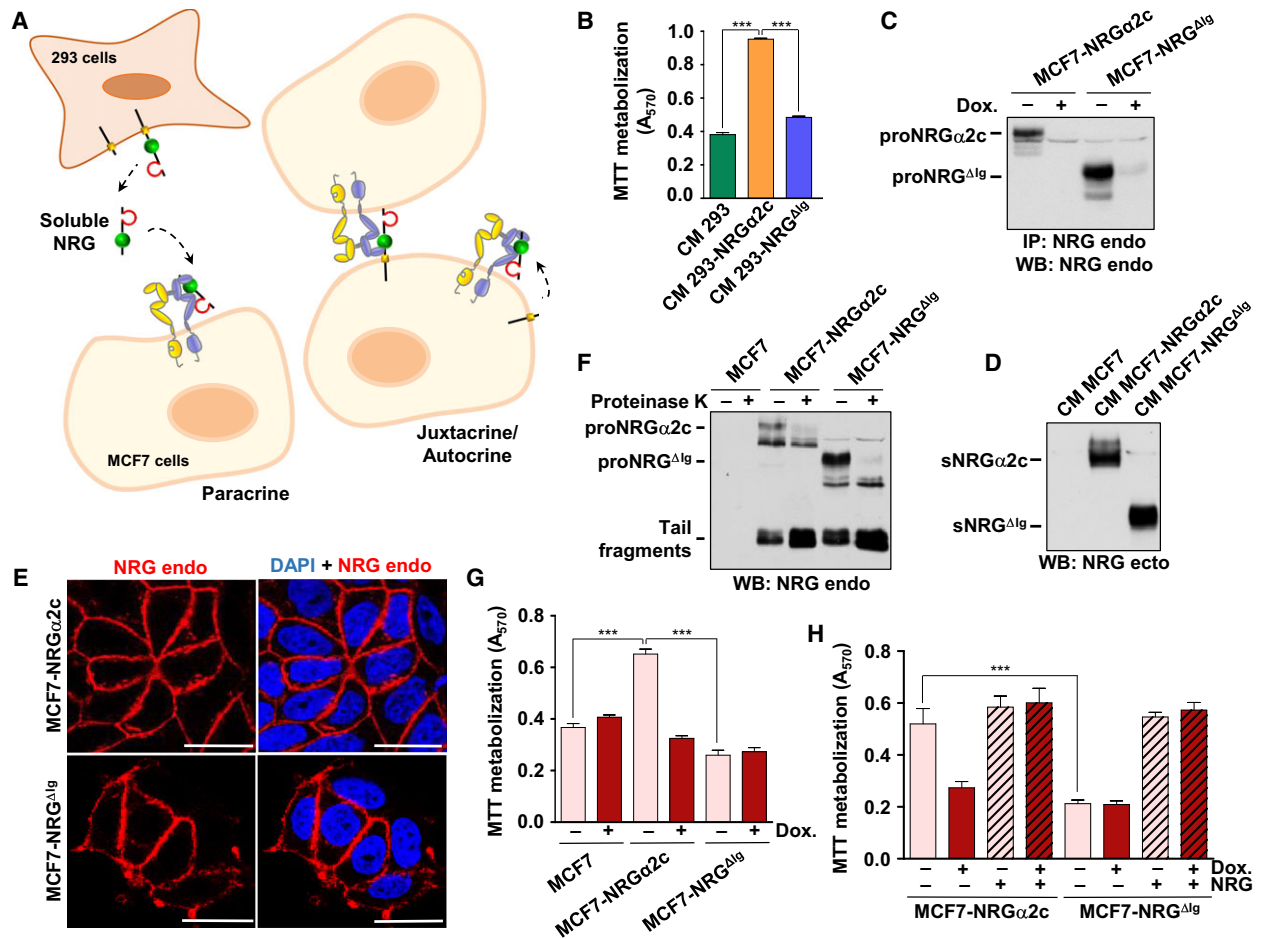


Fig. 4. Biological activity of NRG α 2c and NRG Δ Ig. (A) Representation of the paracrine and juxtacrine/autocrine form of intercellular communication of NRG. In the paracrine form, the soluble NRG produced by 293 cells activates the HER receptors on MCF7 cells that reside at a certain distance from where the NRG is synthesized. In the juxtacrine form, the transmembrane NRG produced in MCF7 cells is able to activate the HER receptors present at the membrane of cells that are in physical contact with the cell that produces the NRG. In the autocrine form, the soluble NRG produced in MCF7 cells is able to activate HER receptors in the same cell that produced the NRG. (B) Effect of the conditioned medium of 293, 293-NRG α 2c, and 293-NRG Δ Ig cells in proliferation. MCF7 cells were stimulated with the indicated conditioned medium, and MTT metabolization was measured 5 days later. *** $P < 0.001$. (C) Expression of proNRG α 2c and proNRG Δ Ig in MCF7tetoff cells. Clones of MCF7tetoff expressing proNRG α 2c and proNRG Δ Ig (MCF7-NRG α 2c and MCF7-NRG Δ Ig) were cultured with or without doxycycline (DOX, 10 ng·mL $^{-1}$) during 2 days and then lysed. The samples were analyzed by western blotting with the anti-endodomain antibody. (D) The levels of sNRG released in the conditioned medium of MCF7-NRG α 2c and MCF7-NRG Δ Ig cells were analyzed by western blotting with the anti-ectodomain antibody. (E) Subcellular distribution of proNRG α 2c and proNRG Δ Ig in MCF7 cells was analyzed by immunofluorescence using the anti-endodomain antibody. Nuclear staining was performed with DAPI. Images were captured using a Leica TCS SP5 confocal microscope. Bar, 25 μ m. (F) Protease protection experiments. Intact MCF7tetoff cells expressing proNRG α 2c and proNRG Δ Ig were treated with or without proteinase K and lysed. The samples were analyzed by western blotting with the anti-endodomain antibody. (G) Proliferation of MCF7, MCF7-NRG α 2c, and MCF7-NRG Δ Ig cells. These cells were cultured in the presence or absence of doxycycline (10 ng·mL $^{-1}$), and MTT metabolization was measured 5 days later. *** $P < 0.001$. (H) Cells cultured in the presence or absence of doxycycline (10 ng·mL $^{-1}$) were treated with or without NRG 10 nM, and the MTT metabolization was measured 5 days later. *** $P < 0.001$.

Expression of wild-type proNRG α 2c favored proliferation of MCF7-NRG α 2c cells, and such effect was sensitive to doxycycline (Fig. 4G). Proliferation of MCF7-NRG α 2c cells treated with doxycycline was similar to that of parental, untransfected MCF7-

NRG Δ Ig proliferated less than MCF7-NRG α 2c cells, and that proliferation was insensitive to addition of doxycycline. MCF7-NRG α 2c and MCF7-NRG Δ Ig proliferated similarly in response to addition of exogenous NRG (Fig. 4H), demonstrating that the differences in

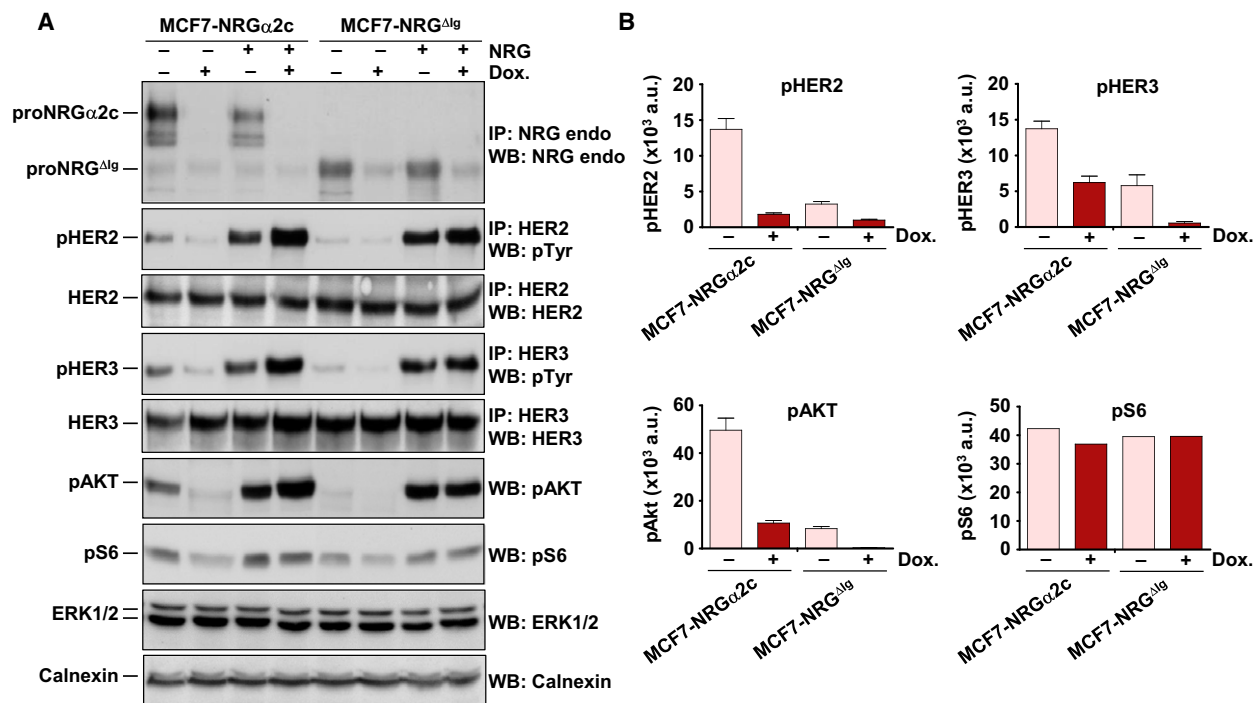


Fig. 5. Cell surface NRG α 2c activates signaling through ErbB receptors. (A) MCF7-NRG α 2c and MCF7-NRG Δ Ig cells cultured in the presence or absence of doxycycline (10 ng·mL⁻¹) and treated with or without NRG (10 nM) during 15 min were lysed. Immunoprecipitation (where pertinent) and western blotting were performed with the indicated antibodies. (B) Graphical representation of the quantification of the phosphorylation of HER2, HER3, AKT, and S6. Data are expressed as the mean \pm SD of two independent experiments, except for the phosphorylation of S6, performed as in B.

cell proliferation found between the cell lines were not due to differences in their proliferative capabilities.

3.6. HER pathway activation in MCF7-NRG α 2c and MCF7-NRG Δ Ig cells and sensitivity to trastuzumab

The signaling capability of wild-type proNRG α 2c and proNRG Δ Ig in MCF7 cells expressing these forms was then analyzed. Resting levels of pHER2, pHER3, pAKT, and pS6 were higher in MCF7-NRG α 2c than in MCF7-NRG Δ Ig cells (Fig. 5A,B). Repression of NRG expression by the addition of doxycycline reduced the phosphorylation status of all these proteins, especially in MCF7-NRG α 2c cells. Both cell lines responded to the addition of exogenous NRG, indicating that they preserved signaling responses to the added growth factor.

The sensitivity of MCF7-NRG α 2c and MCF7-NRG Δ Ig cells to the anti-HER2 therapeutic antibody trastuzumab was then explored. Trastuzumab has been formerly reported to exert a potent inhibition of proliferation of NRG-expressing cells (Yuste *et al.*, 2005). Moreover, clinical responses to trastuzumab have been

shown to correlate with the expression of NRGs in breast cancer tumors which do not overexpress HER2 (de Alava *et al.*, 2007). Trastuzumab substantially decreased proliferation of MCF7-NRG α 2c cells (Fig. 6A). Such decrease in cell proliferation was at least the magnitude obtained by repressing the expression of proNRG α 2c by treatment with doxycycline. Combination of trastuzumab treatment with repression of the expression of proNRG α 2c did not augment the inhibition of cell proliferation caused by trastuzumab alone. These data indicated that trastuzumab neutralized the proliferation advantage supplied by the expression of proNRG α 2c in MCF7 cells.

Trastuzumab slightly decreased the proliferation of MCF7-NRG Δ Ig cells. Addition of doxycycline or combination of the latter with trastuzumab did not substantially change the proliferation of these cells when compared to that of untreated MCF7-NRG Δ Ig cells.

Western blotting (Fig. 6B) and quantitative analyses (Fig. 6C) demonstrated that trastuzumab inhibited the degree of constitutive activation of HER3, and AKT present in MCF7-NRG α 2c cells. Interestingly, the levels of pHER2 were poorly affected by trastuzumab in MCF7-NRG α 2c cells. Trastuzumab also decreased

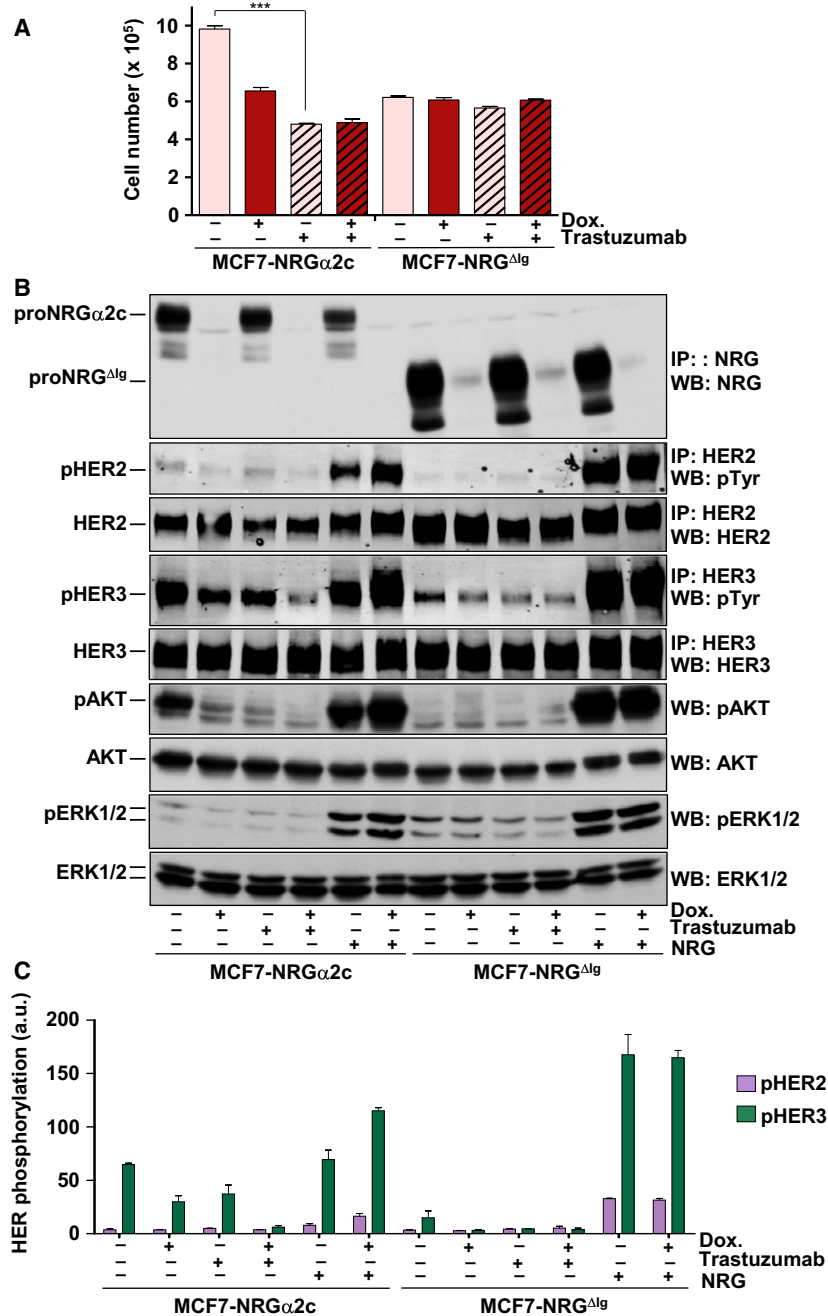


Fig. 6. MCF7-NRG α 2c cells are sensitive to the anti-HER2 therapeutic antibody trastuzumab. (A) Effect of trastuzumab in the proliferation of MCF7-NRG α 2c and MCF7-NRG Δ Ig. Cells cultured in the presence or absence of doxycycline (10 ng·mL⁻¹) were treated with or without trastuzumab (50 nM), and the number of the cells was counted 5 days later. *** $P < 0.001$. (B) MCF7-NRG α 2c and MCF7-NRG Δ Ig cells cultured in the presence or absence of doxycycline (10 ng·mL⁻¹) and treated with or without trastuzumab (50 nM) and NRG (10 nM) during 15 min. The cells were lysed and the expression of different proteins was analyzed by western blotting with the indicated antibodies. (C) Graphical representation of the quantification of the phosphorylation of HER2 and HER3. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments performed as in B.

pHER3 levels in MCF7-NRG Δ Ig cells. However, an action of trastuzumab on the activation status of the other proteins analyzed (pHER2 and pAKT) could not be adequately interpreted as their degree of activation was very low in MCF7-NRG Δ Ig cells (Fig. 6B,C). The levels of pERK1/2 were low in both cell lines and were not affected by trastuzumab or doxycycline. We also tested the action of pertuzumab, an antibody that inhibits ligand-dependent HER2 receptor dimerization (Agus *et al.*, 2002), on pHER2, pHER3, and

downstream signaling. These experiments reported similar results to those obtained with trastuzumab (Fig. S1). However, it should be noted that pertuzumab decreased pHER2 levels in MCF7-NRG α 2c cells.

4. Discussion

The accumulation of reports that link NRGs to cancer justifies studies aimed at deciphering the relevance of different regions of NRGs in their biological activity,

not only because of that, but also because such studies may uncover new therapeutic possibilities. In fact, some reports have already approached that latter possibility, showing the therapeutic benefit of acting on the NRG-ErbB system (Jones *et al.*, 2017). While some studies have offered information on the role of different domains in the sorting of NRGs (Montero *et al.*, 2007, 2011), the impact of elimination of the different domains on their biological activity has not been explored and had to be done. With that purpose in mind, we prepared several deletion mutants of proNRG α 2c, a prototypical proNRG, and analyzed their biological activity, measured as capability to activate HER receptors and proliferation responses.

We observed that the Ig-like domain of proNRGs exerts an important role in their signal-promotion capabilities, but did not affect cell surface sorting. In fact, elimination of the Ig-like region did not affect transport and accumulation of the mutant proNRG Δ Ig at the cell surface, as indicated by immunofluorescence or proteinase K protection experiments. Moreover, regulated proteolytic cleavage, which exclusively occurs at the cell surface (Montero *et al.*, 2007), was unaffected by deletion of the Ig-like domain, not only indicating that such domain is dispensable for proteolytic cleavage, but also supporting the fact that proNRG Δ Ig reached the cell surface as well as wild-type proNRG α 2c. That such cleavage occurred similarly to that of the wild-type protein was also suggested by the accumulation of sNRG Δ Ig in the culture media, in amounts similar to those observed in the media of proNRG α 2c-expressing cells.

Initially surprising was the fact that conditioned media from 293 cells expressing proNRG Δ Ig were much less efficient in promoting tyrosine phosphorylation of HER receptors. Such effect was accompanied by decreased phosphorylation of several proteins that are used as readouts of activation of pathways that participate in NRG-HER signal transduction. As a final consequence, the much lower activation of signaling by this system translated into poor stimulation of cell proliferation by NRG Δ Ig with respect to wild-type NRG α 2c.

The reason for the failure of soluble or transmembrane NRG Δ Ig to efficiently activate HER2 and HER3 is unknown. Former reports indicated that the Ig-like domain is required for efficient interaction of the EGF-like domain of NRGs with their receptors (Eto *et al.*, 2006). Such phenomenon can be due to a direct action of the Ig-like region of NRGs on receptor binding or a more global change in the structure affecting the EGF-like region, and ultimately altering interaction with HER receptors. While this appears possible, it is worth mentioning that other growth factors that belong to the EGF family of transmembrane growth factors, such as

proTGF α , are devoid of Ig-like domains and their soluble form is biologically active (Massague and Pandiella, 1993). It is also interesting to mention that most commercially available forms of NRGs are prepared without the Ig-like domain and are active. It is possible that the amounts used are much higher than the amounts we used from the culture media and that may explain the weak stimulation properties of the media form proNRG Δ Ig-transfected cells as compared to the wild-type or even to the commercially available NRG.

Using the MCF7 reporter system, we observed that activation of HER3, measured as its tyrosine phosphorylation, was more efficiently induced by sNRG α 2c with respect to sNRG Δ Ig. Such differential action may be due to several circumstances. Tyrosine phosphorylation of HER receptors has been shown to occur in an asymmetric manner, in which a donor receptor phosphorylates tyrosine residues of an adjacent acceptor receptor (Zhang *et al.*, 2006). In the case of HER2-HER3 receptor dimers, and due to the deficient kinase activity of HER3 (Shi *et al.*, 2010), the latter is expected to mainly act as the acceptor receptor, being HER2 the donor kinase. The restricted kinase activity of HER3 may very well explain the poor tyrosine phosphorylation of HER2, as indicated by western blotting experiments with anti-HER2 phosphospecific antibodies. Moreover, previously published results (Sanchez-Martin and Pandiella, 2012) have already shown that the pY signal obtained in western blots in which HER2 was immunoprecipitated after stimulation with NRG could be due to pY-HER3 which coprecipitated with HER2.

As proliferation of MCF7 cells has been reported to be insensitive to the action of trastuzumab (Agus *et al.*, 2002; Yuste *et al.*, 2005), it is interesting that this drug had an effect on the proliferation of MCF7-NRG α 2c cells. While such finding has already been reported (Yuste *et al.*, 2005), the responsible mechanism of action was not explored. Interestingly, the amount of pHER2 present in MCF7-NRG α 2c cells was poorly affected by trastuzumab, a finding that falls in line with published data using soluble NRG to activate HER2 (Agus *et al.*, 2002). In contrast, trastuzumab has a substantial effect on the tyrosine phosphorylation of HER3, and on the activation status of AKT. Those findings are relevant, given the important role of the HER3-PI3K signaling route in the proliferation of breast cancer cells (Chakrabarty *et al.*, 2012). Our results, together with data available in the literature, led us to postulate that the antiproliferative action of trastuzumab on MCF7-NRG α 2c cells may occur indirectly, by decreasing the HER2-mediated tyrosine phosphorylation of HER3, which in turn affects HER3-dependent downstream signaling.

An important aspect that requires some comments is to which extent the results herewith reported may have a translational impact. The finding that the Ig-like domain of proNRGs favors their HER receptor activating properties opens the possibility of targeting that domain to improve the effectiveness of anti-NRG therapies. Due to the unquestionable capability of NRGs to promote proliferation of cells bearing HER receptors, neutralization of NRG activity may represent an attractive approach (Jones *et al.*, 2017; Montero *et al.*, 2007, 2011; Yuste *et al.*, 2005). One could envisage several scenarios in which neutralization of NRGs may be of potential therapeutic benefit. On the one hand, neutralizing anti-NRG antibodies may reduce proliferation of tumors in which NRGs fed tumoral cells expressing HER receptors. Moreover, the expression of NRGs by some tumoral tissues may offer additional novel therapeutic possibilities, some of them based on their structural and cell biological properties. Thus, the fact that NRGs are synthesized as transmembrane molecules offers the possibility of raising antibodies that recognize the extracellular region of the proNRGs. These antibodies may not only neutralize the growth-promoting properties of NRGs, but may also serve to generate immune responses against the tumor, similarly to those raised against therapies that target the HER receptors (Clynes *et al.*, 2000). Furthermore, considering the transmembrane nature of proNRGs, they could preserve properties similar to those of other transmembrane proteins, such as HER receptors, including internalization and recycling (Sorkin and Goh, 2009). Given the fact that some efficient treatments directed to those receptors include antibody–drug conjugates that internalize and deliver a cytotoxic drug, the possibility of using a similar approach to target tumoral cells expressing proNRGs appears attractive and should be explored.

5. Conclusion

In conclusion, this report demonstrates that the Ig-like region of proNRGs exerts an important role in their capability to activate mitogenic responses upon ErbB/HER receptor activation. This knowledge is important when considering the potential targeting of proNRGs in tumors, as it may improve the antiproliferative properties of agents aimed at neutralizing the pro-oncogenic properties of proNRGs.

Acknowledgements

This study was supported by Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (BFU2012-39151, BFU2015-71371-R, PI15/00684, and FEDER), the

Scientific Foundation of the Spanish Association Against Cancer (AECC), and the CRIS Cancer Foundation. JCM is funded by the Instituto de Salud Carlos III through a Miguel Servet program (CPII17/00015). AC was supported by a doctorate fellowship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Ministry of Education, Brazil.

Author contributions

AC and JCM performed experiments, prepared figures, and wrote parts of the manuscript. RR-B performed experiments. AP supervised research and wrote parts of the manuscript. All authors corrected and approved the final version of the manuscript.

References

- Agus DB, Akita RW, Fox WD, Lewis GD, Higgins B, Pisacane PI, Lofgren JA, Tindell C, Evans DP, Maiese K *et al.* (2002) Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* **2**, 127–137.
- de Alava E, Ocana A, Abad M, Montero JC, Esparis-Ogando A, Rodriguez CA, Otero AP, Hernandez T, Cruz JJ and Pandiella A (2007) Neuregulin expression modulates clinical response to trastuzumab in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **25**, 2656–2663.
- Atlas E, Cardillo M, Mehmi I, Zahedkargaran H, Tang C and Lupu R (2003) Heregulin is sufficient for the promotion of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells in vivo. *Mol Cancer Res* **1**, 165–175.
- Breuleux M (2007) Role of heregulin in human cancer. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2358–2377.
- Britsch S, Li L, Kirchhoff S, Theuring F, Brinkmann V, Birchmeier C and Riethmacher D (1998) The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* **12**, 1825–1836.
- Burden S and Yarden Y (1997) Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* **18**, 847–855.
- Carraway KL III and Burden SJ (1995) Neuregulins and their receptors. *Curr Opin Neurobiol* **5**, 606–612.
- Chakrabarty A, Sanchez V, Kuba MG, Rinehart C and Arteaga CL (2012) Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 2718–2723.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG and Ravetch JV (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* **6**, 443–446.
- Ebbing EA, Medema JP, Damhofer H, Meijer SL, Krishnadath KK, van Berge Henegouwen MI, Bijlsma

- MF and van Laarhoven HW (2016) ADAM10-mediated release of heregulin confers resistance to trastuzumab by activating HER3. *Oncotarget* **7**, 10243–10254.
- Esparis-Ogando A, Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P and Pandiella A (2002) Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol* **22**, 270–285.
- Esparis-Ogando A, Montero JC, Arribas J, Ocana A and Pandiella A (2016) Targeting the EGF/HER ligand-receptor system in cancer. *Curr Pharm Des* **22**, 5887–5898.
- Eto K, Eda K, Kanemoto S and Abe S (2006) The immunoglobulin-like domain is involved in interaction of neuregulin1 with ErbB. *Biochem Biophys Res Commun* **350**, 263–271.
- Falls DL (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* **284**, 14–30.
- Hayes NV, Blackburn E, Smart LV, Boyle MM, Russell GA, Frost TM, Morgan BJ, Baines AJ and Gullick WJ (2007) Identification and characterization of novel spliced variants of neuregulin 4 in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 3147–3155.
- Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD *et al.* (1992) Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* **256**, 1205–1210.
- Jeong H, Kim J, Lee Y, Seo JH, Hong SR and Kim A (2014) Neuregulin-1 induces cancer stem cell characteristics in breast cancer cell lines. *Oncol Rep* **32**, 1218–1224.
- Jones MR, Lim H, Shen Y, Pleasance E, Ch'ng C, Reisle C, Leelakumari S, Zhao C, Yip S, Ho J *et al.* (2017) Successful targeting of the NRG1 pathway indicates novel treatment strategy for metastatic cancer. *Ann Oncol* **28**, 3092–3097.
- Kim J, Jang SJ, Choi CM and Ro JY (2016) Correlation of histologic subtypes and molecular alterations in pulmonary adenocarcinoma: therapeutic and prognostic implications. *Adv Anat Pathol* **23**, 330–338.
- Krane IM and Leder P (1996) NDF/hergulin induces persistence of terminal end buds and adenocarcinomas in the mammary glands of transgenic mice. *Oncogene* **12**, 1781–1788.
- Loeb JA and Fischbach GD (1995) ARIA can be released from extracellular matrix through cleavage of a heparin-binding domain. *J Cell Biol* **130**, 127–135.
- Loeb JA, Khurana TS, Robbins JT, Yee AG and Fischbach GD (1999) Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development. *Development* **126**, 781–791.
- Massague J and Pandiella A (1993) Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* **62**, 515–541.
- Meetze K, Vincent S, Tyler S, Mazsa EK, Delpero AR, Bottega S, McIntosh D, Nicoletti R, Winston WM, Weiler S *et al.* (2015) Neuregulin 1 expression is a predictive biomarker for response to AV-203, an ERBB3 inhibitory antibody, in human tumor models. *Clin Cancer Res* **21**, 1106–1114.
- Mei L and Xiong WC (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* **9**, 437–452.
- Meyer D and Birchmeier C (1995) Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* **378**, 386–390.
- Montero JC, Rodriguez-Barrueco R, Ocana A, Diaz-Rodriguez E, Esparis-Ogando A and Pandiella A (2008) Neuregulins and cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 3237–3241.
- Montero JC, Rodriguez-Barrueco R and Pandiella A (2011) Transautocrine signaling by membrane neuregulins requires cell surface targeting, which is controlled by multiple domains. *J Biol Chem* **286**, 24350–24363.
- Montero JC, Rodriguez-Barrueco R, Yuste L, Juanes PP, Borges J, Esparis-Ogando A and Pandiella A (2007) The extracellular linker of pro-neuregulin-alpha2c is required for efficient sorting and juxtacrine function. *Mol Biol Cell* **18**, 380–393.
- Montero JC, Yuste L, Diaz-Rodriguez E, Esparis-Ogando A and Pandiella A (2000) Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Mol Cell Neurosci* **16**, 631–648.
- Montero JC, Yuste L, Diaz-Rodriguez E, Esparis-Ogando A and Pandiella A (2002) Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent routes control shedding of transmembrane growth factors through multiple secretases. *Biochem J* **363**, 211–221.
- Sanchez-Martin M and Pandiella A (2012) Differential action of small molecule HER kinase inhibitors on receptor heterodimerization: therapeutic implications. *Int J Cancer* **131**, 244–252.
- Schwarz LJ, Hutchinson KE, Rexer BN, Estrada MV, Gonzalez Ericsson PI, Sanders ME, Dugger TC, Formisano L, Guerrero-Zotano A, Red-Brewer M *et al.* (2017) An ERBB1-3 neutralizing antibody mixture with high activity against drug-resistant HER2+ breast cancers with ERBB ligand overexpression. *J Natl Cancer Inst* **109**, <https://doi.org/10.1093/jnci/djx065>.
- Seoane S, Montero JC, Ocana A and Pandiella A (2016) Breast cancer dissemination promoted by a neuregulin-collagenase 3 signalling node. *Oncogene* **35**, 2756–2765.
- Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R and Lemmon MA (2010) ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 7692–7697.

- Sorkin A and Goh LK (2009) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* **315**, 683–696.
- Tsai MS, Shamon-Taylor LA, Mehmi I, Tang CK and Lupu R (2003) Blockage of heregulin expression inhibits tumorigenicity and metastasis of breast cancer. *Oncogene* **22**, 761–768.
- Warren CM, Kani K and Landgraf R (2006) The N-terminal domains of neuregulin 1 confer signal attenuation. *J Biol Chem* **281**, 27306–27316.
- Wen D, Suggs SV, Karunakaran D, Liu N, Cupples RL, Luo Y, Janssen AM, Ben-Baruch N, Trollinger DB, Jacobsen VL *et al.* (1994) Structural and functional aspects of the multiplicity of Neu differentiation factors. *Mol Cell Biol* **14**, 1909–1919.
- Yang L, Li Y, Shen E, Cao F, Li L, Li X, Wang X, Kariminia S, Chang B, Li H *et al.* (2017) NRG1-dependent activation of HER3 induces primary resistance to trastuzumab in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Int J Oncol* **51**, 1553–1562.
- Yuste L, Montero JC, Esparis-Ogando A and Pandiella A (2005) Activation of ErbB2 by overexpression or by transmembrane neuregulin results in differential signaling and sensitivity to herceptin. *Cancer Res* **65**, 6801–6810.
- Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA and Kuriyan J (2006) An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**, 1137–1149.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article:

Fig. S1. MCF7-NRG α 2c cells are sensitive to the anti-HER2 therapeutic antibody pertuzumab.