

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Papel de la pseudoquinasa Tribbles 3 en cáncer de mama: estudios mecanísticos e implicaciones en el pronóstico del subtipo lumina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alba Orea Soufi

DIRECTORES

Guillermo Velasco
María del Mar Lorente Pérez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Papel de la pseudoquinasa Tribbles 3 en cancer de mama: estudios mecanísticos e implicaciones
en el pronóstico del subtipo luminal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alba Orea Soufi

DIRECTOR

Dr. Guillermo Velasco
Dra. María del Mar Lorente Pérez

A Íñigo,
por su sonrisa.

AGRADECIMIENTOS

Tras todos estos años en el laboratorio 1, luego 2, después en la mitad del 6 y ahora en el 7, después de haber aprendido más de lo que pensaba y haber visto que los experimentos podían salir mal más veces de las que nunca me imaginé, tengo mucho y a muchas personas que agradecer.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis. A Guille, gracias por brindarme esta oportunidad y por tu acertada dirección, por guiarme pero también por darme autonomía desde el principio. Por tu dedicación, por apoyarme y comprenderme durante todos estos años y por abrirme la puerta del maravilloso mundo de las pseudoquinasas. A Mar, gracias por enseñarme, por ayudarme, por cuidarme, por estar conmigo mano a mano, tanto en mis primeros pasos en el laboratorio, como ahora en los últimos. Por compartir mi desorden, por tu atención, por confiar en mí y por ser sincera conmigo, por decirme lo que está bien y lo que está mal, siempre de la forma más dulce posible, y por hacerme ver que la tesis no estaba tan mal.

En segundo lugar, agradecer a los colaboradores que han hecho posible este trabajo. A José Lizcano y a Tatiana Erazo por permitirme hacer mi primera estancia y conocer otro laboratorio y otra ciudad, por darme otra visión del proyecto y enseñarme que una IP no tiene por qué durar tres días. A Endre Kiss-Toth por acogerme en su laboratorio, por su interés constante en el proyecto y por hacerme sentir una más en el consorcio TRAIN. A Eric Kalkhoven por ofrecerme la posibilidad de conocer nuevas técnicas y permitirme trabajar en un laboratorio de temática diferente, lo cual ha resultado muy enriquecedor para mí. A Ander Matheu e Isabel Manuela Álvarez por suministrarnos las muestras de los TMAs, y a Manuel Moreno, por la cuantificación de los mismos y por enseñarme a distinguir lo que era un tumor, una reacción desmosómica o las distintas células inmunes en ese fin de semana tan intenso. A José Ramos Pittol por estar conmigo durante el tiempo en Utrecht, por facilitarme muestras, protocolos, datos bioinformáticos, ideas, consejos, risas, todo lo que necesité y más de una manera tan desinteresada.

Sin embargo, no todo ha sido gente de fuera, dentro del departamento he recibido muchísimo apoyo y en este caso quería destacar a Begoña García Álvarez y a Sonia Castillo. A las dos quería agradecerles haberme dejado suero, placas y todo lo que nos faltaba o se nos agotaba en el L1/L2/L7. A Sonia, por enseñarme tantas cosas, desde las nociones básicas del cáncer de mama, pasando por el tratamiento de datos, hasta conceptos de lo más molecular. Por todas las ideas nuevas, los protocolos, muestras y experimentos que me has dado y en los que me has ayudado, porque sin ti el cauce de esta tesis hubiera sido muy distinto. A Bego, por darme la oportunidad de colaborar en un proyecto distinto que ha sido super enriquecedor, que me permitió salir de mi rutina del papel dual para hacer algo mucho más molecular, con nuevas aproximaciones experimentales, y que me ha encantado. Por la confianza con la que me has tratado y por todo lo que me has enseñado.

A Né, porque eres la mejor. Porque sin ti no hubiera sido lo mismo, ni en lo personal ni en lo profesional. Por ayudarme en tantos experimentos, porque nadie revela tantos blots y tan bien del tirón. Por secarme todas las membranas que abandono sin echarme la bronca, por estar ahí siempre, por comprenderme, por motivarme y por todos tus consejos. A Esti, mi “codirectora”. Por ayudarme cuando he estado atascada (y cuando no), por ser la experta en EMT, por leerte mi tesis y escuchar todas mis presentaciones, por estar conmigo, y por decir verdades. A Isri, por tu comprensión y confianza; por los viernes fuertes, por el vinho verde y por las apuestas absurdas. A Angélica, por tu ayuda con los experimentos de actividad GTPasa y por enseñarnos nuevas palabras; y a Ana, por tu ayuda con los clonajes y por la mejor playlist de Disney. A Esther, porque

aprendí un montón contigo y espero que algo de ti se me haya pegado al escribir la tesis en tu silla; estoy super contenta de que hayas sido mi evaluadora externa, gracias por tus consejos. A Andrea, por las risas y frustraciones que hemos compartido; a Elena, porque inspiras positivismo en el laboratorio, a Kun, por revisarme el inglés, y a Elenita, por enseñarme tantos protocolos, trucos, normas y orden cuando entré en el labo, te echo de menos. A Silvia y a Paola por ser las mayores expertas en cristal violeta del labo y las TFM's más majas que hemos tenido.

Además, quería agradecer a toda la gente del L1/L2/L7 por vuestro compañerismo y porque el ambiente de trabajo sin vosotros hubiera sido muy diferente. En especial a Irene, por ser mi "Mili", porque aunque solo fuese bajando a por agua, ese momento de descanso, de risa o de desahogo, ha sido super importante para mí en este tiempo. También a Juan, por todas las risas y por toda la ayuda que nos dabas cada vez que teníamos que hacer algún papel del doctorado.

Pero mi tesis no hubiera sido lo mismo sin toda la gente de fuera del labo. A mis amigos del instituto y a los bioquímicos, porque sin ellos no estaría aquí. Porque para rendir entre semana es importante desconectar el fin de semana y ahí estáis vosotros, siempre, en lo bueno y en lo malo, con una sonrisa, una palabra, una cerveza, un gesto. Especialmente, quería dar las gracias a los bioquímicos, porque también habéis estado ahí para todas esas preguntas que me han surgido y que he compartido sobre protocolos, reactivos, etc. Fuisteis lo mejor de estudiar bioquímica. Concretamente a Pablo, por ayudarme a hacer clonajes, expresiones fallidas en bacterias, ayudarme con la espectrometría de masas, etc.

Gracias a mis padres, por enseñarme lo que era la ciencia desde bien pequeñita (mezclar sustancias, ¿no?), por vuestro apoyo, por escuchar mis problemas, mis logros y mis presentaciones y por corregirme todas esas erratas que no había visto. A mi madre, por cuidarme, por intentar comprenderme siempre y por repetirme una y mil veces que sí había tesis suficiente. A mi padre, por salvarme la vida tantas veces, por todas las veces que me has esperado en la verja de biológicas, y por todas aquellas en las que me has recordado la importancia de la seguridad y la salud en el trabajo, "eternamente agradecida". A Peq, porque eres el mejor hermano del mundo, porque me inspiras, porque me ayudas, porque me apoyas, porque me entiendes. Porque me ha encantado compartir estos años en la misma facultad y porque no puedo resumir en una frase todo lo que te podría agradecer. Por eso, te dedico esta tesis (por eso y para ser iguales jeje). A la abu, por ser la mejor abuela del universo, por ser mi ejemplo, por darme fuerza y porque sin saber que $6 \times 6 = 36$ no podría haber llegado hasta aquí.

A Andrés, mi compañero, mi amigo, mi amor, mi corrector de tesis, mi densitometrador. Por enseñarme que el ImageLab mola más que el ImageJ, que *grouped* a veces es mejor que *column*, por ayudarme, por apoyarme, por escucharme, por darme tu opinión, por creer en mí más de lo que yo creo, por crecer juntos. Porque te odio porque me escribiste los agradecimientos más bonitos que he leído. Porque contigo puedo discutir sobre ciencia si lo necesito u olvidarla por completo. Por estar conmigo y por mucho más, GRACIAS.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	9
ABREVIATURAS.....	13
INTRODUCCIÓN.....	23
1. Cáncer de mama.....	25
1.1. Clasificación del cáncer de mama.....	26
1.1.1. Clasificación histológica.....	26
1.1.2. Clasificación molecular.....	27
1.1.3. Clasificación basada en perfiles de expresión génica: subtipos intrínsecos.....	27
1.2. Biología molecular del cáncer de mama.....	28
1.2.1. Origen y desarrollo del cáncer de mama	28
1.2.2. Principales vías de señalización implicadas en el desarrollo del cáncer de mama.....	31
Receptores tirosina-quinasa y las cascadas de señalización que desencadenan....	32
Vía de PI3K/AKT.....	33
Quinasas activadas por mitógenos (MAPK): vía de ERK.....	34
Receptores nucleares en cáncer de mama.....	35
Otros receptores y vías de señalización alteradas en cáncer de mama.....	36
1.3. Tratamiento.....	37
2. Pseudoquinasas Tribbles.....	39
2.1. Estructura de las proteínas Tribbles.....	40
2.1.1. Dominio quinasa y pseudoquinasa	40
2.1.2. Dominio Tribbles pseudoquinasa.....	41
2.1.3. Dominios N y C terminal de las proteínas Tribbles.....	41
2.2. Mecanismo de acción de las proteínas Tribbles e implicación en cáncer.....	42
3. TRIB3.....	43
3.1. Regulación de TRIB3.....	43
3.2. Funciones de TRIB3.....	44
3.3. Papel TRIB3 en cáncer.....	46
3.3.1. Expresión de TRIB3 en pacientes.....	46
3.3.2. Mecanismo de acción de TRIB3 en cáncer.....	46
3.4. TRIB3 en cáncer de mama.....	48
OBJETIVOS.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. Análisis de bases de datos de pacientes.....	57
2. Análisis de TRIB3 en muestras de pacientes.....	57
3. Cultivos celulares.....	58
4. Silenciamiento génico transitorio.....	59
5. Transfección de plásmidos para la expresión transitoria de proteínas.....	60
6. Infección con partículas lentivirales para el silenciamiento génico estable.....	61
7. Infección con partículas lentivirales para la expresión de proteínas.....	61
8. Tinción con cristal violeta.....	62
9. Ensayo de viabilidad celular mediante conteo de células fluorescentes.....	63
10. Ensayos de migración celular.....	63

11. Ensayos de invasión celular en cámaras de Boyden.....	63
12. Estudio de la actividad mitocondrial.....	64
13. Análisis por PCR cuantitativa (qPCR) de los niveles de mRNA.....	64
14. Análisis electroforético de los niveles de proteína.....	65
15. Fraccionamiento subcelular.....	67
16. Inmunofluorescencia.....	68
17. Coimmunoprecipitación.....	68
18. Precipitación de proteínas marcadas con GST.....	69
19. Ensayo de actividad GTPasa.....	70
20. Ensayos de ubiquitinación: precipitación de proteínas marcadas con histidinas.....	70
21. Análisis de las proteínas que interaccionan con TRIB3 por espectrometría de masas....	70
22. Clonajes.....	71
23. Purificación de proteínas.....	72
24. Ensayo de actividad quinasa de MTORC2 <i>in vitro</i>	74
25. Ensayo de interacción de RAC1 y TRIB3 <i>in vitro</i>	74
26. Inyección de células tumorales en la vena de la cola de ratones inmunodeficientes...	75ç
27. Análisis estadísticos.....	75
RESULTADOS.....	77
1. Estudio de los niveles de localización subcelular de TRIB3 y su correlación con el pronóstico en muestras de pacientes de cáncer de mama.....	79
1.1. TRIB3 se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama.....	79
1.2. TRIB3 podría ser un biomarcador de buen pronóstico en cáncer de mama luminal.....	80
1.3. Los niveles de TRIB3 y HER2 correlacionan positivamente en cáncer de mama.....	83
2.1. Estudio del papel de la pseudoquinasa TRIB3 en la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama luminal y análisis del mecanismo molecular subyacente.....	85
2.1.1. El silenciamiento de TRIB3 supone un incremento en la proliferación celular en líneas de cáncer de mama luminal HER2 positivas.....	85
2.1.2. El silenciamiento de TRIB3 induce un aumento en los niveles de HER2 en líneas de cáncer de mama luminal HER2 positivas.....	86
2.1.3. El silenciamiento de TRIB3 produce un incremento en la fosforilación de AKT pero no de ERK en líneas de cáncer de mama luminal HER2 positivas.....	87
2.1.4. El silenciamiento de TRIB3 supone una menor proliferación celular que se asocia a una menor fosforilación de AKT en líneas de cáncer de mama luminal HER2 negativas....	89
2.1.5. La sobreexpresión de TRIB3 disminuye la proliferación celular y fosforilación de AKT en líneas de cáncer de mama luminal HER2 positivas, pero aumenta la proliferación celular y fosforilación de AKT en líneas de cáncer de mama luminal HER2 negativas.....	93
2.2. Estudio del mecanismo molecular que determina el papel dual de TRIB3 en cáncer de mama: regulación de HER2 y de la vía AKT.....	95
2.2.1. El silenciamiento de TRIB3 afecta a la estabilidad de HER2 pero no a sus niveles de mRNA.....	95
2.2.2. El receptor HER2 también tiene un papel en la modulación de los niveles de la pseudoquinasa TRIB3.....	95
2.2.3. TRIB3 interacciona con AKT en las células BT474 y MCF7.....	96
2.2.4. TRIB3 inhibe la fosforilación de AKT mediada por MTORC2 <i>in vitro</i>	98
3. Análisis del papel de TRIB3 en los procesos de invasión y metástasis en cáncer de mama.....	102
3.1. Elevados niveles de TRIB3, tanto en el tumor como en las áreas ganglionares afectadas, se asocian a un menor desarrollo de metástasis en pacientes de cáncer de mama ER positivo.....	102
3.2. El silenciamiento de TRIB3 afecta a la capacidad migratoria e invasiva de células de cáncer de mama.....	104

3.3. TRIB3 podría regular la capacidad de colonización de las células de cáncer de mama.....	105
3.4. TRIB3 podría modular la expresión de proteínas relacionadas con la transición epitelio-mesénquima.....	106
3.5. TRIB3 interacciona con RAC1 y regula su actividad.....	108
4. Estudio de la implicación de TRIB3 en la respuesta a terapia de células de cáncer de mama luminales.....	109
DISCUSIÓN.....	113
CONCLUSIONES.....	129
CONCLUSIONS.....	133
BIBLIOGRAFÍA.....	137

RESUMEN

El cáncer de mama es el tipo tumoral más frecuente en mujeres. Numerosos estudios sobre los procesos moleculares implicados en el desarrollo tumoral mamario han incrementado el conocimiento de esta patología y han permitido la identificación de biomarcadores pronósticos y el desarrollo de nuevas terapias. Sin embargo, sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en la mayoría de los países. Se trata de una patología muy heterogénea que se clasifica atendiendo a distintos marcadores moleculares, siendo el subtipo tumoral más frecuente el cáncer de mama luminal, caracterizado por la expresión del receptor de estrógenos y diversas citoqueratinas características de las células epiteliales luminales que conforman los ductos mamarios.

TRIB3 es una pseudoquinasa que pertenece a la familia de las proteínas Tribbles y cuya disregulación se ha visto implicada en el desarrollo de distintas patologías, entre las que destacan los trastornos cardiovasculares y el cáncer. Concretamente en cáncer, se ha propuesto que TRIB3 puede desempeñar una acción pro- o antitumoral según el contexto celular y tipo de tumor y, particularmente en cáncer de mama, la bibliografía existente es escasa y poco concluyente.

Por ello, en esta tesis doctoral, estudiamos el papel de TRIB3 en el control del desarrollo y progresión del cáncer de mama, utilizando dos aproximaciones experimentales: por un lado, mediante el análisis los niveles y localización subcelular de TRIB3 en muestras de pacientes con cáncer de mama ER positivo y su relación con las características clínicas de dichas pacientes; y por otro lado, a través del estudio del efecto del silenciamiento y la sobreexpresión de TRIB3 en las propiedades tumorigénicas de líneas celulares de cáncer de mama luminal así como los mecanismos moleculares mediante los cuales TRIB3 regula dichas propiedades.

El análisis de los datos derivados de las muestras de pacientes mostró que niveles elevados de TRIB3 se asocian con una mayor supervivencia libre de enfermedad y una menor incidencia de metástasis. Por otro lado, los resultados obtenidos empleando líneas celulares mostraron que el silenciamiento de TRIB3 en líneas de cáncer de mama luminal HER2 positivas aumenta la proliferación y capacidad invasiva de estas células. Este efecto se asoció además a un incremento en los niveles de HER2 y a una mayor activación de la vía PI3K/AKT así como a una mayor actividad de la proteína G monomérica RAC1. Por el contrario, el silenciamiento de TRIB3 en líneas de cáncer de mama luminal HER2 negativo, se asoció a una menor proliferación y capacidad invasiva de estas células, así como a una menor actividad de la vía PI3K/AKT y de RAC1. Específicamente, nuestros resultados muestran que existe una regulación cruzada entre TRIB3 y HER2 de manera que HER2 regula positivamente los niveles de TRIB3 mientras que TRIB3 regula negativamente la estabilidad de HER2. Desde el punto de vista mecanístico, nuestros resultados indican que TRIB3 inhibe la fosforilación de AKT por el complejo MTORC2 *in vitro* y que TRIB3 puede interactuar de manera diferente con las isoformas de AKT en células HER2 positivas y HER2 negativas. Adicionalmente, este estudio ha permitido identificar a RAC1 y a STUB1 como dos posibles nuevos interactores de TRIB3 candidatos a mediar sus efectos. Finalmente, estudiamos el efecto del tratamiento con distintos agentes antitumorales y encontramos que las células con niveles reducidos de TRIB3, tanto HER2 positivas como las HER2 negativas, fueron más resistentes al tratamiento con agentes quimioterapéuticos, lo que indicaría que TRIB3 podría sensibilizar las células a la terapia y por tanto tener un papel antitumoral en estas condiciones.

Tomados en conjunto los datos obtenidos en este trabajo apoyan la idea de que TRIB3 puede ser un biomarcador pronóstico que se asocia a una mayor supervivencia libre de enfermedad y a una menor incidencia de metástasis al menos en pacientes de cáncer de mama luminal que vayan a ser tratados posteriormente con quimioterapia y podría desempeñar un papel supresor tumoral en este tipo de tumores. Nuestros resultados también apoyan la existencia de un papel dual de

RESUMEN

TRIB3 en la regulación de las propiedades tumorigénicas de las células de cáncer de mama luminal dependiendo del contexto celular y del tipo de alteraciones genéticas presentes en las mismas. Además, la regulación recíproca entre TRIB3 y HER2 descrita en esta tesis doctoral podría ser relevante para el futuro diseño de terapias más selectivas para el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo. Por último, nuestros datos también sugieren que la expresión de TRIB3 se relaciona con una mejor respuesta al tratamiento quimioterapéutico lo que apoya que podría explorarse su posible papel como biomarcador de respuesta a terapia en este tipo de tumores.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most common type of cancer in women. Numerous studies have characterized the molecular processes involved in breast cancer development and have allowed the identification of prognostic biomarkers that have led to the implementation of new more selective therapies. Despite these advances, BC remains as the leading cause of death associated with cancer in women in most countries. BC is a very heterogeneous pathology that is classified according to different molecular markers, being the most frequent tumor subtype luminal breast cancer, characterized by the expression of the estrogen receptor and various cytokeratins characteristic of the luminal epithelial cells that constitute the mammary ducts.

TRIB3 is a pseudokinase that belongs to the family of Tribbles proteins and whose dysregulation has been implicated in the development of different pathologies, including cardiovascular disorders and cancer. Specifically in cancer, it has been proposed that TRIB3 can play a pro- or antitumor role depending on the cellular context. Specifically in breast cancer, the existing literature is scarce and inconclusive.

Therefore, in this doctoral thesis, we studied the role of TRIB3 in the control of breast cancer generation and progression. To this aim, we used two experimental approaches: to analyze the levels and subcellular location of TRIB3 in samples from patients with BC as well as its relationship with the clinical characteristics of these patients; and to investigate the effect of the silencing and overexpression of TRIB3 on the tumorigenic properties of luminal breast cancer cell lines as well as the molecular mechanisms by which TRIB3 regulates these properties.

Analysis of data derived from patient samples showed that elevated levels of TRIB3 are associated with higher disease-free survival and a lower incidence of metastasis. On the other hand, the results obtained using cell lines showed that the silencing of TRIB3 in HER2 positive luminal breast cancer cell lines increases the proliferation and invasiveness of these cells. This effect was also associated with an increase in HER2 levels and a stronger activation of the PI3K/AKT pathway, as well as an enhanced activity of the monomeric G protein RAC1. In contrast, TRIB3 silencing in HER2 negative luminal breast cancer cell lines was associated with lower proliferation and invasiveness of these cells as well as with a lower activity of the PI3K/AKT pathway and RAC1. Our results show that there is a crossed-regulation between TRIB3 and HER2. Thus, HER2 positively regulates TRIB3 levels while TRIB3 negatively regulates the stability of HER2. From a mechanistic point of view, this study has identified RAC1 and STUB1 as two possible new TRIB3 interactors that are candidates to mediate their effects in BC cells. Likewise, our results indicate that TRIB3 inhibits the phosphorylation of AKT by the MTORC2 complex *in vitro* and that TRIB3 may interact differently with AKT isoforms in HER2 positive and HER2 negative cells. Finally, we studied the effect of different antitumor agents and found that low levels of TRIB3, both HER2 positive and HER2 negative cells, are associated with the resistance to treatment with chemotherapeutic agents.

Taken together, the data obtained in this work support the idea that TRIB3 may be a prognostic biomarker that is associated with higher disease-free survival and a lower incidence of metastasis, at least in ER positive breast cancer patients who will be treated with chemotherapy and therefore that TRIB3 may play a tumour suppressing role in this type of tumors. Our results also support the existence of a dual role of TRIB3 in the regulation of the tumorigenic properties of luminal breast cancer cells depending on the cellular context and the type of genetic alterations exhibited by the cells. Furthermore, this doctoral thesis has also described the existence of a reciprocal regulation between TRIB3 and HER2 that could be relevant for the design of more selective therapies for the treatment of HER2 positive breast cancer. Finally, our data also support the idea that TRIB3 expression is related to a better response to

ABSTRACT

chemotherapeutic treatment, suggesting that its expression could be explored as a possible biomarker of response to therapy in these tumors.

ABREVIATURAS

A

ACACA: acetil-CoA carboxilasa α .

AG: ácidos grasos.

AKT: AKT serina/treonina quinasa

APC: regulador APC de la vía de señalización de WNT.

AMPK: proteína quinasa activada por AMP.

APOBEC3A: subunidad catalítica de la enzima de edición del mRNA de la apolipoproteína 3A.

APPL1: proteína adaptadora fosfotirosina que interactúa con el dominio PH y la cremallera de leucina.

ATF4: factor activador de la transcripción 4.

B

BAD: agonista de muerte celular asociado a BCL2.

BCL2: Regulador de apoptosis BCL2.

BRCA: BRCA asociado a la reparación del DNA.

BSA: albúmina de suero bovino.

bucle A: bucle de activación.

bucle T: bucle catalítico.

C

CAMK2: proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina 2.

CB: receptor cannabinoide.

CDC25A: ciclo de división celular 25A.

CDK: quinasa dependiente de ciclina.

CDKN1A/B: inhibidor de CDK 1 A/B.

CEBP α : proteína de unión al potenciador CCAAT α

CHOP: transcrito inducible por daño en el DNA 3.

Nota: el nombre oficial de esta proteína es DDIT3 pero en esta tesis se ha utilizado el símbolo alternativo CHOP por ser la nomenclatura más frecuentemente utilizada.

CHX: cicloheximida.

Citop: citoplasma.

CoA: coactivador.

COP1: E3 ubiquitin ligasa COP1.

CREB: proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc.

ABREVIATURAS

C terminal: carboxilo terminal.

D

DEPTOR: proteína que interactúa con MTOR con dominio DEP.

DHMEQ: dehidroximetilepoxiquinomicina.

DLV: *Dishevelled*.

DMP: pimelimidato de dimetilo.

E

E2: estradiol.

ECAR: ratio de acidificación del medio extracelular.

EDTA: ácido etilendiaminotetra-acético.

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EGTA: ácido etilenglicol-bis(b-aminoetil eter)-tetraamino-tetra-acético.

ELAVL1: proteína de unión a RNA tipo ELAV 1.

ELK1: factor de transcripción ETS ELK1.

EMT: transición epitelio-mesénquima.

Enº: fracción de elución nº.

EP300: proteína de unión a E1A p300.

ER: receptor de estrógenos

ERE: elementos de respuesta a estrógenos.

ERK1/2/5: proteína quinasa activada por mitógenos 3/1/7 (respectivamente).

Nota: los nombres oficiales de estas proteínas son MAPK3/MAPK1/MAPK7 respectivamente pero en esta tesis se han utilizado los símbolos alternativos ERK1/ERK2/ERK5 por ser la nomenclatura más frecuentemente utilizada.

ETV4: factor de transcripción 4 variante de ETS.

Nota: el nombre oficial de esta proteína es ETV4 pero en esta tesis se ha utilizado el símbolo alternativo E1A por ser la nomenclatura más frecuentemente utilizada.

F

FASN: ácido graso sintasa

FBS: suero fetal bovino.

FCCP: carbonil cianuro-4(trifluorometoxi) fenilhidrazona.

FDA: Agencia reguladora de Medicamentos y Alimentos de los EE.UU.

Fig.: Figura.

FISH: hibridación fluorescente *in situ*.

FOXO: *forkhead box*.

FZR1: *fizzy and cell division cycle 20 related 1*.

G

GAP: proteína activadora de GTPasa.

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GEF: factor de intercambio de nucleótidos.

GFP: proteína fluorescente verde.

GLI: miembro de la familia de GLI *zinc finger*.

GPCR: receptor acoplado a proteína G.

GP1R: receptor de estrógeno acoplado a proteína G 1.

GRB2: proteína de unión a receptores de factores de crecimiento 2.

GSK3: glucógeno sintasa quinasa 3

H

H2B: histona 2B.

HER2: Receptor tirosina-quinasa 2 erb-b2.

Nota: el nombre oficial de esta proteína es ERBB2 pero en esta tesis se ha utilizado el símbolo alternativo HER2 por ser la nomenclatura más frecuentemente utilizada.

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos.

HH: molécula de señalización celular hedgehog.

HIF α : factor inducible por hipoxia α .

HisUb: 6His-ubiquitina.

HR: receptor hormonal

HSP90: proteína de choque térmico 90.

I

IGF: factor de crecimiento tipo insulina.

IGF1R: receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1.

IHQ: inmunohistoquímica.

INPP4B: fosfatidil inositol-4 fosfatasa de tipo II.

INPP5B: fosfatidil inositol-5 fosfatasa de tipo II

INSR: receptor de insulina.

IP: inmunoprecipitación.

ABREVIATURAS

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

J

JAG1: ligando canónico de NOTCH *jagged* 1.

JAK: quinasa Janus.

L

LB: medio de cultivo LB.

LC: cromatografía líquida.

LRRFIP1: proteína 1 de unión a FII e interacción con LRR.

M

MAPK: quinasa activada por mitógeno.

MAP2K: MAPK quinasa.

MAP3K: MAP2K quinasa.

MET: oncogén MET, receptor tirosina-quinasa.

MKI67: Marcador de proliferación Ki-67.

MLST8: proteína asociada a MTOR, homóloga a LST8.

MMP2/9: metalopeptidasas de la matriz 2/9.

MNK1/2: quinasa de interacción con MAPK1/2.

MS: espectrometría de masas.

MTOR: diana mecánica de la rapamicina.

MTORC1/2: complejo 1/2 de MTOR.

MYC: proto-oncogén MYC, factor de transcripción tipo bHLH.

N

NFkB: factor nuclear k B.

NOTCH: receptor de notch.

NR1D1: receptor nuclear 1D1

Ns: no significativo.

N terminal: amino terminal.

NTA: ácido nitrilotriacético.

O

OCR: ratio de consumo de oxígeno.

P

PAK1: proteína quinasa activada por p21 (RAC1) 1.

P/S: penicilina/estreptomicina.

PBD: dominio de unión a p21 de PAK1.

PBS: tampón fosfato salino.

PD: *pull-down* (precipitación de proteínas).

PDPK1: quinasa dependiente de 3- fosfoinosítidos.

PEI: polietilenimina.

PET: tereftalato de polietileno.

PH: dominio con homología con pleckstrina.

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa.

PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.

PIP3: fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato.

PRKC: proteína quinasa C.

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PPAR α/γ : receptor α/γ activado por proliferadores de peroxisomas.

PR: receptor de progesterona

PRR5: proteína rica en prolina 5

PTB: dominio de unión a fosfotirosinas.

PTCH: *patched*.

PTEN: proteína fosfatasa y homóloga a la tensina.

PVDF: fluoruro de polivinilideno.

Q

qPCR: PCR cuantitativa.

R

RAR α : receptor α del ácido retinoico.

RAF: proto-oncogén RAF, serina/treonina quinasa.

RAS: proto-oncogén RAS, GTPasa.

RB1: corepresor transcripcional RB 1.

RBPJ: la proteína de unión a la señal de recombinación para la inmunoglobulina κ en la región J.

RE: retículo endoplásmico.

ABREVIATURAS

RHEB: homólogo de RAS de unión a MTORC1.

RICTOR: compañero independiente de RPTOR del complejo de MTOR 2.

RIPA: ensayo de radioinmunoprecipitación.

RPMI: Instituto memorial de Roswell Park.

RSK: quinasa ribosómica S6 p90.

RTK: receptores con actividad tirosina-quinasa.

RT-PCR: PCR en tiempo real.

S

Sb: sobrenadante.

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

SH2: dominio con homología a SRC2

SHC: proteína adaptadora SHC.

shC: shRNA control.

shRNA: RNA de horquilla corta.

shTRIB3: shRNAs contra TRIB3.

SIAH1: proteína E3 ubiquitín-ligasa 1 siah.

siHER2: siRNA contra HER2.

SIN1: Proteína 1 asociada a MAPK.

Nota: el nombre oficial de esta proteína es MAPKAP1 pero en esta tesis se ha utilizado el símbolo alternativo SIN1 por ser la nomenclatura más frecuentemente utilizada.

siRNA: RNA pequeño de interferencia

SMAD3: miembro 3 de la familia SMAD

SMO: *smoothened*, receptor de la clase de *frizzled*.

SOS1: factor de intercambio de nucleótidos de guanina de Ras/Rac SOS 1.

SOX2: factor de transcripción 2 *SRY-box*.

SQSTM1: secuestrosoma 1.

Nota: también se ha utilizado el símbolo alternativo p62 por ser una nomenclatura frecuentemente utilizada.

STAT: transductor de la señal y activador de la transcripción.

STUB1: proteína que contiene *U-box* y homóloga a STIP1.

SV40: virus de simio 40

T

TBST: tampón Tris salino con Tween-20.

TF: factor de transcripción.

TFRE: Elementos de respuesta a factores de transcripción.

TGF β : factor de crecimiento transformante β

THC: Δ^9 -tetrahidrocannabinol.

TIAM1: GEF1 asociado a RAC1 TIAM.

TMA: *microarray* de tejido.

TP53: proteína tumoral p53.

Trbl: Tribbles (en *Drosophila melanogaster*)

TRIB1/2/3: pseudoquinasa Tribbles 1/2/3.

TSC2: subunidad 2 del complejo TSC.

TTA: ácido tetradeciltioacético.

U

USP9X: peptidasa 9 ligada al X específica de ubiquitina.

UTR: región no traducida.

V

Veh: vehículo.

W

WB: Western blot.

WNT: miembro de la familia de WNT.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres, con aproximadamente 2,1 millones de casos nuevos cada año. Aunque la supervivencia de las pacientes se ha incrementado notablemente en las últimas décadas gracias a la mejora en las técnicas de detección y los avances en el tratamiento, sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en la mayoría de los países (Fig. 1).

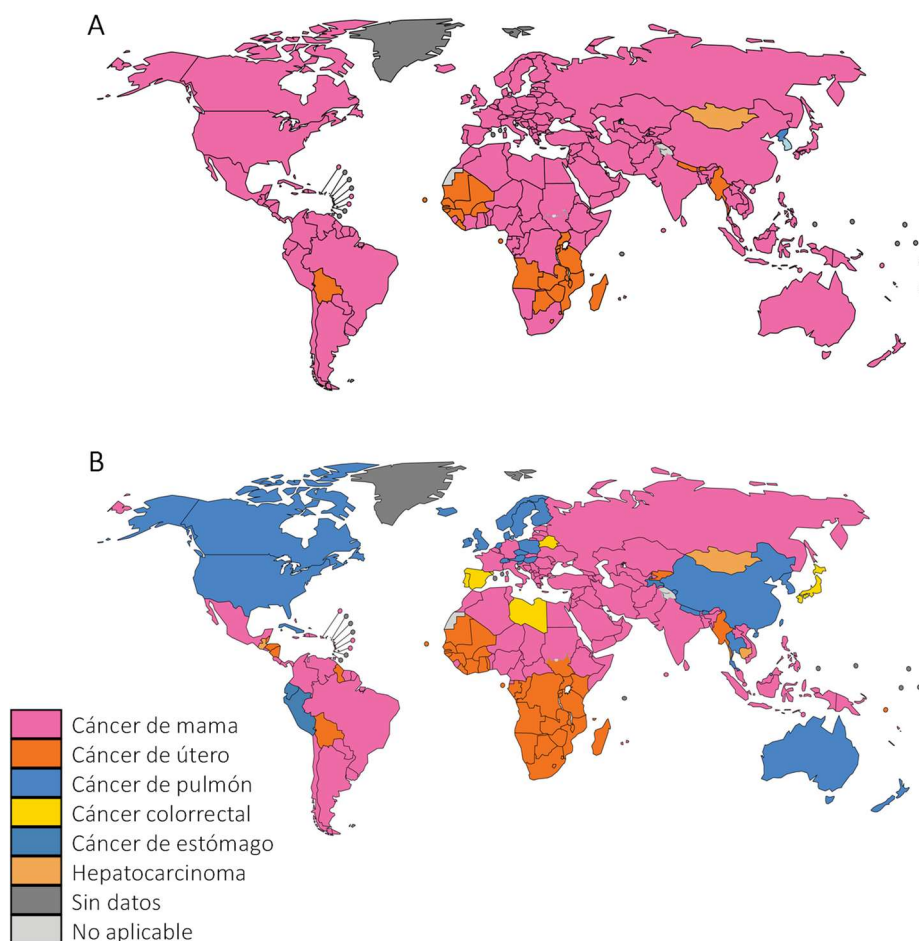


Figura 1. Epidemiología del cáncer en mujeres en 2018 a nivel mundial. Mapamundi donde se representa el tipo de cáncer con mayor incidencia (A) y mortalidad (B) en mujeres en cada país (Adaptado de [1]). Como se observa en la figura, el cáncer de mama es el tipo tumoral de mayor incidencia y con mayor mortalidad en la mayoría de los países.

El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en la glándula mamaria, un órgano bilateral cuya principal función es la producción de leche. Este órgano sufre cambios drásticos a lo largo de la vida de las mujeres en cuanto a tamaño, forma y función; desde la etapa prenatal, pasando por el crecimiento infantil, pubertad, embarazo, lactancia y regresión postmenopáusica [2]. Histológicamente, la mama está constituida por numerosos lóbulos productores de leche, los cuales se unen por ductos o conductos galactóforos que vierten a un conducto interlobular que termina en el pezón (Fig. 2A). Estos lóbulos y conductos están formados por una única capa de células epiteliales que conforman el lumen (células luminales) y por una capa de células mioepiteliales contráctiles que las rodean (células basales). La membrana basal separa estas estructuras del estroma, el cual está formado por matriz extracelular, distintos tipos de células (fibroblastos, células del sistema inmune, adipocitos, etc.) y estructuras organizadas como vasos sanguíneos y linfáticos, los cuales contribuyen

al microambiente y presentan también un papel importante en el desarrollo tumoral. Para aportar consistencia y volumen, la glándula mamaria está rodeada de tejido graso (**Fig. 2B**) [3, 4].

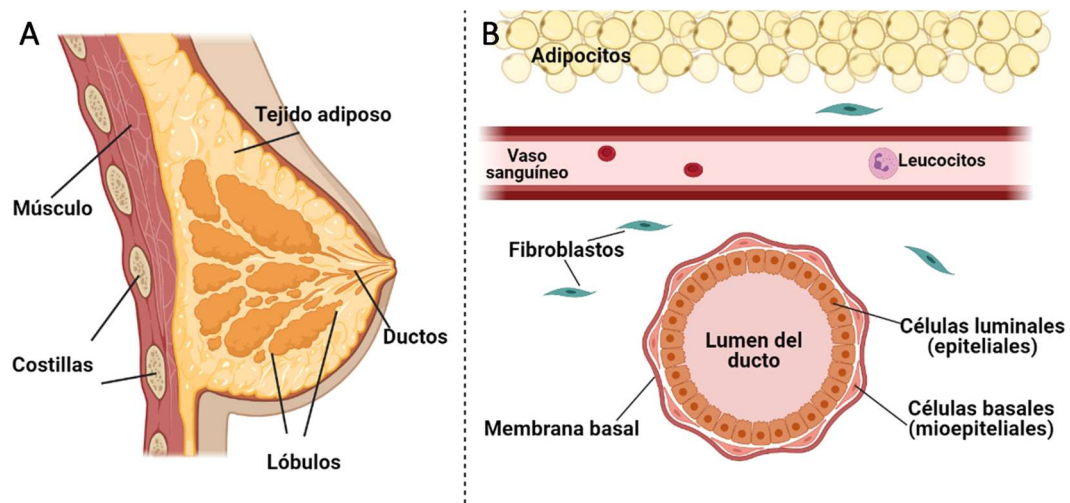


Figura 2. Anatomía de la mama. (A) Esquema de la anatomía de la glándula mamaria, formada principalmente por lóbulos y ductos que terminan en el pezón. (B) Componentes celulares del ducto mamario, formado por una capa interna de células luminales rodeada de una capa de células mioepiteliales, las cuales se separan del estroma por la membrana basal. (Creado con BioRender.com).

1.1. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una patología muy heterogénea que cursa con distintas características clínicas, histopatológicas y moleculares. Por ello, es muy importante clasificar adecuadamente estos tumores para seleccionar el tratamiento de las pacientes y poder predecir la evolución de la patología. Con este objetivo, actualmente se realiza un análisis histopatológico en el que se determina el subtipo histológico, tamaño del tumor y afectación de ganglios linfáticos, junto con un estudio molecular de la presencia de ciertos biomarcadores en el tejido tumoral. Además, se tiene en cuenta la información clínica de la paciente [examen clínico, edad y estado hormonal (menopausia o alteraciones del estado hormonal de la paciente)] así como la existencia de un posible componente hereditario [5].

1.1.1. Clasificación histológica

La clasificación del cáncer de mama que se ha utilizado de manera clásica hace referencia a la histopatología del tumor. Por un lado, se distingue entre carcinoma *in situ*, si la membrana basal se mantiene intacta, o carcinoma invasivo si, por el contrario, la membrana basal se ha roto y las células tumorales han entrado en contacto con el estroma que la rodea. En este último caso, se distingue también entre carcinoma invasivo primario o secundario, según si ha alcanzado el tejido que rodea a la mama, como los nódulos linfáticos axilares (secundarios), o no (primarios). Por otro lado, los tumores de mama se dividen también en dos grandes grupos según se hayan originado a partir de las células que conforman los lóbulos (carcinoma lobular) o los ductos (carcinoma ductal) [3, 6]. Además, atendiendo a los criterios de Elston y Ellis [7], el cáncer de mama se clasifica en tres Grados (I, II, III) según su malignidad, la cual se determina en función del nivel de diferenciación mediante el estudio por tinción con hematoxilina-eosina de la formación de túbulos, la presencia de núcleos atípicos y el número de células mitóticas [4].

Tradicionalmente, se ha empleado en clínica esta clasificación histopatológica que agrupa en la misma categoría tumores con características biológicas y clínicas muy diferentes. Aunque tiene

cierto valor pronóstico, se ha hecho necesaria una clasificación más precisa para estratificar a las pacientes en base a la presencia de determinados marcadores moleculares. Esta nueva clasificación molecular permite la elección de un tratamiento más personalizado para cada paciente, evitando así el sobretratamiento con quimioterapia cuando no resulte necesario [3, 5, 6, 8].

1.1.2. Clasificación molecular

El análisis de rutina de la presencia de marcadores específicos en cáncer de mama ha permitido definir subtipos moleculares con distinto pronóstico, así como identificar tumores susceptibles de recibir un tratamiento específico. Los principales marcadores utilizados son el receptor tirosina-quinasa 2 erb-b2 (HER2) y los receptores hormonales (HR) de estrógenos (ER) y progesterona (PR), de los que se hablará con más detalle en apartados posteriores. Estos marcadores se analizan de manera semicuantitativa por inmunohistoquímica (IHQ), aunque HER2 también se estudia por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en casos dudosos [3, 5].

1.1.3. Clasificación basada en perfiles de expresión génica: subtipos intrínsecos

Los avances en las técnicas de detección a gran escala han permitido analizar miles de genes en un mismo experimento, creando perfiles moleculares en los que poder clasificar los distintos tumores, mejorando así la estratificación de las pacientes de cáncer de mama. En unos primeros trabajos realizados por Perou *et al.* [9] y Sorlie *et al.* [10, 11] se evaluó la expresión génica de muestras de carcinomas de mama extraídas antes y después de haber recibido tratamiento con quimioterapia. Estos autores analizaron 9000 genes en *microarrays* de DNA, seleccionando finalmente 550 genes que parecían definir el fenotipo de tumores individuales. Estos 550 genes conforman la denominada lista de genes “intrínsecos” y permiten definir según sus perfiles de expresión 5 subtipos intrínsecos de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, enriquecidos en HER2, basal y normal [5, 6, 8, 12-14]:

- Tumores luminales: Se caracterizan por la expresión de marcadores de células epiteliales luminales y de los receptores hormonales (HR positivos). Estos tumores se subdividen a su vez en dos categorías. Los tumores de tipo luminal A son, generalmente, de bajo Grado y con muy buen pronóstico. Se caracterizan por ser HER2 negativos, con baja expresión de genes implicados en proliferación celular y elevada expresión de genes relacionados con el receptor de estrógenos. Por el contrario, los tumores tipo luminal B suelen ser de mayor Grado y peor pronóstico. Además, pueden a su vez sobreexpresar HER2 y presentar una elevada expresión de genes implicados en mitosis y proliferación celular.
- Tumores de tipo enriquecido en HER2: Son los tumores que presentan peor pronóstico y se caracterizan por ser HR negativos y sobreexpresar el oncogén HER2 (HER2 positivos). Igualmente, estos tumores suelen tener una expresión aumentada de genes asociados a las vías de señalización reguladas por HER2, o de los genes que se encuentran en la región del cromosoma 17 donde se encuentra HER2 (17q12) y que está frecuentemente amplificada en este subtipo de tumores.
- Tumores de tipo basal: Son tumores de alto Grado, también conocidos como triple negativos por la ausencia de expresión de los tres biomarcadores característicos del cáncer de mama (ER, PR y HER2). Expresan marcadores típicos de células mioepiteliales basales como las citoqueratinas 5, 6, 14 y 17, la P-cadherina y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

- Tumores de tipo normal: Son aquellos que expresan marcadores de células normales de la mama. Sin embargo, en los últimos años este subtipo ha dejado de utilizarse pues se considera una contaminación por el tejido mamario normal adyacente [12, 15].

Posteriormente se identificó otro subtipo de cáncer de mama denominado *Claudin-low*. Se caracteriza por ser también triple negativo, pero además por presentar una escasa expresión de marcadores epiteliales (como claudina 3, 4 y 7 o E-cadherina) y una elevada expresión de proteínas relacionadas con procesos de transición epitelio-mesénquima (EMT) y de células madre tumorales [16, 17].

Esta clasificación en los subtipos intrínsecos resulta muy útil en términos de pronóstico y tratamiento. Actualmente, hay varios *microarrays* comerciales que permiten analizar un panel de genes de manera estandarizada, cuantitativa y reproducible mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) a partir de tejido fijado. Las 5 pruebas más utilizadas son OncotypeDX, MammaPrint, Prosigna, EndoPredict, y Breast Cancer Index SM, las cuales permiten la predicción de recurrencia y, algunas de ellas, también la clasificación de los tumores en los 5 subgrupos y la predicción de la respuesta a terapia [18]. Sin embargo, el valor pronóstico y predictivo varía según el *microarray* utilizado, incluso puede variar dentro de un mismo tumor debido a la heterogeneidad del cáncer de mama. Además, por su elevado coste, aún no se utilizan de manera rutinaria en clínica [19]. Por otro lado, también se han realizado estudios utilizando técnicas de IHQ para clasificar los tumores analizando marcadores como ER, PR, HER2, MKI67 (marcador de proliferación) y citoqueratinas, y el resultado se asemeja considerablemente al obtenido empleando *microarrays* de DNA [12, 13].

1.2. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA

1.2.1. Origen y desarrollo del cáncer de mama

El proceso de tumorigénesis es progresivo y conlleva una serie de alteraciones que derivan en la transformación de una célula normal en una célula cancerígena (**Caja 1**). Entender cómo se inicia y desarrolla un tumor nos puede ayudar a encontrar nuevos marcadores de pronóstico, dianas terapéuticas y comprender los mecanismos de resistencia a las terapias que se utilizan en la actualidad. El cáncer de mama comienza con la progresión desde una hiperproliferación ductal a un carcinoma *in situ*, una proliferación neoplásica intraductal separada del estroma mamario por la membrana basal intacta [20].

Existen dos modelos principales sobre el origen y desarrollo del cáncer de mama: la hipótesis de las células madre y el modelo de la expansión clonal. Ambos modelos apoyan el origen del tumor desde una única célula que adquirió múltiples mutaciones y la capacidad de proliferar de manera ilimitada. Sin embargo, el primero defiende que las células iniciadoras del tumor son células madre, que darán lugar a células diferenciadas, pero son las primeras las que tienen la capacidad de autorrenovación y cuyos cambios génicos podrían asociarse a la progresión tumoral y resistencia a terapia. Sin embargo, el segundo modelo defiende que el tumor podría originarse a partir de cualquier célula que haya adquirido alguna ventaja selectiva y todas las células que lo conforman pueden adquirir nuevas alteraciones genéticas y epigenéticas, así como modificaciones por las señales paracrinas recibidas. Por tanto, todas tendrían el potencial de autorrenovación y podrían contribuir a la progresión tumoral y a la resistencia a terapia. Ambas hipótesis no son excluyentes y una combinación de ambas también sería un modelo plausible [20].

Aproximadamente el 40% de los carcinomas *in situ* progresan a carcinoma invasivo en ausencia de tratamiento, pero actualmente es difícil predecir cuáles podrían progresar a carcinomas invasivos

y cuáles no [21]. La EMT es un programa celular que se activa durante el desarrollo embrionario, pero también puede reactivarse durante el desarrollo tumoral. En el proceso de tumorigénesis, el programa EMT induce a las células tumorales con fenotipo epitelial a adquirir un fenotipo más mesenquimal e invasivo gracias a la modificación de la expresión de las proteínas de adhesión célula-célula y de la matriz extracelular [22-24]. En este proceso, destaca el papel de las cadherinas, siendo dos eventos importantes, por un lado la pérdida de E-cadherina, implicada en las adhesiones célula-célula con otras proteínas epiteliales [25, 26], y por otro lado, la expresión de N-cadherina, que permite la interacción con otras cadherinas mesenquimales y por tanto la interacción con células del estroma [27]. La adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular es mediada por integrinas y también ha de modificarse [26]. Para ello, las células tumorales degradan la matriz con enzimas proteolíticas como metaloproteinasas, lo que permite la salida del tejido [28].

Posteriormente, los carcinomas invasivos pueden progresar a metastásicos. Actualmente, entre el 6% y el 10% de las pacientes con cáncer de mama presentan metástasis en el momento del diagnóstico y aproximadamente el 50% desarrollará metástasis, disminuyendo drásticamente su esperanza de vida a 2-3 años [29] y siendo la principal causa de muerte en estas pacientes [30]. La localización de la metástasis depende de propiedades intrínsecas del subtipo tumoral, de la estructura de los vasos sanguíneos y linfáticos, de la presencia de quimioatrayentes y de las interacciones de las células tumorales con las células y matriz extracelular del nuevo órgano a colonizar [30, 31]. Por tanto, este proceso no ocurre de manera aleatoria y, en el caso de los tumores de mama, los principales órganos afectados son los huesos, pulmones, cerebro e hígado [32, 33]. La terapia utilizada para el cáncer metastásico (cirugía, radioterapia y quimioterapia) es solamente paliativa. Por ello, se está investigando en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas basadas en la identificación de moléculas y rutas de señalización importantes durante el proceso de metástasis. Estas se pueden dividir en tres grupos: (i) proteínas de iniciación de la metástasis, (ii) de progresión de la metástasis, y (iii) de virulencia de la metástasis. En el primer grupo se encuentran aquellas que favorecen el crecimiento e invasión local, la intravasación y la diseminación, destacando proteínas implicadas en la EMT y en el mantenimiento de células madre. El segundo grupo está constituido por factores que promueven la extravasación a un determinado órgano, así como un entorno tumoral adecuado para el crecimiento de la micrometástasis. Y, finalmente, el tercer grupo lo forman factores que permiten la generación de macrometástasis al promover la supervivencia y crecimiento tumoral en la nueva localización [31].

Caja 1. Alteraciones esenciales del cáncer descritas por Hanahan y Weinberg.

En el año 2000, Hanahan y Weinberg describieron 6 alteraciones esenciales para el desarrollo tumoral [34], que ampliaron posteriormente a 8 alteraciones y 2 características habitantes (Fig. 3) [35]:

1. Señalización proliferativa mantenida.

En las células tumorales, ocurre una desregulación del ciclo celular que conlleva la proliferación mantenida de estas células debido a: (i) la secreción de factores de crecimiento que activan el ciclo celular, (ii) la sobreexpresión de los receptores de dichos factores de crecimiento (o la expresión de formas mutadas constitutivamente activas de esos receptores), (iii) la activación constitutiva de componentes de las vías de señalización de estos receptores o (iv) alteraciones que afectan a proteínas directamente implicadas en la regulación del ciclo celular. En cáncer de mama, la ciclina D1, implicada en la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, se encuentra sobreexpresada en el 50% de los tumores [36].

2. Insensibilidad a señales supresoras del crecimiento. Las células tumorales, además de proliferar de forma continuada, han de evadir las señales que suprimen el crecimiento. Por ello, es frecuente encontrar mutaciones en diversos genes supresores tumorales, como TP53, mutado en un 30-35% de los tumores de mama [37].

3. Evasión de la muerte celular programada. En condiciones fisiológicas, la apoptosis se inicia ante señales de estrés celular, activando un programa proteolítico que conlleva la muerte celular. Este proceso se ve limitado en cáncer a través de mutaciones en los sensores de estrés (principalmente TP53) o en efectores de la muerte celular programada como las proteínas de la familia del regulador de la apoptosis BCL2.

4. Inmortalidad replicativa. En general, las células se dividen un número limitado de veces con el objetivo de evitar la inestabilidad cromosómica generada por el acortamiento telomérico que ocurre tras cada división [38]. Las células tumorales adquieren inmortalidad replicativa, por un lado, mediante la activación de la telomerasa, DNA polimerasa que extiende los telómeros evitando la erosión telomérica que ocurre tras cada replicación y, por otro, inhibiendo los sensores de esta inestabilidad genómica (como TP53 o el corepresor transcripcional RB 1, RB1) [39].

5. Inducción de la angiogénesis. Los tumores también inducen la formación de vasos sanguíneos para que, como a cualquier otro tejido, se le suministre nutrientes y oxígeno y evacúe residuos metabólicos y dióxido de carbono. Para ello, activan la secreción de moduladores angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que actúan sobre las células endoteliales vasculares [40]. Respecto a los tumores de mama, una mayor vascularización podría ser indicativo de un mayor riesgo de metástasis [41], y la terapia antiangiogénica podría ser beneficiosa.

6. Activación de la invasión y metástasis. Para que la metástasis ocurra se tienen que producir una serie de eventos durante la progresión del tumor. En primer lugar la invasión local del tejido que



Figura 3. Características del cáncer. La imagen muestra las 8 alteraciones esenciales (en negro) y 2 características habitantes (en azul) descritas por Hanahan y Weinberg. Adaptado de [35].

rodea al tumor, después la intravasación de las células cancerosas a vasos sanguíneos o linfáticos cercanos, así como el desplazamiento por el torrente sanguíneo o linfático, posteriormente la extravasación a tejidos lejanos seguido de la formación de pequeños nódulos de células tumorales denominados micrometástasis y, finalmente, la formación de tumores macroscópicos en un proceso llamado “colonización” [42, 43].

7. Reprogramación del metabolismo energético. El crecimiento descontrolado de las células tumorales requiere una modificación del metabolismo energético para poder mantenerlo. Sin embargo, la adaptación metabólica puede ser diferente según el tipo de cáncer y, en concreto, según el subtipo de cáncer de mama. Por ejemplo, se ha observado que los tumores triple negativos, a diferencia de los tumores ER positivos, obtienen energía preferentemente de la glicolisis anaerobia en lugar de por fosforilación oxidativa [44]. Por otro lado, HER2 parece estar implicado en la regulación del metabolismo lipídico, pues modula positivamente los niveles de la ácido graso sintasa (FASN) y de la acetil-CoA carboxilasa α (ACACA), dos enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos [45] y, además, en el amplicón de HER2 se encuentra el receptor nuclear 1D1 (NR1D1), relacionado con las síntesis *de novo* de ácidos grasos [46].

8. Evasión del sistema inmune. Distintos estudios indican que el sistema inmune está implicado en frenar la formación de numerosos tumores en el organismo. Por tanto, para el desarrollo del cáncer es necesario que las células tumorales consigan evadir la acción del sistema inmune [47]. Para ello, se activan distintos mecanismos inmunomoduladores como el reclutamiento de células inmunes inmunosupresoras como los linfocitos T reguladores [48] o la secreción de factores inmunosupresores como el factor de crecimiento transformante β (TGF β) [49, 50].

Finalmente, estos autores también incluyen dos “características habilitantes” que permiten a los tumores adquirir las características anteriormente mencionadas:

- Inestabilidad genómica, que favorece que tengan lugar un mayor número de mutaciones que conlleven la adquisición de las características necesarias para la formación de un tumor [51]. Este aumento en la tasa de mutaciones puede ocurrir a tres niveles: (i) defectos en la detección del daño en el DNA y activación de la maquinaria de reparación; (ii) defectos que afectan directamente a los componentes de la maquinaria de reparación del DNA; o (iii) aumento en los niveles de moléculas que promueven daño en el DNA. Respecto al cáncer de mama, cabe destacar que, mutaciones en los genes que codifican para BRCA asociados a la reparación del DNA 1 [52] y 2 [53] (BRCA1 y BRCA2), implicados en la reparación homóloga de las roturas de doble de cadena del DNA, incrementan la susceptibilidad genética a dicha patología, siendo los genes más frecuentemente mutados en el cáncer de mama familiar [54].
- Inflamación, la cual genera una situación proinflamatoria beneficiosa para la progresión tumoral pues aporta factores de crecimiento que promueven la supervivencia y proliferación, factores proangiogénicos y enzimas que modifican la matriz extracelular favoreciendo la angiogénesis, pero también la invasión y metástasis [47, 55-57].

1.2.2. Principales vías de señalización implicadas en el desarrollo del cáncer de mama

Las células a través de sus receptores y canales iónicos reciben constantemente estímulos del medio extracelular como hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, anticuerpos, citoquinas o iones [58]. Estas señales inician una serie de vías de señalización a nivel intracelular que desencadenan una respuesta celular. La desregulación de ciertos genes (bien sea por mutaciones a nivel genómico o alteraciones en su transcripción, regulación postraducciona l o degradación) puede

activar de manera constitutiva estas vías, promoviendo la adquisición de las características tumorales mencionadas en el apartado anterior. Por ello, es importante estudiar las cascadas de señalización activadas en cáncer para identificar oncogenes y supresores tumorales importantes para la iniciación de la tumorigénesis, el desarrollo tumoral, la diseminación a otros órganos o la resistencia a terapia [59].

- RECEPTORES TIROSINA-QUINASA Y LAS CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN QUE DESENCADENAN

Los receptores tirosina-quinasa (RTK) son receptores transmembrana con un dominio amino terminal (N terminal) extracelular de unión al ligando y un dominio carboxilo terminal (C terminal) intracelular con actividad tirosina-quinasa. La unión del ligando induce un cambio conformacional en el receptor que le permite homo- o heterodimerizar, y fosforilarse en varias tirosinas del extremo C terminal. Estos residuos fosforilados son reconocidos por proteínas con dominios con homología a SRC 2 (SH2) o de unión a fosfotirosinas (PTB), lo que conlleva finalmente la activación de una serie de cascadas de señalización, siendo la vía de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K)/AKT y la vía de las quinasas asociadas a mitógenos 3 y 1 (ERK1 y ERK2) las dos cascadas más importantes y que se comentarán con mayor detalle más adelante, ya que regulan procesos como la supervivencia celular, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis (**Fig. 4**) [60].

El desarrollo del cáncer de mama se ha asociado a la desregulación de la señalización mediada por RTK. Así, es frecuente que en este tipo de tumores se presenten amplificaciones génicas que conduzcan a la sobreexpresión de alguno de estos receptores o que se produzcan mutaciones que afecten a la estructura del receptor y que tengan como consecuencia un incremento en la actividad tirosina-quinasa. Además, se pueden producir alteraciones que lleven a la sobreexpresión de los ligandos de dichos receptores o que afecten a las cascadas de señalización que se encuentran moduladas por los RTK. En cáncer de mama, los RTK que se encuentran más frecuentemente desregulados son los miembros de la familia ERBB (a la que pertenece HER2), MET, el receptor de insulina (INSR) y el receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF1R) [61].

- FAMILIA ERBB: ONCOGÉN HER2

La familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico está compuesta por cuatro miembros: EGFR (HER1, ErbB1), HER2 (Neu, ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4) [62]. HER2 se sobreexpresa en aproximadamente el 25-30% de los tumores de mama, generalmente debido a una amplificación del gen y, por ello, se trata de uno de los oncogenes más estudiados en cáncer de mama. Aunque su sobreexpresión se asocia a peor pronóstico [63, 64], en los últimos años se han desarrollado terapias dirigidas contra dicho receptor que han incrementado la supervivencia de las pacientes. HER2 carece de ligando endógeno, pero se encuentra constitutivamente en una conformación que le permite formar dímeros y señalizar. Aunque cuando los niveles de HER2 en la célula son elevados puede formar homodímeros, lo más frecuente es que forme heterodímeros con otros miembros de la familia, preferentemente con HER3. El receptor HER2 es el miembro de la familia cuyo dominio quinasa presenta mayor actividad mientras que, por el contrario, HER3 carece de un dominio quinasa funcional. La dimerización y activación de estos receptores desencadena principalmente la activación de las vías de PI3K/AKT y ERK, siendo el dímero HER2-HER3 el activador más potente identificado de la vía PI3K/AKT [65, 66].

- MET

El receptor MET se sobreexpresa en aproximadamente el 20% de los tumores de mama. Se conoce un único ligando de dicho receptor, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que

frecuentemente se coexpresa en dichos tumores. La expresión incrementada de ambos genes se asocia a peor pronóstico en cáncer de mama [67, 68].

- INSR

Por lo general, INSR se encuentra sobreexpresado en los tumores de mama y también se asocia a mal pronóstico [69]. Existen dos isoformas de dicho receptor: INSR-A e INSR-B. INSR-B se expresa en los tejidos sensibles a insulina (músculo, hígado y tejido adiposo), mientras que INSR-A tiene un papel más importante en desarrollo, regulando el crecimiento celular y proliferación. Concretamente, es INSR-A la isoforma que más frecuentemente se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama y podría mediar los efectos negativos que patologías como la hiperinsulinemia, diabetes y obesidad tienen en el desarrollo de este tipo de cáncer [70, 71].

- IGF1R

IGF1R es un receptor homólogo a INSR pero que se une preferentemente a los factores de crecimiento tipo insulina 1 y 2 (IGF1 e IGF2) frente a la insulina. IGF1R se encuentra activo aproximadamente en el 50% de los tumores de mama, lo que se relaciona con mal pronóstico en tumores enriquecidos en HER2 y triple negativos. Además, la activación de IGF1R promueve la resistencia tanto a Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra HER2, como a la terapia endocrina [72].

- VÍA DE PI3K/AKT

La ruta de señalización de PI3K/AKT (**Fig. 4**) es una de las más importantes en la regulación de la proliferación y supervivencia celular, así como en el control de la motilidad celular y la regulación del metabolismo. Esta vía de señalización se activa en respuesta a señales que promueven el reclutamiento a la membrana plasmática y la posterior activación de las PI3K de clase I. Estas enzimas están formadas por una unidad reguladora (p85) y una unidad catalítica (p110) y catalizan la fosforilación en la posición 3 del anillo de inositol de fosfoinosítidos. Frecuentemente, las PI3K de clase I catalizan la conversión del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). El PIP3 actúa como segundo mensajero y se une al dominio de homología con pleckstrina (PH) de AKT, lo que promueve el reclutamiento de esta quinasa a la cara interna de la membrana donde es fosforilada en el bucle T del dominio catalítico por la quinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos (PDK1). PDK1 es una quinasa constitutivamente activa que también presenta un dominio PH, lo que le permite unir PIP3 y colocalizar, por tanto, con AKT en la membrana plasmática tras la activación de PI3K. Para su completa activación, AKT requiere también ser fosforilada por el complejo 2 de la diana mecánica de la rapamicina (MTORC2) en el motivo hidrofóbico de su extremo C terminal. MTORC2 es un complejo multiproteico formado por MTOR, RICTOR, SIN1, MLST8, PRR5 y DEPTOR [73]. Aunque se desconoce el mecanismo, se ha sugerido que MTORC2 también puede activarse por PIP3 [74]. Una vez activa, AKT puede fosforilar en serina o treonina, activando o, generalmente inhibiendo, a muy diversas proteínas dianas entre las que se encuentran quinasas, factores de transcripción, reguladores de proteínas G pequeñas y de tráfico vesicular, enzimas implicadas en metabolismo, E3 ubiquitín-ligasas, reguladores del ciclo celular, etc. Entre estas dianas destacan proteínas proapoptóticas como el agonista de la muerte celular asociado a BCL2 (BAD), los factores de transcripción *forkhead box* (FOXO), la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) que regula el metabolismo del glucógeno, o TSC2, que inhibe la actividad de MTORC1, un complejo implicado en la síntesis proteica, metabolismo lipídico, ciclo celular, formación de lisosomas y autofagia [75, 76]. Por último, la actividad catalítica de PI3K es antagonizada por la proteína fosfatasa y homóloga a la tensina (PTEN), que cataliza la desfosforilación de PIP3, por la fosfatidilinositol-5

fosfatasa de tipo II (INPP5B), que también desfosforila PIP3, y por la fosfatidil inositol-4 fosfatasa de tipo II (INPP4B), que desfosforila PIP2.

En cáncer de mama, la vía PI3K/AKT es la más frecuentemente activada. Además, aproximadamente el 70% de los tumores presentan mutaciones en algún gen implicado en la ruta [77]. Entre ellos, aproximadamente el 30% presenta mutaciones en el gen *PIK3CA* [78], que codifica la subunidad catalítica de PI3K α (p110 α) y entre el 30 y el 40% muestran delecciones en el gen *PTEN* [79]. Además, la activación de esta vía se ha relacionado no solo con el desarrollo y progresión tumoral sino también con la resistencia a terapia, tanto endocrina como dirigida contra HER2 [80-83].

- QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK): VÍA DE ERK

Las vías de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK) son un conjunto de cascadas de señalización que juegan un papel central en la transducción de señales. Las MAPK se clasifican en cuatro grupos: (i) ERK1 y ERK2, (ii) MAPK8-10 (o JNK1/2/3), (iii) MAPK11-14 (o proteínas p38 $\beta/\gamma/\delta/\alpha$) y (iv) MAPK7 (o ERK5). En todas estas vías de señalización, la MAPK correspondiente es activada por MAPK quinasas (MAP2K) específicas y estas, a su vez, por MAPK quinasa quinasas (MAP3K) [84]. Distintos componentes de estas rutas se han visto implicados en cáncer de mama, sin embargo, es la cascada de señalización de ERK1/2 la que parece tener un papel más importante en estos tumores [85].

La vía de ERK1/2 (**Fig. 4**) regula la proliferación, supervivencia y muerte celular [86] pero también está implicada en el control de procesos de migración [87] y angiogénesis [88]. Las principales proteínas adaptadoras que conectan la activación de los receptores tirosina-quinasa con la vía de ERK son la proteína adaptadora SHC y la proteína de unión a receptores de factores de crecimiento 2 (GRB2). GRB2 se une al factor de intercambio de nucleótidos de guanina de Ras/Rac SOS 1 (SOS1), que recluta y activa a RAS, una GTPasa pequeña que activa a RAF (MAPK quinasa quinasa) y, esta, a su vez, a MAP2K1/2 (MAPK quinasa), la cual, finalmente, fosforila y activa a las MAPK, ERK1 y ERK2. Una vez activadas, ERK1/2 fosforilarán a sus sustratos, tanto en el citoplasma como en el núcleo. Entre ellos, destacan factores de transcripción ETS ELK1 (ELK1) o MYC y proteínas citoplásmicas como la quinasa ribosómica S6 p90 (RSK), que fosforila a BAD inhibiendo la apoptosis, o las serina/treonina quinasas de interacción con MAPK 1 y 2 (MNK1 y MNK2), que regulan la traducción [84, 85]. En cáncer de mama, la vía de ERK1/2 se encuentra frecuentemente hiperactivada [89] y un 30% de los tumores presentan mutaciones en ERK1 o ERK2 [85]. Este aumento en la señalización se relaciona con un peor pronóstico y resistencia a terapia [90, 91].

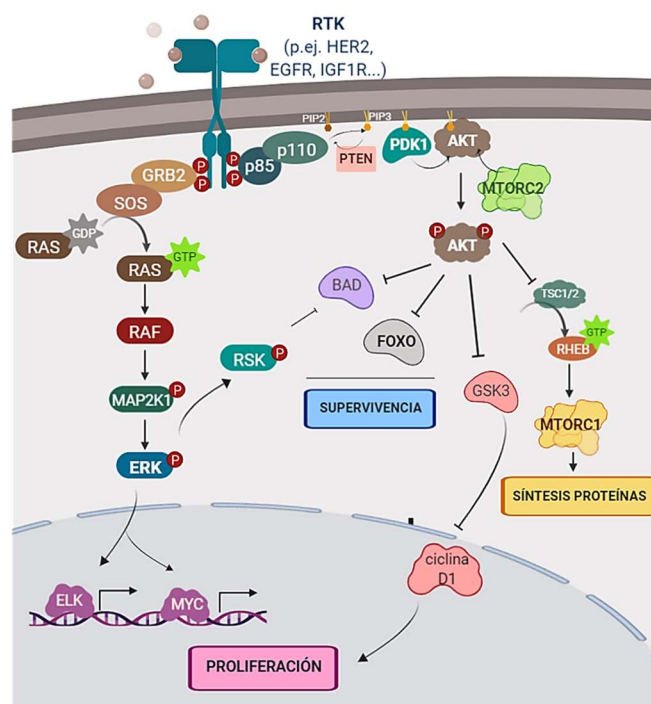


Figura 4. Esquema de las vías de señalización de PI3K/AKT y ERK activadas por receptores tirosina-quinasa. Representación esquemática de las cascadas de señalización de PI3K/AKT y de ERK, las cuales regulan procesos relacionados con la tumorigénesis como la síntesis proteica, la supervivencia o la proliferación celular. Se describen con detalle en el texto principal. (Creado con BioRender.com).

- RECEPTORES NUCLEARES EN CÁNCER DE MAMA

Los receptores nucleares son una familia de proteínas consideradas factores de transcripción activados por ligando. Estos ligandos son de naturaleza lipofílica lo que les permite atravesar la membrana plasmática, y pueden ser, entre otros, hormonas esteroideas, tiroideas o ácidos grasos. La señalización clásica comienza cuando el ligando se une al receptor, favoreciendo un cambio conformacional en el receptor que le permite disociarse de las proteínas que lo mantienen en estado inactivo en el citoplasma. Entonces, como monómeros o como dímeros pueden translocarse al núcleo y activar la transcripción génica al unirse al DNA junto con proteínas reguladoras, que pueden ser coactivadores o correpresores [92, 93]. El receptor de estrógenos (ER) es el receptor nuclear más relevante en cáncer de mama, puesto que aproximadamente el 70-75% de los tumores son considerados ER positivos [94, 95].

• RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Los receptores de estrógenos (ER α y ER β) transducen señales hormonales en una gran variedad de respuestas fisiológicas relacionadas con el desarrollo, la reproducción y la homeostasis tisular [96]. Ambas isoformas están codificadas por distintos genes, pero comparten una estructura común con elevada similitud de secuencia, tienen una afinidad parecida por el estradiol y se unen a los mismos elementos de respuesta en el DNA. Sin embargo, desempeñan funciones distintas, no redundantes y en ocasiones contradictorias [97].

A nivel de mecanismo de acción (Fig. 5), la respuesta dependiente de ligando comienza cuando el estrógeno se une al receptor, lo cual permite su traslocación al núcleo y su dimerización, formando homo- o heterodímeros. Estos dímeros pueden unirse al DNA de forma directa, en el promotor de genes diana que tengan elementos de respuesta a estrógenos (ERE), o de forma indirecta, al interactuar con otros factores de transcripción y modular la

transcripción de genes que carecen de ERE. Además, reclutan una serie de proteínas reguladoras que contribuyen a la remodelación de la cromatina incrementando la actividad transcripcional [98]. Por otro lado, se ha descrito una activación de ER de manera independiente de ligando: en respuesta a factores de crecimiento, los receptores de estrógenos pueden ser fosforilados, lo que promueve su dimerización, unión al DNA y, por tanto, la modulación génica [97]. Además de los efectos transcripcionales del estradiol, se han descrito otros efectos más rápidos que no implican cambios en la transcripción sino la activación de vías de señalización como la de las MAPK, AKT o proteína quinasa C (PRKC). Esta respuesta podría deberse a una pequeña población de ER que se encuentra en la membrana plasmática [99, 100] y que podría interactuar con proteínas como la subunidad reguladora p85 α de PI3K [101], o a otros receptores que se encuentren en la membrana plasmática como el receptor de estrógenos acoplado a proteína G 1 (GPER1), que también une estradiol [102, 103].

En condiciones fisiológicas, tanto ER α como ER β se expresan en la glándula mamaria en bajos niveles y controlan la proliferación y diferenciación celular tras la unión de estradiol. Sin embargo, es ER α el que está implicado principalmente en el desarrollo del cáncer de mama y, por ello, es el que se detecta en clínica por IHQ en las biopsias de cáncer de mama. ER α , tras ser activado por la unión de estradiol, regula genes relacionados con la proliferación, supervivencia, diferenciación, invasión y angiogénesis, funciones de elevada importancia en el desarrollo tumoral [104]. Entre ellos, destacan algunos genes implicados en la progresión del ciclo celular, como la ciclina D1 que, a su vez puede activar a ER, contribuyendo de esta forma a la resistencia a terapia [105-107].

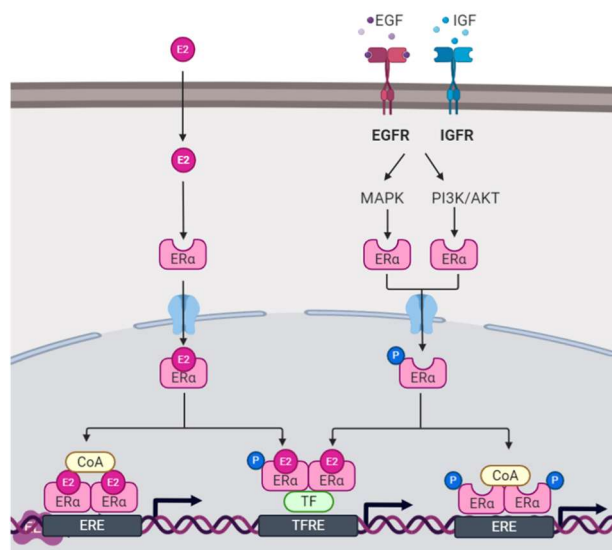


Figura 5. Esquema de la señalización mediada por ER. Representación esquemática de la señalización de ER, descrita con detalle en el texto principal (E2, estradiol; TF, factor de transcripción; TFRE, elementos de respuesta a TF; CoA, coactivador). (Creado con BioRender.com).

- OTROS RECEPTORES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ALTERADAS EN CÁNCER DE MAMA

Además de las vías de señalización descritas, hay otras cascadas de señalización que también se ven alteradas en algunos tumores de mama (Fig. 6). Así, las células tumorales expresan un gran número de receptores de citoquinas que se activan también de manera autocrina, por ejemplo, por las citoquinas secretadas por macrófagos y fibroblastos asociados al tumor, favoreciendo su supervivencia y proliferación celular. En este contexto, destaca la vía de la quinasa Janus (JAK)/transductores de la señal y activadores de la transcripción (STAT), que presenta un papel

esencial en procesos como hematopoyesis, respuesta inflamatoria, mantenimiento de células madre y desarrollo de la glándula mamaria [108], pero que también podría estar implicada en cáncer de mama [109, 110]. Por otro lado, las integrinas y cadherinas, que regulan procesos de adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, se han visto implicadas en procesos de migración, adhesión, invasión, motilidad celular, angiogénesis y metástasis y están frecuentemente desreguladas en cáncer de mama metastásico [26, 111]. Además, las integrinas pueden señalizar a través de las vías de PI3K/AKT y ERK y regular la actividad tirosina-quinasa de HER2 [112-115]. Por último, cabe destacar la importancia de cascadas de señalización importantes en el desarrollo como son las vías de NOTCH [116-118], WNT [119] y Hedgehog [120, 121], las cuales modulan tanto la diferenciación como la capacidad de autorrenovación celular y podrían estar implicadas no solo en la regulación de ciclo celular sino también en el mantenimiento de las células madre.

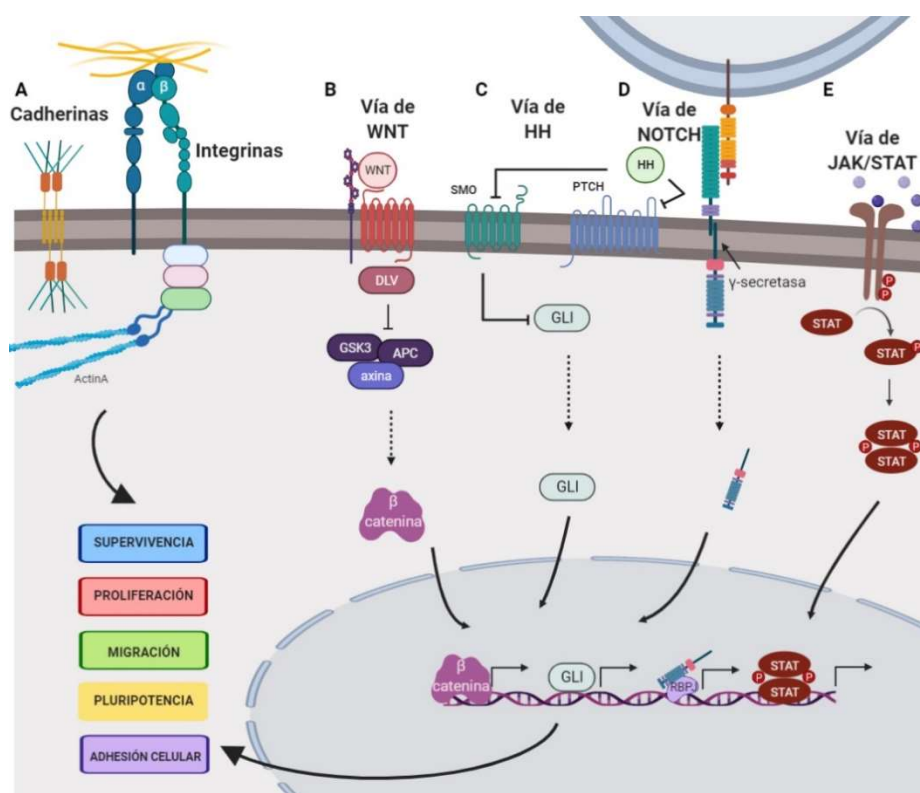


Figura 6. Otras vías de señalización importantes en cáncer de mama. En la figura se muestra de manera esquemática y resumida la señalización mediada por integrinas y cadherinas y las vías de WNT, Hedgehog (HH), NOTCH y JAK/STAT. Brevemente, **(A)** las cadherinas e integrinas además de su papel estructural participan en la señalización celular mediante la asociación con otras proteínas citoplasmáticas. **(B)** La unión de WNT a sus receptores desencadena la activación de Dishevelled (DLV) y la inhibición del complejo formado por axina, APC y GSK38. Esto evita la fosforilación y degradación de β -catenina que se transloca al núcleo y regula la expresión génica. **(C)** Cuando HH se une a Patched (PTCH) induce su degradación lo cual desreprime a Smoothened (SMO) y conlleva la activación de los factores de transcripción GLI que regulan la expresión de los genes diana de esta vía. **(D)** La unión del ligando de NOTCH desencadena su escisión proteolítica por la γ -secretasa. El dominio intracelular de Notch interacciona con la proteína de unión a la señal de recombinación para la inmunoglobulina κ en la región J (RBPJ) en el núcleo modulando su actividad transcripcional. **(E)** Al unirse las citoquinas a sus receptores, las quinasas JAK, asociadas a estos, fosforilan a STAT. Estas dimerizan y se translocan al núcleo donde activan la transcripción de los genes diana. En conjunto estas vías regulan procesos de supervivencia, proliferación, migración, pluripotencia y adhesión celular que contribuyen al desarrollo tumoral mamario. (Creado con BioRender.com).

1.3. TRATAMIENTO

El principal objetivo del tratamiento de tumores de mama no metastásicos es eliminar el tumor de la mama y los ganglios linfáticos afectados, previniendo la invasión de otros tejidos. La terapia localizada en estos casos consiste en eliminar el tumor mediante cirugía, seguida, en ocasiones, de radioterapia postoperatoria. Además, las pacientes pueden ser tratadas con terapia sistémica pre-

y/o postoperatoria [3, 122]. En el caso del cáncer de mama metastásico, el principal objetivo es disminuir los síntomas e incrementar la esperanza de vida de la paciente sin afectar a la calidad de la misma [29]. En ambos casos, la elección del tratamiento dependerá de las características moleculares del subtipo tumoral que presente cada paciente (**Tabla 1**).

Los tumores positivos para ER reciben terapia endocrina y, en algunos casos, según la malignidad y el riesgo de recurrencia, quimioterapia. La terapia endocrina se basa en distintas estrategias para parar el crecimiento tumoral promovido por los estrógenos. En primera línea de tratamiento para mujeres premenopáusicas se utiliza tamoxifeno, un modulador selectivo de ER que inhibe de forma competitiva la unión de los estrógenos a su receptor; y para mujeres postmenopáusicas, inhibidores de la aromatasa, que disminuyen los niveles de estrógenos circulantes al inhibir la conversión de andrógenos a estrógenos [123, 124]. En segunda línea de tratamiento, para tumores avanzados, se administra Fulvestrant, un antagonista del ER que además promueve su degradación [125]. A pesar de las distintas estrategias terapéuticas para este tipo de tumores, aproximadamente un 20-30% de las pacientes presentan resistencia a la terapia, bien sea de manera inicial o adquirida tras el tratamiento prolongado [126]. Esta resistencia puede ser debida al incremento en la actividad de otras vías de señalización como las de IG1R o EGFR, que conllevarían la activación del receptor de manera independiente de ligando, a la expresión de variantes truncadas del ER, a mutaciones que lo hagan más sensible a los estrógenos o al aumento de la actividad de coactivadores u otros factores de transcripción, entre otros [127, 128]. Respecto al receptor de progesterona (PR), este tiene menor significancia clínica y su expresión suele coincidir con la del ER. Por ello, el tratamiento de los tumores PR positivos suele ser equivalente al de los tumores ER positivos [129, 130].

Por otro lado, las pacientes con tumores HER2 positivos, reciben terapia específica contra dicho receptor junto con quimioterapia. La terapia dirigida frente al receptor HER2 permite detener el crecimiento tumoral promovido por la sobreexpresión de este oncogén. La primera línea de tratamiento en pacientes con tumores HER2 positivos es la terapia dirigida con Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una región extracelular del receptor e induce citotoxicidad dependiente de anticuerpo [131], interrumpe la señalización de vías proliferativas [132, 133] e inhibe el ciclo celular [134]. En segunda línea de tratamiento, también se emplean inhibidores de la actividad tirosina-quinasa del receptor, como Lapatinib, que se une reversiblemente al sitio de unión al ATP impidiendo su activación [135]. Sin embargo, los tumores HER2 positivos también desarrollan resistencia a la terapia dirigida. Concretamente, en torno al 70% de las pacientes desarrollan resistencia a Trastuzumab [136], la cual puede deberse a la presencia de mutaciones en el receptor HER2, a la expresión de variantes truncadas constitutivamente activas del receptor, como la variante p95, o a la inducción de mecanismos ajenos a HER2. En relación a esto último, se han descrito como responsables de la resistencia a terapia con Trastuzumab la sobreexpresión de otros RTK como IGF1R o EGFR o la alteración de proteínas efectoras que promueven una activación constitutiva de la vía PI3K/AKT [58].

Por último, los tumores triple negativos al carecer de una diana terapéutica son tratados únicamente con quimioterapia. En términos generales, los tratamientos con quimioterapia más comunes en cáncer de mama incluyen antraciclinas, como la Doxorubicina o la Epirubicina, y taxanos, como el Paclitaxel o Docetaxel. Sin embargo, también pueden administrarse otros agentes alquilantes como el Carboplatino o la Ciclofosfamida [29].

Tabla 1. Tratamiento sistémico según el subtipo tumoral

Subtipo tumoral	Tratamiento
HR+ HER2-	Terapia endocrina + quimioterapia (si alto Grado)
HR+ HER2+	Terapia endocrina + dirigida anti-HER2 + quimioterapia
HR- HER2+	Terapia dirigida anti-HER2 + quimioterapia
HR- HER2 -	Quimioterapia

Debido a la frecuente resistencia a la terapia, así como a la ausencia de terapia dirigida en los tumores triple negativos, se están desarrollando e incorporando a la clínica nuevas estrategias terapéuticas para atacar al tumor a otros niveles. Entre ellas, destacan dos estrategias ya aprobadas para el tratamiento de cáncer metastásico HR positivo: el uso de Palbociclib, un inhibidor del ciclo celular que actúa sobre las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4/6); y Everolimus, un inhibidor de MTOR que modula a la baja la vía de PI3K/AKT [122, 137]. Por último, no solo es necesario el desarrollo de nuevas terapias, sino también conocer biomarcadores que permitan predecir la evolución del tumor, el riesgo de metástasis y la respuesta a las distintas terapias, empleando el tratamiento más adecuado para cada paciente: el de mayor probabilidad de éxito y menores efectos secundarios.

2. PSEUDOQUINASAS TRIBBLES

La fosforilación reversible de proteínas es uno de los principales mecanismos de regulación de las funciones celulares [138]. Se trata de un proceso dependiente de ATP llevado a cabo por proteína quinasas. Estas catalizan la reacción gracias a la presencia en su estructura de un dominio quinasa conservado, que consta de una serie de aminoácidos esenciales para la unión de ATP y la catálisis de la reacción. Actualmente, se han descrito más de 500 quinasas diferentes, las cuales conforman el denominado “quinoma” [139]. Sin embargo, aproximadamente el 10% de estas son pseudoquinasas, proteínas que carecen de alguno de los residuos del dominio quinasa necesarios para la fosforilación de proteínas [139, 140]. Por lo general, aunque estas pseudoquinasas carezcan de actividad catalítica y, por tanto, no puedan fosforilar a otras proteínas, son capaces de modular múltiples procesos celulares mediante interacciones proteína-proteína, actuando como reguladores alostéricos, como proteínas de andamiaje o regulando la localización o el tráfico celular [141-154].

Las proteínas Tribbles son una familia de serina/treonina pseudoquinasas que pertenecen al grupo de las calcio/calmodulina quinasas [140]. Su nombre deriva de la proteína Tribbles (Trbl) de *Drosophila*, descubierta al analizar mutaciones génicas relacionadas con la proliferación y migración celular durante el desarrollo [155-157]. En mamíferos, esta familia de pseudoquinasas está formada por tres miembros, TRIB1, TRIB2 y TRIB3, que se expresan de manera ubicua en el organismo aunque con distinto patrón de expresión [158]. Estudios recientes indican que TRIB2 sería el gen más antiguo y que habría dado lugar, más adelante, probablemente por duplicación génica, a TRIB1 y TRIB3 [159]. La aparición de tres genes diferenciados a lo largo de la evolución permitió la especialización de estas proteínas que, a pesar de regular algunos procesos de manera redundante, han desarrollado funciones específicas de cada isoforma.

2.1. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS TRIBBLES

Las proteínas Tribbles constan de tres dominios diferenciados: un dominio N terminal, el dominio pseudoquinasa central y un dominio C terminal [160].

2.1.1. Dominio quinasa y pseudoquinasa

Para entender la estructura del dominio pseudoquinasa, es necesario conocer la estructura de un dominio quinasa canónico. En general, el dominio quinasa (**Fig. 7**) está compuesto por dos lóbulos: el lóbulo N (en el extremo N terminal) y el lóbulo C (en el C terminal). El lóbulo N está formado por 5 cadenas β y una hélice α , denominada hélice C. En estas cadenas β se encuentran dos motivos importantes para la unión del ATP: el motivo rico en glicinas entre las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$, el cual presenta la secuencia de aminoácidos GxGxxG (bucle Gly); y el motivo VAIK (o de manera más general, AxK) en la cadena $\beta 3$, cuya función es estabilizar al ATP fijándolo en el centro activo y posicionándolo para la catálisis. La hélice C se encuentra, de manera dinámica, entre los dos lóbulos y juega un papel importante tanto en la catálisis como en la transición entre el estado activo e inactivo del dominio quinasa. Con respecto al lóbulo C, está formado por 6 hélices α y en él se encuentran el bucle de activación (bucle A) y el bucle catalítico (bucle T). El bucle A está implicado en la unión al sustrato y, al inicio de este bucle, se encuentra el motivo DFG que, a través del Asp une Mg^{2+} , el cual forma enlaces de coordinación con el ATP. Por último, en el bucle T se encuentra el motivo HRD que participa en la catálisis [161-163].

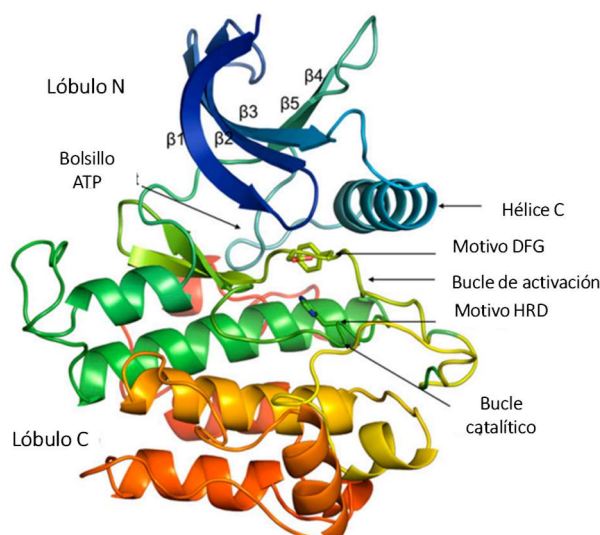


Figura 7. Estructura de un dominio quinasa. En la imagen se observa la posición de los distintos elementos característicos de los dominios quinasa. Adaptado de [161].

La pseudoquinasas presentan un dominio homólogo al dominio quinasa en el que faltan alguno de los motivos esenciales para la catálisis. De hecho, las pseudoquinasas se han clasificado en 8 grupos atendiendo a la presencia o ausencia en su estructura de los motivos VAIK, DFG o HRD [140]. No obstante, se ha descrito que, aunque carezcan de estos motivos, algunas pseudoquinasas son catalíticamente activas, es decir, son capaces de unir ATP e incluso fosforilar a sus sustratos a través de mecanismos no convencionales [164-166]. Así, se ha propuesto una clasificación de las pseudoquinasas en cuatro grupos atendiendo a su actividad catalítica: (i) pseudoquinasas identificadas por comparación de secuencia que presentan al menos un residuo alterado pero para las que no existen evidencias estructurales o bioquímicas acerca de su actividad; (ii) pseudoquinasas en las que no se ha detectado actividad quinasa mediante estudios bioquímicos o estructurales; (iii) quinasas de baja actividad, que son pseudoquinasas identificadas como tales mediante comparación de secuencias pero en las que se ha detectado actividad quinasa residual aunque muy baja en comparación con otras quinasas; y (iv) pseudoquinasas activas que, a pesar de carecer de los motivos catalíticos y gracias a mecanismos compensatorios, presentan una elevada actividad catalítica [167].

2.1.2. Dominio Tribbles pseudoquinasa

El dominio pseudoquinasa central de las proteínas Tribbles presenta un elevado grado de similitud de secuencia entre las distintas isoformas, de forma que la resolución de la estructura tridimensional de TRIB1 (excepto el dominio N terminal) en el año 2015 [168], ha permitido avanzar también en la predicción de la conformación de los otros dos miembros de esta familia.

Las mayores diferencias del dominio pseudoquinasa de TRIB1 con respecto a la estructura de un dominio quinasa canónico están en el lóbulo N, el cual es estructuralmente atípico: el bolsillo de unión a ATP es demasiado amplio, consecuencia de que la hélice C está truncada y de que el bucle Gly se encuentra retraído debido a una secuencia más corta y a la presencia de prolinas en la cadena $\beta 1$ (**Fig. 8**). Por otra parte, el lóbulo C del dominio pseudoquinasa, aunque mantiene las principales características estructurales de un dominio quinasa canónico, al igual que el resto de las proteínas Tribbles, carece del motivo DFG de unión a Mg^{2+} en su bucle A y, en su lugar, presenta una secuencia Ser-Leu-Glu (SLE) que se encuentra interaccionando con distintos residuos de la proteína, lo que da lugar al bloqueo del bolsillo de unión de ATP por parte de este bucle (**Fig. 8**). Debido a estas alteraciones en el dominio pseudoquinasa, los autores de este trabajo determinaron que TRIB1 no podía unir ATP. Esta observación contrasta con un trabajo anterior que había mostrado que TRIB2 y TRIB3 sí podían unir ATP independientemente de la unión de cationes e incluso autofosforilarse, aunque con un nivel de actividad bastante inferior al de las quinasas convencionales [169]. En cualquier caso, no se ha demostrado ninguna implicación fisiológica de esta posible fosforilación.

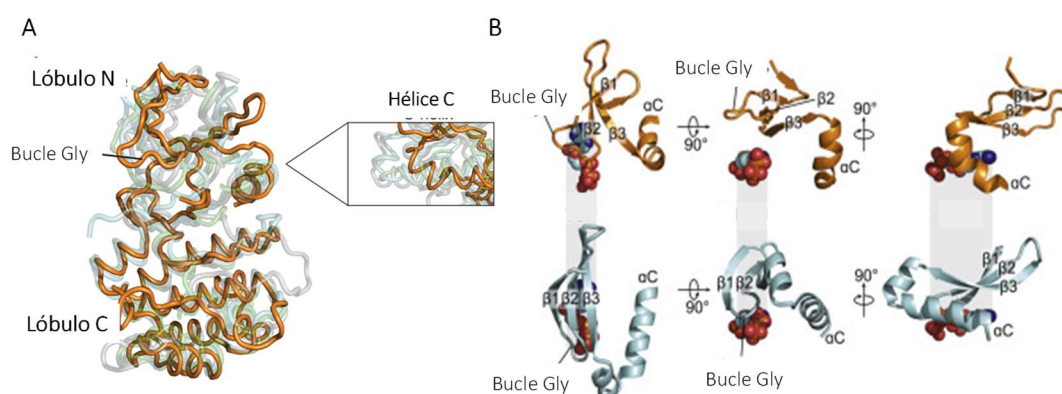


Figura 8. Estructura del dominio pseudoquinasa de TRIB1. **A)** Estructura general del dominio pseudoquinasa de TRIB1 (en naranja) superpuesta con dominios quinasa representativos de proteínas quinasa homólogas: AMPK humana, Aurora A humana y CAMK2 de *Caenorhabditis elegans*. **B)** Lóbulo N del dominio pseudoquinasa de TRIB1 (naranja, parte superior) comparado con la conformación canónica de unión a ATP de la proteína quinasa A (azul, parte inferior). Se muestra la vista superior, frontal y lateral con respecto a la posición del ATP (esferas). Adaptado de [168].

2.1.3. Dominios N y C terminal de las proteínas Tribbles

Además del dominio pseudoquinasa, se ha descrito que los dominios N y C terminal son necesarios para desempeñar algunas de las funciones de estas proteínas. Por un lado, el dominio N terminal es un dominio variable entre las distintas isoformas y se ha relacionado con la localización subcelular y estabilidad de estas proteínas [160]. Por otro lado, el dominio C terminal se trata de un dominio característico de las proteínas Tribbles al no haberse descrito en ninguna otra quinasa y está implicado en interacciones proteína-proteína [159]. En él se encuentran dos secuencias conservadas: un sitio de unión a MAP2K1 y otras MAP2K [170, 171] y un sitio de unión a la E3 ubiquitín-ligasa COP1 [172, 173]. Murphy *et al.*, al resolver la estructura de TRIB1, propusieron un modelo de plegamiento autoinhibitorio en el que la cola C terminal estaría interaccionando con la región adyacente a la hélice C del dominio pseudoquinasa de manera transitoria [168]. Este modelo fue posteriormente

comprobado por Jamieson *et al.* en un trabajo donde demostraron que la unión de un sustrato al dominio pseudoquinasa (en este caso la proteína de unión al potenciador CCAAT α (CEBPA), uno de los sustratos más estudiados de TRIB1 y TRIB2) promovía la disociación de la cola C terminal y la adquisición de una estructura más abierta, lo que permitiría la unión de COP1 en el dominio C terminal [174]. Este plegamiento característico se ha observado también en TRIB2 [175] pero hasta la fecha no se ha comprobado que ocurra en TRIB3.

2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS TRIBBLES E IMPLICACIÓN EN CÁNCER

Las proteínas Tribbles participan en la regulación de multitud de procesos entre los que destacan la progresión del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación [176-178], la respuesta a estrés [179-186], los procesos de señalización celular [160, 171, 176, 187-192], el metabolismo [172, 187, 193, 194], la inflamación [195, 196], la inmunidad [197] o el desarrollo [198]. Para ello, ejercen su acción principalmente mediante dos mecanismos: actuando como proteínas de andamiaje o promoviendo la ubiquitinación de los sustratos con los que interaccionan. Como proteínas de andamiaje, las Tribbles regulan proteínas relacionadas con cascadas de señalización como la de las MAPK, (principalmente mediante la interacción con MAP2K) [171, 188] o la vía de PI3K/AKT [176, 187, 199, 200], pero también pueden actuar como coactivadores o correpresores de la transcripción al interaccionar de forma directa con factores de transcripción. Por ejemplo, TRIB1 interacciona y reprime al receptor α del ácido retinoico (RAR α) y TRIB3 interacciona y regula negativamente al receptor y activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ) [177], el factor de transactivación 4 (ATF4) [185] y el transcrito inducible por daño en el DNA 3 (CHOP) [182]. Con respecto a la inducción de la ubiquitinación de sus sustratos, esta se debe a la capacidad de las Tribbles para interaccionar con E3 ubiquitin-ligasas, generalmente con la E3 ubiquitin-ligasa COP1. En este contexto, se ha descrito que TRIB1 y TRIB2, pero no TRIB3, regulan la ubiquitinación y consecuente degradación de CEBPA [173, 201, 202], un factor de transcripción importante en el desarrollo hematopoyético y la diferenciación de las células mieloides, cuya desregulación se asocia al desarrollo de leucemia mieloide aguda [203]. Además, las tres isoformas podrían regular la ubiquitinación y degradación de ACACA, enzima implicada en el metabolismo lipídico [172, 173].

Adicionalmente, las proteínas Tribbles han adquirido una gran relevancia en el contexto del desarrollo de procesos tumorales. Así, distintos trabajos han descrito un papel oncogénico o supresor tumoral de las mismas dependiendo del subtipo tumoral. En concreto, algunos estudios indican que tanto TRIB1 como TRIB2 promueven la progresión tumoral de la leucemia mieloide aguda, principalmente a través de la regulación de la vía de ERK y de la degradación de CEBPA, aunque podrían actuar también a otros niveles [159, 170, 201, 204]. Además, TRIB2 favorece la supervivencia y crecimiento tumoral de células de melanoma mediante la activación de la vía AKT y el consecuente descenso en la activación de FOXO [205], así como de células de cáncer hepático a través de la modulación de la vía de WNT [191]. Así mismo, niveles elevados de TRIB3 se han asociado con un peor pronóstico en cáncer colorrectal o de pulmón [206-208]. No obstante, otros trabajos muestran un papel supresor tumoral para estas proteínas [209]. En este sentido, la proteína TRIB3 es la más estudiada y aunque existen resultados controvertidos, en general, trabajos previos de varios grupos de investigación, entre ellos el nuestro, indican que TRIB3, a través de la inhibición de la vía PI3K/AKT, actúa como gen supresor tumoral en varios modelos tumorales de cáncer hepático, de mama, de endometrio, de carcinoma de piel o de glioma [192, 210-212]. Además, en el contexto de la respuesta a terapia, existen diversos trabajos, entre ellos de nuestro grupo de investigación, que indican que TRIB3 desempeña una función relevante en el mecanismo de acción de varios fármacos antitumorales, entre ellos, la salinomicina [213], la dehidroximetilepoxiquinomicina

(DHMEQ) [214], el ácido tetradeaciltioacético (TTA) [215], la homocisteína [216], los cannabinoides [217-220], el ácido ginkólico [221] o el ABTL0812 [222].

3. TRIB3

La pseudoquinasa TRIB3 es el miembro más estudiado de la familia Tribbles y su desregulación se ha asociado con distintas condiciones patológicas; principalmente, trastornos metabólicos y cáncer [159, 209, 223-226]. Un gran número de estudios publicados en los últimos años han posicionado a TRIB3 como un importante modulador del metabolismo de la glucosa y lipídico, el estrés celular, la inflamación, proliferación, supervivencia y apoptosis [159, 209, 224-226]. Sin embargo, su acción depende tanto del tipo, magnitud y duración del estímulo, así como del contexto celular, estando implicado tanto en la percepción de estímulos como en la integración de señales y en la respuesta celular. El mecanismo de acción más estudiado de TRIB3 es la regulación de la vía PI3K/AKT/MTOR. En este sentido, se ha propuesto que TRIB3 interacciona con AKT e inhibe su fosforilación en la Ser473 (S473) y, en determinados contextos, también en la Thr308 (T308) [187, 227]. No obstante, TRIB3 también puede regular otras vías de señalización como la de las MAPK [197, 228], NOTCH [208, 229-231] o del factor nuclear κ B (NF κ B) [232, 233]; y la función de factores de transcripción como ATF4 [185], CHOP [182] o PPAR γ [177].

3.1. REGULACIÓN DE TRIB3

La modulación de los niveles y actividad de las proteínas Tribbles y concretamente de TRIB3 es crucial, dado que participan en un gran número de procesos dependiendo del tejido, órgano o especie estudiada.

El gen de TRIB3 se encuentra situado en la región 20p13-p12.2, abarca 16 kb, está organizado en 4 exones, y su expresión está sometida a una estricta regulación. Por ejemplo, diversos estudios han demostrado que TRIB3 es inducido, entre otros, por los factores de transcripción ATF4 y CHOP en respuesta a distintos tipos de estrés celular como deficiencia de nutrientes, estrés oxidativo, hipoxia, alteraciones en la homeostasis de calcio o estrés de retículo endoplásmico [29-36]. Sin embargo, su regulación transcripcional es altamente dependiente del tipo celular, de forma que, por ejemplo, en condiciones de ayuno, se incrementan los niveles en tejido adiposo mientras que disminuyen en músculo esquelético [59]. Por otro lado, la insulina también induce la expresión de TRIB3 en hepatocitos, adipocitos y células de hepatoma, mientras que no afecta a dicha expresión en células β pancreáticas o musculares [234]. Además, se ha descrito que tanto AKT [234] como FOXO1 [235] pueden reprimir la expresión de TRIB3 en células hepáticas. Finalmente, se ha demostrado que TRIB3 puede estar regulado por PPAR α en adipocitos [236] o por la proteína de unión a elementos de respuesta de cAMP (CREB) en células endoteliales [216].

Además, la expresión de TRIB3 también se regula a nivel del procesamiento del mRNA. De esta manera, se ha descrito la existencia de sitios alternativos de inicio de la transcripción en el gen de TRIB3 y de un procesamiento alternativo del exón 1, lo que da lugar a distintas variantes del mRNA de TRIB3 [183]. Estas variantes difieren en la región no traducida en 5' (5' UTR) lo que podría dar origen a diferencias en la eficacia con la que el mRNA de TRIB3 es traducido [237]. También se ha descrito que en condiciones de anoxia la proteína de unión al RNA tipo ELAV 1 (ELAVL1) estabilizaría el mRNA de TRIB3 [238].

En cuanto a la regulación de TRIB3 a nivel proteico, distintas modificaciones postraduccionales podrían afectar a su estabilidad o modular con qué proteínas interacciona. De estas modificaciones, la mejor estudiada es la ubiquitinación, la cual dirige a TRIB3 a la degradación proteasomal y puede estar mediada por las E3 ubiquitín-ligasas SIAH1 [239] o FZR1 [240]. En el proceso de deubiquitinación se ha implicado a la peptidasa 9 ligada al X específica de ubiquitina (USP9X) [230]. Respecto a los residuos de TRIB3 que podrían estar modificados, se han identificado 4 lisinas susceptibles de ubiquitinación en estudios de proteómica, pero no se ha comprobado mediante otras técnicas ni se ha estudiado su relevancia [241]. Además, otras modificaciones postraduccionales podrían ser importantes en la regulación de TRIB3. En este sentido, se ha demostrado que TRIB3 puede acetilarse [242], metilarse [243] y experimentos de espectrometría de masas indican que también podría estar fosforilado [241].

3.2. FUNCIONES DE TRIB3

Papel de TRIB3 en la regulación de supervivencia y apoptosis

Diversos estudios han relacionado a TRIB3 con la regulación de la supervivencia celular, sin embargo, los resultados obtenidos parecen depender del contexto celular. Así, se ha demostrado que mientras TRIB3 promueve la apoptosis de células β pancreáticas [244], de condrocitos [245] o de macrófagos derivados de monocitos [246]; favorece la supervivencia de neuronas postmitóticas PC-12 [180] o de eritroblastos tras el tratamiento con eritropoyetina [247]. Por otro lado, en el contexto de terapia antitumoral, TRIB3 se induce tras el tratamiento con distintos fármacos. De hecho, resultados de distintos grupos, entre ellos el nuestro, muestran que TRIB3 promueve la apoptosis de células tumorales tras el tratamiento con compuestos antitumorales como el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) [217-220], principal componente de la planta *Cannabis sativa*, el ABTL0812, un derivado del ácido linoleico, o el ácido ginkólico [221], un inhibidor de la sumoilación derivado de la planta *Ginkgo biloba* [222].

Papel de TRIB3 en la regulación del ciclo celular

De la misma manera que su homólogo Trbl en *Drosophila*, TRIB3 promueve la degradación de la proteína del ciclo de división celular 25 A (CDC25A), una fosfatasa de especificidad dual que activa complejos CDK-ciclina regulando el ciclo celular [248]. Sin embargo, en una situación de daño en el DNA, TRIB3 estabiliza y reduce la degradación de CDC25A [249]. Al regular de manera dual CDC25A, TRIB3 puede impedir o promover la progresión del ciclo celular dependiendo del contexto. Por otro lado, también se ha descrito que TRIB3 podría regular el ciclo celular a otros niveles, por ejemplo inhibiendo la transcripción de la ciclina B1 [250] o, a través de la inhibición de AKT, incrementando la expresión del inhibidor de CDK 1B (CDKN1B) [216].

Papel de TRIB3 en respuesta a estrés de retículo endoplásmico (RE)

Como se ha comentado en el apartado de regulación, en respuesta a estrés celular se activa la transcripción de TRIB3 y, concretamente en respuesta a estrés de RE, se induce su expresión por ATF4 y CHOP [31-35]. A su vez, éstos son modulados por TRIB3 a distintos niveles: Por un lado, TRIB3 puede interaccionar directamente con ellos, modulando o inhibiendo su actividad transcripcional [29, 30, 32, 35, 75], lo cual podría deberse a que impida la unión del coactivador de la transcripción proteína de unión a E1A p300 (EP300) [251]. Por otro lado, TRIB3 puede promover la degradación de ATF4 [31] e inhibir la transcripción de CHOP [35]. De esta manera, TRIB3 establecería un bucle de retroalimentación negativa con ATF4 y CHOP reduciendo el estrés de RE ante niveles de estrés moderados. Sin embargo, con niveles de estrés más elevados y prolongados, los niveles de TRIB3

serían mayores y promovería en este caso la muerte celular [182]. Concretamente, se ha descrito que, en condiciones de estrés de RE, TRIB3 inhibe AKT y promueve la muerte celular mediada por autofagia [213, 218, 220-222]. Además, TRIB3 puede acelerar la muerte de las células en condiciones de estrés a través de la inhibición de la vía de NF κ B [238, 252, 253]. De cualquier modo, probablemente el papel de TRIB3 en la respuesta a distintos tipos de estrés dependa del contexto celular [186].

Papel de TRIB3 en el metabolismo

En los últimos años, varios estudios han demostrado que TRIB3 podría tener un importante papel en la regulación del metabolismo lipídico y en la respuesta a la insulina. En este contexto, se ha descrito que ratones transgénicos que sobreexpresan TRIB3 en el tejido adiposo son más delgados, gastan más energía y presentan resistencia a la obesidad inducida por la dieta [172]. Por el contrario, ratas deficientes en TRIB3 presentan una ganancia en peso y mayor sensibilidad a la insulina [254].

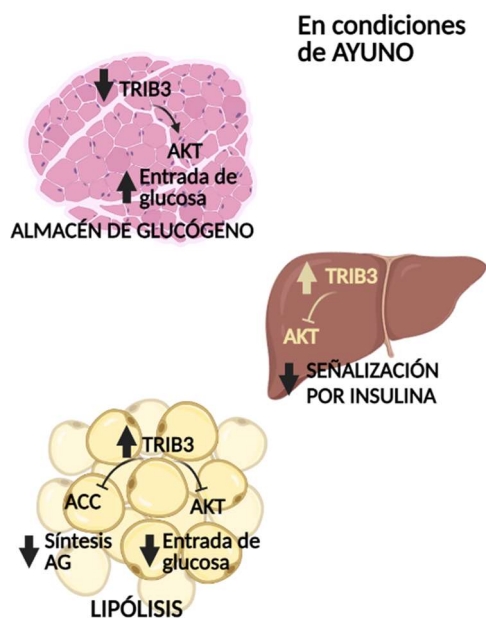


Figura 9. Representación esquemática de la regulación diferencial de los niveles de TRIB3 en condiciones de ayuno según el tejido. (AG, ácidos grasos). (Creado con BioRender.com).

En condiciones de ayuno, se induce la expresión de TRIB3 en el tejido adiposo, disminuyendo, por un lado, la activación de AKT y la entrada de glucosa y, por otro lado, la síntesis de ácidos grasos al promover la ubiquitinación y degradación de ACACA, a través de su interacción con COP1 [172, 255]. De esta manera TRIB3 favorecería la lipólisis en este tejido. En el hígado, también se activa la transcripción de TRIB3, mediada por PPAR α , bloqueando la señalización de la insulina al interactuar e inhibir a AKT [187, 236]. Sin embargo, en el músculo esquelético, los niveles de TRIB3 disminuyen en estas condiciones, favoreciendo la entrada de glucosa a la célula y facilitando así el almacenamiento del glucógeno. De esta manera, la modulación diferencial de TRIB3 según el tejido permitiría la adaptación del organismo a las condiciones de ayuno [255] (**Fig. 9**). Por el contrario, al someter a las ratas a una dieta alta en grasas, los niveles de TRIB3 en músculo aumentan, disminuyendo el transporte de glucosa. Además, experimentos realizados en células demuestran que este aumento de TRIB3 promueve el metabolismo oxidativo de la glucosa [199]. Sin embargo, en estos modelos

experimentales los niveles de TRIB3 disminuyen en el tejido adiposo, lo que favorece la entrada de glucosa y la acumulación de triglicéridos. Los autores de ese trabajo proponen que este efecto podría tener un papel protector para el músculo previniendo así un excesivo almacenamiento de triglicéridos en este tejido [255]. Por otro lado, TRIB3 también está implicado en la diferenciación de adipocitos al inhibir la actividad transcripcional de PPAR γ , impidiendo así la acumulación intracelular de triglicéridos y su diferenciación [177].

En condiciones patológicas que cursan con hiperglicemia crónica como en la Diabetes Mellitus tipo 2, los niveles de TRIB3 en músculo aumentan, lo que podría contribuir a promover la resistencia a la insulina. Así, la acción inhibitoria sobre AKT contribuiría a regular negativamente el transporte de glucosa y la actividad mitocondrial [199]. Además, se ha descrito una mutación en TRIB3, Q84R,

que da lugar a una variante más estable y que podría estar relacionada con mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, ya que puede establecer una interacción más fuerte con AKT, así como con ATF4, e inducir una mayor activación de la vía de ERK, lo que podría contribuir a potenciar el efecto de TRIB3 en la resistencia a la insulina y la hiperlipidemia mencionados anteriormente [256-261].

3.3. PAPEL TRIB3 EN CÁNCER

3.3.1. Expresión de TRIB3 en pacientes

Como se ha comentado en apartados anteriores, diversos estudios han propuesto que la pseudoquinasa TRIB3 desempeña un papel en el control del desarrollo tumoral. En cualquier caso, dependiendo del estudio, contexto celular o tipo tumoral, dicho papel podría ser diferente y TRIB3 podría favorecer o impedir el desarrollo tumoral.

En términos generales, diversos estudios han detectado que los niveles de TRIB3 estarían más elevados en tejido tumoral que en tejido normal, tanto a nivel de mRNA (en cáncer colorrectal, hepático, de pulmón, de mama, de esófago, ovárico y de útero [181, 207, 208, 262]) como a nivel de proteína (en cáncer colorrectal, hepático, de pulmón y gástrico [206-208, 263]). Por otro lado, este aumento en los niveles tanto del mRNA como de la proteína, se han asociado con mal pronóstico de algunos tipos de cáncer como el colorrectal o de pulmón [206-208]. Sin embargo, en cáncer de mama, existe cierta controversia. De hecho, en estudios realizados por el mismo grupo de investigación en muestras de pacientes, determinaron que mientras bajos niveles del mRNA de TRIB3 en los tumores de dichas pacientes se asociaban con una mayor supervivencia libre de enfermedad [264], elevados niveles de la proteína correlacionaban con un mejor pronóstico de las mismas [265].

3.3.2. Mecanismo de acción de TRIB3 en cáncer

Diversos estudios han descrito que TRIB3 presenta un papel protumoral en distintos modelos tumorales (**Fig. 10**). Por ejemplo, en adenocarcinoma de pulmón, se ha descrito que TRIB3 promueve la proliferación, migración e invasión *in vitro*, así como el crecimiento tumoral y metástasis *in vivo* a través de distintos mecanismos. Se ha demostrado que TRIB3 puede (i) interaccionar con ERK y JNK y promover su fosforilación [197], (ii) interaccionar y estabilizar a EGFR [266], (iii) interaccionar y activar la señalización mediada por β -catenina [267], (iv) regular la expresión de NOTCH [208], y (v) incrementar la glicolisis aerobia a través de la regulación del factor inducible por hipoxia α (HIF α) [268]. También se ha descrito que TRIB3 puede promover el crecimiento celular en carcinoma hepático y que, mediante la regulación de SMAD3 promueve la invasión y migración de células HepG2 y HEK293T [189]. Por último, se ha demostrado que TRIB3 puede promover la tumorigénesis a través de la interacción con secuestrosoma 1 (SQSTM1 o p62) y la consecuente inhibición de la autofagia en modelos tumorales de hígado y pulmón generados por carcinogénesis química y en modelos tumorales de melanoma, cáncer de hígado y colon generados en ratones por xenoinjerto de células tumorales [206]. Este efecto inhibitorio de TRIB3 sobre el flujo autofágico también se ha observado en células de glioblastoma [269].

Sin embargo, otros estudios realizados por nuestro grupo de investigación y otros, han demostrado que TRIB3 presenta un papel supresor tumoral en distintos contextos tumorales (**Fig. 10**), principalmente a través de la inhibición de la vía de PI3K/AKT. Concretamente, en distintos modelos celulares se ha demostrado que la pérdida de TRIB3 promueve un incremento en la fosforilación de AKT por MTORC2, lo que se traduce en una mayor fosforilación e inactivación de algunas de sus dianas como BAD o FOXO [192]. Esta fosforilación promueve su interacción con las proteínas de unión a fosfoserina/fosfotreonina 14-3-3 quedando secuestradas en el citoplasma e

inhibiendo su translocación a la mitocondria o núcleo respectivamente [270-272]. En este contexto, empleando fibroblastos embrionarios transformados con las proteínas RASV12/ETV4 procedentes de ratones silvestres o deficientes en TRIB3 (TRIB3^{-/-}), comprobaron que la deficiencia en TRIB3 acelera el crecimiento tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, la pérdida de TRIB3 incrementa la incidencia de lesiones malignas en ratones heterocigotos para PTEN y, en un modelo de carcinogénesis química en piel, los ratones TRIB3^{-/-} generaron también un mayor número de lesiones [192]. Por otro lado, se ha descrito que TRIB3 también reduce la tumorigénesis a través de la inhibición de AKT en modelos de carcinoma de pulmón [211], de cáncer de endometrio [210] y en diversas líneas celulares tumorales [192, 212]. Además, se ha comprobado que TRIB3 puede reducir la carcinogénesis a través de la regulación de la vía de NFκB en adenocarcinoma de esófago [273] y cáncer de pulmón [274]. Por último, TRIB3 puede inhibir a la citidina desaminasa subunidad catalítica de la enzima de edición del mRNA de la apolipoproteína 3A (APOBEC3A), protegiendo la integridad genómica [275].

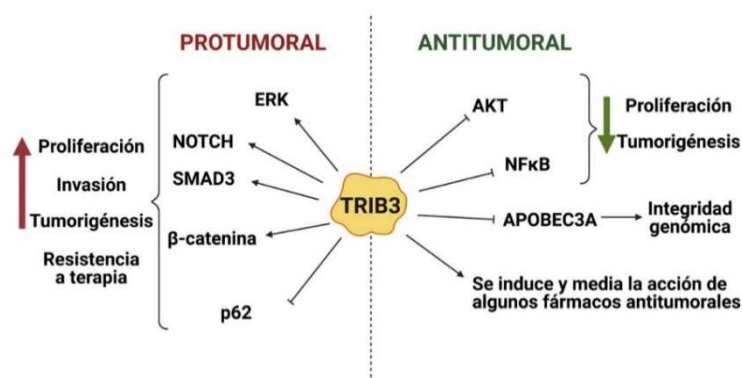


Figura 10. Representación esquemática del papel dual de TRIB3 en cáncer. Se ha descrito una acción protumoral de esta proteína a través de su interacción con p62 e inhibición de la autofagia, activación de SMAD3, de β-catenina y regulación de las vías de ERK y NOTCH (imagen izquierda). Sin embargo, en otros modelos tumorales, se ha propuesto un papel antitumoral a través de la inhibición de AKT, NFκB o APOBEC3A, así como mediando la acción de diversos fármacos antitumorales (imagen derecha). (Creado con BioRender.com).

Adicionalmente, TRIB3 se ha visto implicado en el mecanismo de acción de algunos fármacos antitumorales como el THC [217-220] o el ABTL0812 [222, 276]. De manera resumida, ambos desencadenan estrés de RE lo que promueve la activación de ATF4 y CHOP, y la consecuente inducción de la expresión de TRIB3. Además, el ABTL0812 actúa como agonista de PPARα y PPARγ, que también promueven la expresión de TRIB3. En este contexto, TRIB3 inhibe la fosforilación de AKT y, en consecuencia MTORC1, desencadenando en definitiva la muerte celular mediada por autofagia [218, 220, 222, 276] (**Fig. 11**). Asimismo, se han descrito otros compuestos, en su mayoría de origen natural, que inducen estrés de retículo endoplásmico y la expresión de TRIB3. Entre ellos destacan el ácido ginkólico [221], los extractos derivados del hongo *Antrodia cinnamomea* [277], el ácido corosólico derivado de las hojas de *Lagerstroemia speciosa* y la raíces de *Actinidia chinensis* [278] o la kurarinona, procedente de las raíces de *Sophora flavescens* [279]. Finalmente, cabe destacar que también se ha demostrado que la expresión de TRIB3 es inhibida por rapamicina y fármacos análogos. Estos, a pesar de ser inhibidores de MTORC1, regulan la expresión de TRIB3 a través de la proteína 1 de unión a FII e interacción con LRR (LRRFIP1), de una manera independiente a MTORC1. En este contexto, parece que TRIB3 podría modular el procesamiento génico alternativo inducido por la rapamicina e impedir su acción citotóxica [280].

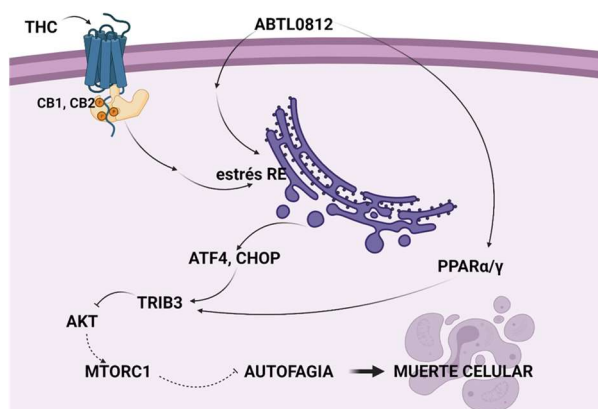


Figura 11. Representación esquemática del papel de TRIB3 en la acción antitumoral del THC y ABTL0812. El THC, a través de su unión a los receptores cannabionoides 1 y 2 (CB1 y CB2), así como el ABTL0812, promueven estrés de RE, lo que induce la expresión de ATF4 y CHOP y estos, a su vez, la de TRIB3. La expresión de TRIB3 también se activa por PPARα/γ regulados alostéricamente por ABTL0812. TRIB3 inhibe el eje AKT/MTORC1, lo que se traduce en la autofagia y muerte de las células tumorales. (Creado con BioRender.com).

3.4. TRIB3 EN CÁNCER DE MAMA

Respecto al papel de TRIB3 en cáncer de mama, la bibliografía existente es limitada y relativamente contradictoria. En cáncer de mama triple negativo, varios estudios indican que TRIB3 podría promover el desarrollo tumoral mediante la regulación de la vía de NOTCH. TRIB3, a través de la modulación de la vía de ERK y de SMAD4, podría regular los niveles del ligando canónico de NOTCH *jagged 1* (JAG1), uno de los ligandos de la vía de NOTCH, promoviendo de esta manera la proliferación celular [228, 230]. Además, también se ha relacionado la regulación de esta vía por TRIB3 con una mayor resistencia a radioterapia en cáncer de mama triple negativo [231]. En este sentido, se ha descrito que TRIB3, mediante su interacción e inhibición de AKT, evita la degradación de FOXO1, lo cual activa la transcripción del factor de transcripción 2 *SRY-box* (SOX2) [281], un factor de transcripción implicado en el mantenimiento de las células madre, en la determinación del destino celular o en el desarrollo del linaje neuroectodérmico; y cuya sobreexpresión en cáncer de mama se ha asociado a mal pronóstico y resistencia a terapia [282, 283]. Sin embargo, estos resultados contrastan con otros estudios, tanto en cáncer de mama como en otros modelos tumorales, donde se muestra que la inhibición de AKT y consecuente activación de los factores de transcripción FOXO reducen la proliferación, supervivencia y crecimiento celular de los tumores [192, 284]. Por otro lado, a pesar de que los tumores luminales son los más frecuentes en cáncer de mama [5, 6, 13] y que alteraciones en la vía de AKT son frecuentes en este tipo tumoral [77], el papel de TRIB3 en esta patología no ha sido prácticamente explorado.

Asimismo, se ha estudiado el papel de TRIB3 en la respuesta a terapia. En este caso, diversos estudios indican que TRIB3 se induce en células de cáncer de mama tras el tratamiento con varios compuestos antitumorales como el extracto de *Drimys maritima* [285], extracto de *Boswellia serrata*, ácido 3-O-acetil-β-boswélico [286], tocotrienol [287], pimpinelol [288], ácido ginkólico [221] o THC (datos no publicados). Estudios más exhaustivos indican además que TRIB3 podría mediar la acción de algunos de estos compuestos antitumorales a través de la inhibición de AKT [221]. Por último, la inducción de TRIB3 en condiciones de anoxia también podría inhibir la vía de supervivencia de NFκB [233].

Estos datos en conjunto sugieren que TRIB3 podría estar implicado tanto en el desarrollo tumoral como en la respuesta a terapia y, por tanto, su estudio podría ser relevante en el contexto del cáncer de mama. Sin embargo, debido a la contradicción entre unos trabajos y otros, es necesario

ampliar el número de estudios para entender el papel que juega TRIB3 en cáncer de mama y evaluar si podría emplearse como biomarcador o diana terapéutica y en qué contextos tumorales. Además, a pesar de que los tumores luminales son los más frecuentes, los estudios en este tipo tumoral son escasos.

OBJETIVOS

Como se indica en la Introducción de la presente tesis doctoral, la mayor parte de los tumores de mama son luminales y la vía de PI3K/AKT es muy importante para el crecimiento y respuesta al tratamiento de los mismos. Además, se ha descrito que la pseudoquinasa TRIB3 puede regular negativamente AKT en diversos contextos tumorales pero su papel ha sido poco estudiado en el contexto del cáncer de mama. Por ello, esta tesis doctoral pretende profundizar en el estudio de la implicación de TRIB3 en este tipo tumoral postulando la siguiente **hipótesis**: TRIB3 podría tener un papel importante en el desarrollo, progresión tumoral y respuesta a terapia del cáncer de mama luminal y podría participar en la regulación de las propiedades tumorigénicas de las células de cáncer de mama, probablemente a través de la vía de señalización de PI3K/AKT.

Así, el **objetivo general** de esta tesis es estudiar el papel de TRIB3 como biomarcador y potencial diana terapéutica en cáncer de mama luminal y para ello, proponemos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar los niveles y localización subcelular de TRIB3 y su correlación con el pronóstico en muestras de pacientes con cáncer de mama ER positivo.
2. Analizar el papel de TRIB3 en la regulación de la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama luminal (2.1) y el mecanismo molecular subyacente: regulación de HER2 y de la vía PI3K/AKT (2.2).
3. Analizar la implicación de TRIB3 en procesos de migración, invasión y metástasis en cáncer de mama.
4. Evaluar el papel de TRIB3 en la respuesta a la terapia en células de cáncer de mama luminal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANÁLISIS DE BASES DE DATOS DE PACIENTES

Con el objetivo de comparar los niveles de TRIB3 en tejido normal y tejido tumoral mamario se llevaron a cabo análisis bioinformáticos utilizando las plataformas UCSC Xena [289], Cancertool [290] y Human Protein Atlas [291]. Además, la plataforma Cancertool se empleó para el análisis de supervivencia de las pacientes de cáncer de mama en función de la expresión de TRIB3 mediante la obtención de gráficas de Kaplan-Meier [290].

2. ANÁLISIS DE TRIB3 EN MUESTRAS DE PACIENTES

2.1. Preparación del *microarray* de tejido (TMA) de tumores mamarios y datos clínicos de las pacientes

Para el análisis de la expresión de TRIB3 se utilizó un *microarray* de tejido (TMA) con muestras de tumor y ganglios afectados de 291 pacientes procedentes del Hospital Universitario de Donostia y del Instituto Oncológico Onkologikoa. Las muestras se tomaron en la primera cirugía, previamente al tratamiento, y los TMAs se prepararon siguiendo el protocolo estándar establecido por el servicio de anatomía patológica del hospital y con la aprobación de comité ético de experimentación clínica. Todas las pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado. Los datos clínicos de las pacientes se muestran en la **tabla 2**. Todas las muestras se manejaron de forma anónima de acuerdo con los requerimientos de la Ley Orgánica 3/2018 de Protección de Datos de Carácter Personal.

Tabla 2. Información clínica de las muestras tumorales utilizadas

Características clínicas		Número de pacientes
Sexo	Hombre	3
	Mujer	198
Grado histológico	1 (bien diferenciado)	39
	2 (moderadamente diferenciado)	63
	3 (mal diferenciado)	78
Recurrencia	No	217
	Sí	71
Metástasis	No	221
	Sí	64
Tratamiento	Ninguno	1
	Hormonoterapia	24
	Hormonoterapia + radioterapia	40
	Hormonoterapia + quimioterapia	44
	Hormonoterapia + radioterapia + quimioterapia	181

Marcadores moleculares		Número de pacientes
ER	Negativo	0
	Positivo	291
PR	Negativo	47
	Positivo	244
HER2	0	65
	1	66
	2	11
	3	17

*La suma del número de pacientes para cada característica clínica no siempre coincide con el total de las pacientes debido a la ausencia de valores.

2.2. Inmunohistoquímica para detectar los niveles de la proteína TRIB3

En las muestras de tejido se realizó una tinción de TRIB3 por inmunohistoquímica empleando el anticuerpo ab73547 (Abcam) a una dilución 1:100 siguiendo un protocolo estándar establecido por la Unidad de Histopatología del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

2.3. Cuantificación de los niveles de la proteína TRIB3

Los niveles de la proteína TRIB3 se cuantificaron teniendo en cuenta únicamente las áreas tumorales, determinándose por separado sus niveles en el citoplasma y en el núcleo de las células del tumor. Dicha cuantificación se realizó mediante el valor H, el cual se obtiene a partir de la intensidad del marcaje estratificada en cuatro niveles (0=negativo, 1=leve, 2=medio y 3=fuerte), y el porcentaje de células marcadas (**Ecuación 1**). El valor H total del tumor se obtuvo sumando los valores obtenidos para citoplasma y núcleo.

$$H = \sum(i * \%i)$$

Ecuación 1. Ecuación para el cálculo del valor H, siendo *i* cada uno de los niveles de intensidad de marcaje (0-3) y %i el porcentaje de células marcadas para cada uno de ellos.

3. CULTIVOS CELULARES

Para los estudios llevados a cabo en esta tesis se han empleado las líneas celulares de cáncer de mama recogidas en la **tabla 3**. Todas ellas se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo a 37°C y 5% de CO₂, pero cada una se cultivó en su medio correspondiente (**Tabla 3**). Además, para la expresión y purificación de proteínas y para la generación de lentivirus, se utilizó la línea celular HEK293T, que proviene de la línea celular de riñón embrionario HEK293 y expresan el antígeno T grande del virus de simio 40 (SV40). Estas se cultivaron en medio DMEM (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 5 µg/mL de penicilina/estreptomicina (P/S).

Cuando las células alcanzaron un 70-90% de confluencia se subcultivaron pasándolas a una nueva placa de cultivo. Para ello, las células se lavaron primero con tampón fosfato salino (PBS), y se incubaron en presencia de Tripsina (170.000U/L)/EDTA (0,2 g/L) durante 2 min a 37°C, momento en el que se añadió medio completo con suero para detener la reacción. Este procedimiento permitió

levantar las células adheridas, recogerlas y sembrarlas de nuevo diluidas en el medio de cultivo correspondiente.

Tabla 3. Líneas celulares de cáncer de mama empleadas, características y medios de cultivos

Línea celular	Procedencia	Subtipo	Expresión de marcadores	Medio de cultivo
MDA-MB-361	Adenocarcinoma mamario; extraídas de lesión metastática (cerebro)	Luminal	ER+ PR+ HER2+	DMEM +FBS 10% + P/S 5 µg/mL
AU565	Adenocarcinoma mamario; extraídas de lesión metastática (efusión pleural)	Luminal	ER- PR- HER2+	RPMI +FBS 10% + P/S 5 µg/mL
BT474	Carcinoma ductal; extraídas de la glándula mamaria	Luminal	ER+ PR+ HER2+	RPMI +FBS 10% + P/S 5 µg/mL C ₃ H ₃ NaO ₃ 1mM + insulina 10µg/mL
MCF7	Adenocarcinoma mamario; extraídas de lesión metastática (efusión pleural)	Luminal	ER+ PR+ HER2-	DMEM +FBS 10% + P/S 5 µg/mL insulina 10µg/mL
T47D	Carcinoma ductal; extraídas de lesión metastática (efusión pleural)	Luminal	ER+ PR+ HER2-	RPMI +FBS 10% + P/S 5 µg/mL
ZR75B	Carcinoma ductal; extraídas de lesión metastática (ascitos)	Luminal	ER+ PR- HER2-	RPMI +FBS 10% + P/S 5 µg/mL
231-HER2/LM-4	Células 231 (de adenocarcinoma mamario; extraídas de efusión pleural) con sobreexpresión de HER2 y seleccionadas para la metástasis en pulmón	-	ER- PR- HER2+	DMEM +FBS 10% + P/S 5 µg/mL

4. SILENCIAMIENTO GÉNICO TRANSITORIO

Para el silenciamiento transitorio de HER2 se empleó una mezcla de 4 siRNAs específicos contra el mRNA que codifica para dicha proteína o siRNA control (*ON-TARGET Plus Smart-pool*, Dharmacon). Estos siRNAs se transfectaron empleando el reactivo de transfección DharmaFECT 1 (Dharmacon).

MATERIALES Y MÉTODOS

Brevemente, se sembraron 30.000 células/cm² en una placa de 60 mm de diámetro en medio completo. Al día siguiente, las células se cambiaron a un medio sin antibióticos. A continuación, se añadió sobre la placa de cultivo una mezcla de 0,5µM de los siRNAs a transfectar y 5 µL de DharmaFECT1 en 200 µL de medio sin antibióticos que se había incubado previamente durante 20 minutos. Los análisis correspondientes se llevaron a cabo 48 horas después de la transfección.

5. TRANSFECCIÓN DE PLÁSMIDOS PARA LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE PROTEÍNAS

Para la expresión de proteínas en las líneas celulares de manera transitoria se recurrió a la transfección de los siguientes plásmidos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Plásmidos empleados para la expresión transitoria de proteínas

INSERTO	VECTOR	ORIGEN
Myc-TRIB3	pGlo-myc	Generación propia*
TRIB3-GFP	pLenti	Proporcionado por el laboratorio del Dr. Eric Kalkhoven (Dpt. of Molecular Cancer Research, Universidad de Utrecht, Países Bajos)
GST-AKT1	pEBG	Proporcionado por el laboratorio del Dr. Dario Alessi (Universidad de Dundee, Reino Unido)
GST-AKT2	pEBG	
GST-AKT3	pEBG	
Myr-AKT	pBABE	
His-ubiquitina WT	pCMV5	Proporcionados por el laboratorio del Dr. Manuel Guzmán (Universidad Complutense de Madrid)
His-ubiquitina K48R	pCMV5	
His-ubiquitina K63R	pCMV5	
His-ubiquitina 7KR	pCMV5	
His-ubiquitina 7KR R48K	pCMV5	
His-ubiquitina 7KR R63K	pCMV5	
HER2	pLV	Proporcionado por el laboratorio de la Dra. Cristina Sánchez (Universidad Complutense de Madrid)
Histona 2B (H2B)-Neon	pLV	Proporcionado por el Dr. José Miguel Ramos Pittol (Universidad de Utrecht, Países Bajos)
Gag, Pol, Rev y Tat del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1)	psPAX2	Proporcionado por el laboratorio de la Dra. Cristina Sánchez (Universidad Complutense de Madrid)
Glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G)	pMD2.G	

*Detallado en el apartado de clonajes.

Metodológicamente, se sembraron 30.000 células/cm² el día anterior a la transfección. Todas las transfecciones se llevaron a cabo con polietilenimina (PEI, Sigma-Aldrich), utilizándose 4 µL de este reactivo lipofílico por cada µg de DNA plasmídico a transfectar. Tras una incubación de 15 minutos del DNA con PEI en medio sin antibióticos, la mezcla se añadió gota a gota sobre la placa de cultivo. Las cantidades de plásmido, reactivo PEI y medio de cultivo para cada placa se indican en la **tabla 5**. Independientemente del plásmido expresado, todos los experimentos correspondientes se realizaron 48 horas después de la transfección.

Tabla 5. Cantidades de reactivo de transfección y plásmido utilizadas

PLACA	PLÁSMIDO	PEI	MEDIO DE CULTIVO
Placa de 6 pocillos	1 µg	4 µL	250 µL
Placa de 100 mm de diámetro	4 µg	16 µL	1 mL
Placa de 150 mm de diámetro	10 µg	40 µL	2,5 mL

6. INFECCIÓN CON PARTÍCULAS LENTIVIRALES PARA EL SILENCIAMIENTO GÉNICO ESTABLE

Para el silenciamiento estable de TRIB3 se utilizó una mezcla de partículas lentivirales comerciales que contienen tres secuencias específicas de shRNA para TRIB3 (de 19 a 25 nucleótidos, en horquilla) o 3 shRNAs inespecíficos utilizados como control (Santa Cruz Biotechnology). Las construcciones presentan además un gen de resistencia a puromicina que permite la posterior selección de las células infectadas.

Para llevar a cabo este protocolo de infección, las células se sembraron en placas de 12 pocillos y cuando alcanzaron el 50% de confluencia, se cambiaron a medio fresco con polibreno a 8 µg/mL. A continuación, se añadieron 5 µL de las correspondientes partículas lentivirales. Tras 24 horas, se cambió el medio al medio de cultivo habitual para cada línea celular y se seleccionaron las células infectadas añadiendo puromicina en concentraciones crecientes (de 0,5 mg/mL a 5 mg/mL).

7. INFECCIÓN CON PARTÍCULAS LENTIVIRALES PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

7.1. Generación de partículas lentivirales

Las células HEK293T se sembraron en placas de 100 mm de diámetro a una densidad de 50.000 células/cm². Al día siguiente, se transfectaron con 3 µg del plásmido de interés y los dos plásmidos necesarios para la formación de los lentivirus: 2 µg del plásmido de empaquetamiento psPAX2 y 1 µg del plásmido de envuelta pMD2.G. Un día más tarde, se cambió el medio al medio de cultivo estándar de las células a infectar y 24 horas después se recogió el medio, el cual contenía los lentivirus. Este se centrifugó y filtró usando filtros con un tamaño de poro de 0,45 µm para eliminar posibles células HEK293T que hubiera en suspensión.

7.2. Infección con las partículas lentivirales

Las células BT474 o MCF7 se sembraron a una densidad de 30.000 células/cm² en placas de 60 mm de diámetro y al día siguiente se cambió el medio al medio con lentivirus previamente obtenido. Para la expresión estable de estas proteínas, 48 horas más tarde se comenzó con la selección de las células que habían incorporado el plásmido añadiendo puomicina en el caso de la infección de H2B-Neon, o blasticidina en el caso de HER2. Para la expresión transitoria, se iniciaron los experimentos 48 horas después de la infección.

8. TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA

Para evaluar el efecto de distintos fármacos sobre la viabilidad celular se empleó la tinción con cristal violeta, un colorante soluble en agua derivado de triarilmetano que se une a moléculas tipo ribosa como las presentes en el DNA. Se trata de un ensayo colorimétrico en el que únicamente se tiñen las células viables adherentes.

Metodológicamente, se sembraron 16.000 células/cm² en su medio correspondiente en placas de 12 pocillos por triplicado. Al día siguiente, se cambió el medio a medio sin suero y 4 horas después se trataron las células con los fármacos correspondientes (**Tabla 6**) a las concentraciones indicadas en cada experimento. Como control de los tratamientos se utilizó el disolvente indicado para cada fármaco. 24 o 48 horas más tarde, las células se lavaron con PBS para eliminar las células muertas no adheridas y las células que permanecían adheridas se fijaron con p-formaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron de nuevo tres veces con PBS y se tiñeron con una solución de cristal violeta (cristal violeta 1%, metanol 20%) durante 30 minutos. Después, las placas se lavaron con agua y se dejaron secar hasta el día siguiente. Para resuspender los precipitados, se incubaron con Tritón 0,125% en PBS durante 30 minutos y, finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm. Esta medida resulta proporcional al número de células viables que hubiera en el cultivo y permite estimar el efecto de los distintos tratamientos sobre la supervivencia o viabilidad de las células sembradas.

Tabla 6. Características de los fármacos utilizados

Fármaco	Disolvente	Función	Casa comercial
Lapatinib	DMSO	Inhibidor de la actividad tirosina-quinasa de HER2	Sigma
Inhibidor de AKT X	H ₂ O	Inhibidor de la actividad de AKT	Sigma
UO126	DMSO	Inhibidor de MAPK2K1 y MAP2K2	Sigma
Doxorrubicina	DMSO	Agente intercalante del DNA	Sigma
Cisplatino	DMSO	Agente alquilante del DNA	SantaCruz Biotechnology
Tamoxifeno	DMSO	Inhibidor competitivo de ER	Sigma

9. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE CONTAJE DE CÉLULAS FLUORESCENTES

Para evaluar el efecto de distintas condiciones en el crecimiento celular, se infectaron las células con H2B-Neon. La expresión de esta histona fluorescente permite visualizar mediante microscopía los núcleos celulares para un conteo diario del número de células. Así, es posible analizar la proliferación celular bajo distintas condiciones.

Para ello, se sembraron 30.000 células/cm² en placas de 96 pocillos por triplicado en su medio estándar. Al día siguiente, se cambió el medio a cada una de las condiciones evaluadas (medio estándar o medio sin suero, sin glutamina y con baja glucosa) y se contaron las células. Se volvieron a contar las células para estudiar el efecto del tratamiento los días consecutivos.

10. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR

Con el objetivo de estudiar la capacidad migratoria de las células, se realizaron ensayos en cámaras de Boyden (#734-2748; VWR). Estas cámaras presentan dos reservorios separados por una membrana porosa de tereftalato de polietileno (PET) y 8 µm de tamaño de poro. Sobre ella, se siembran células en medio sin suero, de forma que quedan separadas físicamente del reservorio inferior que contiene medio con suero. Así el suero actúa como quimioatrayente, favoreciendo la migración de las células a través de la membrana, lo que permite cuantificar cuántas células lo han atravesado y así estimar su capacidad migratoria.

Para realizar los ensayos, las cámaras de Boyden se colocaron dentro de los pocillos de una placa de 24 pocillos y fueron incubadas durante 30 minutos con el medio de cultivo. A continuación, sobre el filtro se sembraron 10⁵ células en medio sin suero, mientras que, en la cámara inferior (en el pocillo) se añadió medio que contenía 20% de FBS. Tras 48 horas, se lavó con PBS tanto la parte superior (donde se encuentran las células que no han migrado) como la parte inferior (donde se encuentran las células que han migrado). Después, se eliminaron mecánicamente las células no migradas y se fijaron las células migradas con p-formaldehído al 4% durante 15 minutos. Tras lavarlas de nuevo con PBS, las células que habían migrado (y que se encontraban en la cara del filtro que estaba en contacto con la cámara que contenía el suero) se tiñeron con DAPI (Roche) 1:5.000 durante 10 minutos tras lo cual se lavaron con PBS. Por último, la membrana se cortó con un bisturí y se colocó en un portaobjetos con Mowiol (Milipore) para su posterior visualización en el microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan 2 empleando el programa Metamorph-Offline 6.2 (Universal Imaging).

11. ENSAYOS DE INVASIÓN CELULAR EN CÁMARAS DE BOYDEN

El protocolo llevado a cabo para los ensayos de invasión fue equivalente al de los ensayos de migración, pero en este caso, se emplearon cámaras de Boyden con una membrana de PET recubierta con la matriz de membrana basal matrigel (#354480, Corning). Del mismo modo que en el apartado anterior, se sembraron las células en medio sin suero y se utilizó medio con 20% de FBS como quimioatrayente durante 48 horas. A continuación, se lavaron y se eliminaron mecánicamente las células no migradas. Las células que habían invadido se fijaron con p-formaldehído al 4% durante 15 minutos para posteriormente teñirlas con DAPI 1:5.000 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, las preparaciones se montaron con Mowiol y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan 2 empleando el programa Metamorph-Offline 6.2.

12. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

Para analizar la actividad mitocondrial celular, se realizó una prueba de estrés mitocondrial (*Mito Stress Test*) empleando Agilent Seahorse XF, que permite monitorizar la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y el cociente de acidificación del medio extracelular (ECAR) en tiempo real. El ensayo consiste en añadir a las células distintos moduladores de la cadena de transporte de electrones (oligomicina, carbonil cianida-4(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), rotenona y antimicina) y la monitorización del OCR.

Brevemente, se sembraron por triplicado 20.000 células por pocillo en la placa XFe96 (Agilent) de 96 pocillos y al día siguiente, 1 hora antes del ensayo, se cambió el medio a DMEM/F12, glutamina 2mM y glucosa 10mM pH 7,4. Las placas y compuestos se prepararon siguiendo el protocolo sugerido por la casa comercial. Una vez introducida la placa en el equipo Agilent Seahorse XF y realizadas las medidas del OCR basal, se inyectaron secuencialmente la oligomicina a 2,5µM, para la inhibición de la ATPasa mitocondrial; FCCP 1,2 µM, un protonóforo para el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial, y finalmente rotenona 1µM y antimicina A 1 µM, que inhiben el complejo I y III de la cadena de transporte electrónico, respectivamente, para la inhibición completa de la respiración mitocondrial. Los resultados se analizaron con el programa *Seahorse XF Mito Stress Test Report Generator*.

13. ANÁLISIS POR PCR CUANTITATIVA (qPCR) DE LOS NIVELES DE mRNA

13.1. Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de líneas celulares se empleó NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de RNA se cuantificó mediante absorbancia a 260 nm en un Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies).

13.2. Retrotranscripción del RNA a cDNA

Para la obtención de cDNA se utilizó el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Brevemente, se incubaron 2 µg del RNA extraído anteriormente con los cebadores durante 10 minutos a 65°C para la desnaturalización. A continuación, se añadieron a la mezcla de reacción los desoxinucleótidos, el inhibidor de RNasas y la transcriptasa inversa (**Tabla 7**). Finalmente, la reacción de síntesis del cDNA se llevó a cabo mediante dos incubaciones consecutivas: una primera a 25°C durante 10 minutos y una segunda a 55°C durante 1 hora. Para la completa inactivación de la transcriptasa inversa, se calentó a 85°C durante 5 minutos.

Tabla 7. Composición del Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)

Componentes	Concentración
RNA	2 µg
Cebadores: hexanucleótidos al azar	60µM
Desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	1mM
Inhibidor de RNasas	1 U/µL
Transcriptasa inversa Transcriptor	0,5 U/µL
Tampón de reacción	1x

13.3. qPCR

Los ensayos de qPCR se realizaron usando *FastStart Universal SYBR* (Roche). La reacción se realizó en placas de 384 pocillos donde se incubaron 250 ng de cDNA con los cebadores específicos para el gen de interés a 2µM (**Tabla 8**) y la Master Mix 1x (que contiene la Taq DNA polimerasa, dNTPs, SYBR Green y MgCl₂). Las amplificaciones se realizaron con un sistema de PCR en tiempo real 7900 HT-Fast (Applied Biosystems). La expresión génica se cuantificó mediante la aplicación del método $\Delta\Delta C_t$ y los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del RNA mensajero de la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Tabla 8. Cebadores utilizados para los experimentos de qPCR

Gen	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')
HER2	GGGAAACCTGGAACCTCACCT	CCCTGCACCTCCTGGATA
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAG	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

14. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS

14.1. Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteína total de las distintas líneas celulares, las muestras se lisaron en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA; Tris-HCl 25mM, pH 7,9, NaCl 150mM, EGTA 1mM, pirofosfato sódico 5mM, ácido desoxicolico 0,5%, dodecilsulfato sódico (SDS) 0,1%, NP-40 1%, PMSF 1mM, cóctel de inhibidores de proteasas 1x (cOmplete, Roche)). A continuación, las muestras se incubaron a 4°C durante 30 minutos y se centrifugaron a 15.520g durante 15 minutos a 4°C. La cuantificación de la concentración de proteína presente en los sobrenadantes se realizó mediante el método de Bradford (Biorad) [292]. Para la preparación de las muestras, se diluyeron entre 20 y 30 µg de proteína en volúmenes iguales y se calentaron a 95°C durante 5 minutos en tampón de carga (Tris HCl 0,0125M pH 6,8, SDS 10%, azul de bromofenol 0,05%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10mM).

14.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras se cargaron en geles de acrilamida/bisacrilamida (Biorad) de distintos porcentajes (7,5%, 10% o 12%, según el tamaño molecular de la proteína de interés) y las proteínas se separaron por electroforesis vertical en presencia de SDS. El tampón de electroforesis empleado estaba compuesto por Tris 25mM pH 8,3, glicina 200mM y SDS 1%.

Según la aproximación experimental, una vez finalizada la electroforesis, o bien se tiñó el gel con azul de Coomasie o *BlueSafe* (Nzytech), para visualizar todas las proteínas presentes en la muestra, o bien se transfirió a una membrana para la posterior inmunodetección de proteínas con anticuerpos específicos.

14.3. Tinción de geles con azul de Coomasie

La tinción con azul de Coomasie se empleó en los experimentos de purificación de proteínas para comprobar la presencia en la muestra tanto de la proteína purificada como de otras posibles proteínas contaminantes. Este protocolo consiste en la incubación del gel durante 1 hora en una solución de Coomasie (Coomasie azul brillante R-250 1 mg/mL, metanol 45%, ácido acético 10%), lo que permite la tinción de las proteínas presentes en el gel, seguido de varios lavados con solución de destiñido (metanol 45%, ácido acético 10%) para visualizar correctamente las bandas proteicas. Finalmente, el gel puede conservarse en agua y fotografiarse.

14.4. Tinción de geles con *BlueSafe*

En los ensayos de actividad quinasa de MTORC2 *in vitro*, se empleó la tinción del gel con el reactivo *BlueSafe* en lugar de con azul de Coomasie, por ser una alternativa a este que permite transferir el gel después de teñirlo. Para ello, se sumergió el gel en la solución *BlueSafe* durante 10-15 minutos y, a continuación, se lavó con agua, se fotografió y se destiñó realizando lavados sucesivos en el tampón de transferencia para su posterior análisis por Western blot.

14.5. Western blot

Para la inmunodetección de proteínas con anticuerpos específicos, en primer lugar, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando el sistema de transferencia en semiseco *Trans-Blot-Turbo Transfer System* (Biorad). A continuación, para evitar posteriores uniones inespecíficas del anticuerpo, las membranas se bloquearon en leche desnatada en polvo al 5% o albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en tampón TBST (Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 100mM, Tween-20 0,1%) durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación. Seguidamente, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario diluido en TBST (**Tabla 9**) durante toda la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con TBST y se incubaron durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación, con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano (anti-IgG de ratón o conejo, GE Healthcare).

Tabla 9. Anticuerpos primarios empleados para los experimentos de Western blot.

Anticuerpo	Dilución	Especie	Casa comercial y referencia
TRIB3	1:1000	Conejo	Abcam; #75946
HER2	1:1000	Ratón	Cell signaling, #2248
p-AKT (S473)	1:1000	Conejo	Cell signaling, #9271
p-AKT (T308)	1:1000	Conejo	Cell signaling, #9275
AKT	1:1000	Conejo	Cell signaling, #9272
p-ERK	1:1000	Conejo	Cell signaling, #9101
ERK	1:1000	Ratón	Cell signaling; #9102
pFOXO	1:1000	Conejo	Cell signaling; #9464
FOXO	1:1000	Conejo	Cell signaling; #2497
MTOR	1:1000	Conejo	Cell signaling; #2983
His-HRP	1:5000	-	Sigma; A7058
E-cadherina	1:1000	Conejo	Cell signaling; #3195S
Vimentina	1:1000	Ratón	BD Pharmingen; #550513
STUB1	1:1000	Conejo	Abcam; ab2917
Lámina A/C	1:1000	Conejo	Cell signaling; #2032S
β -actina	1:5000	Ratón	Sigma; A5441
α -tubulina	1:5000	Ratón	Sigma; T9026
HSP90	1:5000	Ratón	Sigma; SAB4200812

Tras el lavado del anticuerpo secundario, la señal se reveló por quimioluminiscencia usando el reactivo *Clarity Western ECL Substrate* (Biorad) y las bandas proteicas se cuantificaron mediante densitometrado con el programa Image-J.

15. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Para el estudio de la localización subcelular de TRIB3 en líneas celulares de cáncer de mama, se llevó a cabo un fraccionamiento subcelular para aislar por separado la fracción citosólica y la nuclear.

Para ello, las células sembradas en placas de 100 mm de diámetro se lavaron con PBS frío y se levantaron en 0,5 mL de tampón A (HEPES 10mM pH 7,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5mM, PMSF 1mM, cóctel de inhibidores 1x). Para proceder a la lisis de las membranas, se utilizó un homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem realizándose 50 repeticiones. A continuación, se centrifugó a 2.000g durante 15 minutos a 4°C. En el sobrenadante se encuentra la fracción citosólica y en el precipitado la nuclear junto con las membranas y otros orgánulos. Para extraer el núcleo, se lavó el precipitado de nuevo con 1 mL de tampón A y se centrifugó a 2.000g durante 10 minutos a 4°C. Para lisar el

MATERIALES Y MÉTODOS

precipitado, se añadieron 0,25 mL de tampón RIPA, se incubó durante 10 minutos y se pasó 5 veces por una jeringa de 25G. Por último, se centrifugó a 200g durante 15 minutos a 4°C obteniendo la fracción nuclear en el sobrenadante. El precipitado con la fracción de membrana fue descartado. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford en las fracciones citosólica y nuclear y se prepararon para su análisis por Western blot. Se utilizaron lámina A/C y α -tubulina como controles de carga del núcleo y citoplasma respectivamente.

16. INMUNOFLUORESCENCIA

Esta técnica se llevó a cabo para analizar los niveles y localización subcelular de proteínas tanto en células como en tejido. En el primer caso, las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 15 mm de diámetro y se fijaron con p-formaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. En el caso de las inmunofluorescencias de tejido, el tumor diseccionado y embebido en Tissue-Tek (Sakura) se cortó en secciones de 10 μ m y se fijó con p-formaldehído (o metanol en el caso de la inmunodetección de E-cadherina) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, para ambos casos, y siempre que el marcador a analizar fuera nuclear, se desenmascararon los epítomos con citrato 10mM a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se lavó con PBS y se bloqueó y permeabilizó durante 1 hora a temperatura ambiente con suero de cabra al 10% y Triton x-100 al 0,25% en PBS (PBS-T). Después, se incubó toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C (Tabla 10) y al día siguiente, las células o secciones de tejido se lavaron con PBS-T para su incubación durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a Alexa-488 o Alexa- 594 (Invitrogen) a una dilución 1:500. Los núcleos fueron teñidos con DAPI 1:5.000, que se añadió simultáneamente con el anticuerpo secundario. Tras el lavado del anticuerpo secundario, las preparaciones se montaron con Mowiol y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia ZAISS-Axioplan 2 empleando el programa Metamorph-Offline 6.2.

Tabla 10. Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia

Anticuerpo	Dilución	Especie	Casa comercial y referencia
MKI67	1:300	Conejo	ThermoScientific; RM-9106
CD31	1:300	Ratón	Millipore; CBL468
E-cadherina	1:500	Conejo	Cell signaling; #3195
Vimentina	1:300	Ratón	BD Pharmingen; 550513

17. COINMUNOPRECIPITACIÓN

Para el estudio de interacciones entre proteínas endógenas de la célula se llevaron a cabo ensayos de coimmunoprecipitación. Este método se basa en la utilización de detergentes suaves que permitan la lisis celular sin eliminar interacciones proteína-proteína y en la posterior purificación de una proteína concreta junto a sus interactores mediante el uso de un anticuerpo específico acoplado covalentemente a partículas. Los resultados se analizan por Western blot.

En primer lugar, se realizó una etapa de acoplamiento covalente del anticuerpo a partículas de proteína G-sefarosa, lo que evita que al final del proceso el anticuerpo esté presente en la muestra que se va a someter a electroforesis y por tanto, que las cadenas pesadas y ligeras del mismo sean detectadas por Western blot. Para la conjugación inicial, 10 μ L de partículas de proteína G-sefarosa

por condición se lavaron con PBS y se incubaron durante toda la noche en rotación a 4°C con el anticuerpo de interés (1,2 µg en el caso de TRIB3 y 5 µg para el anticuerpo de STUB1; **Tabla 9**) o con una IgG inespecífica de conejo a la misma concentración como control negativo (#10400C, Invitrogen). Posteriormente, los conjugados se sometieron a 2 lavados con PBS y 3 lavados con borato sódico 0,1M pH 9,3. Para el entrecruzamiento covalente del anticuerpo a la proteína G, los conjugados se incubaron durante 30 minutos, dos veces consecutivas, en rotación y a temperatura ambiente con pimelimidato de dimetilo (DMP) 20mM en borato sódico 0,1 M pH 9,3. Seguidamente, se lavaron 3 veces con glicina 50mM pH 2,5 para eliminar las uniones inespecíficas y 3 veces con Tris-HCl 0,2M pH 8,0 para neutralizarlo, dejando este último lavado durante 2 horas en rotación a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendieron en PBS y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

La segunda etapa de este procedimiento consiste en la inmunoprecipitación de las proteínas de interés empleando las partículas de proteína G-sefarosa acopladas al anticuerpo. Para ello, se lisaron las células con tampón de inmunoprecipitación (IP; Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 150mM, EDTA 0,5M, glicerofosfato sódico 10mM, pirofosfato sódico 10mM, glicerol 10%, NP-40 1%, PMSF 0,5mM, NaF 5mM, Na₂MoO₄ 1mM, NaVO₄ 0,5mM, cóctel de inhibidores de proteasas 1x) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C. El lisado se centrifugó a 15.520g durante 15 minutos a 4°C y se cuantificó la concentración proteica en el sobrenadante mediante el método de Bradford. Una alícuota de 25 µg se separó como posterior control de las proteínas en el lisado total. El resto se incubó con 10 µL de proteína G-sefarosa para eliminar uniones inespecíficas durante 1 hora en rotación a 4°C. A continuación, se centrifugó y 1 mg del sobrenadante se incubó durante toda la noche a 4°C en rotación con los 10 µL de proteína G-sefarosa acoplada al anticuerpo. El inmunoprecipitado se lavó 3 veces con el tampón de IP y finalmente, se resuspendió en 20 µL de tampón de carga para posteriormente calentarlo a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se analizaron por Western blot siguiendo el procedimiento estándar.

18. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS MARCADAS CON GST

Para determinar la interacción de TRIB3 con las distintas isoformas de AKT se recurrió a ensayos de precipitación de proteínas de fusión con GST. Esta aproximación también requiere de unas condiciones suaves para la lisis celular, pero a diferencia de la coimmunoprecipitación, no necesita de anticuerpos, sino de partículas de sefarosa unidas a glutatión y, por tanto, con afinidad por GST. Concretamente, en esta tesis doctoral se precipitaron las distintas isoformas de AKT marcadas con GST para posteriormente determinar los niveles de TRIB3 coprecipitado por Western blot.

Antes de realizar la precipitación proteica, se realizaron dos lavados con PBS de una alícuota de las partículas de sefarosa unida a glutatión y a continuación se incubó con BSA al 0,1% durante 1 hora en rotación a temperatura ambiente para bloquear posibles uniones inespecíficas. Posteriormente, se lavó 3 veces con PBS antes de incubarla con el lisado. Para la precipitación, las células se lisaron en 500 µL de tampón de IP, se incubaron durante 20 minutos a 4°C y se centrifugaron a 15.520g durante 15 minutos a 4°C. Del sobrenadante se separaron 20 µL para emplearlos como control del lisado total y el resto se incubó con 10 µL de la sefarosa unida a glutatión previamente bloqueada y lavada. Tras 40 minutos de incubación en rotación a 4°C, se lavó 3 veces con tampón de IP. Por último, se resuspendió en 20 µL de tampón de carga y se calentó a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se analizaron por Western blot siguiendo el procedimiento estándar.

19. ENSAYO DE ACTIVIDAD GTPasa

Para analizar la actividad GTPasa de RAC1 utilizamos GST-PBD (dominio de unión a p21 de la proteína quinasa activada por p21 (RAC1) 1, PAK1) unido a sefarosa con glutatión. PBD, se une específicamente a RAC1 y CDC42 unidas a GTP pero no a GDP. Por tanto, puede ser empleado para la precipitación específica de RAC1 o CDC42 activa. Metodológicamente, las células se lisaron en tampón FISH (Tris 50mM pH 7,4, NaCl 5M, MgCl₂ 1M, NP40 1%, glicerol 10%), y se centrifugaron 15 minutos a 15.520g a 4°C. Del sobrenadante se separaron 20 µL para emplearlos como control del lisado total y el resto se incubó con 20 µg de sefarosa unida a GST-PDB (cedida por la Dra. Sonia Castillo-Lluva) durante 15 minutos a 4°C. Por último, se realizaron 3 lavados con el tampón FISH, se resuspendió en 20 µL de tampón de carga y se calentó a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se analizaron por Western blot siguiendo el procedimiento estándar. La cantidad de RAC1 precipitada (RAC1-GTP) se normalizó respecto a la cantidad de RAC1 en el lisado total (RAC1 total).

20. ENSAYOS DE UBIQUITINACIÓN: PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS MARCADAS CON HISTIDINAS

Con el objetivo de evaluar la ubiquitinación de TRIB3 en células BT474 o MCF7, se realizaron ensayos de ubiquitinación expresando de manera exógena myc-TRIB3 e His-ubiquitina. En estos experimentos, se utilizan partículas de agarosa unida a níquel/NTA para la precipitación de His-ubiquitina y posteriormente se determinaron los niveles de myc-TRIB3 unido covalentemente a esta ubiquitina mediante Western blot. Dado que este procedimiento conlleva la utilización de una ubiquitina unida a 6 histidinas, no se requiere de un anticuerpo para la precipitación y permite llevar a cabo un protocolo en condiciones mucho más restrictivas y desnaturalizantes, lo que evita cualquier interacción proteína-proteína no covalente y asegura que todo el TRIB3 detectado se corresponde con TRIB3 que está directamente ubiquitinado.

En cuanto al protocolo en concreto, 48 horas después de la transfección las células se lisaron en urea 8M con SDS al 0,3%, se incubaron durante 30 minutos y se pasaron 10 veces por una aguja de 25G. A continuación, se separó una alícuota de 20 µL para emplearla como control del lisado total y el resto se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con 10 µL de la agarosa unida a níquel/NTA previamente lavada con PBS. Posteriormente, se lavó 3 veces con urea 8M con SDS al 0,2% y finalmente se resuspendió en 20 µL de tampón de carga y se calentó a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se analizaron por Western blot siguiendo el procedimiento estándar.

21. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON TRIB3 POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

21.1. Precipitación de proteínas marcadas con GFP

Para el análisis por espectrometría de masas de los interactores de TRIB3, se transfectaron 3 placas de 150 mm de diámetro por condición de las células BT474 o MCF7 con un vector de expresión de GFP o TRIB3-GFP. Transcurridas 48 horas, las células se lisaron en tampón de lisis para espectrometría de masas (MS; Tris 50mM pH 8,0, EDTA 1mM, NaCl 250mM, glicerol 10%, NP-40 0,1%, cóctel de inhibidores de proteasas 1x) y se incubaron 20 minutos a 4°C. A continuación, se centrifugó durante 15 minutos a 15.520g a 4°C y el sobrenadante se incubó con 20 µL de agarosa unida a un anticuerpo contra GFP (*GFP-Trap*, Chromotek) durante 2 horas a 4°C en rotación. Posteriormente, se lavaron tres veces con tampón de lavado bajo en sales (Tris 50mM pH 8,0, EDTA 2mM, glicerol 10%, NP-40 0,1%) y una última vez con PBS. Tras eliminar el último lavado la resina de agarosa precipitada se congeló a -20°C hasta su posterior análisis.

21.2. Cromatografía Líquida seguida de espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Los precipitados de TRIB3-GFP se analizaron por espectrometría de masas con el objetivo de detectar las proteínas con las que se encuentra interaccionando TRIB3 en las células de cáncer de mama. El análisis se realizó en colaboración con el centro de Medicina Molecular del Centro Médico de Utrecht (UMC Utrecht, Países Bajos) siguiendo el procedimiento estándar.

22. CLONAJES

Para la expresión de TRIB3 en células de mamífero o en bacteria, se generaron los plásmidos pGloMyC-TRIB3 y pGex-KG-TRIB3 respectivamente.

Amplificación del cDNA de TRIB3

En primer lugar, se amplificó el cDNA de TRIB3 por PCR a partir del cDNA celular. Para ello, se utilizó la DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion (ThermoFisher Scientific) y los cebadores Fw1 myc-TRIB3, Fw2 GST-TRIB3 y Rv TRIB3 (**Tabla 11**). El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo sugerido por la casa comercial. El programa de PCR empleado se recoge en la **tabla 12**.

Tabla 11. Cebadores empleados en el clonaje y secuenciación de myc-TRIB3 y GST-TRIB3

Cebador	Secuencia 5'-3'	Utilización
Fw1 myc-TRIB3	CAGGGATCCAATGCGAGCCACCCCTGCG	PCR y secuenciación
Fw2 GST-TRIB3	CAGGGATCCATGCGAGCCACCCCTGCG	PCR y secuenciación
Rv TRIB3	CAGGAATTCCTAGCCATACAGAACCAC	PCR y secuenciación
Fw_TRIB3 INT 1	GCCTTTTTCCTC	Secuenciación
Fw_TRIB3 INT 2	GAGATACTCAGC	Secuenciación
Rv_TRIB3 INT 1	GGCTGCCTTGCC	Secuenciación
Rv_TRIB3 INT 2	GAGGAGCTGGG	Secuenciación

Tabla 12. Condiciones de la PCR llevada a cabo para amplificar TRIB3

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	94 °C	30 segundos
2	20	94 °C	15 segundos
3		60 °C	15 segundos
4		72 °C	1 minuto
5	1	72 °C	10 minutos

Electroforesis en geles de agarosa y extracción de la banda

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8%. Las bandas se visualizaron en un transiluminador y se cortó la banda correspondiente con un bisturí. Para la extracción del DNA se utilizó el kit *NucleoSpin Gel and PCR clean up* (Macherey-Nagel).

Digestión con enzimas de restricción y ligación

Para introducir el cDNA de TRIB3 en los vectores correspondientes, 1 µg de plásmido y el DNA extraído de las bandas se cortaron con 10 U de las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (ThermoFischer). Esta incubación se realizó durante 2 horas y a 37°C en el tampón de BamHI (ThermoFischer) y el resultado se lavó con el kit *NucleoSpin Gel and PCR clean up* (Macherey-Nagel). A continuación, se comprobaron las cantidades de plásmido e inserto en una electroforesis horizontal en geles de agarosa. Para la ligación, se incubó el plásmido y el inserto en una proporción aproximada 1:10 con T4 DNA ligasa (New England Biolabs) en el tampón correspondiente durante toda la noche a 16°C.

Transformación bacteriana

Finalmente, con el objetivo de amplificar el producto obtenido, bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α competentes se transformaron con la mezcla de ligación. Para ello, se incubaron las bacterias con el producto de la ligación durante 30 minutos en hielo. A continuación, se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 40 segundos. Tras dos minutos de nuevo en hielo, se incubaron con 1 mL de medio de cultivo LB a 37 °C para la recuperación de las células y expresión de los genes de resistencia. Pasada una hora, se sembraron en una placa con LB-ampicilina que se incubó a 37°C para favorecer el crecimiento exclusivamente de las bacterias transformadas. Al día siguiente, se seleccionaron una serie de colonias crecidas, se extrajo el DNA mediante mini-prep o midi-prep (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones de la casa comercial y se analizó la presencia del plásmido y su correcta secuencia empleando los cebadores recogidos en la **tabla 11**. La secuenciación fue llevada a cabo por la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid.

23. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la realización de los ensayos de la actividad quinasa de MTORC2 *in vitro* ha sido necesaria la purificación de AKT1, AKT2, AKT3, MTORC2 y TRIB3.

23.1. Purificación de AKT1, AKT2 y AKT3

El procedimiento para la purificación de cada una de las isoformas de AKT se realizó siguiendo el mismo protocolo. En primer lugar, las células HEK293T se transfectaron con el vector de expresión de cada una de las isoformas de AKT (pEBG-GST-AKT1, pEBG-GST-AKT2 o pEBG-GST-AKT3) y, 48 horas después, estas células se recogieron mediante raspado de las placas en PBS y posterior centrifugación durante 5 minutos a 200g a temperatura ambiente. El precipitado celular se congeló a -80°C y se guardó hasta tener una cantidad de células recolectadas correspondiente a 20 placas de 150 mm de diámetro. Una vez obtenida esta cantidad de células se procedió a su lisis. Para ello, se incubaron los precipitados de células durante 20 minutos con tampón de lisis (HEPES 40mM pH 7,4, NaCl 120mM, pirofosfato sódico 10mM, glicerofosfato sódico 10mM, NaF 50mM, CHAPS 0,3%, EDTA 0,5mM, EGTA 0,5mM, PMSF 1mM, cóctel de inhibidores de proteasas 1x), se centrifugaron a 15.520g durante 30 minutos a 4°C, y el sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45 µm.

La purificación de GST-AKT se realizó mediante cromatografía de afinidad, empleando una columna GSTrap HP de 1 mL (Cytive Life Sciences) conectada a una bomba peristáltica. Se trata de una columna preempaquetada con resina de agarosa unida a glutatión, lo cual permite la unión de proteínas de fusión acopladas a GST. Para equilibrar la columna, se lavó primero con agua y después con tampón de lavado (HEPES 40mM pH 7,4, NaCl 120mM, pirofosfato sódico 10mM, glicerofosfato sódico 10mM, NaF 50mM, CHAPS 0,3%). Todos los lavados de la columna se realizaron con un volumen de 5 mL del tampón correspondiente. A continuación, se cargó el sobrenadante en la columna y se recogió la fracción no unida. Posteriormente se lavó con 5 mL de tampón de lavado y por último se eluyó empleando glutatión 20mM en tampón de lavado. Se recogieron dos primeras fracciones de elución de 0,5 mL seguidas de 10 fracciones de 0,25 mL. Se cuantificó la cantidad de proteína de cada fracción mediante absorbancia a 280 nm y las fracciones con mayor concentración de proteína y, por tanto, donde se encontraba GST-AKT se juntaron y dializaron frente al tampón en el que se iba a realizar el ensayo quinasa (HEPES 25mM pH 7,5, KCl 50mM). Para la diálisis se emplearon casetes de diálisis desechables de punto de corte de 20 kDa (*Slide-A-Lyzer G2*; Thermo Scientific) y se realizaron 3 cambios del tampón de diálisis durante 16 horas. Finalmente, se cuantificó la cantidad de proteína en la fracción dializada y la proteína purificada se conservó a -80°C.

Paralelamente, de las distintas etapas del proceso se recogieron alícuotas de 10 µL para comprobar la eficacia del proceso y la presencia de AKT mediante PAGE-SDS seguida de tinción con azul de Coomassie o de Western blot.

23.2. Purificación de MTORC2

El complejo MTORC2 está formado por la quinasa MTOR, RICTOR, SIN1, MLST8, PRR5 y DEPTOR [73]. Para la purificación de dicho complejo se utilizaron células HEK293T que expresaban de manera estable la proteína SIN1 unida a 6 histidinas (cedidas por la Dra. Begoña Álvarez de la Universidad Complutense de Madrid). El protocolo fue equivalente al utilizado para la purificación de GST-AKT salvo que en este caso se utilizó una columna HisTRAP HP (Cytiva Life Sciences) que contiene agarosa con 0,12% de níquel, lo que permite la unión específica de proteínas de fusión con una cola de polihistidinas (en este caso, 6 histidinas).

Una vez cargado el sobrenadante en la columna, se lavó primero con tampón de lavado y después con tampón de lavado que contenía imidazol a 50mM para mejorar la eliminación de proteínas unidas inespecíficamente. Por último, se eluyeron las proteínas que quedaban unidas con 500mM de imidazol en tampón de lavado. Del mismo modo que en el caso anterior, se recogieron dos fracciones de 0,5 mL y 10 de 0,25 mL, se cuantificó la proteína de cada una de ellas y se juntaron aquellas donde se encontraba la proteína purificada más concentrada. En este caso, no dializamos MTORC2 tras purificarlo para evitar que precipitase. Finalmente, analizamos por tinción con azul de Coomassie y por Western blot las distintas etapas de la purificación.

23.3. Purificación de TRIB3

Para la purificación de TRIB3 generamos un plásmido pGEX-GST-TRIB3 de expresión inducible en bacteria por isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Así, en primer lugar se transformaron bacterias *E. coli* BL21 competentes con 1 µg del plásmido siguiendo el protocolo estándar descrito anteriormente. Tras una serie de purificaciones a pequeña escala para comprobar que el plásmido estaba correcto, se realizó un cultivo a gran escala para la purificación de TRIB3. Para ello, se comenzó con un preinóculo de 200 mL de LB-ampicilina con la colonia anterior, la cual se incubó toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, se diluyó la cantidad necesaria del preinóculo en un volumen final de 750 mL en LB-Ampicilina para obtener una densidad óptica de 0,1 (absorbancia

a 600 nm). Se incubó a 37°C y, cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,4-0,5, se indujo la expresión de TRIB3 con IPTG a 0,5mM. 3 horas más tarde, se centrifugó el cultivo a 3.836g durante 10 minutos a 4°C y el precipitado se congeló a -80°C.

Para la purificación de TRIB3, el precipitado obtenido se lisó en el mismo tampón de lisis mencionado anteriormente, pero añadiendo esta vez lisozima para la correcta ruptura de la pared bacteriana. Además, el lisado fue sometido a 4 pulsos de 30 segundos en un sonicador de punta con una amplitud del 20 %. A continuación, se centrifugó, filtró y se cargó en una columna GSTrap HP del mismo modo que se realizó para GST-AKT. Se lavó, eluyó y dializó siguiendo también el mismo protocolo. Por último, se analizó de nuevo esta purificación por tinción con azul de Coomassie y Western blot.

24. ENSAYO DE ACTIVIDAD QUINASA DE MTORC2 *IN VITRO*

24.1. Desfosforilación *in vitro* de AKT

Dado que GST-AKT iba a ser utilizada como sustrato de MTORC2, se procedió a su desfosforilación previa al ensayo empleando la proteína fosfatasa lambda (New England Biolabs). Como sugiere el protocolo de la casa comercial, se utilizaron 20 U de enzima por cada µg de proteína en presencia de MnCl₂ 1mM durante 30 minutos a 30°C. La reacción se paró añadiendo los inhibidores de fosfatasas NaVO₄ 10 mM y NaF 5mM.

24.2. Ensayo de actividad quinasa

Los ensayos de actividad quinasa *in vitro* son aproximaciones que permiten estudiar la capacidad de fosforilación de una proteína quinasa a su sustrato bajo unas condiciones muy controladas, prescindiendo del contexto celular.

Para estudiar la actividad del complejo MTORC2 *in vitro*, se emplearon como sustratos GST-AKT1, GST-AKT2 o GST-AKT3, previamente purificadas y desfosforiladas. Además, se añadió GST-TRIB3 para evaluar si podía modificar *in vitro* la actividad de dicho complejo. Para el ensayo, se empleó el tampón HEPES 25mM pH 7,5, KCl 50mM suplementado con MgCl₂ 5mM y MnCl₂ 5 mM necesarios para la actividad quinasa. El ensayo consiste en la incubación de 10 µg del complejo MTORC2 con 2 µg de su sustrato AKT, en presencia de 0,5mM de ATP. Además, para evitar la posible autofosforilación de AKT se añadió el inhibidor de AKT X a una concentración final de 10 µM. En algunas condiciones se añadió 1,5 µg de GST-TRIB3 a la mezcla de reacción. Como controles negativos se realizaron condiciones sin ATP, sin TRIB3 o sin MTORC2. Dado que MTORC2 no había sido dializado, en las condiciones sin el complejo se añadió el volumen equivalente del tampón de elución (imidazol 500mM en tampón de lavado). El ensayo se realizó a 37°C durante 40 minutos en un volumen final de reacción de 25 µL y se paró añadiendo directamente el tampón de carga a la muestra. El resultado se analizó por Western blot para analizar la fosforilación de AKT en la serina 473 (S473). El control de carga de AKT total se realizó mediante tinción con *BlueSafe* o Western blot contra AKT total.

25. ENSAYO DE INTERACCIÓN DE RAC1 Y TRIB3 *IN VITRO*

Para el estudio de la interacción de RAC1 con TRIB3 se emplearon GST-RAC1 y GST-TRIB3 previamente purificados de bacterias y se realizó un protocolo de precipitación con partículas de sefarosa unida a glutatión.

25.1. Escisión de proteínas de fusión con trombina

Dado que ambas proteínas estaban unidas a GST y esto impedía la realización del ensayo, se empleó trombina (Novagen) para cortar la proteína de fusión GST-RAC1 (cedida por la Dra. Sonia Castillo-Lluva) y separar así RAC1 de GST. Para realizar el corte, se incubó GST-RAC1 con 0,03 U de Trombina por μg de proteína en presencia de CaCl_2 durante toda la noche a 4°C . Posteriormente, la reacción se paró empleando el cóctel de inhibidores de proteasas (A32955, ThermoScientific).

25.2. Precipitación de GST-TRIB3

Para el ensayo de coprecipitación, por un lado se prelavaron 4 μg de RAC1 con 20 μL de partículas de sefarosa unida a glutatión durante 1 hora a temperatura ambiente para evitar posteriores uniones inespecíficas. Por otro lado, 3 μg de GST-TRIB3 se unieron a 40 μL de partículas de sefarosa unida a glutatión mediante su incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en rotación. A continuación, se realizaron tres lavados y se añadió 1 μg de la RAC1 prelavada a estas partículas de sefarosa con GST-TRIB3 ya unido. Paralelamente se incubó 1 μg de RAC1 con 20 μL de partículas de sefarosa sin GST-TRIB3 unido como control negativo. Se incubaron ambas condiciones durante 2 horas a temperatura ambiente en rotación y finalmente se lavaron 3 veces en el tampón de reacción, dejando el último lavado durante 1 hora. Finalmente, se resuspendió en 20 μL de tampón de carga y se calentó a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se analizaron por Western blot siguiendo el procedimiento estándar.

26. INYECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES EN LA VENA DE LA COLA DE RATONES INMUNODEFICIENTES

Para el análisis de la capacidad metastática de las líneas celulares BT474 y MCF7 se realizó un ensayo en el que se evalúa la capacidad de colonización de las células, es decir, la habilidad para llegar a otro órgano y formar un nuevo tumor.

Este ensayo consiste en la inyección con una aguja de 25G de 500.000 células en 200 μL de PBS en la vena lateral de la cola de ratones hembra de 6 semanas inmunodeprimidas (ratones atímicos, Envigo). Se inocularon células BT474 shC, BT474 shTRIB3, MCF7 shC y MCF7 shTRIB3 en 10 ratones por cada condición. Dichos ratones se sacrificaron 6 semanas después para la evaluación de las alteraciones histopatológicas en el hígado, corazón y pulmones por la Dra. Juana M. Flores del servicio externo de Patología de animales de experimentación de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. En un experimento piloto, se realizó el mismo protocolo inyectando células 231-HER2/LM-4 shC y shTRIB3 en 12 ratones por condición, pero en este caso solo se analizaron macroscópicamente las alteraciones en pulmón.

27. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los datos presentados en esta tesis fueron analizados empleando el programa informático GraphPad Prism 6.0. Para las gráficas de supervivencia de las pacientes (curvas Kaplan-Meier) los valores se dividieron en cuartiles (datos procedentes de las bases de datos) o por la mediana (datos de las muestras del TMA) y se analizaron mediante la prueba *log-rank*. Para los análisis de correlación se utilizó el coeficiente de Spearman. Los datos se expresan en diagramas de barras, de dispersión de puntos o en curvas dosis-respuesta como la media $\pm$ SEM de al menos tres experimentos independientes. Cuando se compararon dos grupos de muestras se empleó la prueba T, la prueba T con corrección de Welch's o la prueba de Wilcoxon según la distribución de la muestra. Para comparaciones múltiples, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con la corrección de Šidák. Valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LOS NIVELES Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TRIB3 Y SU CORRELACIÓN CON EL PRONÓSTICO EN MUESTRAS DE PACIENTES DE CÁNCER DE MAMA

1.1. TRIB3 se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama

Con el objetivo de estudiar el papel de TRIB3 en cáncer de mama, comparamos en primer lugar los niveles de esta pseudoquinasa en tejido tumoral respecto a tejido normal mamario. Para ello, empleamos las plataformas *UCSC Xena* [289] y *Cancertool* [290], las cuales permiten comparar datos de mRNA de varios estudios. Asimismo, consultamos *Human Protein Atlas* [291] para comparar de manera cualitativa los niveles de TRIB3 a nivel de proteína. Como se observa en la **figura 12**, el tejido tumoral presenta mayores niveles de TRIB3 que el tejido normal, tanto a nivel de mRNA (**Fig. 12A, 12B**) como a nivel de proteína (**Fig. 12C**), sugiriendo una posible implicación de esta proteína en cáncer de mama.

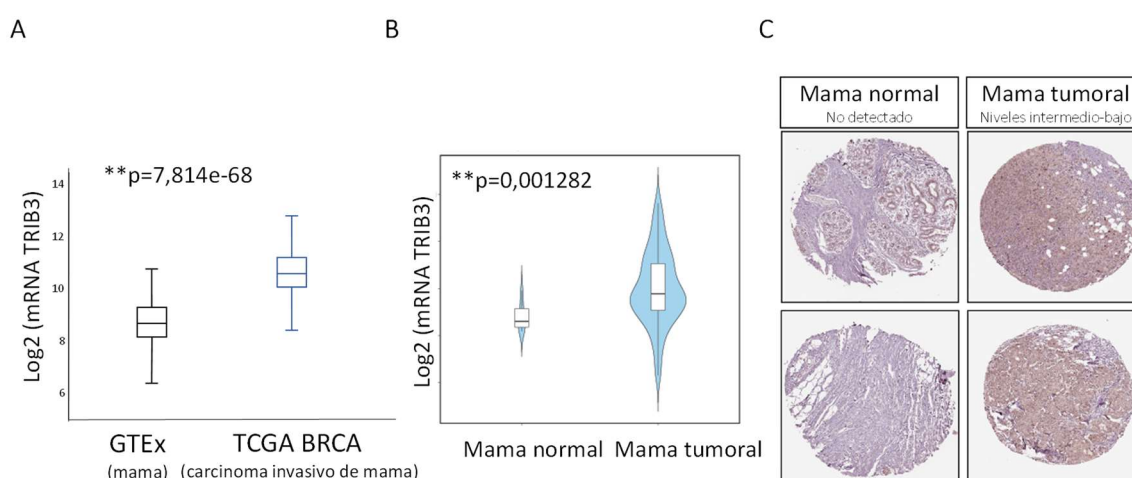


Figura 12. TRIB3 se encuentra sobreexpresado en el tejido tumoral mamario respecto al tejido normal. (A, B) Análisis bioinformático de los niveles de mRNA de TRIB3 en muestras de carcinoma mamario respecto a tejido mamario normal en los estudios GTEx y TCGA a través de la plataforma UCSC Xena (A; n=1278; $**p < 0.01$; utilizando la prueba T con corrección de Welch's) y Lu *et al.* a través de la plataforma Cancertool (B; n=131; $**p < 0.01$; utilizando la prueba T). (C) Imágenes representativas de tinción por IHQ con el anticuerpo HPA055442 de TRIB3 en muestras de tejido normal y tumoral mamario obtenidas de Human Protein Atlas.

A continuación, analizamos si existe alguna correlación entre los niveles de TRIB3 y la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama. Utilizando de nuevo la plataforma *Cancertool* [290] comprobamos que altos niveles del mRNA de TRIB3 parecen asociarse con una menor supervivencia libre de enfermedad de las pacientes en tres de los estudios mostrados, sin embargo, esta correlación no se observa en todas las cohortes analizadas (**Fig. 13**).

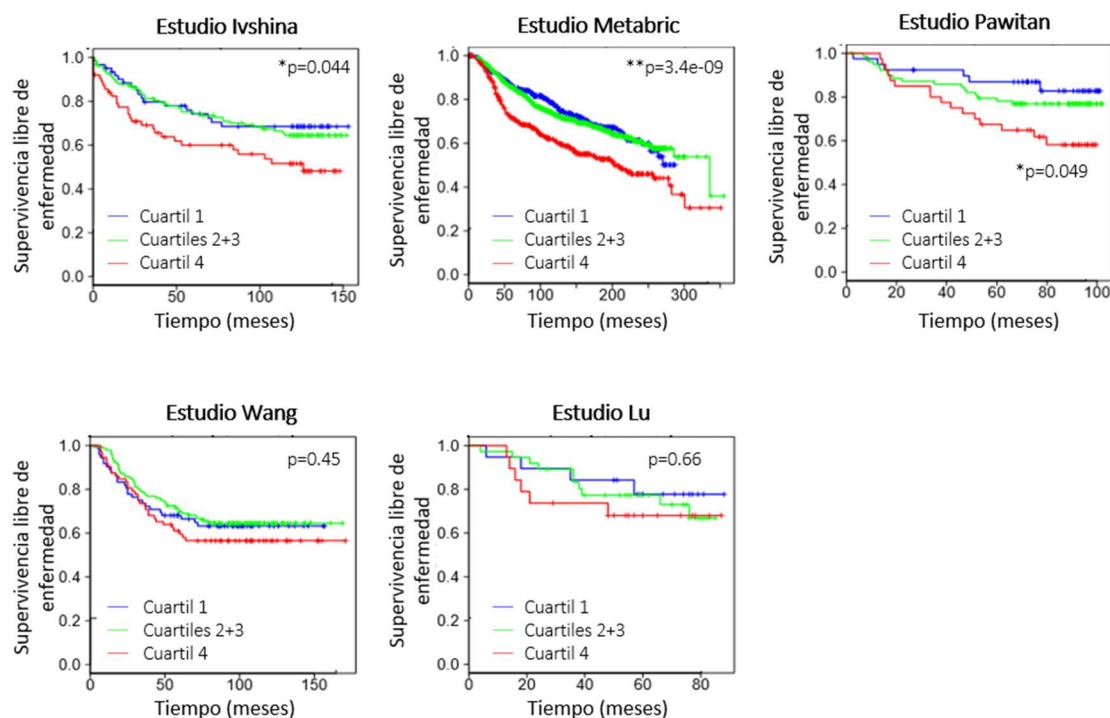


Figura 13. Niveles elevados del mRNA de TRIB3 se relacionan con un peor pronóstico de las pacientes de cáncer de mama. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de enfermedad de pacientes con cáncer de mama con respecto a la expresión de TRIB3 estratificada en cuartiles (cuartil 1 vs cuartil 2+3 vs cuartil 4). Para su obtención se empleó la plataforma Cancertool y se muestra el análisis de distintos estudios ($n(\text{Ivshina}) = 249$, $n(\text{Metabric}) = 1980$, $n(\text{Pawitan}) = 159$, $n(\text{Wang}) = 286$, $n(\text{Lu}) = 131$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; utilizando la prueba log-rank (Mantel-Cox)).

Aunque con cierta controversia, estos resultados parecen indicar que niveles elevados del mRNA de TRIB3 podrían asociarse a un peor pronóstico de las pacientes de cáncer de mama. Un resultado similar se reflejó en el trabajo de Wennemers *et al.* [264] tras estudiar los niveles de mRNA en muestras de pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, en una publicación posterior en la que analizaron los niveles proteicos de TRIB3 encontraron que, por el contrario, niveles elevados de la proteína TRIB3 se asociaban con un mejor pronóstico en estas mismas pacientes, indicando, finalmente, que no existía correlación entre los niveles de proteína y mRNA de TRIB3 en dichas muestras [265]. Con estos resultados aparentemente controvertidos y teniendo en cuenta que las proteínas son los mediadores activos en la mayoría de los procesos celulares [293], nos planteamos profundizar en el papel de TRIB3 en el pronóstico del cáncer de mama estudiándolo a nivel de proteína.

1.2. TRIB3 podría ser un biomarcador de buen pronóstico en cáncer de mama luminal

Como se ha desarrollado en la introducción, los tumores de mama de tipo luminal son, en términos generales, ER positivos [5, 6, 13]. Por ello, analizamos en primer lugar la expresión a nivel de proteína de TRIB3 en muestras de pacientes de cáncer de mama ER positivo. Para ello, utilizamos un *microarray* de tejidos (TMA) con tejido tumoral mamario de 291 pacientes proporcionado por el Hospital Universitario de Donostia y del Instituto Oncológico Onkologikoa. De cada una de estas pacientes, obtuvimos muestras de tejido tumoral y de algunas de ellas también obtuvimos muestras procedentes de ganglios afectados. Además, disponíamos de una información clínica detallada de las pacientes. Cabe destacar que las muestras se tomaron en la primera cirugía, previamente al tratamiento y que posteriormente un total de 24 pacientes fueron tratadas con hormonoterapia, 40 con hormonoterapia y radioterapia, 44 con hormonoterapia y quimioterapia y 86 con una

combinación de los tres tratamientos. Además, de dichas pacientes, 71 presentaron recurrencia y 64 metástasis.

La inmunohistoquímica de TRIB3 en estas muestras reveló una importante variabilidad en la tinción entre los distintos tumores, tanto a nivel de intensidad como de localización subcelular, observando su expresión tanto en citoplasma como en núcleo (**Fig. 14A**). Los niveles de TRIB3 fueron cuantificados atendiendo al porcentaje de células marcadas y a la intensidad del marcaje considerando cuatro niveles: 0 (negativo), 1 (leve), 2 (medio) y 3 (fuerte). A continuación, se calculó el valor H siguiendo la fórmula $H = \sum(i * \%i)$, en la que i corresponde a cada uno de los valores asignados (0-3) y $\%i$ al porcentaje de células marcadas para cada uno de ellos.

Con el objetivo de estudiar la relación entre los niveles de TRIB3 en el tumor (cuantificado mediante el valor H) y el pronóstico de las pacientes, analizamos tanto la supervivencia libre de enfermedad (tiempo transcurrido desde la cirugía hasta la recurrencia del tumor) como la supervivencia global (tiempo desde la cirugía hasta la muerte de la paciente). Para ello, atendiendo al valor H de la tinción de TRIB3 estratificamos las pacientes como “TRIB3 alto” y “TRIB3 bajo” separándolas por la mediana. Como se observa en las gráficas de Kaplan-Meier de la **figura 14**, las pacientes con elevados niveles de TRIB3 en el tumor presentaron una mayor supervivencia libre de enfermedad (**Fig. 14B**) aunque no observamos diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global (**Fig. 14C**). La discrepancia entre la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global podría deberse a que esta última se ve afectada por un mayor número de parámetros que desconocemos: probablemente, una vez que aparezca la recurrencia, las pacientes difieran en cuanto a la línea terapéutica seguida; y tampoco conocemos los niveles de TRIB3 en este tumor recurrente, con lo que no podemos inferir cómo afectará a su crecimiento y progresión. Así, la supervivencia libre de enfermedad nos da una idea más precisa de la relevancia de TRIB3 en el tumor inicial del que disponemos, en cuanto a la recurrencia, el tiempo hasta la misma y la respuesta al tratamiento inicial.

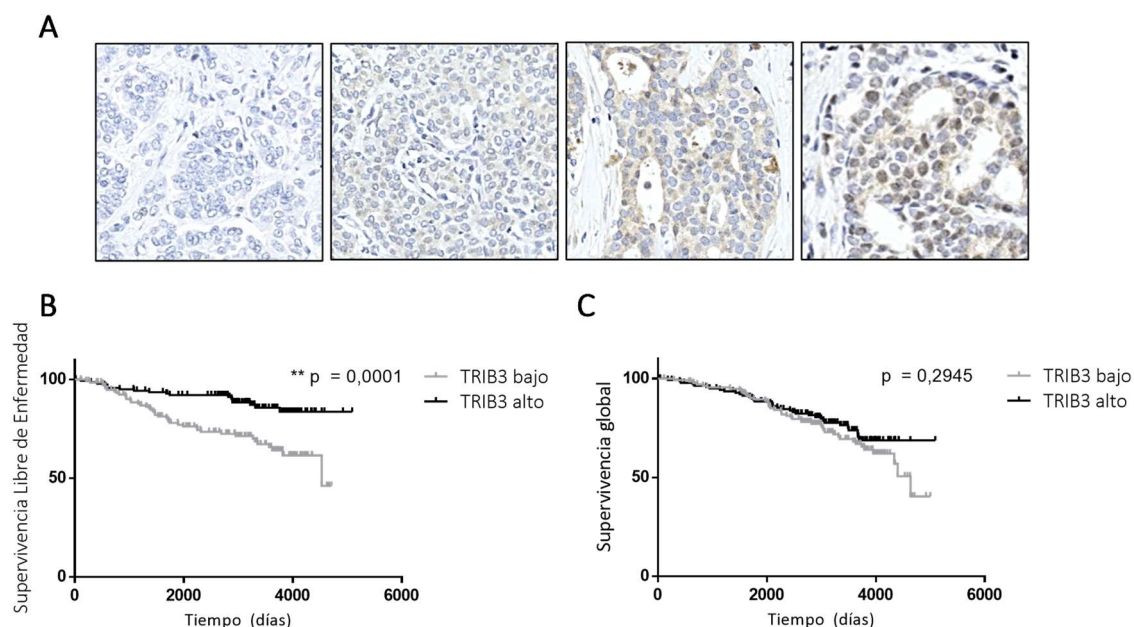


Figura 14. Niveles elevados de TRIB3 en el tumor de pacientes con cáncer de mama ER positivo se relaciona con buen pronóstico. (A) Imágenes representativas de tumores con distinta intensidad de marcaje y localización subcelular de TRIB3. (B, C) Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de enfermedad (B) y supervivencia global (C) de las pacientes con respecto a la expresión de TRIB3 en el tumor primario. Los tumores se estratificaron en altos niveles de TRIB3 (TRIB3 alto) y bajos niveles de TRIB3 (TRIB3 bajo) por la mediana ($n=291$; $**p<0.01$; utilizando la prueba log-rank (Mantel-Cox)).

RESULTADOS

A continuación, dado que el marcaje de TRIB3 se observaba tanto en el núcleo como en el citoplasma dependiendo del tumor analizado, estudiamos también la relación entre el marcaje de TRIB3 en estas localizaciones (calculando el valor H para cada una de ellas) con el buen pronóstico de las pacientes, concluyendo que tanto TRIB3 citoplasmático (**Fig. 15A**) como nuclear (**Fig. 15B**) se relacionan con una mayor supervivencia libre de enfermedad. En conjunto, estos datos sugieren que la expresión de TRIB3 a nivel de proteína se asocia con un mejor pronóstico de las pacientes con cáncer de mama ER positivo.

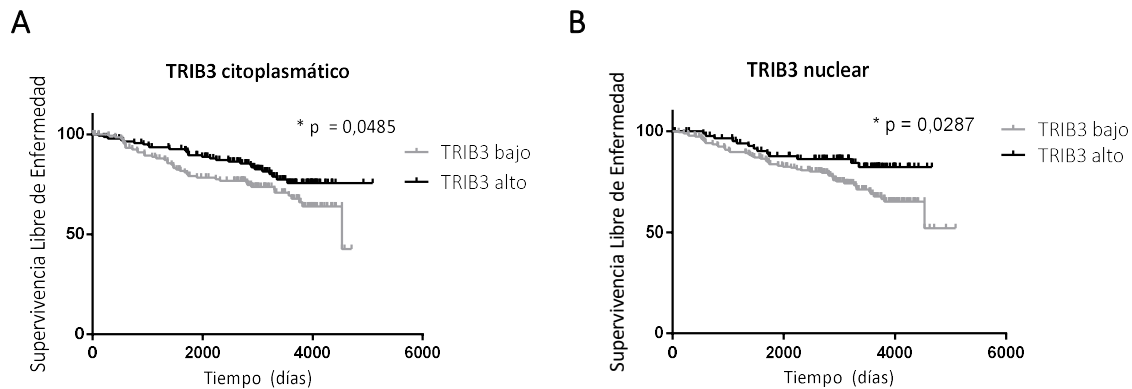


Figura 15. Niveles elevados de TRIB3 tanto en el citoplasma como en el núcleo del tumor de pacientes con cáncer de mama ER positivo se relaciona con buen pronóstico. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de enfermedad con respecto a la expresión de TRIB3 en el citoplasma (A) o en el núcleo (B) de las células del tumor primario. Los tumores se estratificaron en altos niveles de TRIB3 (TRIB3 alto) y bajos niveles de TRIB3 (TRIB3 bajo) por la mediana (n=291 *p<0.05; utilizando la prueba log-rank (Mantel-Cox)).

Por último, estudiamos la relación entre los niveles de TRIB3 en las áreas tumorales de los ganglios y los parámetros anteriormente mencionados. Del mismo modo que para las muestras de tumores primarios, calculamos el valor H y estudiamos la relación con la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad. Sin embargo, en este caso, no observamos ninguna relación entre los niveles de TRIB3 en los ganglios afectados con la supervivencia libre de enfermedad ni la supervivencia global de las pacientes (**Fig. 16**), lo que sugiere que la presencia de TRIB3 en las afecciones ganglionares tendría, en principio, menor relevancia clínica. El hecho de no ver una asociación entre los niveles de TRIB3 en las afecciones ganglionares con la supervivencia de las pacientes, podría deberse, en parte, al sesgo por estar cuantificando únicamente aquellas muestras que ya tenían tumores ganglionares en el momento de la cirugía y que por tanto tienen un peor pronóstico *per se*. De hecho, de los 58 pacientes cuyo ganglio no analizamos al no estar afectado, 57 no presentaron recurrencia de la enfermedad.

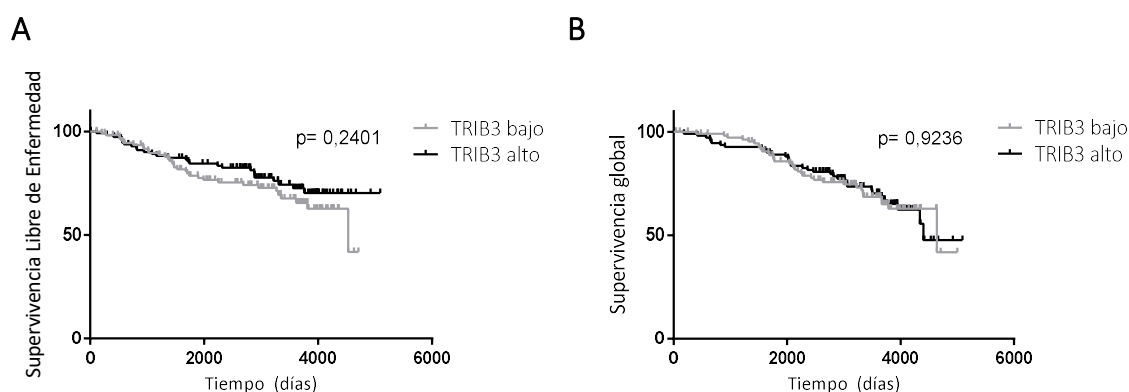


Figura 16. Relación entre el marcaje de TRIB3 en los ganglios afectados con el pronóstico de las pacientes. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de enfermedad (A) y supervivencia global (B) de las pacientes con respecto a la expresión de TRIB3 en el área tumoral del ganglio. Los tumores se estratificaron en altos niveles de TRIB3 (TRIB3 alto) y bajos niveles de TRIB3 (TRIB3 bajo) por la mediana (n=225. p calculada utilizando la prueba log-rank (Mantel-Cox)).

1.3. Los niveles de TRIB3 y HER2 correlacionan positivamente en cáncer de mama

Como se ha comentado previamente en la introducción, los tumores mamarios se clasifican principalmente atendiendo a tres marcadores concretos: los receptores hormonales (de estrógenos y progesterona, siendo el ER de mayor relevancia clínica) y el oncogén HER2. Las muestras de pacientes que se han analizado durante la presente tesis son todas provenientes de tumores ER positivos, pero a su vez, dichas muestras se pueden subclasificar en HER2 negativas y HER2 positivas. Teniendo en cuenta, por un lado, la relevancia clínica de este marcador en la clasificación, diagnóstico, tratamiento y pronóstico de las pacientes y, en definitiva, en la etiología de la enfermedad; y por otro lado, la variabilidad observada en el marcaje de TRIB3 en los tumores, nos planteamos si existía alguna diferencia en la expresión de TRIB3 en función de estos dos subtipos HER2 positivo y HER2 negativo.

Tal y como se recoge en la **tabla 13**, los tumores presentes en el TMA habían sido previamente clasificados según la sobreexpresión de HER2 analizada por IHQ y cuantificada del 0 al 3. Consideramos los tumores con un marcaje de 0-1 como HER2 negativos y aquellos con una intensidad de 2-3 como HER2 positivos [294]. Cuando analizamos la relación entre los niveles de TRIB3 y HER2, encontramos que los tumores HER2 positivos presentan una mayor expresión proteica de TRIB3 que los tumores HER2 negativos (**Fig. 17A**). Esta correlación a nivel de proteína en las muestras de pacientes se confirmó mediante análisis de correlación, de nuevo empleando bases de datos de RNA de pacientes (**Fig. 17B**) y de líneas celulares (**Fig. 17C**) de cáncer de mama obtenidos mediante secuenciación del transcriptoma. Finalmente, analizamos los niveles de TRIB3 y HER2 en extractos proteicos de distintas líneas celulares HER2 positivas y HER2 negativas cedidos por la Dra. Sonia Castillo-Lluva. En primer lugar, empleamos un panel de células de cáncer de mama con representación de todos los subtipos (**Fig. 17D, imagen izquierda**) y en segundo lugar, un panel exclusivamente de células de cáncer de mama luminal (**Fig. 17D, imagen derecha**), todas ellas HER2 positivas o HER2 negativas. En los dos casos, corroboramos por Western blot que las células HER2 positivas presentaban niveles proteicos de TRIB3 más elevados.

Tabla 13. Número de muestras en función de la cuantificación de la tinción de HER2 por IHQ

HER2 IHQ	n
HER2 = 0	65
HER2 = 1	66
HER2 = 2	11
HER2 = 3	17

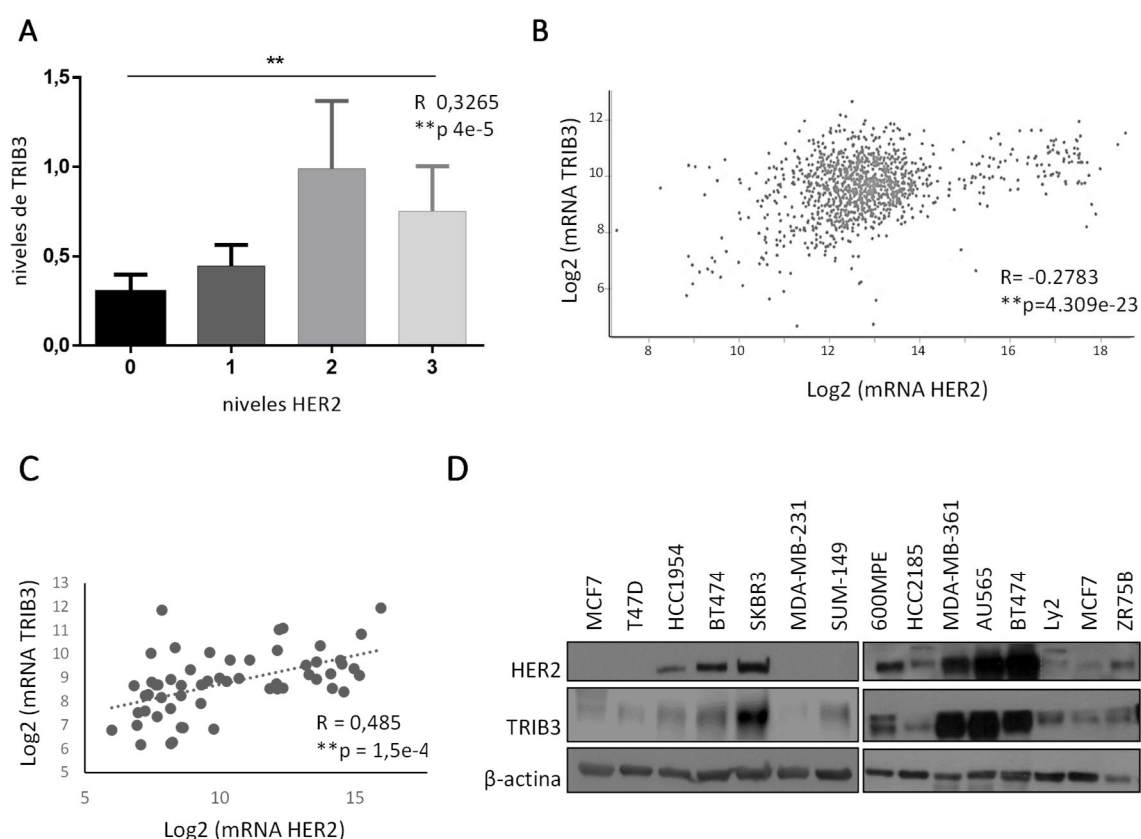


Figura 17. Correlación entre los niveles de TRIB3 y HER2. (A) Niveles de proteína de TRIB3 cuantificados mediante el valor H respecto a los niveles de HER2 (cuantificados del 0 al 3) en muestras de pacientes ER positivo del TMA (n=159; p y R calculados utilizando el coeficiente de correlación de Spearman). (B) Análisis bioinformático de la correlación entre los niveles de RNA de TRIB3 y HER2 expresados en su forma logarítmica en base 2 procedentes de experimentos de secuenciación del transcriptoma y analizados empleando la plataforma UCSC Xena (B; n=1247; p y R calculados utilizando el coeficiente de correlación de Spearman). (C) Análisis bioinformático de la correlación entre los niveles de RNA de TRIB3 y HER2 de líneas celulares expresados en su forma logarítmica en base 2 (n=56; **p<0.01; p y R calculados utilizando el coeficiente de correlación de Spearman). (D) Imagen representativa de los niveles de proteína de TRIB3 y HER2 en un panel de líneas celulares de distintos subtipos de cáncer de mama (imagen izquierda) y de líneas de cáncer de mama luminal (imagen derecha).

2.1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PSEUDOQUINASA TRIB3 EN LA PROLIFERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA LUMINAL Y ANÁLISIS DEL MECANISMO MOLECULAR SUBYACENTE

Dentro de los tumores luminales ER positivos, la expresión del receptor HER2 resulta relevante no solo en cuanto a la clínica de las pacientes con cáncer de mama sino también en cuanto a la biología del tumor. Teniendo en cuenta que estos tumores, en función del estatus del receptor HER2, se desarrollan y responden a la terapia de manera diferente, y que los niveles de TRIB3 son muy distintos en estos dos subtipos tumorales, decidimos investigar el papel de TRIB3 en estos dos contextos moleculares por separado, utilizando como modelo líneas celulares de cáncer de mama derivadas de tumores luminales HER2 positivos y HER2 negativos.

2.1.1. El silenciamiento de TRIB3 supone un incremento en la proliferación celular de líneas de cáncer de mama luminal HER2 positivas.

Para estudiar la función de TRIB3 en líneas celulares, seleccionamos tres líneas de cáncer de mama luminales HER2 positivas en las que habíamos analizado previamente los niveles de HER2 y TRIB3: MDA-MB-361, AU565 y BT474 (**Fig.17D**). En primer lugar, dado que en las muestras de pacientes estudiadas en el apartado anterior habíamos observado que TRIB3 podía localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma celular, analizamos la distribución subcelular de esta proteína en las líneas seleccionadas. Los resultados obtenidos mostraron que TRIB3 se encuentra en ambas localizaciones en las líneas celulares estudiadas, aunque con predominio de la forma nuclear (**Fig. 18**).

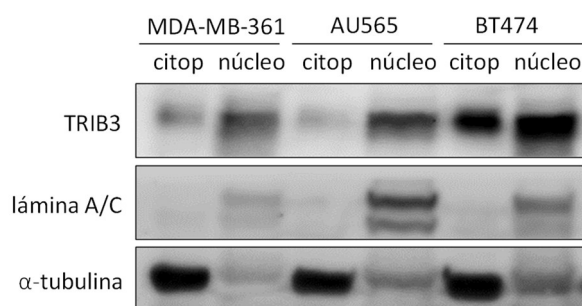


Figura 18. TRIB3 se encuentra en núcleo y citoplasma en líneas celulares de cáncer de mama luminal HER2+. Imagen representativa del fraccionamiento subcelular de citoplasma (citop) y núcleo en las líneas celulares MDA-MB-361, AU565 y BT474 (n = 3).

A continuación, silenciamos de manera estable TRIB3 utilizando partículas lentivirales con shRNAs específicos (**Fig. 19A**) y estudiamos el efecto de este silenciamiento en la proliferación celular mediante inmunocitofluorescencia del marcador de proliferación MKI67. Como se muestra en la **figura 19B**, las células en las que TRIB3 ha sido silenciado (shTRIB3) proliferan más que las células control (shC), sugiriendo un papel de esta pseudoquinasa en este proceso. Además, en línea con estos datos, resultados previos del laboratorio habían demostrado que xenotransplantes de células BT474 shTRIB3 en ratones inmunodeficientes, generaban tumores más rápido y de mayor tamaño que las células control [192].

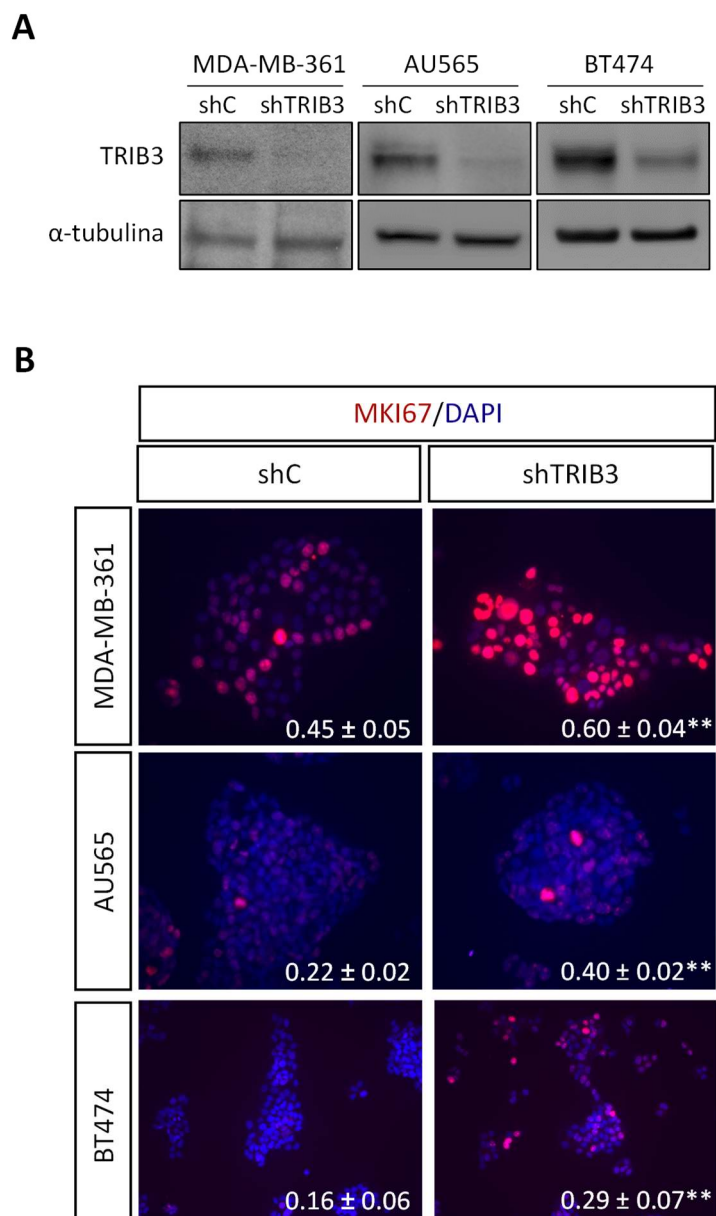


Figura 19. La inhibición genética de TRIB3 aumenta la proliferación de células de cáncer de mama Her2+. (A) Efecto de la expresión mediante la utilización de partículas lentivirales de un shRNA control (shC) o de una mezcla de shRNAs contra TRIB3 (shTRIB3) en la expresión de TRIB3 (determinada mediante Western blot (WB)) en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-361, AU565 y BT474. Se muestra una imagen representativa (n = 5). (B) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en líneas celulares HER2+ en la proliferación celular determinada mediante marcaje con MKI67. Se muestran imágenes representativas de la tinción por inmunocitofluorescencia del marcador de proliferación MKI67 (rojo) y del marcador de núcleos DAPI (azul). El valor en la esquina inferior derecha de las imágenes corresponde a la cuantificación del número de células positivas para MKI67 (MKI67+) expresada como la fracción media $\pm$ SEM del número de células MKI67+ con respecto a las células totales. Las cuantificaciones se realizaron contando 10 campos por condición experimental (n=4-5; **p<0.01 con respecto a las células shC; utilizando la prueba T).

2.1.2. El silenciamiento de TRIB3 induce un aumento en los niveles de HER2 en líneas de cáncer de mama luminal HER2 positivas.

Al tratarse de tumores HER2 positivos, en los cuales la sobreexpresión del oncogén está íntimamente relacionada con la proliferación celular y con la progresión tumoral, y teniendo en cuenta que previamente habíamos observado una correlación entre los niveles de TRIB3 y HER2 en

las muestras de pacientes, evaluamos si la mayor proliferación de las células HER2 positivas shTRIB3 podía estar relacionada con una regulación de dicho receptor.

Como se observa en la **figura 20A y 20B**, el silenciamiento de TRIB3 supone un incremento en los niveles totales del receptor HER2. Además, analizamos si esta regulación de HER2 por parte de TRIB3 podría ser causante del incremento en la proliferación observado en las células shTRIB3. Para ello, seleccionamos la línea celular BT474 y cuantificamos mediante tinción con cristal violeta el número de células shC y shTRIB3 (lo que nos permite estimar la existencia de cambios en la proliferación celular) tras el tratamiento con Lapatinib, un inhibidor de la actividad tirosina-quinasa del receptor HER2. En línea con las observaciones descritas en el apartado anterior, el silenciamiento de TRIB3 produjo un aumento en el número de células 72 horas después de su siembra en comparación con las células shC (**Fig. 20C**), un efecto que quedó anulado cuando las células se trataron con Lapatinib (**Fig. 20C**). Estas observaciones sugieren que TRIB3 regula la proliferación celular a través de la modulación de los niveles de HER2.

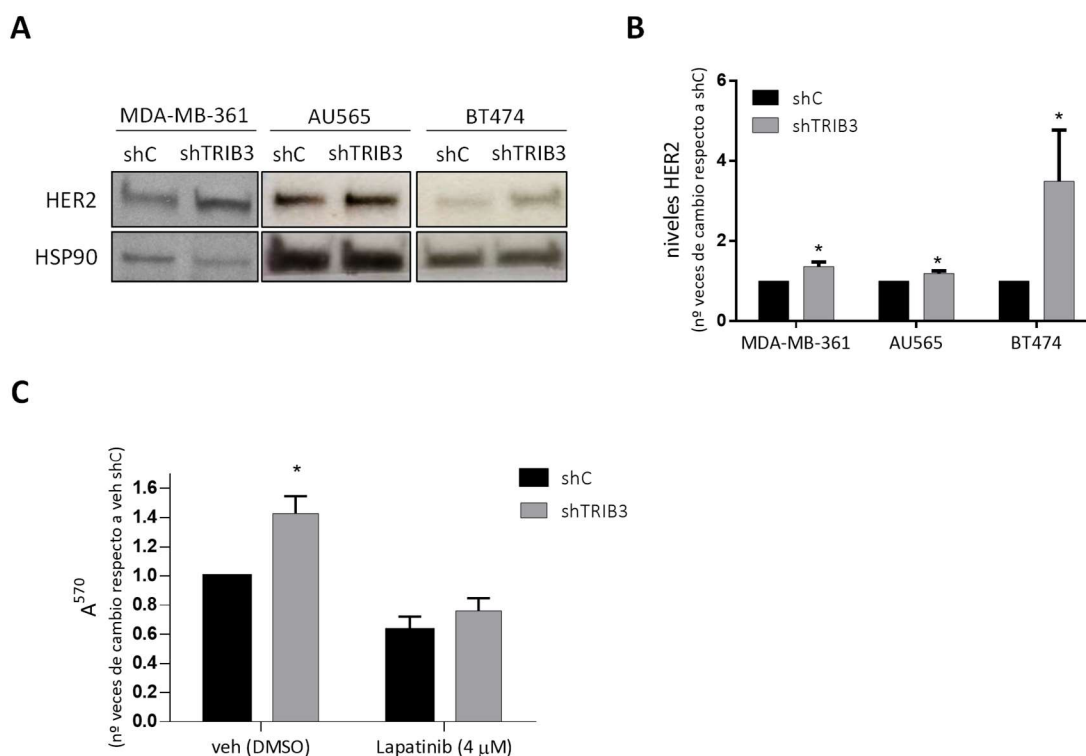


Figura 20. El silenciamiento de TRIB3 en líneas celulares HER2 positivas (HER2+) supone un incremento en los niveles de HER2. (A) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en los niveles de HER2 (analizados mediante WB) en células MDA-MB-361, AU565 y BT474. Se muestra una imagen representativa ($n=7$). (B) Cuantificación mediante densitometrado de los niveles de HER2. Los datos corresponden a la densidad óptica en unidades arbitrarias para cada condición experimental normalizados con respecto al control de carga (HSP90) y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM de la condición shTRIB3 respecto a shC para cada caso ($n=7$; $*p<0.05$ con respecto a las células shC; utilizando la prueba de Wilcoxon). (C) Efecto del tratamiento con Lapatinib (48h, 4 μ M) o con vehículo (veh, DMSO) en el número de células BT474 shC y shTRIB3 (estimado mediante la técnica de cristal violeta). Los datos corresponden a la absorbancia a 570 nm y se expresan como el número de veces de cambio $\pm$ SEM con respecto a las células shC tratadas con vehículo ($n=5$; $*p<0.05$ con respecto a las células shC; utilizando la prueba ANOVA de dos vías).

2.1.3. El silenciamiento de TRIB3 produce un incremento en la fosforilación de AKT pero no de ERK en líneas de cáncer de mama luminal HER2 positivas.

Trabajos realizados por varios grupos de investigación incluyendo el nuestro han demostrado que TRIB3 regula las vías de señalización de AKT y de ERK, vías directamente implicadas en la supervivencia y proliferación celular [171, 188, 192, 218, 219]. Del mismo modo, el receptor HER2 también puede acoplarse a la estimulación de estas dos rutas de señalización [60, 65]. Por ello, nos planteamos estudiar si el silenciamiento de TRIB3 podía afectar a la activación de las vías de AKT y ERK en células de cáncer de mama HER2 positivas y si esta activación puede contribuir a explicar el fenotipo observado.

En línea con esta idea, encontramos que el silenciamiento de TRIB3 produjo un incremento en la fosforilación de AKT en la serina 473 en las células BT474 y AU565, aunque no en las células MDA-MB-361 (**Fig. 21A, 21B**). Para evaluar si este incremento en la fosforilación de AKT podría también ser responsable de la mayor proliferación de las células shTRIB3, empleamos la tinción con cristal violeta y tratamos las células BT474 con el inhibidor de AKT (*AKT inhibitor X*), comprobando que dicho tratamiento revertía el aumento en la proliferación celular en las células BT474 en las que TRIB3 había sido silenciado (**Fig. 21C**).

Por el contrario, al analizar el efecto del silenciamiento de TRIB3 en la vía de ERK, aunque existe una gran variabilidad en los resultados, no observamos diferencias en la fosforilación de ERK1/2 entre las células control y las células en las que TRIB3 había sido inhibido genéticamente (**Fig. 21D**). En línea con estos resultados, al tratar con el inhibidor de la vía de ERK UO126 tampoco revertimos las diferencias en el número de células en la condición shTRIB3 con respecto a shC (**Fig. 21E**).

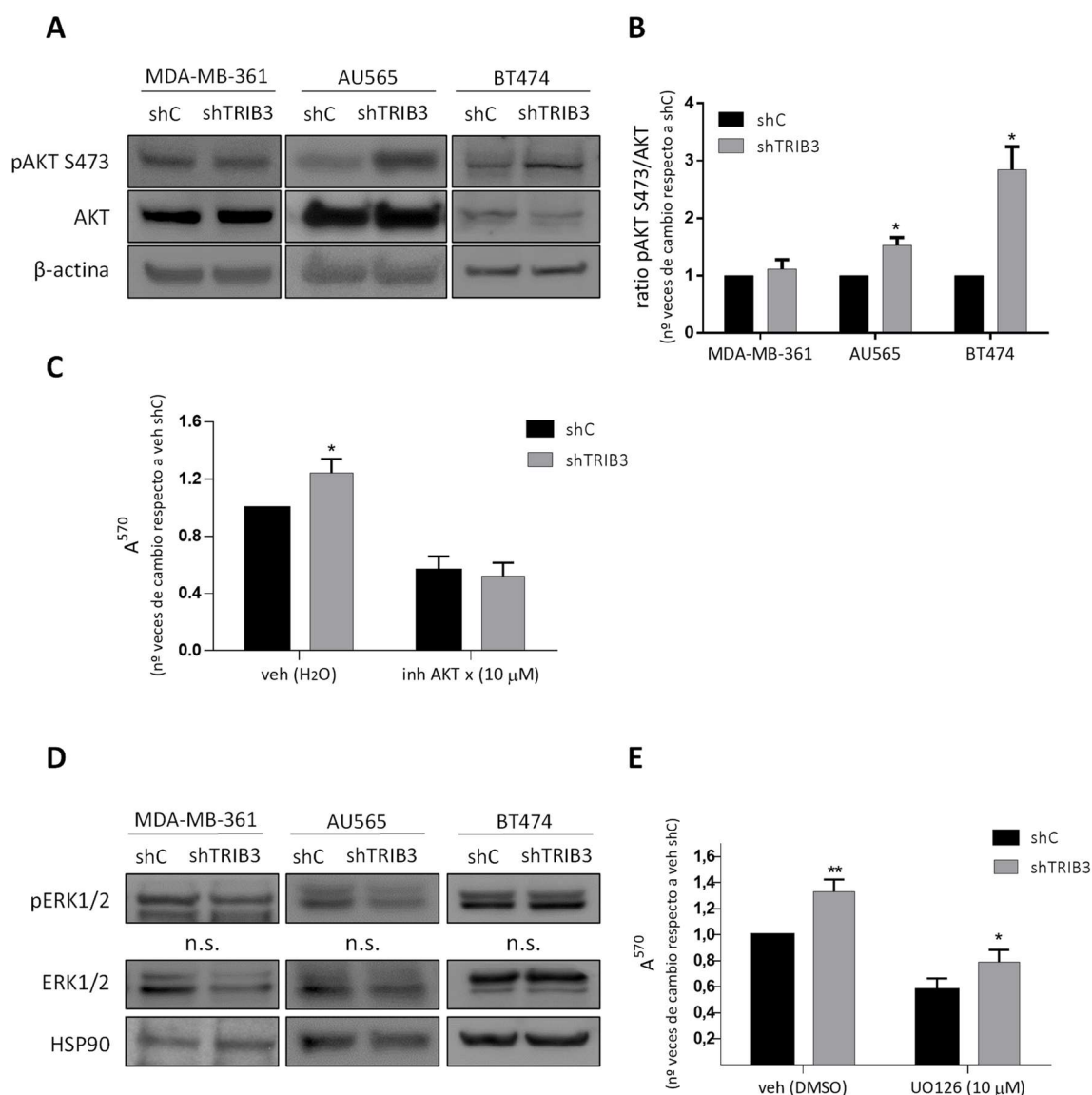


Figura 21. El silenciamiento de TRIB3 en líneas celulares HER2 positivas supone un incremento en la fosforilación de AKT pero no de ERK. (A) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en la fosforilación de AKT en la serina 473 (analizada mediante WB) en células MDA-MB-361, AU565 y BT474. Se muestra una imagen representativa ($n=6-12$). **(B)** Cuantificación mediante densitometrado de los niveles de AKT fosforilada en S473 (pAKT S473). Los datos corresponden a la densidad óptica en unidades arbitrarias para cada condición experimental normalizados con respecto a AKT total y al control de carga (β -actina) y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM de la condición shTRIB3 respecto a shC para cada caso ($n=6-12$; $*p<0.05$ con respecto a la condición shC; utilizando la prueba de Wilcoxon). **(C)** Efecto del tratamiento con inhibidor de AKT X (10 μ M, 48h) o con el vehículo de dicho tratamiento (veh, H₂O) en el número de células BT474 shC y shTRIB3 (estimada mediante tinción con cristal violeta). Los datos corresponden a la absorbancia a 570 nm y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM con respecto a las células shC tratadas con vehículo ($n=6$; $*p<0.05$ con respecto a las células shC; utilizando la prueba ANOVA de dos vías). **(D)** Efecto del silenciamiento de TRIB3 en la fosforilación de ERK1/2 (analizada mediante WB) en células MDA-MB-361, AU565 y BT474. Se muestra una imagen representativa ($n=7$). n.s. indica diferencias no significativas en la cuantificación mediante densitometrado de los niveles de ERK1/2 fosforilada en Thr202 y Tyr204 respectivamente (pERK1/2) normalizados respecto a ERK1/2 total y al control de carga (HSP90) de la condición shTRIB3 respecto a shC ($n=7$; utilizando la prueba de Wilcoxon). **(E)** Efecto del tratamiento con el inhibidor de MEK1/2 UO126 (10 μ M, 48 h) o con el vehículo de dicho tratamiento (veh, DMSO) en el número de células BT474 shC y shTRIB3 (estimada mediante tinción con cristal violeta). Los datos corresponden a la absorbancia a 570 nm y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM con respecto a las células shC tratadas con vehículo ($n=4$; $*p<0.05$, $**p<0.01$; utilizando la prueba ANOVA de dos vías).

RESULTADOS

Tomados de manera conjunta, estos resultados indican que TRIB3 regula la proliferación de las células de cáncer de mama luminal HER2 positivo mediante la modulación de los niveles de HER2 y de la vía de PI3K/AKT pero no de la vía de ERK.

2.1.4. El silenciamiento de TRIB3 supone una menor proliferación celular que se asocia a una menor fosforilación de AKT en las líneas de cáncer de mama luminal HER2 negativas.

Una vez estudiado el fenotipo resultante del silenciamiento de TRIB3 en las líneas celulares de mama HER2 positivas, procedimos a estudiar el papel de dicha pseudoquinasa en las líneas celulares de cáncer de mama luminal HER2 negativas. Para ello, seleccionamos tres líneas celulares con estas características y en las que previamente habíamos comprobado los niveles de TRIB3 y HER2: MCF7, T47D y ZR75B (**Fig. 17D**). De nuevo, analizamos en primer lugar la localización subcelular de TRIB3 y observamos que, también en este contexto tumoral, TRIB3 se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo aunque predomina la localización nuclear de la proteína (**Fig. 22**).

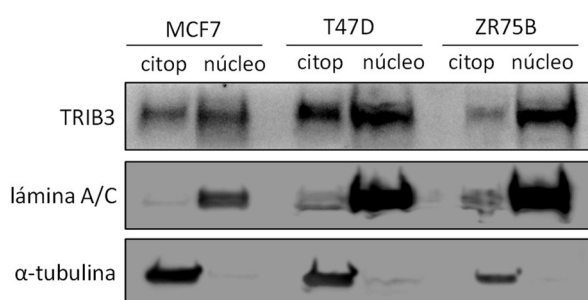


Figura 22. TRIB3 se encuentra en núcleo y citoplasma en líneas celulares de cáncer de mama luminal HER2 negativas (HER2-). Imagen representativa del fraccionamiento subcelular de citoplasma (citop) y núcleo en las líneas celulares MCF7, T47D y ZR75B (n = 3).

Seguidamente, silenciamos TRIB3 en estas líneas celulares siguiendo el mismo procedimiento que utilizamos en las células HER2 positivas (**Fig. 23A**) y analizamos la proliferación celular y el papel de las vías de AKT y ERK.

Sorprendentemente, el silenciamiento de TRIB3 en las células HER2 negativas seleccionadas produjo un fenotipo opuesto al descrito en el apartado anterior. Así, el silenciamiento de TRIB3 se tradujo en una disminución de la proliferación celular en las tres líneas celulares analizadas (**Fig. 23B**).

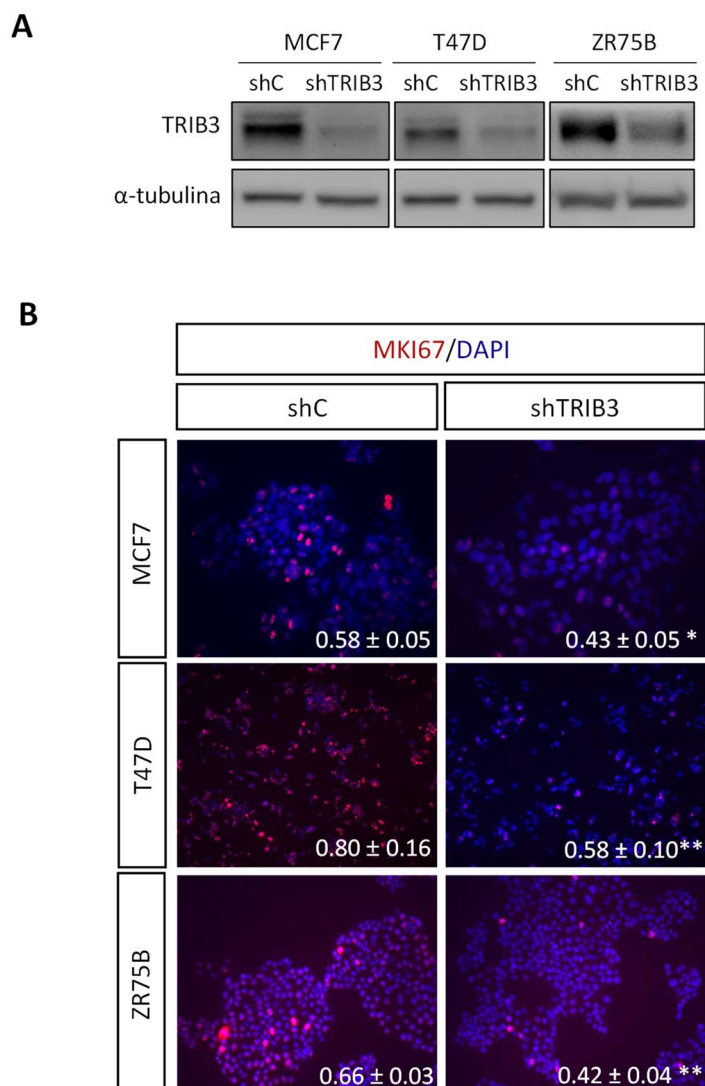


Figura 23. La inhibición genética de TRIB3 aumenta la proliferación de células de cáncer de mama Her2-. (A) Efecto del silenciamiento de TRIB3 utilizando partículas lentivirales en la expresión de TRIB3 (determinada mediante WB) en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, T47D y ZR75B. Se muestra una imagen representativa (n=5). (B) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en líneas celulares HER2- en la proliferación celular determinada mediante marcaje con MKI67. Se muestran imágenes representativas de la tinción por inmunocitofluorescencia del marcador de proliferación MKI67 (rojo) y del marcador de núcleos DAPI (azul). El valor en la esquina inferior derecha de las imágenes corresponde a la cuantificación del número de células MKI67+ expresada como la fracción media $\pm$ SEM del número de células MKI67+ con respecto a las células totales. Las cuantificaciones se realizaron contando 10 campos por condición experimental (n=4-5; *p<0.05 o **p<0.01 con respecto a las células shC; utilizando la prueba T).

A continuación, estudiamos también en este contexto si los cambios observados en la proliferación podrían asociarse a una distinta activación de las vías de AKT y ERK1/2 analizando los niveles de fosforilación de estas proteínas. Como se observa en la **figura 24A y 24B**, el silenciamiento de TRIB3 en MCF7 y T47D se asocia a una menor fosforilación de AKT mientras que no afecta a la fosforilación de ERK1/2 (**Fig. 24D, 24E**). En este caso, para estudiar si la menor proliferación observada se debía a la menor fosforilación de AKT de las células shTRIB3, transfectamos las células MCF7 con myr-AKT, una forma miristoilada de AKT que se encuentra permanentemente asociada a la membrana, lo cual provoca su fosforilación y activación de manera constitutiva [295]. Empleando la tinción con cristal violeta, comprobamos que la transfección con myr-AKT revierte las diferencias en el número de células viables entre las condiciones shTRIB3 y shC (**Fig. 24C**), lo cual confirma que la vía de AKT está implicada en la modulación de la proliferación por TRIB3. Por otro lado, cabe

RESULTADOS

destacar que en la línea celular ZR75B, el silenciamiento de TRIB3, que se asociaba a una menor proliferación, produce también una menor fosforilación de ERK1/2 pero no de AKT (**Fig. 24**), sugiriendo que, como habían descrito otros autores previamente, TRIB3 también podría regular la vía de ERK. Sin embargo, consideramos que tomados de manera conjunta nuestros resultados apoyan la idea de que el efecto regulatorio de TRIB3 en las células de cáncer de mama luminal ocurriría de manera predominante a través de la vía de AKT.

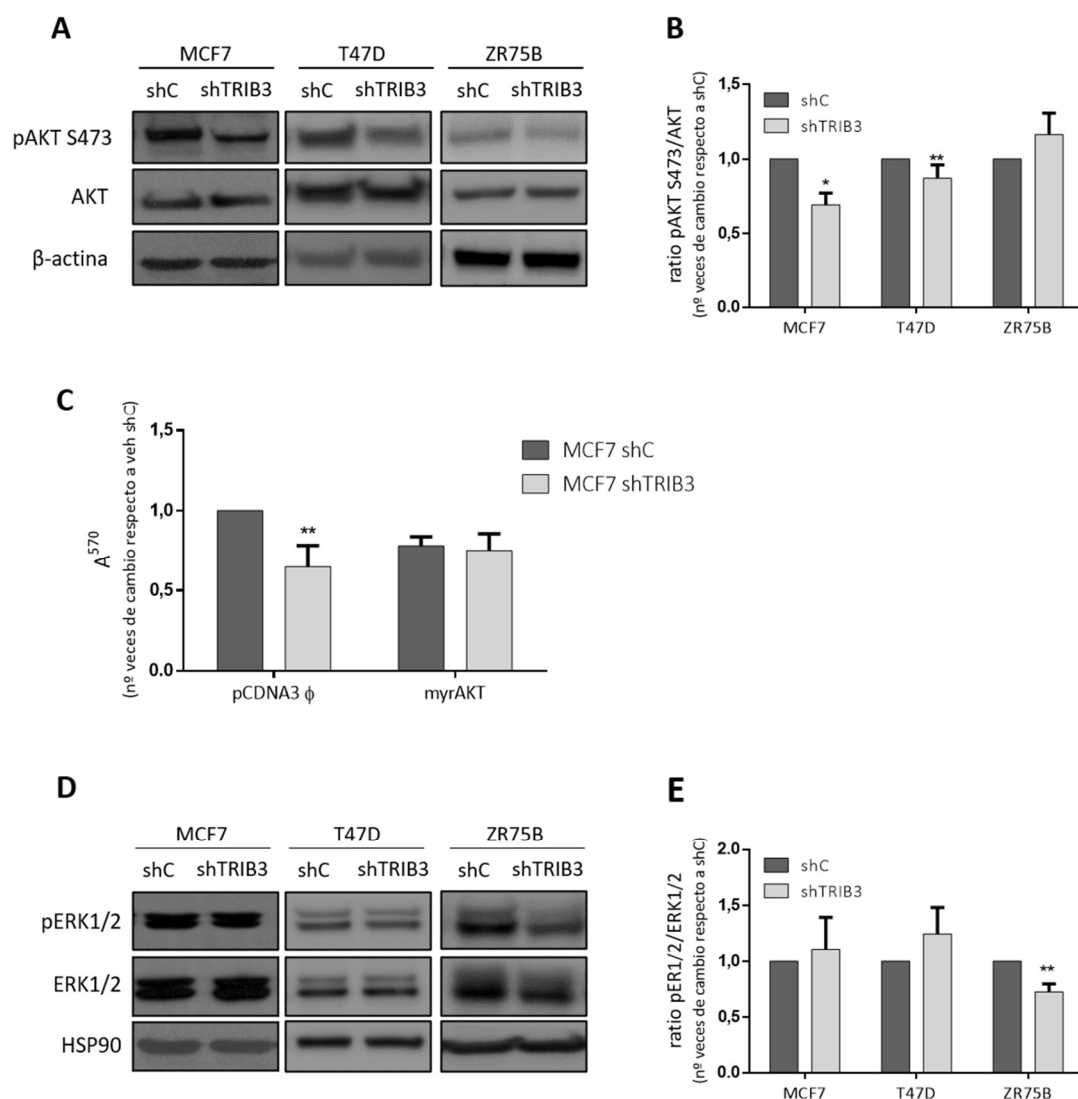


Figura 24. El silenciamiento de TRIB3 en líneas celulares HER2- supone un descenso en la fosforilación de AKT. (A) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en la fosforilación de AKT en S473 (analizada mediante WB) en células MCF7, T47D y ZR75B. Se muestra una imagen representativa (n=6-12). (B) Cuantificación mediante densitometrado de los niveles de AKT fosforilada en S473 (pAKT S473). Los datos corresponden a la densidad óptica en unidades arbitrarias para cada condición experimental normalizados con respecto a AKT total y al control de carga (β-actina) y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM de la condición shTRIB3 con respecto a shC para cada caso (n=6-12; *p<0.05, **p<0.01 con respecto a la condición shC; utilizando la prueba de Wilcoxon). (C) Efecto de la sobreexpresión de myr-AKT en el número de células BT474 shC y shTRIB3 (estimada mediante tinción con cristal violeta). Los datos corresponden a la absorbancia a 570 nm y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM con respecto a las células BT474 shC transfectadas con el plásmido control (Φ) (n=6; **p<0.01 con respecto a las células shC + Φ; utilizando la prueba ANOVA de dos vías). (D) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en la fosforilación de ERK1/2 en Thr202 y Tyr204 respectivamente (analizada mediante WB) en células MCF7, T47D y ZR75B. Se muestra una imagen representativa (n=5-10). (E) Cuantificación mediante densitometrado de los niveles de ERK1/2 fosforilada (pERK1/2). Los datos corresponden a la densidad óptica en unidades arbitrarias para cada condición experimental normalizados con respecto a ERK total y al control de carga (HSP90) y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM de la condición shTRIB3 con respecto a shC para cada caso (n=5-10; **p<0.01 con respecto a shC; utilizando la prueba de Wilcoxon).

2.1.5. La sobreexpresión de TRIB3 disminuye la proliferación celular y la fosforilación de AKT en líneas de cáncer de mama luminal HER2 positivas, pero aumenta la proliferación celular y la fosforilación de AKT en líneas de cáncer de mama luminal HER2 negativas.

Una vez caracterizado el fenotipo derivado del silenciamiento de TRIB3, procedimos a evaluar el efecto de la sobreexpresión transitoria de TRIB3 tanto en las líneas HER2 positivas como HER2 negativas (**Fig. 25A**). En primer lugar, estudiamos el efecto de la sobreexpresión de TRIB3 en la proliferación celular en células BT474 (HER2 positivas) y MCF7 (HER2 negativas) y comprobamos que la sobreexpresión de esta pseudoquinasa se tradujo respectivamente en una disminución (BT474) y un aumento (MCF7) en la proliferación celular (**Fig. 25B**), efecto opuesto al observado al silenciar TRIB3 en dichas líneas.

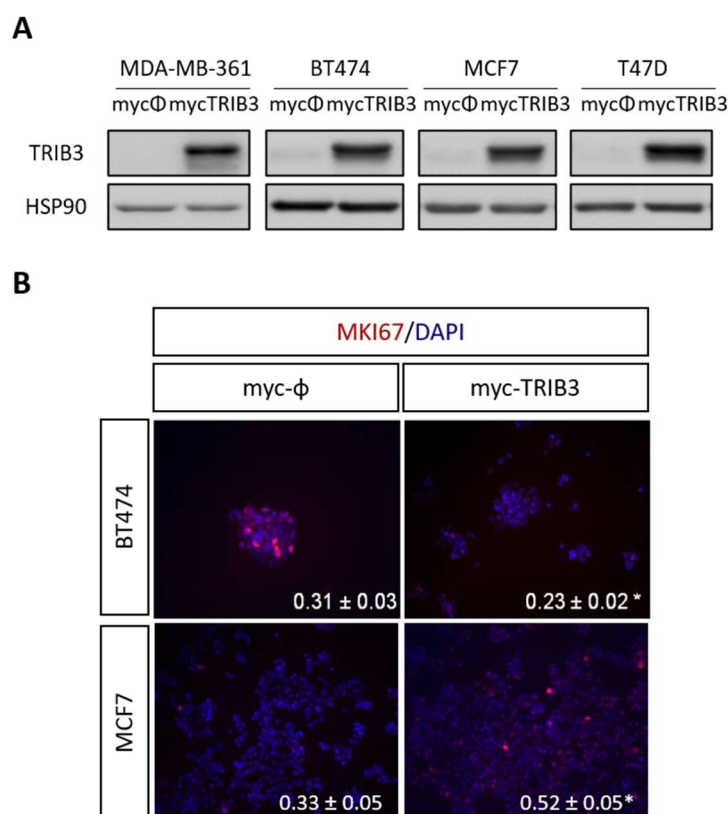


Figura 25. La sobreexpresión de TRIB3 modula de forma opuesta la proliferación en células HER2+ y HER2-. (A) Efecto de la transfección con el plásmido pGlo-myc-TRIB3 (mycTRIB3) y el plásmido pGlo-myc como control (mycΦ) en la expresión de TRIB3 en líneas celulares de cáncer de mama luminal. Se muestra una imagen representativa (n=10). (B) Efecto de la sobreexpresión de TRIB3 en la proliferación celular determinada mediante marcaje con MKI67. Se muestran imágenes representativas de la tinción por inmunocitofluorescencia del marcador de proliferación MKI67 (rojo) y del marcador de núcleos DAPI (azul). El valor en la esquina inferior derecha de las imágenes corresponde a la cuantificación del número de células MKI67+ expresada como la fracción media ± SEM del número de células MKI67+ con respecto a las células totales. Las cuantificaciones se realizaron contando 10 campos por condición experimental (n=4-5; *p<0.05 con respecto a las células mycΦ; utilizando la prueba T).

Además, analizamos el efecto de la sobreexpresión de TRIB3 en la fosforilación de AKT y ERK y observamos que en las células HER2 positivas la sobreexpresión de TRIB3 se relacionaba con una menor fosforilación de AKT, mientras que en las HER2 negativas ocurría lo contrario (**Fig. 26A, 26B**). Por último, no observamos cambios en la fosforilación de ERK1/2 en ningún caso (**Fig. 26C**).

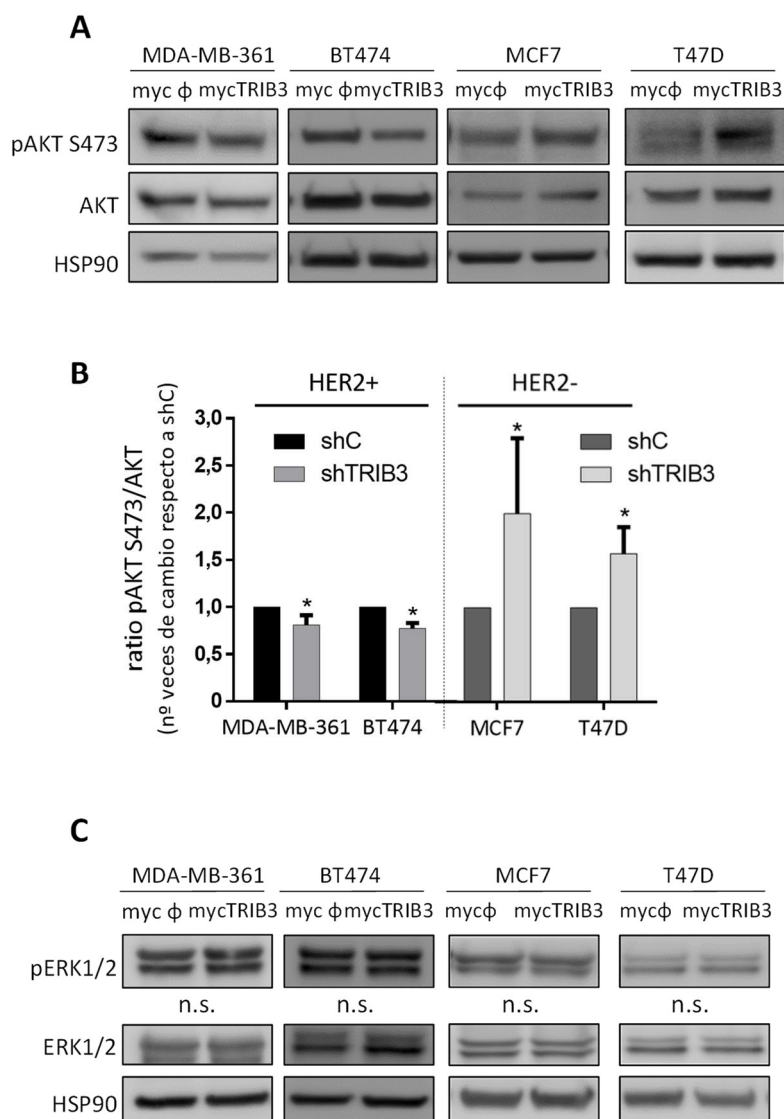


Figura 26. La sobreexpresión de TRIB3 tiene un efecto diferencial sobre la regulación de la vía de AKT y ERK en células HER2+ y HER2-. (A) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en la fosforilación de AKT en la serina 473 (analizada mediante WB). Se muestra una imagen representativa (n=5-8). (B) Cuantificación mediante densitometrado de los niveles de AKT fosforilada en S473 (pAKT S473). Los datos corresponden a la densidad óptica en unidades arbitrarias para cada condición experimental normalizados con respecto a AKT total y al control de carga (HSP90) y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM de la condición mycTRIB3 con respecto a myc Φ para cada caso (n=5-8; *p<0.05 con respecto a la condición myc Φ ; utilizando la prueba de Wilcoxon). (C) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en la fosforilación de ERK1/2 en Thr202 y Tyr204 respectivamente (pERK1/2) (analizada mediante WB). Se muestra una imagen representativa (n=7; n.s. indica diferencias no significativas de la condición shTRIB3 respecto a shC utilizando la prueba de Wilcoxon).

Con los datos obtenidos a lo largo de este apartado, derivados del silenciamiento y la sobreexpresión de TRIB3 en líneas celulares, podemos concluir que TRIB3 podría tener un papel dual en cáncer de mama luminal. En un contexto HER2 positivo, TRIB3 inhibe la fosforilación de AKT y reduce los niveles de HER2 contribuyendo así a regular negativamente la proliferación celular, lo que apoyaría un papel oncosupresor de esta pseudoquinasa en este contexto. Por el contrario, en líneas HER2 negativas, TRIB3 parece promover la fosforilación de AKT y la proliferación celular, lo que sugiere que podría desempeñar un papel protumoral en este subtipo celular.

2.2. ESTUDIO DEL MECANISMO MOLECULAR QUE DETERMINA EL PAPEL DUAL DE TRIB3 EN CÁNCER DE MAMA: REGULACIÓN DE HER2 Y DE LA VÍA DE AKT

Los resultados obtenidos en el apartado anterior han puesto de manifiesto que el papel dual desempeñado por TRIB3 en cáncer de mama luminal viene determinado al menos en parte por la expresión de HER2, así como por la existencia de una regulación diferencial en la activación de la vía de AKT. En este apartado nos planteamos profundizar en el estudio del mecanismo molecular mediante el cual TRIB3 regula a HER2 y AKT.

2.2.1. El silenciamiento de TRIB3 afecta a la estabilidad de HER2 pero no a sus niveles de mRNA.

Para estudiar el mecanismo por el que TRIB3 regula los niveles de HER2 utilizamos la línea celular HER2 positiva BT474. En primer lugar, analizamos por qPCR si las diferencias observadas en los niveles proteicos de HER2 se correspondían con un incremento en los niveles de mRNA. Tal y como se muestra en la **figura 27A**, nuestros resultados mostraron que el silenciamiento de TRIB3 no afecta a los niveles del mRNA de HER2, lo que descarta una regulación a nivel génico o transcripcional. A continuación, investigamos si la variación en los niveles de proteína podría deberse a diferencias en la estabilidad del receptor. Para ello, analizamos el tiempo de vida media de HER2 tras el tratamiento con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, y comprobamos que la estabilidad de HER2 se veía incrementada en las células BT474 shTRIB3 (**Fig. 27B**), lo cual concuerda con el aumento en los niveles de dicho receptor cuantificados previamente.

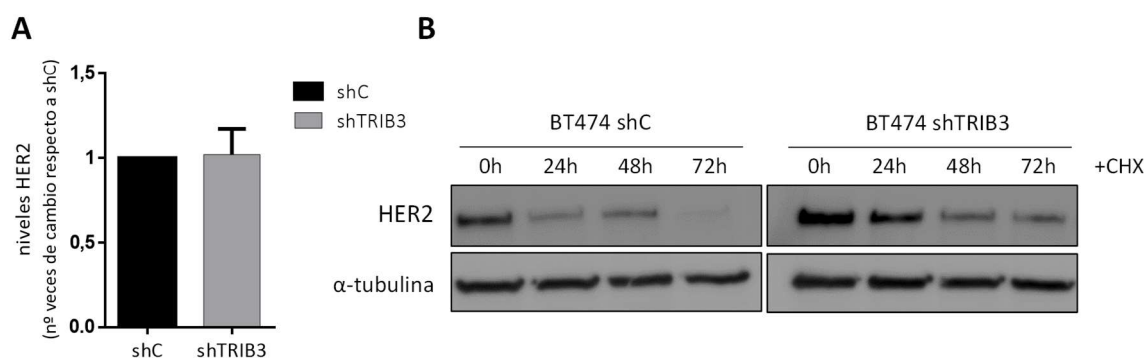


Figura 27. El silenciamiento de TRIB3 no afecta a los niveles de mRNA de HER2 pero sí a su estabilidad en las células BT474. (A) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en los niveles del mRNA de HER2 cuantificados mediante qPCR. Los datos corresponden a los niveles de mRNA de HER2 normalizados respecto al control de carga (GAPDH) y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM de la condición shTRIB3 respecto a shC. ($n=3$; n.s. utilizando la prueba de Wilcoxon). **(B)** Efecto del silenciamiento de TRIB3 y el tratamiento con cicloheximida (CHX, $10\mu\text{M}$) en los niveles de HER2 (determinados mediante WB) de las células BT474 shC y shTRIB3. Se muestra una imagen representativa ($n=3$). α -tubulina fue empleada como control de carga.

2.2.2. El receptor HER2 también tiene un papel en la modulación de los niveles de la pseudoquinasa TRIB3.

El incremento en la estabilidad y, en consecuencia, en los niveles de HER2 en las células en las que la expresión de TRIB3 había sido inhibida genéticamente, contrasta con la correlación positiva observada tanto en muestras de pacientes como en células donde dichos tumores o células HER2 positivas presentaban niveles más elevados de TRIB3. Para profundizar en el estudio de la existencia de mecanismos adicionales implicados en la regulación de TRIB3 y HER2, a continuación, analizamos si HER2 también podría modular los niveles de TRIB3. Para ello, silenciamos HER2 en las células BT474 (HER2 positivas) y lo sobreexpresamos en células MCF7 (HER2 negativas), con el objetivo de analizar

RESULTADOS

los niveles de TRIB3 en estas condiciones. Los resultados mostrados en la **figura 28** indican que el silenciamiento transitorio de HER2 (utilizando una mezcla de siRNAs específicos para dicho receptor) produjo un descenso en los niveles proteicos de TRIB3. Por otra parte, la sobreexpresión de HER2 (mediante la utilización de un vector lentiviral) llevó a un incremento en los niveles de dicha pseudoquinasa. Aunque serán necesarios desarrollar estudios adicionales para evaluar si la regulación de TRIB3 por HER2 tiene lugar a nivel transcripcional o traduccional/postraduccional, estos resultados apoyan la existencia de una modulación positiva de TRIB3 por parte de HER2.

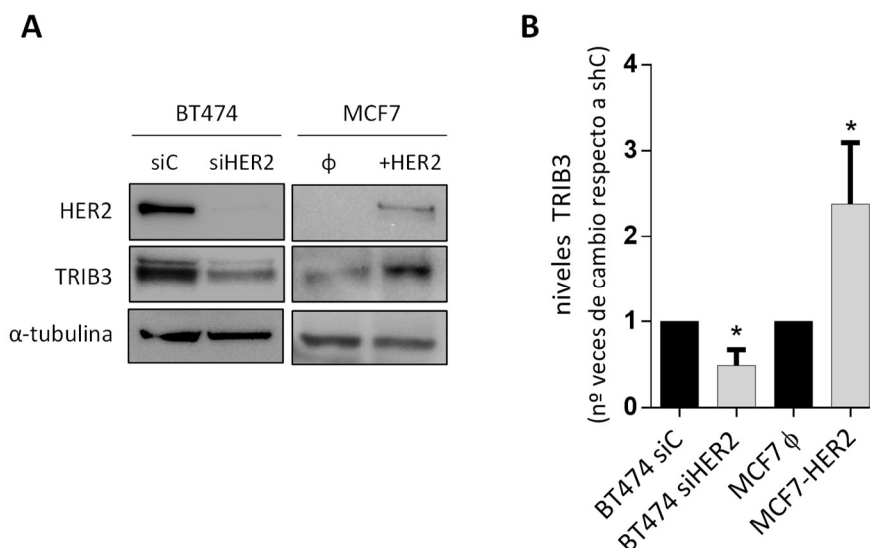


Figura 28. La modulación de los niveles de HER2 se asocia a cambios en los niveles de proteína de TRIB3. (A) Efecto del silenciamiento de HER2 en las células BT474 (siHER2) y de la sobreexpresión de HER2 en células MCF7 en los niveles de TRIB3 determinados mediante WB. Se muestra una imagen representativa (n=5). (B) Cuantificación mediante densitometrado de los niveles de TRIB3. Los datos corresponden a la densidad óptica en unidades arbitrarias para cada condición experimental normalizados respecto al control de carga (α-tubulina) y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM de la condición siHER2 respecto a siC o +HER2 respecto a Φ para cada caso. (n=5; *p<0.05 con respecto a BT474 shC o MCF7 Φ; utilizando la prueba de Wilcoxon).

Tomadas de manera conjunta, nuestras observaciones sugieren la existencia de un mecanismo regulatorio de retroalimentación en el que TRIB3 promueve la desestabilización de HER2 y, por tanto, una disminución en sus niveles proteicos, mientras que HER2 regula positivamente los niveles de TRIB3.

2.2.3. TRIB3 interacciona con AKT en las células BT474 y MCF7

Para profundizar en el mecanismo molecular por el que TRIB3 podría modular de manera opuesta a AKT en líneas celulares HER2 positivas y HER2 negativas, escogimos las líneas BT474 y MCF7 como representativas de los dos subtipos y, en primer lugar, puesto que previamente habíamos demostrado que TRIB3 regula de manera opuesta la fosforilación de AKT en la serina 473 (S473), evaluamos si el silenciamiento de TRIB3 también se asociaba a cambios en la fosforilación de AKT en la treonina 308 (T308). Sin embargo, y aunque con cierta variabilidad, no observamos cambios significativos en la fosforilación de AKT en este residuo (**Fig. 29A, 29C**). A continuación, para comprobar si los cambios observados en la fosforilación de AKT en S473, a pesar de no asociarse a diferencias en la fosforilación en T308, se traducían en un cambio en la actividad de esta quinasa, analizamos la fosforilación de FOXO, una de sus dianas que parece especialmente asociada a los cambios en la fosforilación en el residuo S473 de AKT inducidos por TRIB3 [192, 219, 296]. De este modo, comprobamos que el silenciamiento de TRIB3 en BT474, donde promueve un incremento en

la fosforilación de AKT mediada por MTORC2, se traduce en un aumento en la fosforilación de su diana FOXO, mientras que en MCF7 ocurre lo contrario, el silenciamiento de TRIB3 disminuye la fosforilación de AKT en S473 así como de FOXO (Fig. 29B, 29D).

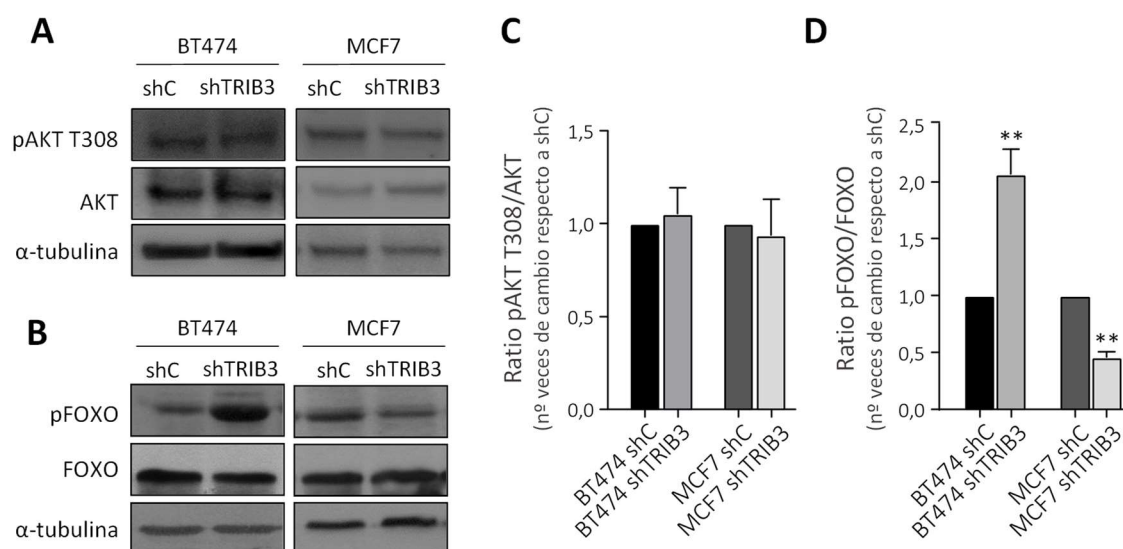


Figura 29. El silenciamiento de TRIB3 no afecta a la fosforilación de AKT en la T308, pero sí a la fosforilación de su diana FOXO. (A, B) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en la fosforilación de AKT en T308 (pAKT T308) (A) y en la fosforilación de FOXO1 en T24 y pFOXO3A en T32 (pFOXO) (B) analizada mediante WB en células BT474 y MCF7. Se muestra una imagen representativa (n=6 y n=9 respectivamente). (C, D) Cuantificación mediante densitometrado de los niveles de pAKT T308 (C) y pFOXO1 en T24/pFOXO3A en T32 (D). Los datos corresponden a la densidad óptica en unidades arbitrarias para cada condición experimental normalizados respecto a AKT total (C) o FOXO3A total (D) y al control de carga (α -tubulina) y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM de la condición shTRIB3 con respecto a shC para cada caso ((C) n=6 y (D) n=9; **p<0.01 con respecto a shC; utilizando la prueba de Wilcoxon).

Estudios previos han demostrado que TRIB3 puede interaccionar con AKT e inhibir su actividad [187, 281]. En este trabajo, nos planteamos estudiar si podría haber diferencias en esta interacción en las líneas HER2 positivas y HER2 negativas que pudieran justificar el papel diferencial de TRIB3 en el comportamiento de las líneas de cáncer de mama luminal descrito anteriormente. Como primer abordaje para analizar esta hipótesis, estudiamos la interacción entre TRIB3 y AKT mediante la inmunoprecipitación de TRIB3 en células cáncer de mama luminal. Como se observa en la figura 30, AKT coimmunoprecipita con TRIB3 tanto en BT474 como en MCF7 lo cual indica que ambas proteínas pueden interaccionar, directa o indirectamente, en los dos casos.

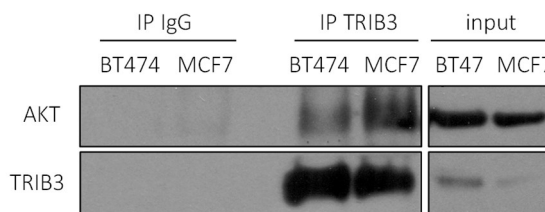
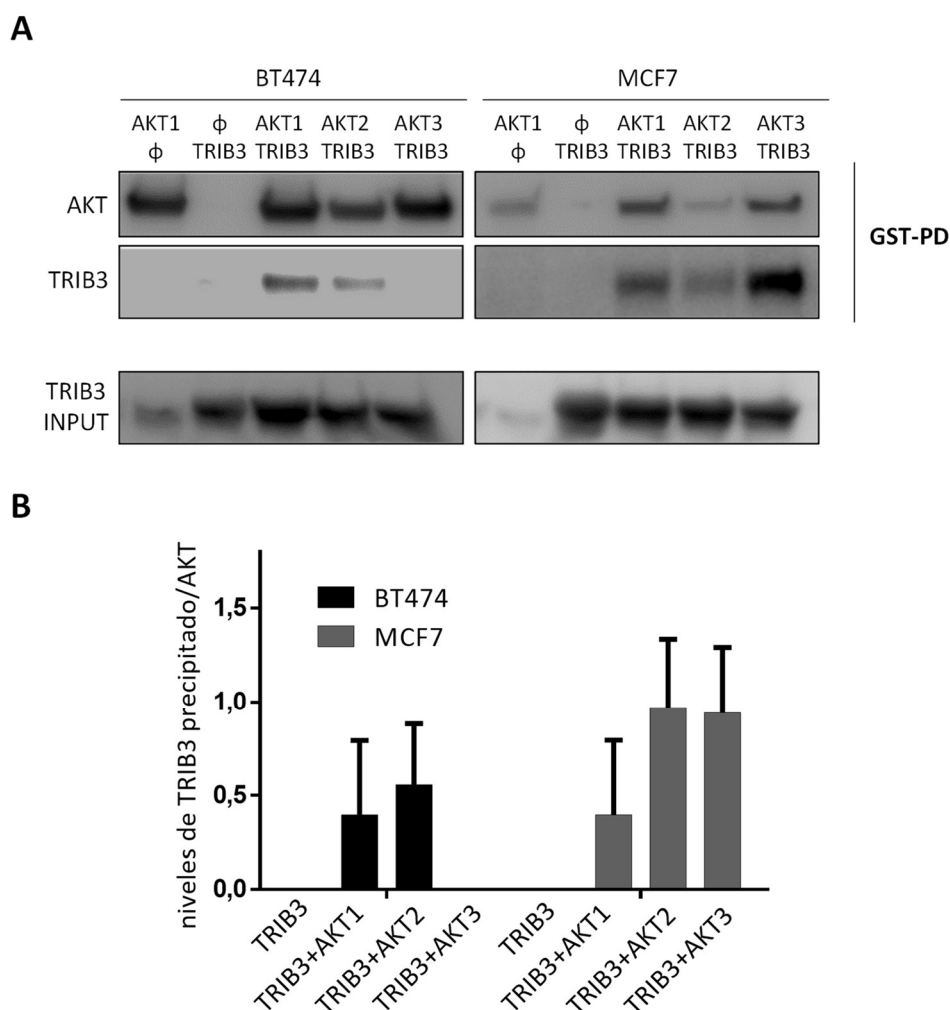


Figura 30. TRIB3 y AKT coimmunoprecipitan. Las células BT474 y MCF7 fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación (IP) empleando el anticuerpo de TRIB3 (IP TRIB3) y un anticuerpo inespecífico (IP IgG). La cantidad de TRIB3 y AKT precipitada se determinó por WB. El input indica la cantidad de proteína en el lisado total. Se muestra una imagen representativa (n=3).

Sin embargo, cabe destacar que el análisis en estos experimentos se realizó utilizando un anticuerpo anti-pan-AKT con el cual no era posible diferenciar con cuál de las tres isoformas de AKT

RESULTADOS

(AKT1, AKT2 y AKT3) estaba interaccionando TRIB3. AKT1, AKT2 y AKT3 presentan numerosas funciones redundantes, pero también funciones específicas, y una interacción diferencial de TRIB3 con alguna de estas isoformas podría ser importante en el contexto de nuestra investigación. Como una primera aproximación para caracterizar la existencia de interacciones específicas de TRIB3 con alguna de las isoformas de AKT, procedimos a expresar tanto TRIB3 como las tres isoformas de AKT unidas a GST en células BT474 y MCF7. Utilizamos esta aproximación basada en la expresión de formas exógenas con el fin de facilitar la precipitación específica de cada una de las isoformas de AKT. La **figura 31** muestra que mientras que TRIB3 coprecipita con AKT1 y AKT2 tanto en células BT474 como en MCF7, la coprecipitación con AKT3 solamente tiene lugar en las células MCF7. Aunque sería necesario desarrollar análisis adicionales, estos datos sugieren que la interacción de TRIB3 con AKT, así como la regulación de su actividad, podría ocurrir de manera diferente en células



HER2 positivas y HER2 negativas y contribuir a explicar el papel diferencial de TRIB3 en estas células.

Figura 31. TRIB3 coprecipita con AKT1 y AKT2 en BT474 y MCF7 pero con AKT3 solo en MCF7. (A) Las células BT474 y MCF7 transfectadas con GST-AKT1, GST-AKT2, GST-AKT3, o el vector vacío como control (Φ) y con myc-TRIB3 o el vector vacío como control (Φ), se lisaron y sometieron a precipitación de GST con resina de sefarosa unida a glutatión (GST pull down, GST-PD). La cantidad de TRIB3 y AKT precipitada se determinó por WB. El input indica la cantidad de proteína en el lisado total. Se muestra una imagen representativa (n=4). (B) Cuantificación mediante densitometrado de los niveles de TRIB3. Los datos corresponden a la densidad óptica en unidades arbitrarias para cada condición experimental y se expresan como el cambio medio en los niveles de TRIB3 ± SEM normalizados con respecto a AKT precipitada y a TRIB3 en el lisado total para cada caso (n=4).

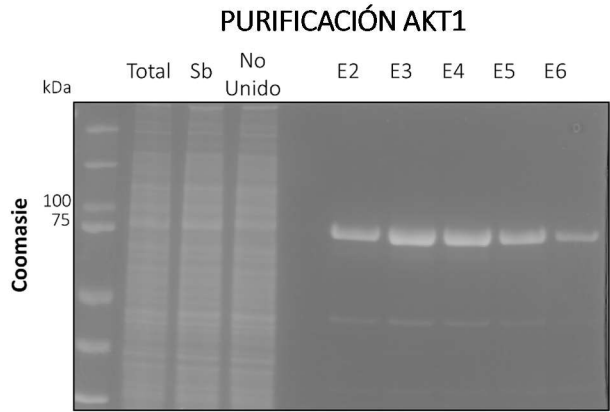
2.2.4. TRIB3 inhibe la fosforilación de AKT mediada por MTORC2 *in vitro*.

A la vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior nos propusimos estudiar *in vitro* si la interacción de TRIB3 con las isoformas de AKT se traduce en diferencias en su fosforilación por parte de MTORC2 y por tanto en diferencias en su actividad.

Para poder llevar a cabo estos análisis, procedimos al desarrollo y puesta a punto de un ensayo que nos permitiese analizar la actividad quinasa de MTORC2 *in vitro*. En primer lugar, pusimos a punto la purificación de las distintas isoformas de AKT, así como de TRIB3 y del complejo MTORC2. Para ello empleamos células HEK293T que sobreexpresaban de manera transitoria GST-AKT1, GST-AKT2 o GST-AKT3, o que sobreexpresaban de manera estable SIN1, proteína del complejo MTORC2 unida a 6 histidinas (6His-SIN1). Para la purificación de TRIB3, utilizamos bacterias transformadas con un plásmido de expresión procariota de GST-TRIB3. Tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, dichas purificaciones se realizaron mediante cromatografía de afinidad empleando columnas de agarosa conectadas a una bomba peristáltica. Concretamente, en el caso de GST-AKT y GST-TRIB3 se empleó una columna de agarosa con glutatión unido, mientras que en el caso de MTORC2 se utilizó una columna de agarosa con níquel unido, que permitía la retención de proteínas marcadas con histidinas, en este caso SIN1 y, en consecuencia, MTORC2. Una vez completado el protocolo, comprobamos la eficacia de la purificación analizando por tinción con azul de Coomasie y por Western blot fracciones de distintas etapas del proceso. Mediante la tinción con azul de Coomasie pudimos comprobar un elevado grado de purificación de las proteínas al no observar prácticamente bandas de proteínas contaminantes en las fracciones de elución (**Fig. 32**). Además, por Western blot comprobamos que las proteínas purificadas eran en efecto AKT, TRIB3 y MTORC2. Para ello, empleamos un anticuerpo contra AKT en el primer caso, y contra TRIB3 en el segundo. Para evaluar la presencia de MTORC2 utilizamos un anticuerpo contra histidinas (que reconoce la forma marcada con 6-His de SIN1) y lo corroboramos con un anticuerpo contra MTOR (**Fig. 32**).

RESULTADOS

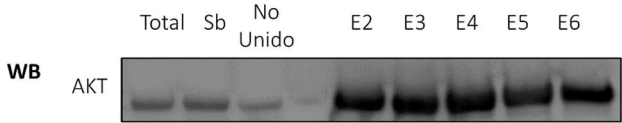
A



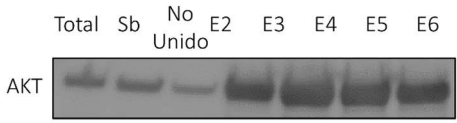
B



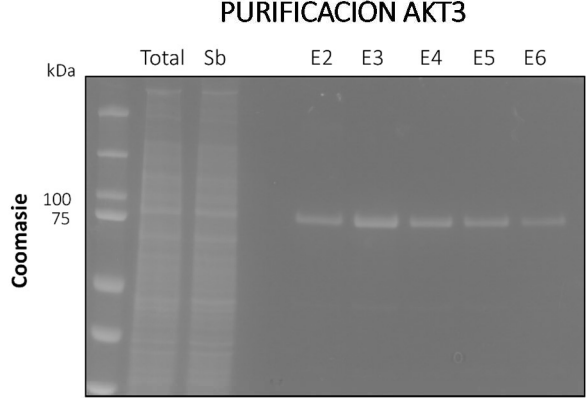
C



D



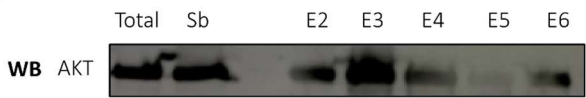
E



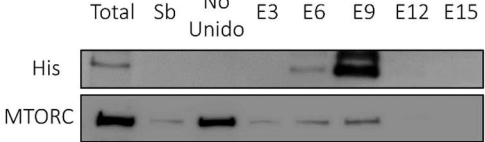
F



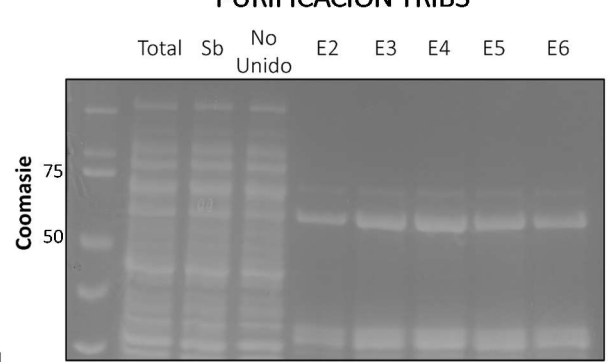
G



H



I



J

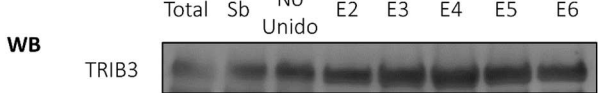


Figura 32. Imágenes representativas del proceso de purificación de GST-AKT1, GST-AKT2, GST-AKT3, MTORC2 Y TRIB3. Las células HEK293T que expresan las proteínas correspondientes se lisaron, sonicaron (lisado total) y centrifugaron. El sobrenadante (Sb) se cargó en una columna de agarosa unida a glutatión para la purificación de GST-AKT1 (A, B), GST-AKT2 (C, D), GST-AKT3 (E, F) Y TRIB3 (I, J) o en una columna de agarosa unida a Níquel para MTORC2 (G, H). Para todos los casos, se recogieron distintas fracciones de elución (En^o). Se muestra la tinción con azul de Coomasie (A, C, E, G, I) y el revelado por WB contra AKT (B, D, F), His y MTOR (H) o TRIB3 (J) de las distintas etapas del proceso de purificación.

Para poner a punto los ensayos quinasa y teniendo en cuenta que AKT iba a ser empleada como sustrato de MTORC2, antes de llevarlos a cabo tuvimos que asegurarnos que AKT estaba desfosforilada. Para ello, incubamos AKT con lambda fosfatasa durante 30 minutos a 30°C en presencia de Mn²⁺. Además, para comprobar que el complejo MTORC2 purificado era funcional, realizamos un primer ensayo de actividad quinasa de MTORC2 *in vitro* utilizando como sustrato AKT1. Así, incubamos MTORC2 y AKT1 con ATP en presencia de Mg²⁺ y Mn²⁺ durante 40 minutos a 37°C. Además, realizamos las mismas incubaciones pero sin añadir AKT, MTORC2 o ATP como controles negativos. Los resultados mostraron que al incubarse AKT con MTORC2 en presencia de ATP, su fosforilación se veía incrementada y, por tanto, que MTORC2 purificado es activo y puede fosforilar AKT1 *in vitro* (Fig.33).

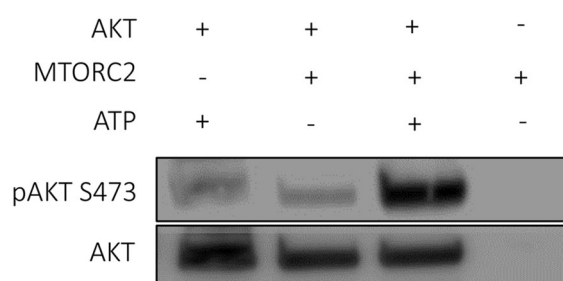


Figura 33. Ensayo quinasa *in vitro* de MTORC2. Análisis de la fosforilación de AKT1 por MTORC2 en un ensayo quinasa *in vitro*. Las incubaciones se realizaron en presencia de Mg²⁺ y Mn²⁺ y AKT1 ± MTORC2 ± ATP (40 min, 37°C). Se muestra una imagen representativa del análisis mediante WB de la fosforilación de AKT en S473 y de AKT total (n=3).

A continuación, y una vez puesto a punto el ensayo de actividad quinasa, analizamos si la incubación en presencia de TRIB3 podía modular *in vitro* la fosforilación de cualquiera de las tres isoformas de AKT por parte de MTORC2. Para ello seguimos el mismo protocolo, pero añadiendo TRIB3 al medio de reacción de manera que estuviese en proporción 2:1 con AKT. Para asegurar que la cantidad de AKT total era equivalente en las distintas condiciones experimentales, en lugar de revelar contra el anticuerpo de AKT total, realizamos una tinción del gel con el reactivo *Bluesafe* previa al análisis de la fosforilación de AKT mediante Western blot. Esto nos permitía evaluar la cantidad de AKT en la muestra sin necesidad de cargar dos geles distintos o proceder al decapado de la membrana. Los resultados obtenidos en el ensayo indican que TRIB3 reduce de manera similar la fosforilación de AKT1, AKT2 y AKT3 por MTORC2 *in vitro* (Fig. 34), sugiriendo que TRIB3 tiene capacidad de regular la fosforilación de las tres isoformas de AKT por el complejo en la serina 473 y que dicha regulación puede deberse a una interacción directa de TRIB3 con AKT y/o con el complejo MTORC2. Sin embargo, no podemos descartar que en presencia de otros interactores o de modificaciones postraduccionales el papel de TRIB3 pudiese ser diferente *in vivo*.

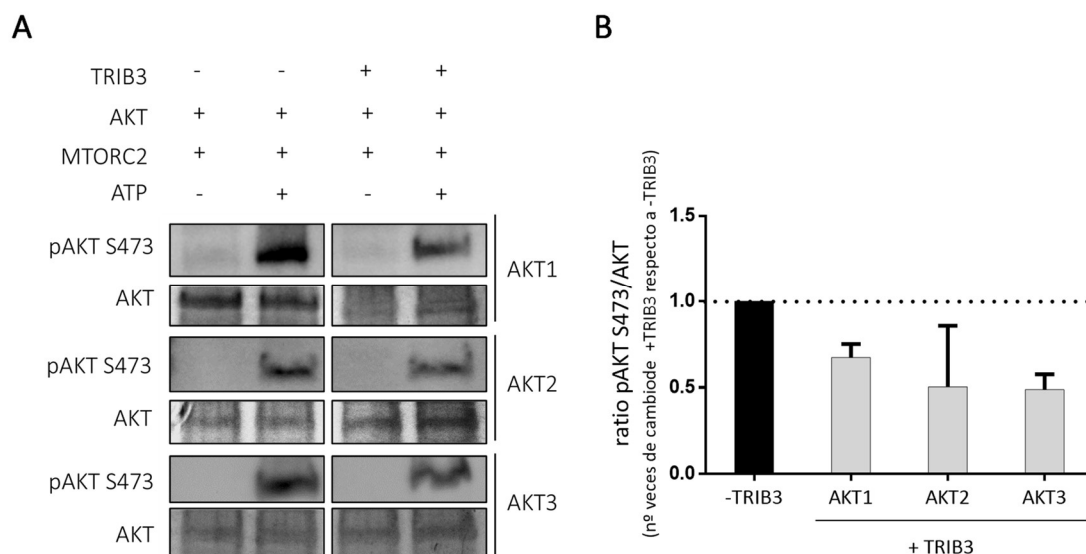


Figura 34. TRIB3 reduce la fosforilación de AKT1, AKT2 y AKT3 por MTORC2 *in vitro*. Análisis de la fosforilación de AKT1, AKT2 y AKT3 por MTORC2 en presencia de TRIB3 en un ensayo quínasa *in vitro*. Las incubaciones se realizaron en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} y AKT + MTORC2 $\pm$ ATP $\pm$ TRIB3 (indicado con +) (40 min, 30°C). **(A)** Se muestra el resultado por WB de la fosforilación de AKT en S473 y la tinción con Bluesafe de AKT total (n=2-3). **(B)** Cuantificación mediante densitometrado de los niveles de pAKT en S473. Los datos corresponden a la densidad óptica en unidades arbitrarias para cada condición experimental y se expresan como el cambio medio en los niveles de AKT fosforilada $\pm$ SEM normalizados con respecto a AKT total para cada caso (n=2-3).

En ese sentido, serían necesarios experimentos adicionales para determinar si en el contexto de cáncer de mama la interacción entre TRIB3 y alguna de las isoformas de AKT puede contribuir a la regulación diferencial que parece ejercer esta pseudoquinasa en el comportamiento de las células de cáncer de mama luminal HER2 positivas y HER2 negativas.

3. ANÁLISIS DEL PAPEL DE TRIB3 EN LOS PROCESOS DE INVASIÓN Y METÁSTASIS EN CÁNCER DE MAMA

La mayoría de las muertes por cáncer de mama se deben a la formación de lesiones metastásicas en otros órganos [30], principalmente en hígado, hueso, pulmón y cerebro [32, 33]. Así, conocer mejor los mecanismos moleculares precisos que regulan estos procesos es una de las estrategias que ayudará a desarrollar tratamientos más específicos que permitan aumentar la esperanza y calidad de vida de las pacientes con cáncer de mama. Con este objetivo, nos planteamos analizar el papel de TRIB3 en la regulación de los procesos que controlan el desarrollo de la metástasis o la adquisición de características que permitan la diseminación de las células de cáncer de mama a otros órganos.

3.1. Elevados niveles de TRIB3, tanto en el tumor como en las áreas ganglionares afectadas, se asocian a un menor desarrollo de metástasis en pacientes de cáncer de mama ER positivo.

Con el objetivo de estudiar la relación entre TRIB3 y el desarrollo de metástasis en cáncer de mama del tipo luminal, analizamos en los TMA de pacientes de cáncer de mama empleados en el capítulo 1 si existía alguna relación entre los niveles de TRIB3 y la presencia de metástasis.

Para ello, en primer lugar, comparamos la expresión de TRIB3 (cuantificada mediante el valor H) en los tumores de aquellas pacientes que habían desarrollado metástasis respecto a las que no. Los resultados mostrados en las **figuras 35A, 35B** indican que las pacientes que no sufrieron metástasis presentaban niveles más elevados de TRIB3 en el tumor que aquellas que sí la padecieron. Además, la cuantificación de los niveles de TRIB3 tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células de los tumores analizados, permitía obtener la misma conclusión: elevados niveles de TRIB3 en ambas localizaciones subcelulares se relacionan con una menor incidencia de metástasis (**Fig. 35C, 35D**).

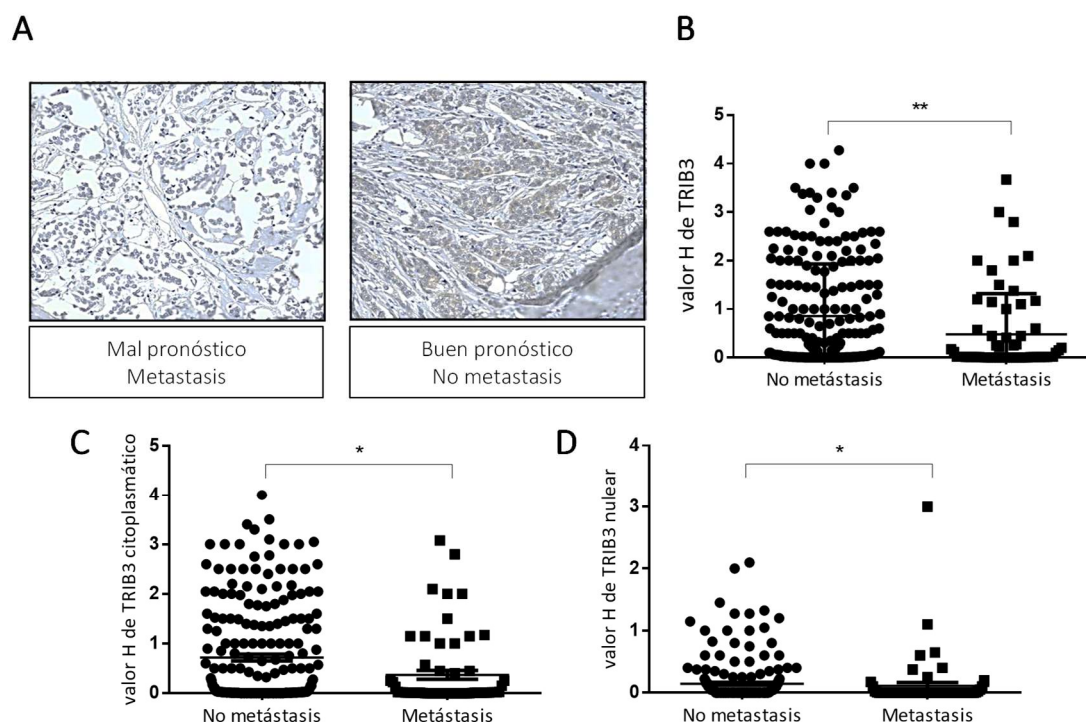


Figura 35. Elevados niveles de TRIB3 en el tumor primario se asocian a una menor presencia de metástasis. (A) Imagen representativa del marcaje de TRIB3 en un tumor correspondiente a una paciente que sufrió metástasis (imagen izquierda) y en el tumor de otra paciente que no desarrolló metástasis (imagen derecha). (B) Cuantificación del valor H de la expresión de TRIB3 en los tumores primarios subdivididos en función de si habían desarrollado o no metástasis. (C,D) Cuantificación del valor H de la expresión de TRIB3 en los tumores primarios subdivididos en función de si habían desarrollado o no metástasis específicamente en el citoplasma (C) o en el núcleo (D). Los datos se expresan en unidades arbitrarias como la media $\pm$ SEM para cada caso. (n=291 *p<0.05, **p<0.01; utilizando la prueba T con corrección de Welch's).

A continuación, estudiamos si los niveles de TRIB3 en las áreas tumorales del ganglio también podrían estar relacionados con el pronóstico en términos de metástasis, y comprobamos que, al igual que ocurre con los niveles de TRIB3 en el tumor, las pacientes que no desarrollaron metástasis mostraron mayores niveles de TRIB3 en los ganglios afectados que aquellos que sí progresaron a cáncer metastásico (**Fig. 36**); en este caso, no observamos correlación al analizar concretamente la expresión nuclear ya que los niveles de TRIB3 eran muy bajos (**Fig. 36C**). En general, estos datos sugieren que la expresión de TRIB3 podría ser un biomarcador de progresión de la enfermedad asociado con el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama ER positivo.

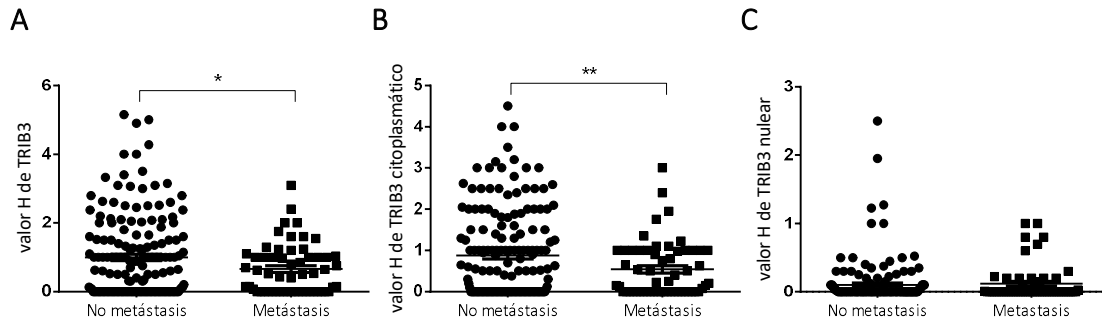


Figura 36. Elevados niveles de TRIB3 en las áreas tumorales ganglionares se asocian a una menor presencia de metástasis. (A) Cuantificación del valor H de la expresión de TRIB3 en los tumores primarios subdivididos en función de si habían desarrollado o no metástasis. (B,C) Cuantificación del valor H de la expresión de TRIB3 en los tumores primarios subdivididos en función de si habían desarrollado o no metástasis específicamente en el citoplasma (B) o en el núcleo (C). Los datos se expresan en unidades arbitrarias como la media $\pm$ SEM para cada caso. ($n=225$ * $p<0.05$, ** $p<0.01$; utilizando la prueba T con corrección de Welch's).

3.2. El silenciamiento de TRIB3 afecta a la capacidad migratoria e invasiva de células de cáncer de mama

Dado que en el apartado anterior habíamos encontrado que la expresión de TRIB3 en pacientes de cáncer de mama luminal estaba relacionada con el desarrollo de metástasis, nos planteamos si TRIB3 podría regular la invasividad y capacidad metastática de las células de cáncer de mama. Con el fin de analizar esta posibilidad, seleccionamos las células BT474 y MCF7 como modelo para estudiar el efecto de la inhibición genética de TRIB3 en la capacidad migratoria e invasiva *in vitro* de células de cáncer de mama luminal. En los experimentos de migración evaluamos la habilidad de las células para atravesar una membrana porosa atraídas por los agentes quimioatrayentes presentes en el suero. Para los experimentos de invasión, el procedimiento fue similar pero añadiendo sobre la membrana una capa de matrigel, que presenta propiedades semejantes a las de la matriz extracelular, para analizar la capacidad de estas células de atravesarla. Como se observa en la **figura 37**, el silenciamiento de TRIB3 incrementó la capacidad migratoria e invasiva de las células BT474 mientras que la disminuyó en las células MCF7, sugiriendo que, dependiendo del contexto molecular concreto de cada tumor, TRIB3 podría modular de manera distinta los procesos de invasión.

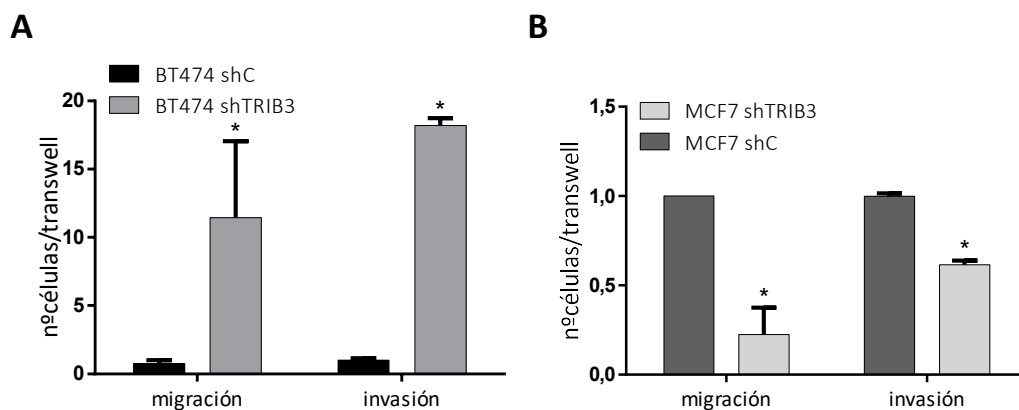


Figura 37. TRIB3 regula la capacidad migratoria e invasiva de las células de cáncer de mama BT474 y MCF7. Efecto del silenciamiento de TRIB3 en la capacidad migratoria e invasiva de las células BT474y MCF7. Los datos corresponden al número de células que han migrado o invadido en cámaras de Boyden y se expresan como el número de veces de cambio $\pm$ SEM normalizadas con respecto a la condición shC en cada caso. Las cuantificaciones se realizaron contando la totalidad de las células en el transwell para cada condición experimental ($n=3$, * $p<0.05$ con respecto a las células shC; utilizando la prueba de Wilcoxon).

3.3. TRIB3 podría regular la capacidad de colonización de las células de cáncer de mama

Para corroborar el efecto de TRIB3 en procesos metastásicos realizamos un experimento *in vivo* empleando las células BT474 y MCF7 silenciadas para TRIB3 y ratones inmunodeficientes. Concretamente, pinchamos 500.000 células en la vena de la cola de los ratones y 6 semanas más tarde los sacrificamos para analizar si las células tumorales habían sido capaces de generar micrometástasis en pulmón, hígado o corazón. Este ensayo, si bien no reproduce el proceso de metástasis al completo, sí es útil para evaluar la habilidad de las células para llegar a un nuevo tejido y formar un nuevo tumor (colonización). Sin embargo, en nuestro caso, las células empleadas tienen una baja capacidad invasiva. Así, ninguno de los ratones inyectados con células MCF7 desarrolló lesiones. En cuanto a los ratones en los que habíamos inyectado células BT474, el análisis patológico no reveló alteraciones ni en el corazón ni en los pulmones más allá de cierta inflamación. Sin embargo, en el hígado sí que pudimos observar una respuesta inflamatoria más pronunciada e incluso la presencia de células neoplásicas en dos de los ratones (Tabla 14). A pesar de ello, los resultados no son concluyentes y experimentos adicionales serían necesarios, por ejemplo, en los que los ratones se sacrificasen tras un periodo más largo desde la inyección de las células tumorales con el fin de facilitar la colonización de los distintos tejidos.

Tabla 14. Alteraciones hepáticas observadas en los ratones inmunodeficientes en los que se había inyectado en la vena de la cola células BT474 shC y shTRIB3

ALTERACIONES HEPÁTICAS	BT474 shC	BT474 shTRIB3
Sin lesiones	2 (25%)	0
Inflamación ligera-moderada	5 (62,5%)	3 (60%)
Hepatitis severa con necrosis focales	0	1 (20%)
Inflamación, necrosis y presencia de células neoplásicas	1 (12,5%)	1 (20%)

En cualquier caso, estos datos también sugieren que probablemente el impacto de TRIB3 en la capacidad metastásica requiera la cooperación con alteraciones moleculares adicionales. En ese sentido, desarrollamos un experimento piloto utilizando células de cáncer de mama con capacidad metastásica: 231-HER2/LM-4, en las que también silenciamos la expresión de TRIB3. Estas células sobreexpresan el receptor HER2 y han sido seleccionadas para la metástasis específica en pulmón, pero en este caso no son derivadas del subtipo luminal. Un análisis preliminar y macroscópico de los pulmones (tabla 15) sugiere que en este contexto el silenciamiento de TRIB3 sí aceleró la capacidad metastásica (o de colonización) de estas células, lo cual indicaría que en determinados contextos genéticos una menor expresión de TRIB3 podría tener un impacto significativo en el desarrollo de lesiones metastásicas.

Tabla 15. Alteraciones pulmonares observadas en los ratones inmunodeficientes en los que se había inyectado en la vena de la cola células 231-HER2/LM-4 shC y shTRIB3

ALTERACIONES PULMONARES	231 HER2 LM2C shC	231 HER2 LM2C shTRIB3
Sin lesiones	6 (50%)	1 (9%)
Signos de hiperplasia ligera	5 (42%)	2 (18%)
Signos de hiperplasia severa	1 (8%)	5 (45%)
Lesiones de tipo neoplásico	0	3 (27%)

3.4. TRIB3 podría modular la expresión de proteínas relacionadas con la transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio-mesénquima comienza con la pérdida de adhesiones célula-célula debido a la disminución de la expresión de marcadores epiteliales, como E-cadherina y a la expresión de marcadores mesenquimales, como vimentina o N-cadherina [297]. Para comprobar que los cambios en invasión observados *in vitro* en las células van asociados a cambios en los marcadores relacionados con la transición epitelio-mesénquima, analizamos por Western blot E-cadherina y vimentina en las células tumorales de cáncer de mama BT474 y MCF7 en las que los niveles de TRIB3 se habían inhibido genéticamente. Los resultados de la **figura 38** muestran que en las células BT474, donde el silenciamiento de TRIB3 provoca un incremento en la capacidad invasiva, se produce una pérdida de E-cadherina asociada a una mayor expresión de vimentina. En las células MCF7 por el contrario, la pérdida de TRIB3 causó un aumento en la expresión de E-cadherina lo cual concuerda con la menor invasión observada previamente. Sin embargo, en este caso no observamos cambios en los niveles de vimentina.

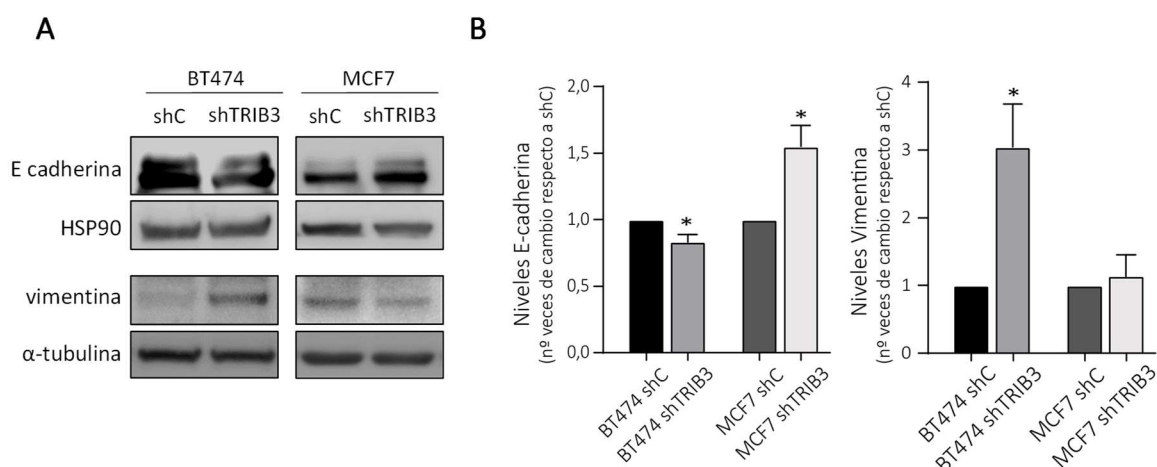


Figura 38. El silenciamiento de TRIB3 modula la expresión de E-cadherina y de vimentina en células de cáncer de mama luminal. (A) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en los niveles de E-cadherina y de vimentina (analizados por WB) en células BT474 y MCF7. Se muestra una imagen representativa. **(B)** Cuantificación mediante densitometrado de los niveles E-cadherina y de vimentina. Los datos corresponden a la densidad óptica en unidades arbitrarias para cada condición experimental normalizados respecto al control de carga (HSP90 o α-tubulina) y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM con respecto a shC para cada caso ($n=5-7$; $*p<0.05$, con respecto a shC; utilizando la prueba de Wilcoxon).

Previamente en nuestro grupo de investigación, se habían generado tumores por xenoinjerto de células BT474 shC y shTRIB3 en el flanco de ratones inmunodeficientes para analizar el efecto del silenciamiento de TRIB3 en la aparición y progresión tumoral [192]. En esta tesis doctoral, utilizamos estos tumores para analizar también los marcadores E-cadherina y vimentina por inmunofluorescencia. Como se observa en la **figura 39**, y en línea con los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* descritos en la **figura 38**, el silenciamiento de TRIB3 también promovió una pérdida de E-cadherina y un aumento en la expresión de vimentina *in vivo*.

Otro fenómeno importante en la progresión tumoral que facilitará la extravasación de las células tumorales es la vascularización del tumor [34]. Por este motivo, también analizamos en estos tumores si la deficiencia de TRIB3 podría afectar a la vascularización tumoral y comprobamos que los tumores generados con células BT474 deficientes en TRIB3 estaban más vascularizados que los tumores control (**Fig. 39**).

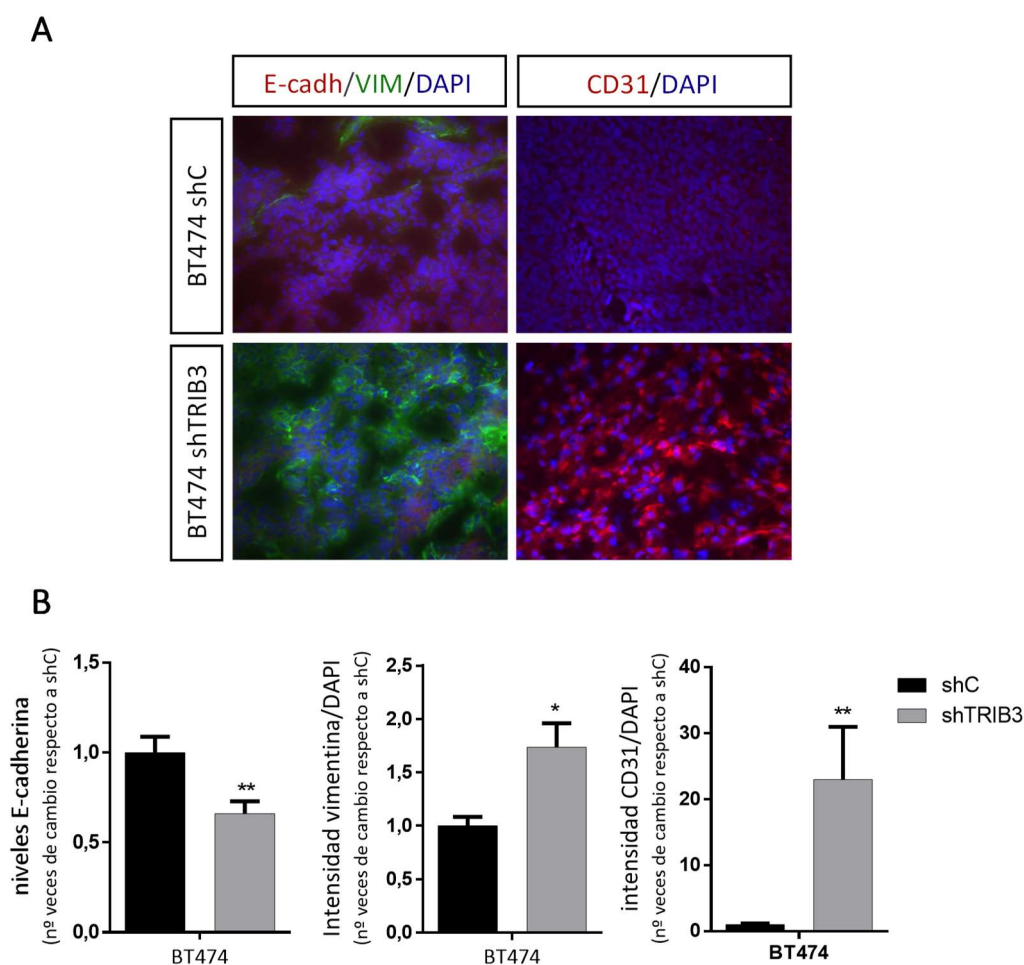


Figura 39. El silenciamiento de TRIB3 modula la expresión de E-cadherina y de vimentina, así como la vascularización, en tumores generados con las células de cáncer de mama BT474. (A) Imágenes representativas de la tinción por inmunocitofluorescencia de E-cadherina (rojo), vimentina (verde) y del marcador de núcleos DAPI (azul) en la imagen de la izquierda, y del marcador de vasos CD31 (rojo) y DAPI (azul) en la imagen de la derecha (n=3). **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias para cada marcador respecto al DAPI expresadas como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM con respecto a la condición shC en cada caso. Las cuantificaciones se realizaron contando 10 campos por condición experimental (n=3; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; utilizando la prueba T).

3.5. TRIB3 interacciona con RAC1 y regula su actividad.

Con el fin de analizar los mecanismos mediante los cuales TRIB3 regula la invasividad de las células de cáncer de mama luminal, nos preguntamos si podrían tener relación con la regulación de las proteínas G monoméricas de la familia RhoA, concretamente con RAC1. Esta GTPasa pequeña está implicada en la reorganización del citoesqueleto regulando la morfología y polaridad celular, así como procesos de adhesión y migración. Además, se ha descrito su implicación en procesos de tumorigénesis y metástasis y, concretamente en cáncer de mama puede estar sobreexpresada o hiperactivada [298]. RAC1, como cualquier GTPasa pequeña, fluctúa entre un estado activo (unido a GTP) o inactivo (unido a GDP). Este proceso está regulado por diversos factores de intercambio de nucleótidos (GEFs, permiten el intercambio de GDP a GTP) y por proteínas activadoras de GTPasas (GAPs, promueven la desfosforilación del GTP a GDP y la consecuente inactivación de la GTPasa) [299]. Además, su actividad también se ve regulada por modificaciones postraduccionales como la ubiquitinación, la sumoilación o modificaciones por lípidos isoprenoides (farnesilo o geranilgeranilo, concretamente) [299].

Teniendo en cuenta todo lo anterior, para continuar con el estudio de TRIB3 en la regulación de los procesos metastásicos, analizamos el papel de esta pseudoquinasa en la regulación de RAC1. Para ello, en primer lugar realizamos un ensayo de actividad GTPasa de RAC1 en células BT474 y MCF7, en las que TRIB3 había sido silenciado. Brevemente, este tipo de ensayos consisten en la precipitación específica de RAC1-GTP (y no RAC1-GDP) empleando GST-PBD, un dominio de la proteína PAK que se une específicamente a RAC1 unida a GTP. De esta forma, las diferencias en la interacción entre GST-PBD y RAC1 son indicativas del distinto grado de activación de esta GTPasa. Al realizar la precipitación de GST-PDB (utilizando sefarosa con glutatión unido) observamos que en las células BT474 shTRIB3 precipita una mayor cantidad de RAC1, correspondiente a RAC1-GTP, y por tanto RAC1 activo, que en las células shC. Sin embargo, en las células MCF7 shTRIB3, hay una menor cantidad de RAC1 precipitada y por tanto menores niveles de RAC1 activo que en las células control. **(Fig. 40A, 40B)**. Estos resultados sugieren que TRIB3 modula la actividad de RAC1 en células de cáncer de mama luminales y que existe una correlación entre los cambios inducidos por TRIB3 en la actividad de RAC1 y la capacidad migratoria e invasiva de estas células descrita anteriormente.

Además, nos preguntamos si TRIB3 podría estar regulando la actividad de RAC1 interaccionando de manera directa con ella, o si por el contrario se trata de una regulación indirecta mediada por otros efectores. Por ello, realizamos un ensayo de interacción *in vitro* de estas dos proteínas. Para ello, utilizamos GST-TRIB3 y GST-RAC1 previamente purificadas en bacterias. A continuación, para evitar interferencias entre dos proteínas de fusión con GST, escindimos el fragmento GST de RAC1 con trombina aprovechando la presencia de un sitio de corte para esta proteasa en la zona de conexión entre ambos dominios de la proteína de fusión, obteniendo finalmente RAC1. Finalmente, realizamos una precipitación de GST-TRIB3 (utilizando sefarosa unida a glutatión) y observamos que RAC1 coprecipita. Este resultado sugiere que TRIB3 y RAC1 pueden interaccionar **(Fig. 40C)**.

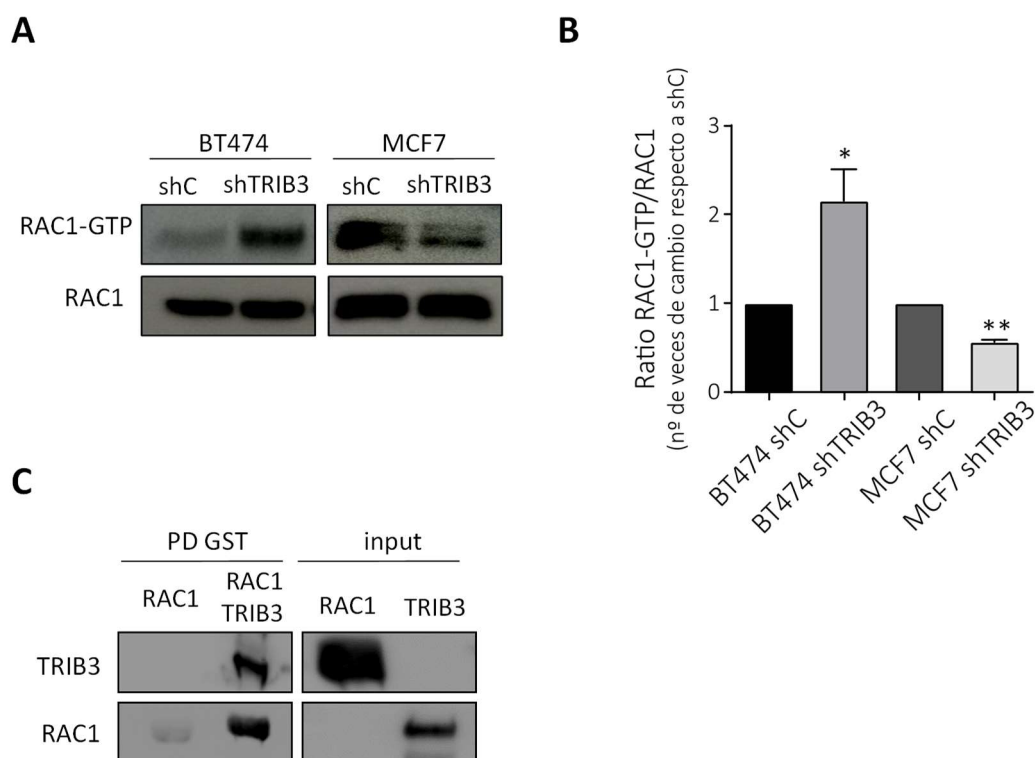


Figura 40. TRIB3 modula la actividad de RAC1. (A, B) Efecto del silenciamiento de TRIB3 en los niveles de RAC1 activo (RAC1-GTP, analizados mediante ensayo de interacción con GST-PDB y posterior análisis mediante WB de la fracción de RAC1 coprecipitado) en células BT474 y MCF7. Se muestra una imagen representativa. (B) Cuantificación mediante densitometrado de los niveles de RAC1-GTP. Los datos corresponden a la densidad óptica en unidades arbitrarias para cada condición experimental normalizados respecto los niveles totales de RAC1 y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM con respecto a shC para cada caso ($n=3$, $*p<0.05$, $**p<0.01$ con respecto a la condición shC; utilizando la prueba de Wilcoxon). (C) Ensayo de interacción de GST-TRIB3 y RAC1. Ambas proteínas purificadas se incubaron y sometieron a precipitación con resina de sefarosa unida a glutatión (GST pull down, GST-PD). La cantidad de GST-TRIB3 y RAC1 precipitada se determinó por WB. El input indica la cantidad de proteína total sin someter a precipitación. Se muestra una imagen representativa ($n=3$).

En conjunto, estos resultados indican que TRIB3 podría regular procesos de invasión y metástasis en un contexto de cáncer de mama ER positivo, probablemente a través de la regulación de la actividad de RAC1 y la modulación de la transición epitelio-mesénquima.

4. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE TRIB3 EN LA RESPUESTA A TERAPIA DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA LUMINALES

A lo largo de esta tesis doctoral, hemos estudiado el papel de TRIB3 en la regulación de la capacidad proliferativa e invasiva de células de cáncer de mama e incluso su posible relevancia como biomarcador en pacientes con esta enfermedad. Con este último objetivo quisimos analizar el posible papel de esta pseudoquinasa en la resistencia o sensibilidad a algunas de las terapias que se emplean habitualmente en el tratamiento del cáncer de mama.

Para ello, evaluamos si la inhibición genética de TRIB3 podía afectar a la respuesta a diferentes tratamientos de las células BT474 y MCF7. Previamente habíamos mostrado que el tratamiento con Lapatinib prevenía el aumento en la proliferación inducido por el silenciamiento de TRIB3 de células HER2 positivas, sugiriendo que el tratamiento con este fármaco podría ser de utilidad en este subtipo de pacientes (Fig. 20). A continuación, puesto que las pacientes que presentan tumores ER positivos

RESULTADOS

son tratados con terapia endocrina, analizamos el efecto del tratamiento con tamoxifeno en las células BT474 y MCF7 deficientes en TRIB3 respecto a células control mediante la tinción con cristal violeta de las células viables. Como se observa en la **figura 41**, no encontramos diferencias en la respuesta al tratamiento con tamoxifeno en función de los niveles de TRIB3 en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas.

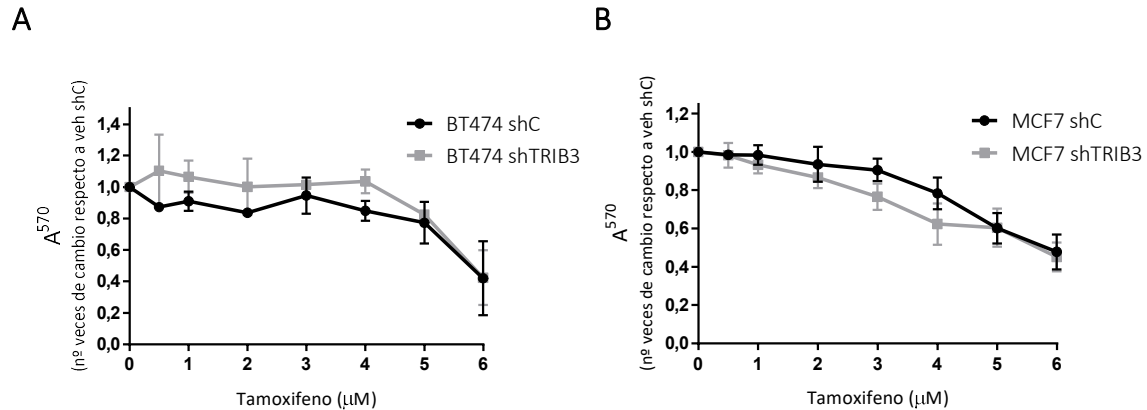


Figura 41. El silenciamiento de TRIB3 no afecta a la respuesta al tratamiento con tamoxifeno. Efecto del tratamiento con tamoxifeno en la viabilidad celular (estimada mediante tinción con cristal violeta) en células BT474 (A) y MCF7 (B) shC y shTRIB3. Los datos corresponden a la absorbancia a 570 nm y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM con respecto al tratamiento con el vehículo para cada caso ($n=3-5$; no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos utilizando la prueba ANOVA de dos vías).

Para continuar con el estudio del papel de TRIB3 en la respuesta a fármacos, analizamos el efecto del tratamiento con los agentes quimioterapéuticos doxorrubicina y cisplatino, puesto que también son frecuentemente empleados para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama. En este caso, observamos que la inhibición genética de TRIB3 aumentó la resistencia tanto de las células BT474 como de las células MCF7 al tratamiento con estos compuestos (Fig. 42).

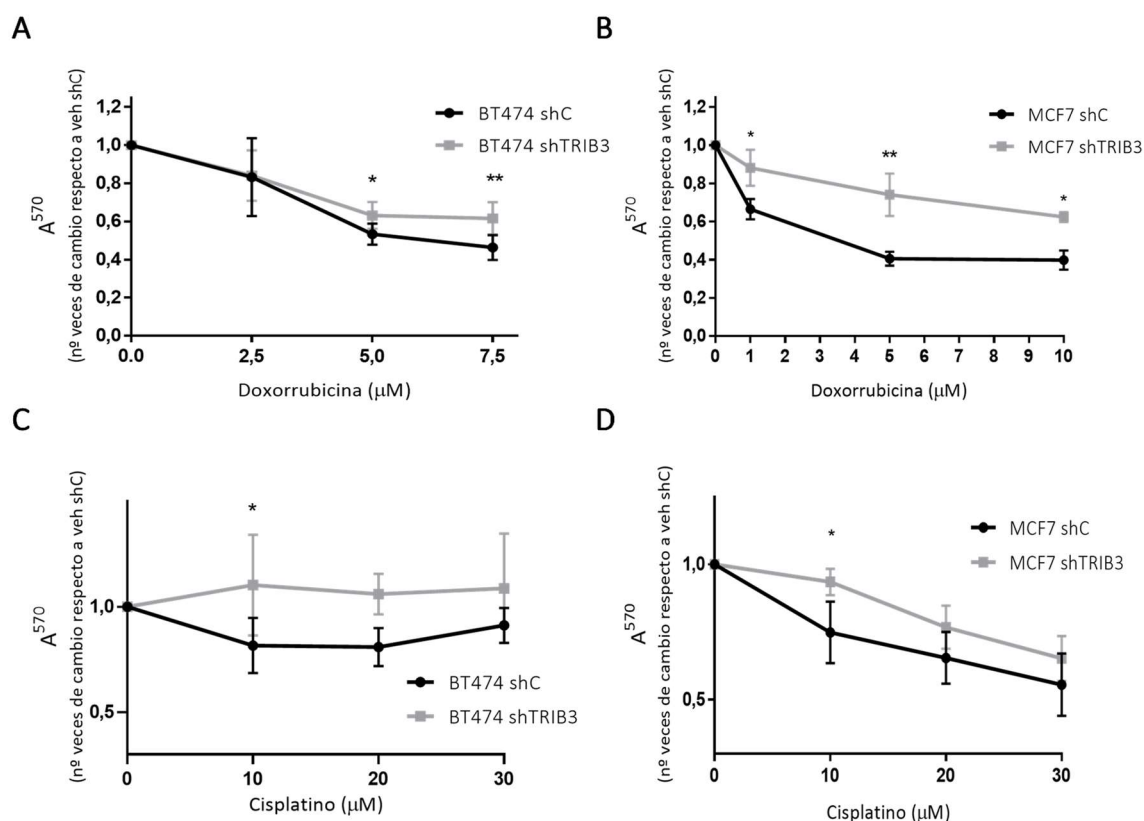
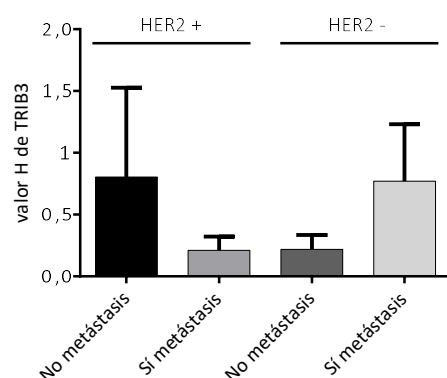


Figura 42. Las células deficientes en TRIB3 son más resistentes al tratamiento con doxorrubicina o cisplatino. Efecto del tratamiento con Doxorrubicina (A, B) o cisplatino (C, D) en la viabilidad celular (estimada mediante tinción con cristal violeta) en células BT474 (A, C) y MCF7 (B, D) shC y shTRIB3. Los datos corresponden a la absorbancia a 570 nm y se expresan como el número de veces de cambio medio $\pm$ SEM con respecto al tratamiento con el vehículo para cada caso ($n=3-5$; * $p<0.05$ con respecto a shC; utilizando la prueba ANOVA de dos vías).

Como hemos comentado en apartados anteriores, la expresión de TRIB3 en muestras de pacientes se relacionaba en general con buen pronóstico a pesar de que nuestros experimentos en líneas celulares indican que, en algunos casos concretos, dependiendo del contexto molecular, TRIB3 podría no tener un papel supresor tumoral. Teniendo en cuenta estas discrepancias, analizamos de nuevo las muestras de pacientes subdividiéndolos según si habían sido tratados o no con quimioterapia y en función de si habían sido considerados HER2 positivos o HER2 negativos. El número de pacientes que no habían recibido quimioterapia era escaso por lo que no pudimos realizar análisis estadístico en este caso (Fig. 43A). Sin embargo, sí observamos una tendencia similar a nuestros datos en líneas celulares: las pacientes con tumores HER2 positivos que no han desarrollado metástasis parecían tener niveles más elevados de TRIB3 en el tumor que las que sí desarrollaron metástasis, mientras que en las pacientes con tumores HER2 negativos, la tendencia era la contraria (Fig. 43A). Sin embargo, para aquellas que sí habían recibido quimioterapia, los valores de TRIB3 eran más altos en los tumores de las pacientes que no habían desarrollado metástasis, tanto si eran HER2 positivos como HER2 negativos (siendo la diferencia estadísticamente significativa solamente para los HER2 negativos, aunque igual que en el caso anterior la falta de significancia en los tumores HER2 positivos parece relacionarse con el tamaño muestral; Fig. 43B). Aunque sería necesario analizar un mayor número de muestras para corroborar nuestra hipótesis, estas observaciones están en consonancia con los resultados obtenidos *in vitro*, y sugieren que una mayor expresión de TRIB3 podría correlacionarse con una mejor respuesta a quimioterapia en cáncer de mama luminal.

A

PACIENTES NO TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA



B

PACIENTES TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA

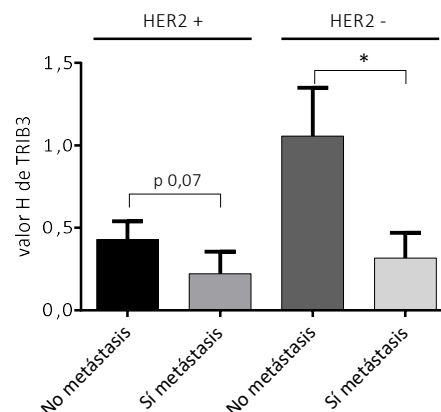


Figura 43. Niveles elevados de TRIB3 se correlacionan con una mejor respuesta a terapia tanto en pacientes con cáncer de mama HER2+ como HER2-. Relación entre los niveles de TRIB3 y el desarrollo de metástasis en función de la administración de quimioterapia y del subtipo HER2 positivo o negativo en muestras de un TMA de pacientes con cáncer de mama ER positivo. Los datos corresponden a la cuantificación del valor H de la expresión de TRIB3 en los tumores de las pacientes que no habían recibido quimioterapia (A) o que sí la habían recibido (B) y se expresan como la media $\pm$ SEM del valor H asignado a las muestras de las pacientes de cada una de las agrupaciones. Las pacientes se subdividieron en función de si habían desarrollado metástasis y de la expresión del oncogén HER2. (n(A)=32, n(B)=118; * $p < 0.05$ con respecto a las pacientes que no desarrollaron metástasis; utilizando la prueba T con corrección de Welch

DISCUSIÓN

TRIB3 puede ser un biomarcador de buen pronóstico en cáncer de mama luminal

El cáncer de mama es el tipo tumoral más frecuente en mujeres. Aunque en los últimos años se han producido numerosos avances en su clasificación, diagnóstico temprano y tratamiento que han contribuido a reducir la mortalidad asociada a este tipo tumoral, un gran número de pacientes presentan tumores agresivos que o bien no responden a la terapia o desarrollan resistencia a la misma. Además, el cáncer de mama es una patología muy heterogénea en la que la evolución clínica y el tratamiento de las pacientes depende del subtipo tumoral que a su vez se encuentra asociado a distintas características moleculares [5]. Así, se han definido varios subtipos intrínsecos de cáncer de mama que se basan sobre todo en los perfiles de expresión génica. Sin embargo, para la clasificación de las pacientes y la selección del tratamiento más adecuado en la clínica, se emplean fundamentalmente técnicas inmunohistoquímicas para analizar los niveles de los receptores hormonales (ER y PR), HER2, así como el grado de proliferación celular utilizando el marcador MKI67. Aproximadamente un 70% de los tumores de mama son de tipo luminal y se caracterizan por ser ER positivos y expresar una serie de proteínas características de células epiteliales luminales. Sin embargo, dentro de este subtipo mayoritario, encontramos también heterogeneidad entre los distintos tumores. Así, los tumores luminales pueden ser a su vez PR positivos o negativos, HER2 positivos o negativos y/o presentar una distinta tasa proliferativa. Por ello, dentro de los tumores luminales, se distinguen los subtipos A y B, presentando los tumores de tipo luminal A mejor pronóstico y siendo por lo general ER positivos, PR positivos, HER2 negativos y MKI67<14% [6, 12, 13]. En cualquier caso, existe bastante variabilidad en la asignación del subtipo A o B y esta subclasificación sigue englobando tumores heterogéneos [300]. Por lo tanto, resulta esencial profundizar en el conocimiento de las características genéticas, moleculares o histopatológicas de los distintos tipos de tumores mamarios. Esta estrategia permitirá entender mejor la biología molecular de esta patología, facilitando la identificación de nuevos biomarcadores de pronóstico y dianas terapéuticas que se asocien a alguno de estos subtipos de cáncer de mama y que contribuirán a un diagnóstico más certero, a precisar el riesgo de recurrencia y a implementar tratamientos individualizados más eficaces.

Las proteína quinasas tienen un papel esencial en los procesos de señalización celular. Así, su desregulación, bien como consecuencia de cambios en su expresión, en los mecanismos que controlan su actividad o mediante mutaciones estructurales, se ha asociado al desarrollo tumoral. Asimismo, cabe destacar que muchos miembros de esta familia de proteínas son potenciales dianas terapéuticas, existiendo más de 50 inhibidores de quinasas aprobados actualmente por la FDA [301]. Además de su función canónica de fosforilación de proteínas, se han descrito funciones no catalíticas para un gran número de proteína quinasas que también se han asociado a procesos tumorales [302-307]. Del mismo modo, diversos estudios indican que las pseudoquinasas, aunque carezcan de actividad catalítica, también pueden modular múltiples vías de señalización actuando como reguladores alostéricos o proteínas de andamiaje, y su desregulación también se ha relacionado con el cáncer [140, 167]. En este contexto, destacan las proteínas Tribbles, y en concreto TRIB3, pues diversos trabajos han relacionado esta proteína con procesos de supervivencia, proliferación, migración, invasión, capacidad de autorrenovación celular y, en definitiva, con el desarrollo tumoral [159, 209, 224-226]. Sin embargo, el papel de TRIB3 en cáncer de mama y concretamente en el de tipo luminal, a pesar de ser el subtipo más frecuente, ha sido poco estudiado y la bibliografía existente presenta ciertas discrepancias.

En esta tesis doctoral se ha abordado el análisis del papel de TRIB3 en diferentes aspectos del desarrollo y progresión del cáncer de mama de tipo luminal, utilizando para ello diversos modelos celulares y una amplia cohorte de pacientes con esta patología. De este modo, un análisis detallado

de los niveles proteicos de TRIB3 en un *microarray* de tejido, generado a partir de muestras de tumores de pacientes de cáncer de mama ER positivo, recopiladas en el Hospital Universitario de Donostia y en el Instituto Oncológico Onkologikoa, reveló que niveles elevados de TRIB3 se asocian tanto con una mayor supervivencia libre de enfermedad como con una menor incidencia de metástasis. Estos datos ponen de manifiesto un posible valor pronóstico de la inmunodetección de TRIB3 en muestras de cáncer de mama luminal. Dado que la mayoría de las pacientes que forman la cohorte del TMA analizado recibieron tratamiento tras la cirugía (hormonoterapia, quimioterapia y/o radioterapia), estos resultados podrían indicar asimismo que TRIB3 podría funcionar como un biomarcador de respuesta a terapia (**Fig. 44**). Un único artículo publicado hasta la fecha analiza los niveles de TRIB3 a nivel de proteína en muestras de pacientes de cáncer de mama [265]. En este caso, las pacientes no eran solo de cáncer de mama luminal, sino que se trataba de 120 pacientes con representación de los distintos subtipos tumorales mamarios y donde solo el 60% de las pacientes recibirían tratamiento, concretamente, radioterapia. En este caso, los niveles elevados de TRIB3 también se relacionaban con una mayor supervivencia libre de enfermedad, sugiriendo que el papel pronóstico de TRIB3 podría ir más allá de los tumores luminales y de su relación con el tratamiento recibido. Cabe destacar que la correlación de los niveles de TRIB3 con la menor incidencia de metástasis es de extraordinaria importancia a la hora de asignar un potencial papel como biomarcador a esta proteína dado que la formación de tumores secundarios es la principal causa de muerte asociada al cáncer de mama. Adicionalmente, sería relevante realizar estudios similares en muestras recogidas en la actualidad. Las muestras analizadas en esta tesis fueron en su mayoría recopiladas entre los años 2000 y 2006 y los regímenes de tratamiento han cambiado desde entonces.

Por otro lado, la mayoría de los estudios que tratan de identificar biomarcadores se han centrado en el cáncer de mama triple negativo o enriquecido en HER2 por considerar que estas pacientes presentarían un peor pronóstico. Sin embargo, trabajos recientes señalan que el riesgo de recurrencia a largo plazo podría resultar equivalente para todos los subtipos debido fundamentalmente a las distintas aproximaciones terapéuticas utilizadas para cada uno de ellos [308-310]. Es por tanto fundamental definir biomarcadores adicionales para estratificar las pacientes y administrar la terapia más adecuada en cada caso. En este sentido, la búsqueda de nuevos marcadores para el subtipo luminal cobra una extraordinaria relevancia dado que es el mayoritario.

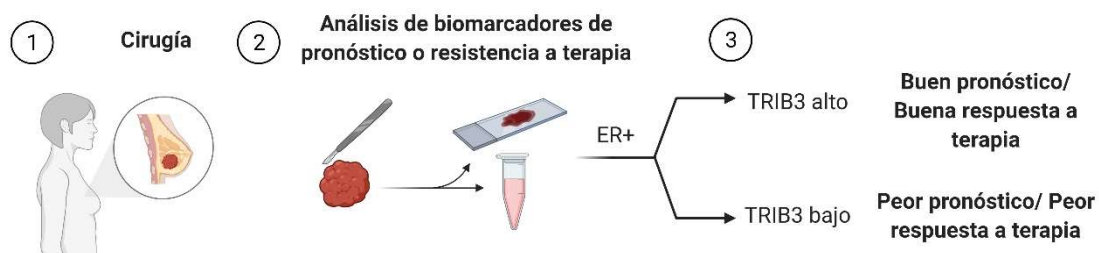


Figura 44. El análisis de TRIB3 en los tumores ER+ podría predecir el pronóstico de las pacientes de cáncer de mama. La toma de muestra tumoral tras la cirugía para el análisis de marcadores como ER, PR, HER2 o MKI67 podría ser combinada con el estudio de marcadores adicionales como TRIB3 que ayuden a predecir el pronóstico de las pacientes.

Cabe destacar que los datos obtenidos en este estudio contrastan con los de otros trabajos que muestran una relación negativa entre los niveles de mRNA de TRIB3 y el pronóstico de las pacientes de cáncer de mama [264, 281]. Sin embargo, esta discrepancia podría deberse a la falta de correlación entre los niveles de mRNA y proteína de TRIB3 [265]. Esta discordancia ya ha sido descrita para otros genes y, de hecho, en términos generales, los niveles de mRNA solo explican alrededor

del 40% de la variabilidad observada en los niveles de proteínas [311, 312]. Esto puede deberse a diversos eventos que afectan a la traducción como la presencia de miRNAs, la existencia de algunas variantes de procesamiento alternativo, así como a modificaciones postraduccionales o interacciones con otras proteínas que modulen la estabilidad proteica [311, 312]. En cualquier caso, nuestros datos apoyan la idea de que los niveles proteicos de TRIB3 constituyen un buen biomarcador de buen pronóstico en cáncer de mama luminal.

El mecanismo de acción de TRIB3 podría depender del contexto molecular

Para profundizar en el mecanismo por el que TRIB3 puede estar implicado en el desarrollo y progresión tumoral, empleamos líneas celulares de cáncer de mama luminal donde silenciemos o sobreexpresamos TRIB3. Sorprendentemente, los resultados presentados en este trabajo indican que TRIB3 podría tener un papel dual en líneas de cáncer de mama luminal con características moleculares diferentes, observándose en este caso un fenotipo opuesto en las líneas celulares HER2 positivas respecto a las HER2 negativas. Así, en modelos celulares de cáncer de mama luminal HER2 positivo, el silenciamiento de TRIB3 supone: (i) un incremento en los niveles de HER2, (ii) una mayor activación de la vía PI3K/AKT, y (iii) una mayor actividad de RAC1, lo cual se asocia, en definitiva, a una mayor proliferación, migración e invasión de las células tumorales (**Fig. 45**). Estos datos concuerdan con un experimento previo en el que se inyectaron células BT474 (ER positivas, PR positivas, HER2 positivas) en el flanco de ratones inmunodeficientes donde se comprobó que los tumores generados con las células donde TRIB3 se había inhibido genéticamente, aparecieron antes, crecieron más rápido y alcanzaron tamaños mayores [192]. Además, el análisis de estos tumores mostró un mayor índice de proliferación asociado a una mayor fosforilación de AKT [192]. Adicionalmente, en esta tesis doctoral hemos comprobado que estos tumores también estaban más vascularizados y presentaban cambios en proteínas relacionadas con EMT. En conjunto, estos resultados indican que TRIB3 tiene un papel supresor tumoral en este subtipo celular HER2 positivo de cáncer de mama. Por el contrario, el silenciamiento de TRIB3 en líneas de cáncer de mama luminal HER2 negativo, se asocia a: (i) una menor actividad de la vía PI3K/AKT y (ii) una menor actividad de RAC1, lo cual concuerda con la menor supervivencia, proliferación, capacidad migratoria e invasiva de estas células (**Fig. 45**).

Si bien este papel dual de TRIB3 en la regulación de la señalización tumorigénica de líneas de cáncer de mama luminal es novedosa, previamente ya se había descrito que TRIB3 puede regular de manera dual otros procesos. Por ejemplo, Kiss-Toth *et al.* describieron que TRIB3 puede actuar como activador de la vía de las MAPK pero que el aumento de los niveles de la pseudoquinasa puede producir el efecto contrario [188]. Por otro lado, Shimizu *et al.*, mostraron también un papel dual de TRIB3 en la muerte celular mediada por caspasas. Así, ante una inducción leve de la apoptosis, se induce la expresión de TRIB3 lo que promueve la translocación de pro-caspasa 3 al núcleo evitando así la muerte celular. Por el contrario, ante un estímulo más fuerte de apoptosis la caspasa 3 se activa ejecutando un corte proteolítico en TRIB3 en el residuo Asp338. Esta variante truncada de TRIB3 promueve la hiperactivación de las caspasas 3 y 7 y, en consecuencia, la apoptosis [313].

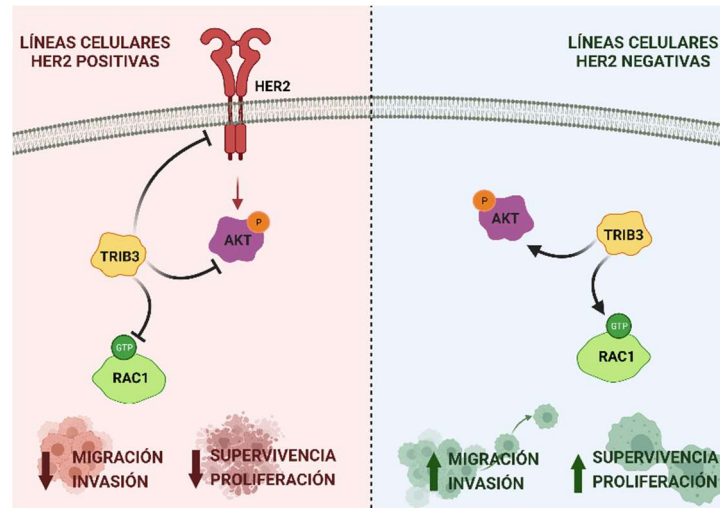


Figura 45. Esquema representativo de la función de TRIB3 en cáncer de mama luminal HER2+ o HER2-. Se muestra esquemáticamente los resultados obtenidos acerca del papel de TRIB3 en cáncer de mama luminal HER2 positivo (*imagen izquierda*) y HER2 negativo (*imagen derecha*). (*Imagen izquierda*) TRIB3 reduce los niveles de HER2, inhibe la fosforilación de AKT e inhibe la actividad de RAC1, regulando negativamente procesos de supervivencia, proliferación, migración e invasión celular. (*Imagen derecha*) En un contexto HER2 negativo, TRIB3 promueve la fosforilación de AKT y actividad de RAC1 promoviendo la supervivencia, proliferación, migración e invasión celular.

Estos resultados *a priori* se contraponen con los datos obtenidos en muestras de pacientes, donde una mayor expresión de TRIB3 se asocia a un mejor pronóstico y menor incidencia de metástasis independientemente de la expresión de HER2, y sugieren que el papel de esta pseudoquinasa en la regulación de la señalización oncogénica en cáncer de mama luminal podría depender de las alteraciones moleculares presentes en esas células. En cualquier caso, los datos derivados de las muestras de pacientes, que en su mayoría provenían de tumores HER2 negativos, indican que en el contexto del desarrollo y, sobre todo de la progresión tumoral, TRIB3 desempeñaría prioritariamente un papel oncosupresor.

Una posible explicación a estas observaciones potencialmente contradictorias es que los modelos celulares de cáncer de mama luminal HER2 negativos utilizados en este trabajo no sean completamente representativos de la situación que tendría lugar en una paciente. Sin embargo, nuestros datos concuerdan con un trabajo anterior donde se comprobó que el silenciamiento de TRIB3 en la línea celular HER2 negativa MCF7 suponía una menor formación de mamóferas *in vitro* y menor formación, crecimiento tumoral y generación de metástasis *in vivo* [281]. En cualquier caso, estos modelos sí nos han permitido estudiar el papel de TRIB3 en la regulación de las vías de señalización que se encuentran activadas en células de cáncer luminal en presencia de distintas alteraciones genéticas y ponen de manifiesto que TRIB3 puede modular de manera opuesta la señalización oncogénica. Por otra parte, no se puede descartar que TRIB3 pueda regular la tumorigénesis a otros niveles. Por ejemplo, en una serie de experimentos piloto desarrollados para analizar el impacto de la modulación genética de TRIB3 en células de cáncer de mama luminal, encontramos que las células MCF7 shTRIB3, a pesar de presentar una tasa proliferativa menor que las de las correspondientes células shC, pueden continuar proliferando en condiciones adversas de restricción de nutrientes (al ser cultivadas en medio sin suero, sin glutamina y con baja concentración de glucosa, **Fig. 46A**). Además, estas células presentan un metabolismo más quiescente (con valores reducidos de OCR y ECAR; **Fig. 46B**), lo cual también podría relacionarse con la adquisición de un fenotipo característico de células madre dentro de la población tumoral [314]. De este modo, una menor expresión de TRIB3 podría relacionarse con el peor pronóstico observado en el análisis de las pacientes con cáncer de mama luminal HER2 negativo a través de diferentes mecanismos, incluyendo adaptaciones metabólicas que podrían contribuir a potenciar la progresión tumoral. En

cualquier caso, habría que profundizar en estos aspectos para conocer si este fenotipo diferencial se debe exclusivamente a la expresión de HER2 o si está relacionado con otros factores como son los bajos niveles de TRIB3 presentes en estas células o la mayor activación de vías de señalización relacionadas con el oncogén HER2 como es la vía de PI3K/AKT en el subtipo HER2 positivo.

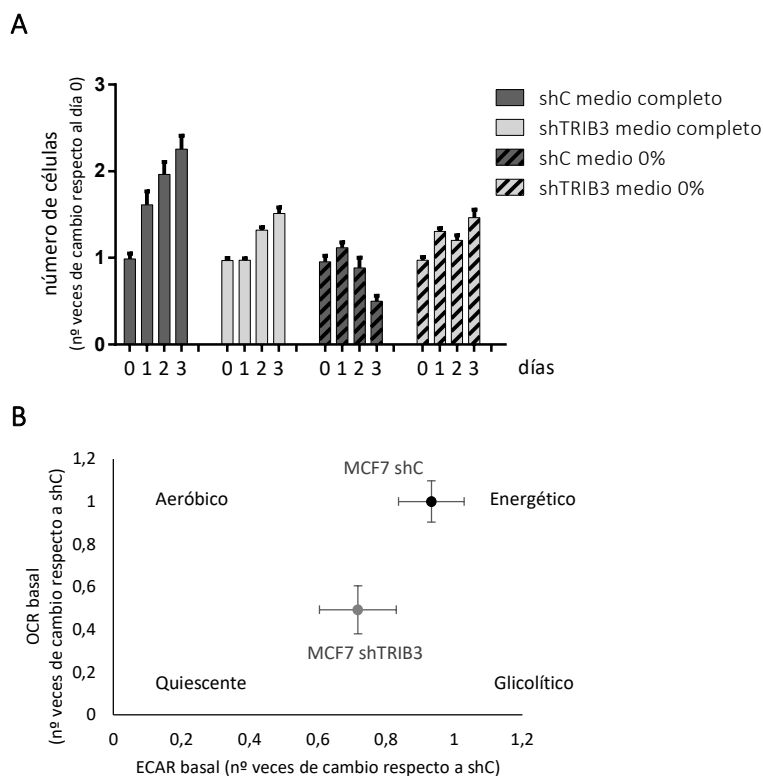


Figura 46. Las células MCF7 shTRIB3 son más resistentes a condiciones restrictivas de nutrientes y presentan un metabolismo más quiescente. (A) Las células MCF7 shC y shTRIB3 fueron cultivadas en su medio habitual (medio completo) o en medio sin suero, sin glutamina y con baja glucosa (medio 0%). Se muestra la cuantificación del número de células en cada día $\pm$ SEM respecto al día 0 (día siguiente a la siembra) para cada caso ($n=2$ experimentos independientes con triplicados en cada caso). (B) Representación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) respecto al ratio de acidificación extracelular (ECAR) de las células MCF7 shC y shTRIB3 analizado mediante la prueba de mito stress empleando Agilent Seahorse XF Cell ($n=3$).

Existe una regulación cruzada entre TRIB3 y HER2

En esta tesis, hemos identificado la existencia de una regulación cruzada entre TRIB3 y HER2. Así, por un lado, tanto en muestras de pacientes como en cultivos celulares hemos identificado una correlación positiva entre los niveles de TRIB3 y HER2 tanto a nivel de mRNA como de proteína. En línea con estos resultados, encontramos que los niveles proteicos de TRIB3 son modulados positivamente por HER2 en líneas de cáncer de mama luminal. Estos datos concuerdan con estudios previos donde se había demostrado que la activación de PI3K, mediador de la acción del receptor HER2, inducía la expresión de TRIB3 [60, 186]. Por otro lado, también encontramos que el silenciamiento de TRIB3 produce un aumento en los niveles de HER2 sugiriendo que existe un control recíproco entre ambas proteínas.

Con el fin de profundizar en el estudio de los mecanismos responsables del papel dual de TRIB3 en la regulación de las características de las células de cáncer de mama luminal HER2 positivas y HER2 negativas, nos propusimos analizar los interactores de TRIB3 en dichas células mediante un análisis proteómico. Para ello, desarrollamos un primer experimento piloto en colaboración con el grupo de Eric Kalkhoven de la Universidad de Utrecht (Países Bajos). En dicho experimento transfectamos células MCF7 y BT474 con una construcción que permitía expresar TRIB3-GFP y

realizamos una inmunoprecipitación empleando un anticuerpo contra GFP acoplado a partículas de agarosa. A continuación, se llevó a cabo la caracterización mediante espectrometría de masas de las proteínas que coprecipitaron con TRIB3. Aunque se trata de un primer experimento y no pudimos realizar una comparativa entre ambas líneas celulares, lo que sí nos permitió es obtener resultados interesantes acerca de posibles interactores de TRIB3. Así, identificamos interactores ya conocidos de TRIB3 como COP1, lo que confirmó la validez de la aproximación experimental utilizada. Además, también identificamos otras proteínas cuya interacción con TRIB3 no había sido descrita con anterioridad y que potencialmente podrían desempeñar una función relevante en el mecanismo de acción de esta pseudoquinasa. Entre ellos, destaca la E3 ubiquitín-ligasa proteína que contiene *U-box* y homóloga a STIP1 (STUB1).

Uno de los mecanismos de regulación de la funcionalidad del receptor HER2 es el control de su estabilidad. HER2 es un receptor estable y resistente a la internalización y degradación en comparación con otros receptores de la misma familia como EGFR [315]. El mecanismo que determina esa estabilidad no ha sido muy estudiado, pero se ha descrito que la E3 ubiquitín-ligasa STUB1 está implicada en su poliubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma [316]. STUB1 es una cochaperona E3 ubiquitín-ligasa de tipo *U-box* con numerosos sustratos conocidos y cuya función es regulada tanto por modificaciones postraduccionales como por la interacción con distintas proteínas [317]. En este trabajo, hemos demostrado que la deficiencia de TRIB3 supone un incremento en la estabilidad y, en consecuencia, en los niveles de HER2, lo que se traduce en un incremento en la proliferación tumoral. Teniendo en cuenta que TRIB3 regula la estabilidad y degradación de diversas proteínas mediante la interacción con E3 ubiquitín-ligasas a través de su extremo carboxilo terminal, y que los experimentos de proteómica habían identificado a STUB1 como un posible interactor de TRIB3, postulamos que STUB1 podría mediar la regulación de HER2 por parte de TRIB3. Con el fin de comprobar esta hipótesis desarrollamos un experimento de coinmunoprecipitación de TRIB3 y STUB1 en células BT474 que confirmó la existencia de una interacción entre ambas proteínas en estas células (**Fig. 47**). Aunque las restricciones de tiempo no han permitido realizar experimentos adicionales creemos que se trata de una observación interesante que nos proponemos investigar en mayor profundidad en el futuro.

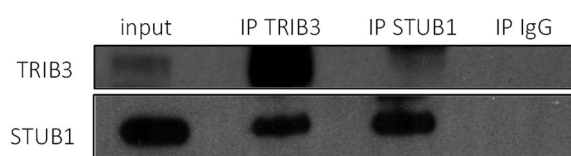


Figura 47. TRIB3 y STUB1 coinmunoprecipitan en BT474. Las células BT474 fueron lisadas y sometidas a inmunoprecipitación (IP) empleando el anticuerpo de TRIB3 (IP TRIB3), el anticuerpo de STUB1 (IP STUB1) y un anticuerpo inespecífico (IP IgG). La cantidad de TRIB3 y STUB1 precipitada se determinó mediante WB. El input indica la cantidad de proteína en el lisado total. Se muestra una imagen representativa (n=2).

Tomados de manera conjunta, nuestros datos indican que existe una regulación funcional compleja y recíproca entre el receptor HER2 y TRIB3 que podría desempeñar un papel relevante en la patología del cáncer de mama.

TRIB3 modula la fosforilación de AKT mediada por MTORC2

Una vía de regulación de extraordinaria importancia en el cáncer es la vía PI3K/AKT. En esta tesis se demuestra que gran parte de la implicación de TRIB3 en el desarrollo del cáncer de mama se debe a la regulación de la vía de AKT y proponemos que la función opuesta de esta pseudoquinasa en líneas celulares HER2 positivas y HER2 negativas podría estar relacionada con una interacción diferencial con las isoformas de AKT. En este sentido, a pesar de que las tres isoformas de AKT presentan en torno a un 80% de similitud de secuencia, desempeñan funciones no redundantes e

incluso, en ocasiones, opuestas [318, 319]. Aun así, de los más de 100 sustratos descritos para estas proteínas, no se ha estudiado en detalle si existe especificidad respecto a la capacidad de interaccionar y/o ser regulados de manera diferencial por cada isoforma [320]. Los datos obtenidos en esta tesis doctoral apoyan la idea de que la interacción de TRIB3 con las distintas isoformas de AKT puede ser diferente según el contexto celular. Así, nuestros resultados indican que TRIB3 y AKT3 interaccionan en la línea celular MCF7 (HER2 negativa) pero no en BT474 (HER2 positiva), mientras que la interacción con AKT1 y AKT2 puede tener lugar en ambos contextos celulares. Si bien sería necesario comprobar la abundancia de cada isoforma en el contexto celular empleado, y comprobar estas interacciones con las formas endógenas de TRIB3 y AKT1/2/3, estas observaciones sugieren que el interactoma de TRIB3 y con ello la función desempeñada por esta pseudoquinasa en la regulación del eje PI3K/AKT podría ser diferente en distintos contextos genéticos. Hay que tener en cuenta que diversos estudios han demostrado un papel relevante de cada una de las tres isoformas de AKT en cáncer de mama [319]. Así, en términos generales, se ha propuesto que AKT1 promueve el desarrollo tumoral a través de la regulación de la proliferación celular y la entrada en el ciclo celular, así como mediante la inhibición de la apoptosis [321-324]. Sin embargo, su papel en eventos de migración es contradictorio, con estudios que demuestran un papel inhibitorio de los procesos de EMT, migración y metástasis [22-24], que contrastan con otros que describen un incremento en la secreción de factores promigratorios y un incremento en la expresión de la metalopeptidasa de la matriz 2 (MMP2) [25, 26]. Con respecto a AKT2, su papel en la regulación del cáncer de mama es menos claro [321-326], aunque en este caso, sí parece tener un papel importante en la regulación de la migración e invasión, promoviendo dichos procesos y, en definitiva, la metástasis [321, 327, 328]. El papel de AKT3 ha sido menos estudiado, pero se ha relacionado con el crecimiento independiente de estrógenos y con un incremento en la proliferación celular a través de la inhibición de CDKN1A, CDKN1B y TP53 así como de la regulación positiva de la ciclina D1 y BCL2 [324, 329-332]. Además, también existen discrepancias acerca del papel desempeñado por esta isoforma de AKT en la regulación de los procesos invasivos [330, 333]. Por último, se ha descrito una variante de AKT3 que carece de la serina 472, y por tanto no puede ser fosforilada en este residuo, que parece presentar un papel supresor tumoral [334]. Teniendo en cuenta que presentan funciones diferenciales, la interacción e inhibición (o activación) de las distintas isoformas de AKT por parte de TRIB3 podría tener una repercusión diferente en el fenotipo y, en definitiva, en el desarrollo tumoral.

Más allá de la fosforilación de AKT por MTORC2 y PDPK1, son numerosos los mecanismos adicionales y proteínas implicadas en la regulación de esta quinasa [75]. En este trabajo, en concordancia con estudios previos, hemos descrito que TRIB3 regula la fosforilación de AKT en S473 [192, 210-212]. Si bien no observamos cambios en la fosforilación de AKT en T308, se ha propuesto previamente que la fosforilación en S473 es necesaria para la regulación de algunas de sus dianas, como FOXO, pero no para otras como GSK3 o TSC2, donde solo sería necesaria la fosforilación en T308 [296]. Así, TRIB3 podría estar modulando la especificidad de sustrato de AKT al regular específicamente la fosforilación de AKT por MTORC2. Concretamente, hemos demostrado que TRIB3 puede inhibir la fosforilación de AKT por MTORC2 en experimentos *in vitro*. Sin embargo, en los experimentos realizados en líneas celulares de cáncer de mama luminal, comprobamos que en función del contexto tumoral, TRIB3 modula de forma dual la fosforilación de AKT en S473 y su consecuente activación. En este sentido, nos planteamos tres hipótesis principales que pudieran justificar esta regulación diferencial de AKT por TRIB3: (i) que existan diferencias en la interacción entre TRIB3 y AKT con otras proteínas que se unan a la plataforma de señalización y que regulen la activación de AKT, (ii) que sea causado por diferencias que afecten directamente a la proteína de TRIB3 en términos de secuencia o conformacionales, o (iii) que se trate de una regulación indirecta de AKT por parte de TRIB3.

Atendiendo a la primera hipótesis, se han descrito múltiples interactores de TRIB3. Entre ellos, factores de transcripción, proteínas quinasas o E3 ubiquitín-ligasas [225], proteínas que, dependiendo del contexto celular, podrían determinar el papel de TRIB3 y con ello su capacidad para regular a AKT (**Fig. 49**). Además, puede existir una competición entre TRIB3 y otras proteínas que interactúen con AKT. Por ejemplo, en el hígado, se ha descrito que la proteína adaptadora fosfotirosina que interactúa con el dominio PH y la cremallera de leucina (APPL1) compite con TRIB3 por unirse a AKT promoviendo su translocación a la membrana plasmática y con ello su activación [335]. Así, sería interesante estudiar qué dominios de TRIB3 y AKT participan en esta interacción y determinar utilizando modelos tridimensionales, en qué medida la interacción entre ellas permite la unión de otras proteínas a la plataforma de señalización que regula la actividad de AKT. En este sentido, Yu *et al.* modelizaron la interacción y mediante el empleo de mutantes determinaron que los aminoácidos 149-278 en el dominio catalítico de AKT y el dominio C terminal de TRIB3 son los implicados en la interacción entre TRIB3 y AKT1 y, más aún, desarrollaron un péptido que interfiere con la interacción entre TRIB3 y AKT1 [281]. Sería interesante comprobar si dicho péptido también impide la interacción de TRIB3 con AKT2 o AKT3. Además, el empleo de estas u otras aproximaciones similares permitiría profundizar en el efecto de dicha interacción en el fenotipo observado en nuestro estudio.

Cabe destacar también el posible papel de las otras proteínas Tribbles, pues se ha demostrado que pueden interactuar entre sí e incluso competir entre ellas. Concretamente, mediante experimentos de complementación de proteínas, se determinó que las tres proteínas Tribbles pueden interactuar con MAP2Ks y que esta interacción puede ser desplazada por la presencia de las otras isoformas Tribbles, así como por las MAPKs (concretamente ERK desplazaría a las proteínas Tribbles en su interacción con MAP2K1) [171]. Además, también se ha descrito que TRIB2 favorece la fosforilación de AKT [205] y por tanto, podría ser relevante el estudio de la interrelación entre TRIB2 y TRIB3 con AKT en el contexto de cáncer de mama.

Respecto a las diferencias en la proteína, se ha descrito un polimorfismo de *TRIB3* que genera una proteína en la que la Gln en posición 84 de TRIB3 es sustituida por una Arg (variante Q84R). Esta sustitución produce una alteración en la capacidad de establecer puentes salinos que favorece su interacción con AKT [336]. No obstante, aunque no hemos analizado la presencia de polimorfismos de TRIB3 en los modelos utilizados, dado que en nuestros experimentos de sobreexpresión de TRIB3, el plásmido utilizado para transfectar las líneas de cáncer de mama HER2 positivas y HER2 negativas fue el mismo y carecía de dicha mutación, es poco probable que esta u otras mutaciones sean las responsables de las diferencias observadas. Sin embargo, lo que sí que podría dar lugar a una regulación diferencial de AKT por parte de TRIB3 es la existencia de distintas modificaciones postraduccionales que pudiesen afectar a la pseudokinasa favoreciendo la adquisición de diferentes conformaciones y con ello modulando su capacidad para interactuar con distintas proteínas (**Fig. 49**). De hecho, experimentos preliminares desarrollados durante esta tesis doctoral indican que TRIB3 se puede ubiquitinar y sumoilar. Además, trabajos previos mostraron que también se puede acetilar [242], metilar [243] y fosforilar [241]. En este caso, profundizamos en el estudio de la ubiquitinación de TRIB3. Concretamente, para comprobar si TRIB3 puede ubiquitinarse, realizamos experimentos en los que transfectamos las células con TRIB3 y una forma de ubiquitina marcada con 6 histidinas. En este modelo, utilizamos un protocolo de precipitación con agarosa unida a níquel para la precipitación de la ubiquitina marcada y posterior análisis de las proteínas ubiquitinadas. De este modo, comprobamos que TRIB3 se puede ubiquitinar tanto en células BT474 como en células MCF7 (**Fig. 48A**). En términos generales, las modificaciones que implican la formación de cadenas de ubiquitina a través de su Lys48 promueven la degradación proteasomal de la proteína diana, mientras que las modificaciones que implican la Lys63 regulan la acción de la proteína en términos

de localización subcelular, de interacción con otras proteínas o incluso de su actividad [337]. Para estudiar si la ubiquitinación de TRIB3 es reguladora o degradativa, realizamos experimentos idénticos a los anteriores utilizando unas variantes de ubiquitina en las que la Lys48 o la Lys63 habían sido sustituidas por Arg (K48R y K63R respectivamente). Como se observa en la **figura 48B**, las mutaciones K48R o K63R no eliminan la ubiquitinación de TRIB3, sugiriendo que, o bien las cadenas de poliubiquitina no se construyen sobre estas lisinas o bien que dichas cadenas se construyen también sobre otras lisinas de la ubiquitina. Para comprobarlo, utilizamos un mutante de ubiquitina donde todas las Lys fueron sustituidas por Arg (mutante 7KR) así como otros derivados de este que mantenían únicamente la Lys48 (7KR R48K) o la Lys63 (7KR R63K). Al utilizar estos mutantes observamos que, aunque en menor medida para el caso de 7KR R48K, TRIB3 también se podía ubiquitinar, lo cual indica que la pseudokinasa se puede modificar con cadenas de ubiquitina que implican tanto a la Lys48 como a la Lys63. De este modo, TRIB3 puede sufrir una ubiquitinación tanto degradativa como reguladora y por tanto su acción sí podría estar modulada por esta modificación postraduccional. Sin embargo, serían necesarios más estudios para concretar su relevancia en el desarrollo y progresión del cáncer de mama.

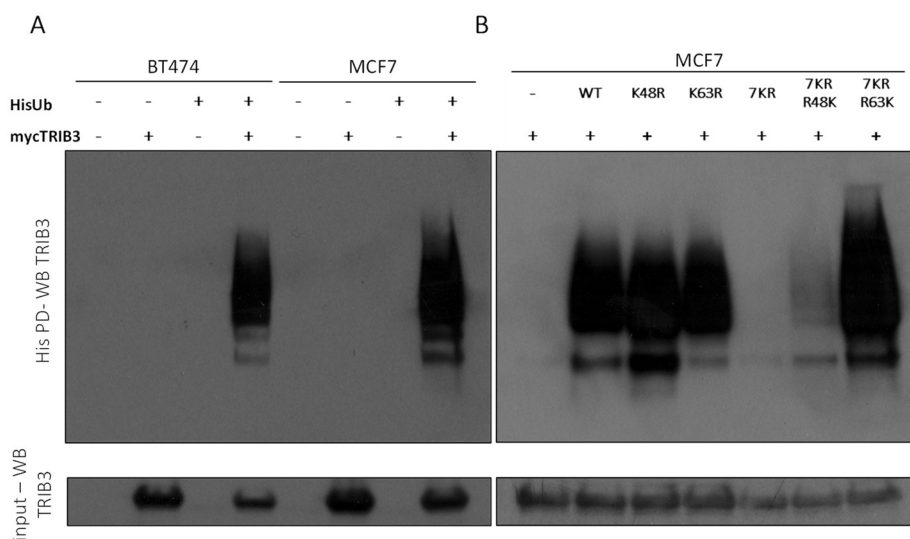


Figura 48. TRIB3 puede modificarse por ubiquitinación mediada tanto por la Lys48 como por la Lys63. Las células BT474 y MCF7 transfectadas con myc-TRIB3 (+) o el vector vacío como control (-) y 6His-ubiquitina (HisUb; +, WT), 6His-ubiquitina con las lisinas correspondientes mutadas (K48R, K63R, 7KR, 7KR R48K o 7KR R63K) o el vector vacío como control (-), fueron lisadas y sometidas a precipitación con resina de agarosa unida a níquel/NTA (His pull down, His-PD). La cantidad de TRIB3 precipitada se determinó por WB. El input indica la cantidad de proteína en el lisado total. Se muestra una imagen representativa de los WB (n=2).

Por último, aunque las células HER2 negativas deficientes en TRIB3 presenten menores niveles de AKT fosforilada, desconocemos si esta situación viene causada por la interacción directa observada entre estas dos proteínas o podría tratarse de una regulación indirecta (**Fig. 49**). En este sentido, datos preliminares no mostrados indican que las células MCF7 shTRIB3 presentan niveles incrementados de la fosfatasa PTEN, lo que podría justificar la menor fosforilación de AKT. Más aún, estos niveles incrementados de PTEN podrían deberse a una regulación indirecta a través de otros factores. Por ejemplo, podría tratarse de una regulación indirecta mediada por PPAR γ , ya que resultados preliminares en MCF7 (no mostrados) y trabajos previos en otros contextos tumorales indican que TRIB3 puede inhibir PPAR γ [177] y, en consecuencia, modular al alza los niveles de esta fosfatasa [338, 339].

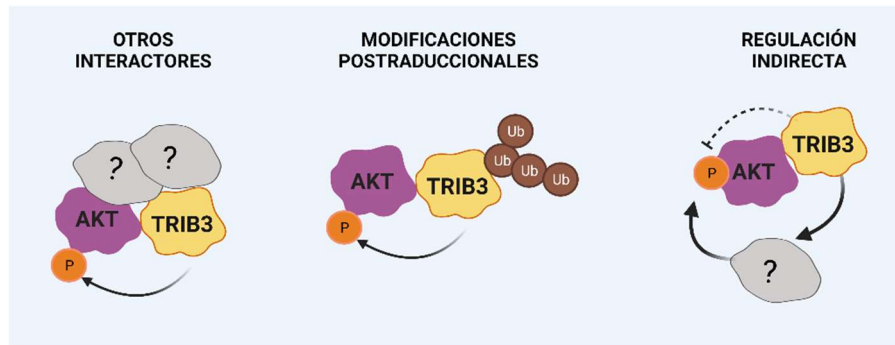


Figura 49. Hipótesis sobre la regulación diferencial de AKT por TRIB3 en líneas celulares HER2 negativas. En las líneas celulares HER2 negativas observamos una mayor fosforilación de AKT inducida por TRIB3 que se contrapone con los resultados *in vitro*, en los que la fosforilación de AKT por MTORC2 es inhibida por TRIB3. Planteamos tres escenarios: (i) la interacción con otras proteínas modula la regulación de AKT por TRIB3 favoreciendo su fosforilación, (ii) modificaciones postraduccionales de TRIB3 modifican la interacción con AKT favoreciendo en este caso su fosforilación, o (iii) aunque TRIB3 pudiera inhibir la fosforilación de AKT, observamos un incremento de esta debido a una regulación indirecta a través de otras vías de señalización.

TRIB3 regula la capacidad migratoria e invasiva de células de cáncer de mama.

Varios trabajos han demostrado la implicación de TRIB3 en la regulación de los procesos de migración e invasión en diversos tipos tumorales. En la línea celular HepG2 de carcinoma hepático se ha comprobado que TRIB3 regula la migración e invasión a través de la regulación de SMAD3 [189], mientras que en otros tipos tumorales como el cáncer colorrectal, de pulmón o glioma promueve la migración e invasión a través de la interacción y activación de β -catenina [267, 340, 341]. Por el contrario, en cáncer de endometrio se ha demostrado que TRIB3 disminuye la capacidad migratoria e invasiva e inhibe la expresión de las metaloproteinasas MMP2 y MMP9 [210].

En este trabajo, estudiamos el papel de TRIB3 en procesos de migración, invasión y metástasis y comprobamos que, en las muestras de pacientes, elevados niveles de TRIB3, tanto en el tumor primario como en tumores secundarios en las áreas ganglionares, se relacionan con una menor incidencia de metástasis. En los experimentos llevados a cabo con la línea celular BT474 observamos que el silenciamiento de TRIB3 incrementa la migración e invasión *in vitro* y además promueve cambios tanto *in vitro* como *in vivo* en la expresión de E-cadherina y vimentina, proteínas asociadas a procesos de transición epitelio-mesénquima. Además, los tumores generados con las células deficientes en TRIB3 están más vascularizados, lo cual también podría favorecer la diseminación de las células desde el tumor primario y el establecimiento de metástasis. Aunque los experimentos para estudiar *in vivo* la influencia de la inhibición genética de TRIB3 en la capacidad de las células para colonizar otros tejidos como parte de un proceso metastásico han sido incompletos y solo en dos de los animales analizados observamos células neoplásicas al inyectar la línea celular BT474, sí parece haber una ligera diferencia entre los ratones donde se habían inyectado células shTRIB3 y células control, presentando los primeros más alteraciones hepáticas. El esclarecimiento del papel de TRIB3 en el desarrollo de metástasis requerirá el desarrollo de experimentos adicionales, por ejemplo en los que se deje transcurrir un tiempo más prolongado entre la inyección de las células tumorales y el análisis de los animales. Por otro lado es posible que el efecto de TRIB3 en la regulación del proceso metastático requiera la utilización de células con una mayor capacidad invasiva. En línea con esta idea, desarrollamos un experimento piloto empleando la línea celular 231-HER2-LM4 donde comprobamos que las células shTRIB3 generaron más lesiones pulmonares, lo cual apoya la idea de que TRIB3 también podría regular la capacidad de colonización. Sin embargo, este efecto podría depender del tipo de alteraciones moleculares presentes y por tanto del contexto celular. En ese sentido, experimentos llevados a cabo con la línea celular MCF7, revelaron un papel opuesto de TRIB3, pues, a pesar de tratarse de una línea celular de por sí con una baja capacidad invasiva, el

silenciamiento de esta proteína disminuyó las capacidades migratoria e invasiva de estas células apoyando de nuevo la idea de que el contexto genético es relevante a la hora de determinar el papel de TRIB3 en las células tumorales.

En esta tesis doctoral, para profundizar en los mecanismos que subyacen a la modulación de la migración, invasión y metástasis promovida por TRIB3 en cáncer de mama, se ha evaluado, además de los marcadores de EMT, el posible papel de RAC1, una de las proteínas más relevantes en la adquisición del fenotipo invasivo por las células tumorales [298, 342]. Los resultados demuestran que TRIB3 puede regular también la actividad de RAC1 y que esta modulación es contraria en las líneas celulares de cáncer de mama BT474 (HER2 positivo) y MCF7 (HER2 negativo). Además, hemos verificado que TRIB3 y RAC1 interactúan *in vitro*. No obstante, haría falta profundizar en este aspecto para conocer si la interacción también ocurre *in vivo* y estudiar el mecanismo por el que regula su actividad, tanto en los contextos en los que la activa como en los que la inhibe, y si se debe a una interacción directa de ambas proteínas o a una modulación indirecta. Más aún, se ha descrito una regulación cruzada entre AKT y RAC1 pues, se ha demostrado que RAC1 promueve la activación tanto de MTORC1 y MTORC2 [343] como de AKT [344, 345] y que AKT también induce la activación de RAC1 a través de la regulación del RAC-GEF TIAM1 [346]. Por otro lado, dentro de la familia de las RhoGTPasas, tres isoformas cobran mayor importancia en la regulación de procesos migratorios: RhoA, relacionada con fibras de estrés, CDC42, implicada en la formación de filopodios, y RAC1, que participa en la formación de lamelipodios [347, 348]. En este contexto, cabe destacar que en un experimento de proteómica realizado por Stefanovska et al., se identificó a CDC42 como uno de los múltiples interactores de TRIB3 [280]. Por tanto, es posible que TRIB3 no solo esté interactuando y regulando a RAC1 sino también otras proteínas de la misma familia, situación que también podría tener relevancia en el desarrollo del cáncer de mama.

Para profundizar en la implicación de TRIB3 en los procesos metastásicos, podría resultar relevante analizar los niveles de TRIB3 también en las metástasis distales. Además, podría ser interesante el estudio no solo de los niveles de TRIB3 *per se* sino de cómo varían estos niveles a medida que evoluciona la patología. En este sentido, observamos un incremento en los niveles de TRIB3 en el ganglio respecto al tumor en aquellas pacientes que no desarrollaron metástasis, mientras que en las pacientes que padecieron metástasis por lo general presentaron una pérdida de TRIB3 en el tumor secundario ganglionar respecto al tumor primario.

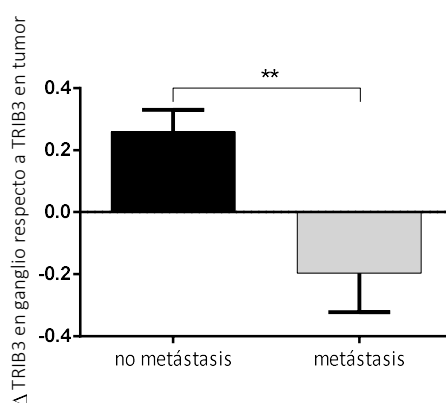


Figura 50. El incremento en los niveles de TRIB3 en el ganglio afectado respecto al tumor se relaciona con menor incidencia de metástasis. Relación entre los niveles de TRIB3 en los tumores ganglionares y primarios y el desarrollo de metástasis en muestras de un TMA de pacientes con cáncer de mama ER positivo. Los datos corresponden a la cuantificación de la diferencia entre el valor H de la expresión de TRIB3 en los tumores ganglionares respecto al valor H en los tumores primarios en la mama y se expresan como la media $\pm$ SEM de la resta del valor H entre las dos condiciones. Las pacientes se subdividieron en función de si habían desarrollado o no metástasis. (n=225; **p<0.01 con respecto a las pacientes que no desarrollaron metástasis; utilizando la prueba T con corrección de Welch's).

Por otro lado, las células que componen el microambiente tumoral así como las moléculas de la matriz extracelular también modulan las funciones tanto de las células mamarias normales como de las células de cáncer de mama en términos de proliferación, supervivencia, polaridad e invasividad [349]. Por ello, también sería de interés estudiar el papel de TRIB3 en otros tipos celulares que puedan participar en el desarrollo tumoral como los fibroblastos o fibroblastos asociados a tumores (CAFs), las células del sistema inmunitario o el tejido adiposo. Al analizar y cuantificar los niveles de TRIB3 en las muestras tumorales de pacientes, observamos que por lo general, los macrófagos y linfocitos presentaban elevados niveles de TRIB3 mientras que los fibroblastos eran negativos (**Fig. 51**). Sin embargo, en los adipocitos observamos variabilidad en el marcaje (**Fig. 51**). Cabe destacar que numerosos estudios han descrito un importante papel del tejido adiposo en el desarrollo del cáncer de mama [350] y, por otro lado, han implicado a TRIB3 en procesos metabólicos, de diferenciación y de proliferación adipogénica, lo que sugiere que sería interesante analizar también la posible existencia de una correlación entre los niveles de TRIB3 en tejido adiposo y una distinta evolución de las pacientes con cáncer de mama.

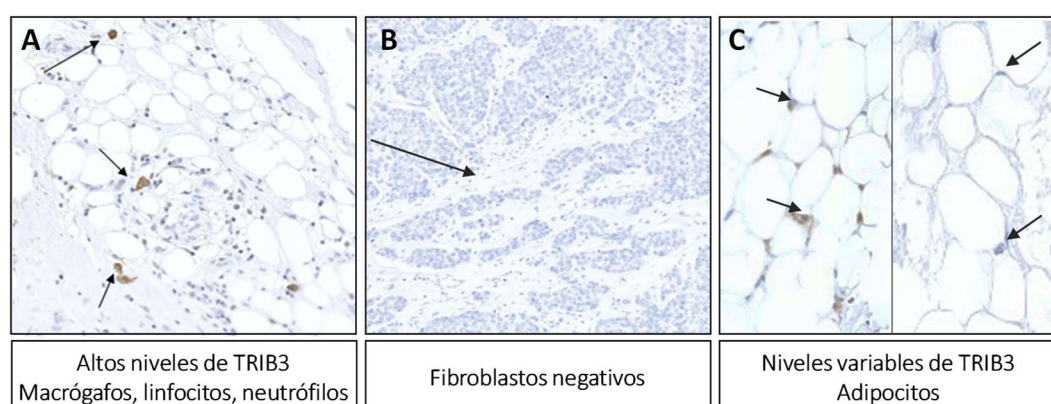


Figura 51. Marcaje de TRIB3 en células no tumorales de las muestras de pacientes. Se muestran cortes representativos de las muestras de tumores de pacientes con cáncer de mama ER positivos de la tinción de TRIB3 en zonas que presentan células inmunes (*imagen izquierda*), fibroblastos (*imagen central*) y tejido adiposo (*imagen derecha*).

TRIB3 podría estar implicado en la sensibilidad a fármacos antitumorales

Como se comentó en la introducción de esta tesis doctoral, TRIB3 se ha implicado en el mecanismo de acción de algunos fármacos antitumorales como el THC [217-220], el ABTL0812 o el ácido ginkólico [221]. Además, se ha descrito el incremento en sus niveles tras el tratamiento con diversos compuestos de origen natural que inducen estrés de RE [277-279].

Teniendo esto en cuenta, analizamos también si el silenciamiento de TRIB3 en las líneas celulares BT474 y MCF7, podía afectar a la respuesta a terapia. En general, los tumores ER positivos son tratados con hormonoterapia. Sin embargo, dependiendo de la evolución de la paciente, además de este tratamiento también pueden recibir quimioterapia, radioterapia o terapia dirigida contra el receptor HER2 en caso de que se encuentre sobreexpresado. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que los niveles de TRIB3 no afectarían a la respuesta al tratamiento con tamoxifeno, al menos en líneas celulares, pero sí podrían influir en la sensibilidad a determinados tratamientos quimioterapéuticos como la Doxorrubicina o el cisplatino. Así, las células con niveles reducidos de TRIB3 fueron más resistentes a la quimioterapia, independientemente de si sobreexpresaban o no HER2. Estos datos apoyan los resultados obtenidos a partir del análisis de las muestras de pacientes, donde, de hecho, la mayoría de las pacientes habían recibido quimioterapia, y sugieren que TRIB3 podría ser un marcador de respuesta a quimioterapia en cáncer de mama luminal. De cualquier

modo, estos ensayos son preliminares y habría que aumentar el panel de fármacos empleados para corroborar nuestra hipótesis, así como profundizar en el mecanismo por el cual TRIB3 mejora la respuesta a terapia. En algunos contextos, la inducción de TRIB3 en respuesta a determinados tratamientos (por ejemplo, THC o ABTL0812) se asocia a una mayor inhibición del eje AKT/MTORC1, lo que contribuye a la activación de la autofagia citotóxica [218, 220, 222, 276]. En cualquier caso, habría que estudiar si un mecanismo similar podría operar en el caso de los agentes quimioterapéuticos empleados.

En el contexto terapéutico, también resultaría interesante analizar la interacción de TRIB3 con moléculas pequeñas que pudieran ser de utilidad en la clínica, afectando a su estabilidad o favoreciendo una conformación determinada de la proteína y por tanto modulando su acción. Estudios de estas características se han realizado con las isoformas TRIB1 y TRIB2, donde se ha demostrado que su estabilidad puede verse afectada por moléculas pequeñas inicialmente diseñadas para inhibir diferentes quinasas, entre las que destaca la familia de EGFR [174, 175, 351]. Sin embargo, hasta el momento no se han llevado a cabo este tipo de aproximaciones con TRIB3. Por otro lado, a menudo la vía de PI3K/AKT se ve alterada en cáncer de mama y está implicada en la resistencia a la terapia. Por ello, el empleo de fármacos que modulen la actividad de TRIB3 como los comentados anteriormente, también podrían ser de utilidad en estos casos, inhibiendo AKT y frenando el desarrollo tumoral, al menos en el contexto de tumores de mama ER positivos HER2 positivos.

En definitiva, esta tesis doctoral presenta un nuevo escenario respecto al papel de TRIB3 en cáncer de mama (**Fig. 52**). Así, proponemos a TRIB3 como un biomarcador pronóstico de la enfermedad, pues se asocia a una mayor supervivencia libre de enfermedad y a una menor incidencia de metástasis, al menos en pacientes de cáncer de mama ER positivo que vayan a ser tratados posteriormente con quimioterapia. Además, demostramos que TRIB3 puede desempeñar un papel oncosupresor u oncogénico dependiendo del contexto celular, ya que hemos comprobado un distinto comportamiento de esta pseudoquinasa en líneas celulares HER2 positivas o HER2 negativas, así como al comparar su función en condiciones basales o tras el tratamiento quimioterapéutico. Además, hemos descrito por primera vez que TRIB3 puede regular a HER2 lo cual podría ser relevante de cara al diseño de terapias más selectivas para el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo. Igualmente, en este estudio hemos profundizado en el papel regulador que TRIB3 ejerce sobre AKT y caracterizado diferencias en la interacción entre TRIB3 y las diferentes isoformas de esta quinasa. Además, hemos identificado dos nuevos interactores de TRIB3: STUB1 y RAC1, que podrían desempeñar funciones relevantes en la regulación ejercida por esta pseudoquinasa sobre la estabilidad de HER2 y la capacidad invasiva y metastática de las células tumorales, respectivamente. Por último, nuestros datos también apoyan la idea de que la expresión

de TRIB3 se relaciona con una mejor respuesta al tratamiento quimioterapéutico lo que sugiere que podría explorarse su posible papel como biomarcador de respuesta a terapia.

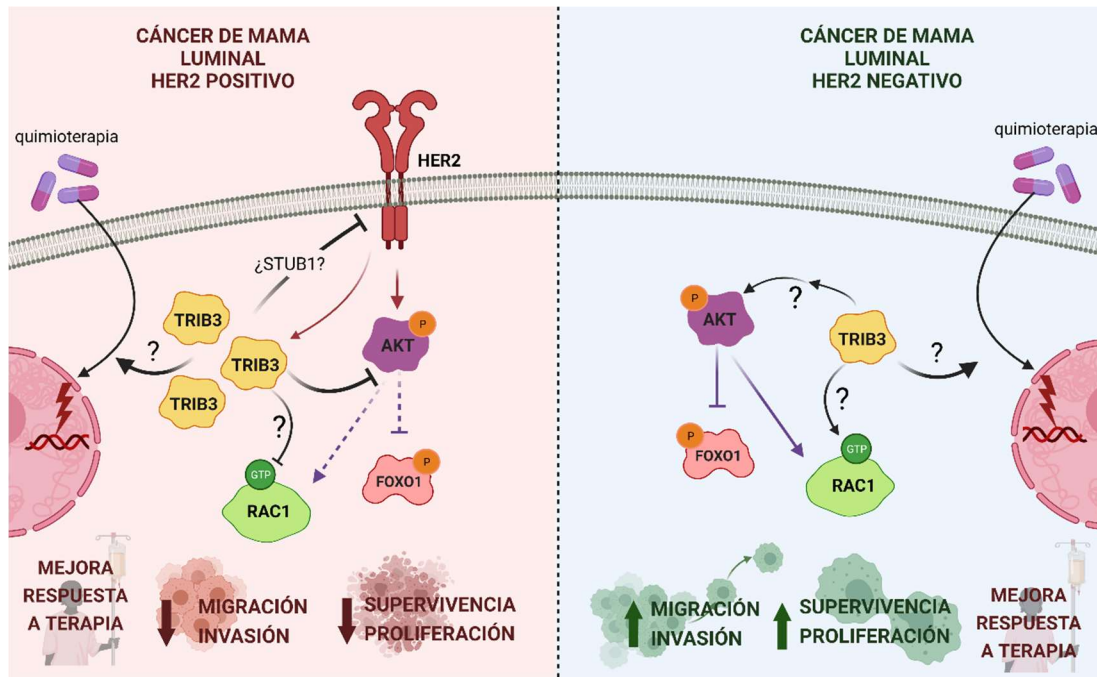


Figura 52. Esquema representativo de la función de TRIB3 en cáncer de mama luminal HER2 positivo o HER2 negativo. Se muestra esquemáticamente la hipótesis del papel de TRIB3 en cáncer de mama luminal HER2 positivo (**imagen izquierda**) y HER2 negativo (**imagen derecha**). (**Imagen izquierda**) En un contexto HER2 positivo, donde la expresión de TRIB3 es más elevada, este inhibe la expresión de HER2, quizá mediante la regulación de la E3 ubiquitín-ligasa STUB1; inhibe la fosforilación de AKT; e inhibe la actividad de RAC1, aunque desconocemos el mecanismo; regulando negativamente procesos de supervivencia, proliferación, migración e invasión celular. Además, TRIB3 favorece la respuesta a quimioterapia. (**Imagen derecha**) En un contexto HER2 negativo, TRIB3 promueve la fosforilación de AKT y actividad de RAC1 aunque desconocemos si se trata de una regulación directa o indirecta promoviendo en definitiva la supervivencia, proliferación, migración e invasión celular. Sin embargo, en este contexto celular también favorece la respuesta a quimioterapia.

CONCLUSIONES

1. Mayores niveles de expresión de la proteína TRIB3 se correlacionan con un mejor pronóstico y menor probabilidad de metástasis en pacientes con cáncer de mama luminal, lo que sugiere que los niveles proteicos de TRIB3 podrían utilizarse como biomarcador de pronóstico en este subtipo mayoritario de tumor mamario.
2. Desde el punto de vista de la regulación de los mecanismos que determinan las propiedades de las células de cáncer de mama luminal, nuestros resultados apoyan la idea de que el papel de TRIB3 podría variar en función de las alteraciones moleculares presentes en dichas células. Específicamente, hemos encontrado que los niveles de HER2 podrían determinar el papel desempeñado por TRIB3. Así, demostramos que TRIB3 presenta un papel oncosupresor en células de cáncer mama HER2 positivas y oncogénico en células HER2 negativas.
3. Existe una regulación cruzada entre TRIB3 y HER2 en la que HER2 regula positivamente los niveles de TRIB3 y TRIB3 modula de forma negativa la estabilidad y en consecuencia los niveles de HER2, contribuyendo así a la regulación de las propiedades tumorigénicas de las células de cáncer de mama luminal.
4. Desde un punto de vista mecanístico, nuestras observaciones indican que la interacción de TRIB3 con AKT podrían determinar su capacidad para regular la proliferación, y sugieren que otros interactores como STUB1 y RAC1 también podrían participar en los efectos que produce TRIB3 en las células de cáncer de mama.
5. TRIB3 podría favorecer la respuesta a la quimioterapia en el contexto del cáncer de mama luminal. Además, esta función de TRIB3 parece ser independiente del subtipo tumoral en términos de la sobreexpresión del oncogén HER2.

CONCLUSIONS

1. Higher TRIB3 protein levels correlated with a better prognostic and a lower probability of metastasis in patients diagnosed with luminal breast cancer, suggesting that TRIB3 protein levels could be used as a prognostic biomarker in this prevailing breast tumor subtype.
2. Regarding the regulation of the mechanisms governing the luminal breast cancer properties, our results support the idea that TRIB3 role could vary depending on the molecular alterations in those cells. Specifically, we have found that HER2 levels could determine the role of TRIB3. Thus, we have demonstrated that TRIB3 plays an oncosuppressor role in HER2 positive breast cancer cells and an oncogenic one in HER2 negative cells.
3. There is a cross regulation between TRIB3 and HER2 so that HER2 upregulates TRIB3 levels and TRIB3 downregulates HER2 stability, and consequently its levels, contributing in this way to the tumorigenic properties regulation in luminal breast cancer cells.
4. From a mechanistic point of view, our findings indicate that the interaction of TRIB3 with AKT could determine their capacity to regulate breast cancer cells proliferation, and suggest that other interactors like STUB1 or RAC1, could also be involved in the effects induced by TRIB3 in breast cancer cells.
5. TRIB3 could boost the chemotherapy response in the context of luminal breast cancer. Moreover, this TRIB3 function seems to be independent of the tumor subtype in terms of HER2 oncogene overexpression.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Russo, J. and I.H. Russo, *Development of the human breast*. Maturitas, 2004. **49**(1): p. 2-15.
3. Bertos, N.R. and M. Park, *Breast cancer — one term, many entities?* Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(10): p. 3789-3796.
4. Snoj, N., *The molecular bases of human disease in Molecular pathology*, G.T. William Coleman, Editor. 2017: London, UK.
5. Russnes, H.G., et al., *Breast Cancer Molecular Stratification*. The American Journal of Pathology, 2017. **187**(10): p. 2152-2162.
6. Malhotra, G.K., et al., *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers*. Cancer Biology & Therapy, 2014. **10**(10): p. 955-960.
7. Elston, C.W., *The Assessment of Histological Differentiation in Breast Cancer*. ANZ Journal of Surgery, 1984. **54**(1): p. 11-15.
8. Viale, G., *The current state of breast cancer classification*. Annals of Oncology, 2012. **23**: p. x207-x210.
9. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-752.
10. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(19): p. 10869-10874.
11. Sørli, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(14): p. 8418-8423.
12. Provenzano, E., G.A. Ulaner, and S.-F. Chin, *Molecular Classification of Breast Cancer*. PET Clinics, 2018. **13**(3): p. 325-338.
13. Prat, A. and C.M. Perou, *Deconstructing the molecular portraits of breast cancer*. Molecular Oncology, 2011. **5**(1): p. 5-23.
14. Eroles, P., et al., *Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways*. Cancer Treatment Reviews, 2012. **38**(6): p. 698-707.
15. Hergueta-Redondo, M., et al., *“New” molecular taxonomy in breast cancer*. Clinical and Translational Oncology, 2008. **10**(12): p. 777-785.
16. Herschkowitz, J.I., et al., *Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors*. Genome Biology, 2007. **8**(5).
17. Prat, A., et al., *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer*. Breast Cancer Research, 2010. **12**(5).
18. Puppe, J., et al., *Genomic Signatures in Luminal Breast Cancer*. Breast Care, 2020. **15**(4): p. 355-365.
19. Wallden, B., et al., *Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay*. BMC Medical Genomics, 2015. **8**(1).
20. Polyak, K., *Breast cancer: origins and evolution*. Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(11): p. 3155-3163.
21. Cowell, C.F., et al., *Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: Revisited*. Molecular Oncology, 2013. **7**(5): p. 859-869.
22. Thiery, J.P., *Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-454.
23. Guarino, M., B. rubino, and g. ballabio, *The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology*. Pathology, 2007. **39**(3): p. 305-318.

24. Bonnomet, A., et al., *Epithelial-to-Mesenchymal Transitions and Circulating Tumor Cells*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 261-273.
25. Wendt, M.K., et al., *Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer*. Molecular Biology of the Cell, 2011. **22**(14): p. 2423-2435.
26. Li, D.-M. and Y.-M. Feng, *Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets*. Breast Cancer Research and Treatment, 2011. **128**(1): p. 7-21.
27. Yilmaz, M. and G. Christofori, *Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells*. Molecular Cancer Research, 2010. **8**(5): p. 629-642.
28. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-174.
29. Veronesi, U., et al., *Breast Cancer*. 2017.
30. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(8): p. 591-602.
31. Yousefi, M., et al., *Organ-specific metastasis of breast cancer: molecular and cellular mechanisms underlying lung metastasis*. Cellular Oncology, 2018. **41**(2): p. 123-140.
32. Lu, X. and Y. Kang, *Organotropism of Breast Cancer Metastasis*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2007. **12**(2-3): p. 153-162.
33. Yates, L.R., et al., *Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse*. Cancer Cell, 2017. **32**(2): p. 169-184.e7.
34. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
35. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
36. Barnes, D.M. and C.E. Gillett, *Cyclin D1 in Breast Cancer*. Breast Cancer Research and Treatment, 1998. **52**(1-3): p. 1-15.
37. Duffy, M.J., N.C. Synnott, and J. Crown, *Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker*. Breast Cancer Research and Treatment, 2018. **170**(2): p. 213-219.
38. Hayflick, L., *Mortality and immortality at the cellular level. A review*. Biochemistry (Mosc), 1997. **62**(11): p. 1180-90.
39. Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond*. Nature Reviews Genetics, 2005. **6**(8): p. 611-622.
40. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-364.
41. Weidner, N., et al., *Tumor Angiogenesis and Metastasis — Correlation in Invasive Breast Carcinoma*. New England Journal of Medicine, 1991. **324**(1): p. 1-8.
42. Hunter, K.W., N.P.S. Crawford, and J. Alsarraj, *Mechanisms of metastasis*. Breast Cancer Research, 2008. **10**(S1).
43. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective*. Cancer Research, 2010. **70**(14): p. 5649-5669.
44. Pelicano, H., et al., *Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential*. Breast Cancer Research, 2014. **16**(5).
45. Yoon, S., et al., *Up-regulation of Acetyl-CoA Carboxylase α and Fatty Acid Synthase by Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 at the Translational Level in Breast Cancer Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(36): p. 26122-26131.
46. Bertucci, F., et al., *Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers*. Oncogene, 2004. **23**(14): p. 2564-2575.
47. Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha, *Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(8): p. 4499-4506.
48. Mougiakakos, D., et al., *Regulatory T Cells in Cancer*. 2010. p. 57-117.

49. Tang, B., et al., *TGF- β switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression*. Journal of Clinical Investigation, 2003. **112**(7): p. 1116-1124.
50. Wakefield, L., *TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis*. Current Opinion in Genetics & Development, 2002. **12**(1): p. 22-29.
51. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 643-649.
52. Miki, Y., et al., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
53. Wooster, R., et al., *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 789-792.
54. Thompson, D. and D. Easton, *The Genetic Epidemiology of Breast Cancer Genes*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2004. **9**(3): p. 221-236.
55. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, Inflammation, and Cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-899.
56. Qian, B.-Z. and J.W. Pollard, *Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
57. DeNardo, D.G., P. Andreu, and L.M. Coussens, *Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity*. Cancer and Metastasis Reviews, 2010. **29**(2): p. 309-316.
58. *Handbook of Cell Signaling*. 2010.
59. Sever, R. and J.S. Brugge, *Signal Transduction in Cancer*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2015. **5**(4): p. a006098-a006098.
60. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-1134.
61. Poloz, Y., R.J.O. Dowling, and V. Stambolic, *Fundamental Pathways in Breast Cancer 1: Signaling from the Membrane*, in *Breast Cancer*. 2017. p. 3-12.
62. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(2): p. 127-137.
63. Slamon, D., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-182.
64. Slamon, D., et al., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science, 1989. **244**(4905): p. 707-712.
65. Moasser, M.M., *The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis*. Oncogene, 2007. **26**(45): p. 6469-6487.
66. Gutierrez, C. and R. Schiff, *HER2: biology, detection, and clinical implications*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(1): p. 55-62.
67. Ho-Yen, C.M., et al., *C-Met in invasive breast cancer*. Cancer, 2014. **120**(2): p. 163-171.
68. Tuck, A.B., et al., *Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma*. Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 225-32.
69. Papa, V., et al., *Elevated insulin receptor content in human breast cancer*. J Clin Invest, 1990. **86**(5): p. 1503-10.
70. Belfiore, A., et al., *Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease*. Endocrine Reviews, 2009. **30**(6): p. 586-623.
71. Sciacca, L., et al., *Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism*. Oncogene, 1999. **18**(15): p. 2471-2479.
72. Farabaugh, S.M., D.N. Boone, and A.V. Lee, *Role of IGF1R in Breast Cancer Subtypes, Stemness, and Lineage Differentiation*. Frontiers in Endocrinology, 2015. **6**.
73. Laplante, M. and David M. Sabatini, *mTOR Signaling in Growth Control and Disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-293.

74. Gan, X., et al., *Evidence for Direct Activation of mTORC2 Kinase Activity by Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(13): p. 10998-11002.
75. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. Cell, 2017. **169**(3): p. 381-405.
76. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
77. Ciruelos Gil, E.M., *Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer*. Cancer Treatment Reviews, 2014. **40**(7): p. 862-871.
78. Shimoi, T., et al., *PIK3CA mutation profiling in patients with breast cancer, using a highly sensitive detection system*. Cancer Science, 2018. **109**(8): p. 2558-2566.
79. Zhang, H.-Y., et al., *PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients*. Oncology Letters, 2013. **6**(1): p. 161-168.
80. Clark, A.S., et al., *Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(9): p. 707-17.
81. Ortega, M.A., et al., *Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR*. Journal of Oncology, 2020. **2020**: p. 1-11.
82. Tokunaga, E., et al., *Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer*. Breast Cancer, 2006. **13**(2): p. 137-144.
83. O'Regan, R. and Paplomata, *New and emerging treatments for estrogen receptor-positive breast cancer: focus on everolimus*. Therapeutics and Clinical Risk Management, 2013.
84. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
85. Whyte, J., et al., *Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development*. Breast Cancer Research, 2009. **11**(5).
86. Pearson, G., et al., *Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions**. Endocrine Reviews, 2001. **22**(2): p. 153-183.
87. Joslin, E.J., et al., *EGF-receptor-mediated mammary epithelial cell migration is driven by sustained ERK signaling from autocrine stimulation*. Journal of Cell Science, 2007. **120**(20): p. 3688-3699.
88. Pagès, G., et al., *Signaling Angiogenesis via p42/p44 MAP Kinase Cascade*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **902**(1): p. 187-200.
89. Mueller, H., et al., *Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients*. International Journal of Cancer, 2000. **89**(4): p. 384-388.
90. McGlynn, L.M., et al., *Ras/Raf-1/MAPK Pathway Mediates Response to Tamoxifen but not Chemotherapy in Breast Cancer Patients*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(4): p. 1487-1495.
91. Santen, R.J., et al., *The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2002. **80**(2): p. 239-256.
92. Nikolenko, J.V. and A.N. Krasnov, *Nuclear receptors: Structure and mechanisms of action*. Russian Journal of Genetics, 2007. **43**(3): p. 234-240.
93. Chawla, A., *Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1866-1870.
94. Nadji, M., et al., *Immunohistochemistry of Estrogen and Progesterone Receptors Reconsidered*. American Journal of Clinical Pathology, 2005. **123**(1): p. 21-27.

95. Cleator, S.J., et al., *A 2009 Update on the Treatment of Patients with Hormone Receptor—Positive Breast Cancer*. Clinical Breast Cancer, 2009. **9**: p. S6-S17.
96. Ascenzi, P., A. Bocedi, and M. Marino, *Structure–function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health*. Molecular Aspects of Medicine, 2006. **27**(4): p. 299-402.
97. Heldring, N., et al., *Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets*. Physiological Reviews, 2007. **87**(3): p. 905-931.
98. Métivier, R., et al., *Estrogen Receptor- α Directs Ordered, Cyclical, and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter*. Cell, 2003. **115**(6): p. 751-763.
99. Song, R.X.D. and R.J. Santen, *Membrane Initiated Estrogen Signaling in Breast Cancer1*. Biology of Reproduction, 2006. **75**(1): p. 9-16.
100. Warner, M. and J.-Å. Gustafsson, *Nongenomic effects of estrogen: Why all the uncertainty?* Steroids, 2006. **71**(2): p. 91-95.
101. Simoncini, T., et al., *Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase*. Nature, 2000. **407**(6803): p. 538-541.
102. Doolan, C.M. and B.J. Harvey, *A G α s protein-coupled membrane receptor, distinct from the classical oestrogen receptor, transduces rapid effects of oestradiol on [Ca²⁺]_i in female rat distal colon*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2003. **199**(1-2): p. 87-103.
103. Filardo, E.J. and P. Thomas, *Minireview: G Protein-Coupled Estrogen Receptor-1, GPER-1: Its Mechanism of Action and Role in Female Reproductive Cancer, Renal and Vascular Physiology*. Endocrinology, 2012. **153**(7): p. 2953-2962.
104. Renoir, J.-M., V. Marsaud, and G. Lazennec, *Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics*. Biochemical Pharmacology, 2013. **85**(4): p. 449-465.
105. Cicatiello, L., et al., *Estrogens and Progesterone Promote Persistent CCND1 Gene Activation during G1 by Inducing Transcriptional Derepression via c-Jun/c-Fos/Estrogen Receptor (Progesterone Receptor) Complex Assembly to a Distal Regulatory Element and Recruitment of Cyclin D1 to Its Own Gene Promoter*. Molecular and Cellular Biology, 2004. **24**(16): p. 7260-7274.
106. Said, T.K., et al., *Progesterone, in Addition to Estrogen, Induces Cyclin D1 Expression in the Murine Mammary Epithelial Cell, in Vivo**. Endocrinology, 1997. **138**(9): p. 3933-3939.
107. Zwijsen, R.M.L., et al., *CDK-Independent Activation of Estrogen Receptor by Cyclin D1*. Cell, 1997. **88**(3): p. 405-415.
108. Harrison, D.A., *The JAK/STAT Pathway*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012. **4**(3): p. a011205-a011205.
109. Dolled-Filhart, M., et al., *Tissue microarray analysis of signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3) and phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 594-600.
110. Alvarez, J.V., et al., *Identification of a Genetic Signature of Activated Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Human Tumors*. Cancer Research, 2005. **65**(12): p. 5054-5062.
111. Sloan, E.K. and R.L. Anderson, *Genes involved in breast cancer metastasis to bone*. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), 2002. **59**(9): p. 1491-1502.
112. Shaw, L.M., et al., *Activation of Phosphoinositide 3-OH Kinase by the α 6 β 4 Integrin Promotes Carcinoma Invasion*. Cell, 1997. **91**(7): p. 949-960.
113. Falcioni, R., et al., *α 6 β 4 and α 6 β 1 Integrins Associate with ErbB-2 in Human Carcinoma Cell Lines*. Experimental Cell Research, 1997. **236**(1): p. 76-85.
114. Dans, M., et al., *Tyrosine Phosphorylation of the β 4 Integrin Cytoplasmic Domain Mediates Shc Signaling to Extracellular Signal-regulated Kinase and Antagonizes Formation of Hemidesmosomes*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(2): p. 1494-1502.
115. Yoon, S.-O., S. Shin, and E.A. Lipscomb, *A Novel Mechanism for Integrin-Mediated Ras Activation in Breast Carcinoma Cells: The α 6 β 4 Integrin Regulates ErbB2 Translation and*

- Transactivates Epidermal Growth Factor Receptor/ErbB2 Signaling*. Cancer Research, 2006. **66**(5): p. 2732-2739.
116. Mittal, S., et al., *Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis*. Molecular Cancer, 2009. **8**(1).
 117. Reedijk, M., et al., *High-level Coexpression of JAG1 and NOTCH1 Is Observed in Human Breast Cancer and Is Associated with Poor Overall Survival*. Cancer Research, 2005. **65**(18): p. 8530-8537.
 118. Dickson, B.C., et al., *High-level JAG1 mRNA and protein predict poor outcome in breast cancer*. Modern Pathology, 2007. **20**(6): p. 685-693.
 119. Brennan, K.R. and A.M. Brown, *Wnt proteins in mammary development and cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004. **9**(2): p. 119-31.
 120. Jeng, K.-S., et al., *High expression of Sonic Hedgehog signaling pathway genes indicates a risk of recurrence of breast carcinoma*. OncoTargets and Therapy, 2013.
 121. ten Haaf, A., et al., *Expression of the glioma-associated oncogene homolog (GLI) 1 in human breast cancer is associated with unfavourable overall survival*. BMC Cancer, 2009. **9**(1).
 122. Waks, A.G. and E.P. Winer, *Breast Cancer Treatment*. Jama, 2019. **321**(3).
 123. Jordan, V.C. and A.M.H. Brodie, *Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer*. Steroids, 2007. **72**(1): p. 7-25.
 124. Patel, R.R., C.G.N. Sharma, and V.C. Jordan, *Optimizing the antihormonal treatment and prevention of breast cancer*. Breast Cancer, 2007. **14**(2): p. 113-122.
 125. Blackburn, S.A., R.M. Parks, and K.-L. Cheung, *Fulvestrant for the treatment of advanced breast cancer*. Expert Review of Anticancer Therapy, 2018. **18**(7): p. 619-628.
 126. Tang, Y., et al., *Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer*. Clinical breast cancer, 2016. **16**(5): p. 335-343.
 127. Mills, J.N., A.C. Rutkovsky, and A. Giordano, *Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors*. Current Opinion in Pharmacology, 2018. **41**: p. 59-65.
 128. Yao, J., et al., *Progress in the Understanding of the Mechanism of Tamoxifen Resistance in Breast Cancer*. Frontiers in Pharmacology, 2020. **11**.
 129. Bartlett, J.M.S., et al., *Estrogen Receptor and Progesterone Receptor As Predictive Biomarkers of Response to Endocrine Therapy: A Prospectively Powered Pathology Study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational Trial*. Journal of Clinical Oncology, 2011. **29**(12): p. 1531-1538.
 130. Dowsett, M., et al., *Relationship Between Quantitative Estrogen and Progesterone Receptor Expression and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2) Status With Recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination Trial*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(7): p. 1059-1065.
 131. Clynes, R.A., et al., *Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets*. Nature Medicine, 2000. **6**(4): p. 443-446.
 132. Junttila, T.T., et al., *Ligand-Independent HER2/HER3/PI3K Complex Is Disrupted by Trastuzumab and Is Effectively Inhibited by the PI3K Inhibitor GDC-0941*. Cancer Cell, 2009. **15**(5): p. 429-440.
 133. Nagata, Y., et al., *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients*. Cancer Cell, 2004. **6**(2): p. 117-127.
 134. Baselga, J. and S.M. Swain, *Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(7): p. 463-475.
 135. Xia, W., et al., *Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways*. Oncogene, 2002. **21**(41): p. 6255-6263.

136. Vu, T. and F.X. Claret, *Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 62.
137. Gradishar, W.J., et al., *Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN, 2016. **14**(3): p. 324-54.
138. Cohen, P., *The origins of protein phosphorylation*. Nature Cell Biology, 2002. **4**(5): p. E127-E130.
139. Manning, G., *The Protein Kinase Complement of the Human Genome*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-1934.
140. Boudeau, J., et al., *Emerging roles of pseudokinases*. Trends in Cell Biology, 2006. **16**(9): p. 443-452.
141. Jura, N., et al., *Mechanism for Activation of the EGF Receptor Catalytic Domain by the Juxtamembrane Segment*. Cell, 2009. **137**(7): p. 1293-1307.
142. Zhang, X., et al., *An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1137-1149.
143. Cui, J., et al., *A secretory kinase complex regulates extracellular protein phosphorylation*. eLife, 2015. **4**.
144. Ohyama, Y., et al., *FAM20A binds to and regulates FAM20C localization*. Scientific Reports, 2016. **6**(1).
145. Saharinen, P., K. Takaluoma, and O. Silvennoinen, *Regulation of the Jak2 Tyrosine Kinase by Its Pseudokinase Domain*. Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(10): p. 3387-3395.
146. Saharinen, P. and O. Silvennoinen, *The Pseudokinase Domain Is Required for Suppression of Basal Activity of Jak2 and Jak3 Tyrosine Kinases and for Cytokine-inducible Activation of Signal Transduction*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(49): p. 47954-47963.
147. Saharinen, P., et al., *Autoinhibition of Jak2 Tyrosine Kinase Is Dependent on Specific Regions in Its Pseudokinase Domain*. Molecular Biology of the Cell, 2003. **14**(4): p. 1448-1459.
148. Boudeau, J., *MO25 / interact with STRAD / enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm*. The EMBO Journal, 2003. **22**(19): p. 5102-5114.
149. Baas, A.F., *Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD*. The EMBO Journal, 2003. **22**(12): p. 3062-3072.
150. Alessi, D.R., K. Sakamoto, and J.R. Bayascas, *LKB1-Dependent Signaling Pathways*. Annual Review of Biochemistry, 2006. **75**(1): p. 137-163.
151. Zehiraj, E., et al., *Structure of the LKB1-STRAD-MO25 Complex Reveals an Allosteric Mechanism of Kinase Activation*. Science, 2009. **326**(5960): p. 1707-1711.
152. McMahon, S.B., et al., *The Novel ATM-Related Protein TRRAP Is an Essential Cofactor for the c-Myc and E2F Oncoproteins*. Cell, 1998. **94**(3): p. 363-374.
153. McMahon, S.B., M.A. Wood, and M.D. Cole, *The Essential Cofactor TRRAP Recruits the Histone Acetyltransferase hGCN5 to c-Myc*. Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(2): p. 556-562.
154. Lang, S.E., et al., *E2F Transcriptional Activation Requires TRRAP and GCN5 Cofactors*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(35): p. 32627-32634.
155. Seher, T.C. and M. Leptin, *Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during Drosophila gastrulation*. Current Biology, 2000. **10**(11): p. 623-629.
156. Großhans, J. and E. Wieschaus, *A Genetic Link between Morphogenesis and Cell Division during Formation of the Ventral Furrow in Drosophila*. Cell, 2000. **101**(5): p. 523-531.
157. Mata, J., et al., *Tribbles Coordinates Mitosis and Morphogenesis in Drosophila by Regulating String/CDC25 Proteolysis*. Cell, 2000. **101**(5): p. 511-522.
158. Cunard, R., *Mammalian Tribbles Homologs at the Crossroads of Endoplasmic Reticulum Stress and Mammalian Target of Rapamycin Pathways*. Scientifica, 2013. **2013**: p. 1-17.

159. Evers, P.A., K. Keeshan, and N. Kannan, *Tribbles in the 21st Century: The Evolving Roles of Tribbles Pseudokinases in Biology and Disease*. Trends in Cell Biology, 2017. **27**(4): p. 284-298.
160. Kiss-Toth, E., et al., *Functional mapping and identification of novel regulators for the Toll/Interleukin-1 signalling network by transcription expression cloning*. Cell Signal, 2006. **18**(2): p. 202-14.
161. Modi, V. and R.L. Dunbrack, *Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019. **116**(14): p. 6818-6827.
162. Kobe, B. and B.E. Kemp, *Principles of Kinase Regulation*, in *Handbook of Cell Signaling*. 2010. p. 559-563.
163. Süveges, D. and N. Jura, *Structural Features of the Kinase Domain*, in *Receptor Tyrosine Kinases: Structure, Functions and Role in Human Disease*. 2015. p. 195-223.
164. Abe, Y., et al., *Cloning and Characterization of a p53-related Protein Kinase Expressed in Interleukin-2-activated Cytotoxic T-cells, Epithelial Tumor Cell Lines, and the Testes*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(47): p. 44003-44011.
165. Min, X., et al., *Crystal Structure of the Kinase Domain of WNK1, a Kinase that Causes a Hereditary Form of Hypertension*. Structure, 2004. **12**(7): p. 1303-1311.
166. Higgins, J.M.G., *Haspin-like proteins: A new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases*. Protein Science, 2001. **10**(8): p. 1677-1684.
167. Zeqiraj, E. and D.M.F. van Aalten, *Pseudokinases-remnants of evolution or key allosteric regulators?* Current Opinion in Structural Biology, 2010. **20**(6): p. 772-781.
168. Murphy, J.M., et al., *Molecular Mechanism of CCAAT-Enhancer Binding Protein Recruitment by the TRIB1 Pseudokinase*. Structure, 2015. **23**(11): p. 2111-21.
169. Bailey, F.P., et al., *The Tribbles 2 (TRB2) pseudokinase binds to ATP and autophosphorylates in a metal-independent manner*. Biochem J, 2015. **467**(1): p. 47-62.
170. Yokoyama, T., et al., *Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis*. Blood, 2010. **116**(15): p. 2768-2775.
171. Guan, H., et al., *Competition between members of the tribbles pseudokinase protein family shapes their interactions with mitogen activated protein kinase pathways*. Scientific Reports, 2016. **6**(1).
172. Qi, L., *TRB3 Links the E3 Ubiquitin Ligase COP1 to Lipid Metabolism*. Science, 2006. **312**(5781): p. 1763-1766.
173. Dedhia, P.H., et al., *Differential ability of Tribbles family members to promote degradation of C/EBP α and induce acute myelogenous leukemia*. Blood, 2010. **116**(8): p. 1321-1328.
174. Jamieson, S.A., et al., *Substrate binding allosterically relieves autoinhibition of the pseudokinase TRIB1*. Sci Signal, 2018. **11**(549).
175. Foulkes, D.M., et al., 2018.
176. Naiki, T., et al., *TRB2, a Mouse Tribbles Ortholog, Suppresses Adipocyte Differentiation by Inhibiting AKT and C/EBP β* . Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(33): p. 24075-24082.
177. Takahashi, Y., et al., *TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPAR γ transcriptional activity*. Journal of Lipid Research, 2008. **49**(4): p. 880-892.
178. Bezy, O., et al., *TRB3 Blocks Adipocyte Differentiation through the Inhibition of C/EBP β Transcriptional Activity*. Molecular and Cellular Biology, 2007. **27**(19): p. 6818-6831.
179. Örd, D. and T. Örd, *Mouse NIPK interacts with ATF4 and affects its transcriptional activity*. Experimental Cell Research, 2003. **286**(2): p. 308-320.
180. Örd, D., K. Meerits, and T. Örd, *TRB3 protects cells against the growth inhibitory and cytotoxic effect of ATF4*. Experimental Cell Research, 2007. **313**(16): p. 3556-3567.
181. Bowers, A.J., S. Scully, and J.F. Boylan, *SKIP3, a novel Drosophila tribbles ortholog, is overexpressed in human tumors and is regulated by hypoxia*. Oncogene, 2003. **22**(18): p. 2823-2835.

182. Ohoka, N., et al., *TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4–CHOP pathway and is involved in cell death*. The EMBO Journal, 2005. **24**(6): p. 1243-1255.
183. Örd, D. and T. Örd, *Characterization of human NIPK (TRB3, SKIP3) gene activation in stressful conditions*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **330**(1): p. 210-218.
184. Morse, E., et al., *TRB3 is stimulated in diabetic kidneys, regulated by the ER stress marker CHOP, and is a suppressor of podocyte MCP-1*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2010. **299**(5): p. F965-F972.
185. Jousse, C., et al., *TRB3 Inhibits the Transcriptional Activation of Stress-regulated Genes by a Negative Feedback on the ATF4 Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(21): p. 15851-15861.
186. Schwarzer, R., et al., *TRB3 is a PI 3-kinase dependent indicator for nutrient starvation*. Cellular Signalling, 2006. **18**(6): p. 899-909.
187. Du, K., *TRB3: A tribbles Homolog That Inhibits Akt/PKB Activation by Insulin in Liver*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1574-1577.
188. Kiss-Toth, E., et al., *Human Tribbles, a Protein Family Controlling Mitogen-activated Protein Kinase Cascades*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(41): p. 42703-42708.
189. Hua, F., et al., *TRB3 interacts with SMAD3 promoting tumor cell migration and invasion*. Journal of Cell Science, 2011. **124**(19): p. 3235-3246.
190. Chan, M.C., et al., *A Novel Regulatory Mechanism of the Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling Pathway Involving the Carboxyl-Terminal Tail Domain of BMP Type II Receptor*. Molecular and Cellular Biology, 2007. **27**(16): p. 5776-5789.
191. Xu, S., et al., *TRIB2 inhibits Wnt/ β -Catenin/TCF4 signaling through its associated ubiquitin E3 ligases, β -TrCP, COP1 and Smurf1, in liver cancer cells*. FEBS Letters, 2014. **588**(23): p. 4334-4341.
192. Salazar, M., et al., *Loss of Tribbles pseudokinase-3 promotes Akt-driven tumorigenesis via FOXO inactivation*. Cell Death & Differentiation, 2014. **22**(1): p. 131-144.
193. Angyal, A. and E. Kiss-Toth, *The tribbles gene family and lipoprotein metabolism*. Current Opinion in Lipidology, 2012. **23**(2): p. 122-126.
194. Jadhav, K.S. and R.C. Bauer, *Trouble With Tribbles-1*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2019. **39**(6): p. 998-1005.
195. Ostertag, A., et al., *Control of Adipose Tissue Inflammation Through TRB1*. Diabetes, 2010. **59**(8): p. 1991-2000.
196. Johnston, J., et al., *Tribbles in inflammation*. Biochemical Society Transactions, 2015. **43**(5): p. 1069-1074.
197. Wei, S.-C., et al., *Tribbles 2 (Trib2) is a novel regulator of toll-like receptor 5 signaling*. Inflammatory Bowel Diseases, 2012. **18**(5): p. 877-888.
198. Dobens, L.L. and S. Bouyain, *Developmental roles of tribbles protein family members*. Developmental Dynamics, 2012. **241**(8): p. 1239-1248.
199. Liu, J., et al., *Mammalian Tribbles homolog 3 impairs insulin action in skeletal muscle: role in glucose-induced insulin resistance*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2010. **298**(3): p. E565-E576.
200. Nicoletti-Carvalho, J.E., et al., *UPR-mediated TRIB3 expression correlates with reduced AKT phosphorylation and inability of interleukin 6 to overcome palmitate-induced apoptosis in RINm5F cells*. Journal of Endocrinology, 2010. **206**(2): p. 183-193.
201. Keeshan, K., et al., *Tribbles homolog 2 inactivates C/EBP α and causes acute myelogenous leukemia*. Cancer Cell, 2006. **10**(5): p. 401-411.
202. Satoh, T., et al., *Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages*. Nature, 2013. **495**(7442): p. 524-528.
203. Paz-Priel, I. and A. Friedman, *C/EBP α Dysregulation in AML and ALL*. Critical Reviews™ in Oncogenesis, 2011. **16**(1-2): p. 93-102.

204. Yokoyama, T. and T. Nakamura, *Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation*. Cancer Science, 2011. **102**(6): p. 1115-1122.
205. Hill, R., et al., *TRIB2 confers resistance to anti-cancer therapy by activating the serine/threonine protein kinase AKT*. Nature Communications, 2017. **8**(1).
206. Hua, F., et al., *TRB3 links insulin/IGF to tumour promotion by interacting with p62 and impeding autophagic/proteasomal degradations*. Nature Communications, 2015. **6**(1).
207. Miyoshi, N., et al., *Abnormal expression of TRIB3 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis*. British Journal of Cancer, 2009. **101**(10): p. 1664-1670.
208. Zhou, H.U.I., et al., *Knockdown of TRB3 induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through regulation of Notch 1 expression*. Molecular Medicine Reports, 2013. **8**(1): p. 47-52.
209. Richmond, L. and K. Keeshan, *Pseudokinases: a tribble-edged sword*. The FEBS Journal, 2019. **287**(19): p. 4170-4182.
210. Qu, J., et al., *<p>TRIB3 suppresses proliferation and invasion and promotes apoptosis of endometrial cancer cells by regulating the AKT signaling pathway</p>*. OncoTargets and Therapy, 2019. **Volume 12**: p. 2235-2245.
211. Roh, J.-i., et al., *Impaired AKT signaling and lung tumorigenesis by PIERCE1 ablation in KRAS-mutant non-small cell lung cancer*. Oncogene, 2020. **39**(36): p. 5876-5887.
212. Restelli, M., et al., *A novel crosstalk between CCAR2 and AKT pathway in the regulation of cancer cell proliferation*. Cell Death & Disease, 2016. **7**(11): p. e2453-e2453.
213. Li, T., et al., *Salinomycin induces cell death with autophagy through activation of endoplasmic reticulum stress in human cancer cells*. Autophagy, 2014. **9**(7): p. 1057-1068.
214. Lampiasi, N., et al., *Antitumor Effects of Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a Novel Nuclear Factor- κ B Inhibitor, in Human Liver Cancer Cells Are Mediated through a Reactive Oxygen Species-Dependent Mechanism*. Molecular Pharmacology, 2009. **76**(2): p. 290-300.
215. Lundemo, A.G., et al., *Tetradecylthioacetic acid inhibits proliferation of human SW620 colon cancer cells - gene expression profiling implies endoplasmic reticulum stress*. Lipids in Health and Disease, 2011. **10**(1).
216. Zou, T., et al., *TRB3 mediates homocysteine-induced inhibition of endothelial cell proliferation*. Journal of Cellular Physiology, 2011. **226**(11): p. 2782-2789.
217. Vara, D., et al., *Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy*. Cell Death & Differentiation, 2011. **18**(7): p. 1099-1111.
218. Salazar, M., et al., *Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells*. Journal of Clinical Investigation, 2009. **119**(5): p. 1359-1372.
219. Salazar, M., et al., *The pseudokinase tribbles homologue-3 plays a crucial role in cannabinoid anticancer action*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2013. **1831**(10): p. 1573-1578.
220. Carracedo, A., et al., *The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells*. Cancer Cell, 2006. **9**(4): p. 301-312.
221. Lorente, M., et al., *Inhibiting SUMO1-mediated SUMOylation induces autophagy-mediated cancer cell death and reduces tumour cell invasion via RAC1*. Journal of Cell Science, 2019. **132**(20).
222. Erazo, T., et al., *The New Antitumor Drug ABTL0812 Inhibits the Akt/mTORC1 Axis by Upregulating Tribbles-3 Pseudokinase*. Clinical Cancer Research, 2016. **22**(10): p. 2508-2519.
223. Salazar, M., et al., *Oncosuppressive functions of tribbles pseudokinase 3*. Biochemical Society Transactions, 2015. **43**(5): p. 1122-1126.

224. Prudente, S., et al., *The Mammalian Tribbles Homolog TRIB3, Glucose Homeostasis, and Cardiovascular Diseases*. Endocrine Reviews, 2012. **33**(4): p. 526-546.
225. Ord, T. and T. Ord, *Mammalian Pseudokinase TRIB3 in Normal Physiology and Disease: Charting the Progress in Old and New Avenues*. Current Protein & Peptide Science, 2017. **18**(8).
226. Mondal, D., A. Mathur, and P.K. Chandra, *Tripping on TRIB3 at the junction of health, metabolic dysfunction and cancer*. Biochimie, 2016. **124**: p. 34-52.
227. He, L., et al., *Chronic Ethanol Intake Impairs Insulin Signaling in Rats by Disrupting Akt Association with the Cell Membrane*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(16): p. 11126-11134.
228. Izrailit, J., et al., *High throughput kinase inhibitor screens reveal TRB3 and MAPK-ERK/TGF beta pathways as fundamental Notch regulators in breast cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(5): p. 1714-1719.
229. Izrailit, J., et al., *High throughput kinase inhibitor screens reveal TRB3 and MAPK-ERK/TGF pathways as fundamental Notch regulators in breast cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(5): p. 1714-1719.
230. Izrailit, J., et al., *Cellular stress induces TRB3/USP9x-dependent Notch activation in cancer*. Oncogene, 2016. **36**(8): p. 1048-1057.
231. Lee, Y.-C., et al., *Tribbles Homolog 3 Involved in Radiation Response of Triple Negative Breast Cancer Cells by Regulating Notch1 Activation*. Cancers, 2019. **11**(2).
232. Wu, M., et al., *SINK is a p65-interacting negative regulator of NF-kappa B-dependent transcription*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(29): p. 27072-27079.
233. Rzymiski, T., et al., *Multiple pathways are involved in the anoxia response of SKIP3 including HuR-regulated RNA stability, NF-kappa B and ATF4*. Oncogene, 2008. **27**(33): p. 4532-4543.
234. Ding, J., S. Kato, and K. Du, *PI3K activates negative and positive signals to regulate TRB3 expression in hepatic cells*. Experimental Cell Research, 2008. **314**(7): p. 1566-1574.
235. Matsumoto, M., *Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism*. Journal of Clinical Investigation, 2006.
236. Koo, S.-H., et al., *PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR- α -dependent induction of TRB-3*. Nature Medicine, 2004. **10**(5): p. 530-534.
237. de Klerk, E. and P.A.C. 't Hoen, *Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing*. Trends in Genetics, 2015. **31**(3): p. 128-139.
238. Rzymiski, T., et al., *Multiple pathways are involved in the anoxia response of SKIP3 including HuR-regulated RNA stability, NF- κ B and ATF4*. Oncogene, 2008. **27**(33): p. 4532-4543.
239. Zhou, Y., et al., *E3 ubiquitin ligase SIAH1 mediates ubiquitination and degradation of TRB3*. Cellular Signalling, 2008. **20**(5): p. 942-948.
240. Ohoka, N., et al., *Anaphase-promoting complex/cyclosome-cdh1 mediates the ubiquitination and degradation of TRB3*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **392**(3): p. 289-294.
241. Hornbeck, P.V., et al., *PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations*. Nucleic Acids Research, 2015. **43**(D1): p. D512-D520.
242. Yao, X.-H. and B.L.G. Nyomba, *Hepatic insulin resistance induced by prenatal alcohol exposure is associated with reduced PTEN and TRB3 acetylation in adult rat offspring*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2008. **294**(6): p. R1797-R1806.
243. Chen, L., et al., *Smyd1 Facilitates Heart Development by Antagonizing Oxidative and ER Stress Responses*. Plos One, 2015. **10**(3).

244. Humphrey, R.K., et al., *Mixed Lineage Kinase-3 Stabilizes and Functionally Cooperates with TRIBBLES-3 to Compromise Mitochondrial Integrity in Cytokine-induced Death of Pancreatic Beta Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(29): p. 22426-22436.
245. Cravero, J.D., et al., *Increased expression of the Akt/PKB inhibitor TRB3 in osteoarthritic chondrocytes inhibits insulin-like growth factor 1-mediated cell survival and proteoglycan synthesis*. Arthritis & Rheumatism, 2009. **60**(2): p. 492-500.
246. Shang, Y.-y., et al., *TRB3, upregulated by ox-LDL, mediates human monocyte-derived macrophage apoptosis*. FEBS Journal, 2009. **276**(10): p. 2752-2761.
247. Sathyanarayana, P., et al., *EPO receptor circuits for primary erythroblast survival*. Blood, 2008. **111**(11): p. 5390-5399.
248. Boutros, R., V. Lobjois, and B. Ducommun, *CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?* Nature Reviews Cancer, 2007. **7**(7): p. 495-507.
249. Sakai, S., et al., *Dual Mode of Regulation of Cell Division Cycle 25 A Protein by TRB3*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2010. **33**(7): p. 1112-1116.
250. Morse, E., E. Selim, and R. Cunard, *PPAR α ligands cause lymphocyte depletion and cell cycle block and this is associated with augmented TRB3 and reduced Cyclin B1 expression*. Molecular Immunology, 2009. **46**(16): p. 3454-3461.
251. Ohoka, N., et al., *Critical and Functional Regulation of CHOP (C/EBP Homologous Protein) through the N-terminal Portion*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(49): p. 35687-35694.
252. Wu, M., et al., *SINK Is a p65-interacting Negative Regulator of NF- κ B-dependent Transcription*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(29): p. 27072-27079.
253. Smith, S.M., et al., *Tribbles 3: A Novel Regulator of TLR2-Mediated Signaling in Response to Helicobacter pylori Lipopolysaccharide*. The Journal of Immunology, 2011. **186**(4): p. 2462-2471.
254. Weismann, D., et al., *Knockdown of the gene encoding Drosophila tribbles homologue 3 (Trib3) improves insulin sensitivity through peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) activation in a rat model of insulin resistance*. Diabetologia, 2010. **54**(4): p. 935-944.
255. Liu, J., et al., *Role of TRIB3 in regulation of insulin sensitivity and nutrient metabolism during short-term fasting and nutrient excess*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2012. **303**(7): p. E908-E916.
256. Prudente, S., et al., *The Functional Q84R Polymorphism of Mammalian Tribbles Homolog TRB3 Is Associated With Insulin Resistance and Related Cardiovascular Risk in Caucasians From Italy*. Diabetes, 2005. **54**(9): p. 2807-2811.
257. Gong, H.p., et al., *TRIB3 Functional Q84R Polymorphism Is a Risk Factor for Metabolic Syndrome and Carotid Atherosclerosis*. Diabetes Care, 2009. **32**(7): p. 1311-1313.
258. Liew, C.W., et al., *The pseudokinase tribbles homolog 3 interacts with ATF4 to negatively regulate insulin exocytosis in human and mouse β cells*. Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(8): p. 2876-2888.
259. Formoso, G., et al., *The TRIB3 R84 variant is associated with increased carotid intima-media thickness in vivo and with enhanced MAPK signalling in human endothelial cells*. Cardiovascular Research, 2011. **89**(1): p. 184-192.
260. Prudente, S., E. Morini, and V. Trischitta, *The emerging role of TRIB3 as a gene affecting human insulin resistance and related clinical outcomes*. Acta Diabetologica, 2009. **46**(2): p. 79-84.
261. Prudente, S., et al., *The TRIB3 Q84R Polymorphism and Risk of Early-Onset Type 2 Diabetes*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009. **94**(1): p. 190-196.
262. Xu, J., et al., *TRB3 interacts with CtIP and is overexpressed in certain cancers*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2007. **1770**(2): p. 273-278.
263. Dong, S., et al., *Overexpression of TRIB3 promotes angiogenesis in human gastric cancer*. Oncology Reports, 2016. **36**(4): p. 2339-2348.

264. Wennemers, M., et al., *Tribbles homolog 3 denotes a poor prognosis in breast cancer and is involved in hypoxia response*. Breast Cancer Research, 2011. **13**(4).
265. Wennemers, M., et al., *TRIB3 protein denotes a good prognosis in breast cancer patients and is associated with hypoxia sensitivity*. Radiotherapy and Oncology, 2011. **101**(1): p. 198-202.
266. Yu, J.-j., et al., *TRIB3-EGFR interaction promotes lung cancer progression and defines a therapeutic target*. Nature Communications, 2020. **11**(1).
267. Zhang, X., et al., *TRIB3 promotes lung cancer progression by activating β -catenin signaling*. European Journal of Pharmacology, 2019. **863**.
268. Xing, Y., et al., *TRIB3 Promotes Lung Adenocarcinoma Progression via an Enhanced Warburg Effect*. Cancer Management and Research, 2020. **Volume 12**: p. 13195-13206.
269. Tang, Z., et al., *TRIB3 facilitates glioblastoma progression via restraining autophagy*. Aging, 2020.
270. Datta, S.R., et al., *Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-241.
271. Datta, S.R., et al., *14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 41-51.
272. Tran, H., et al., *The Many Forks in FOXO's Road*. Science Signaling, 2003. **2003**(172): p. re5-re5.
273. Duggan, S.P., et al., *An integrative genomic approach in oesophageal cells identifies TRB3 as a bile acid responsive gene, downregulated in Barrett's oesophagus, which regulates NF- κ B activation and cytokine levels*. Carcinogenesis, 2010. **31**(5): p. 936-945.
274. Su, J., et al., *Emodin induces apoptosis of lung cancer cells through ER stress and the TRIB3/NF- κ B pathway*. Oncology Reports, 2017. **37**(3): p. 1565-1572.
275. Aynaud, M.-M., et al., *Human Tribbles 3 Protects Nuclear DNA from Cytidine Deamination by APOBEC3A**. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(46): p. 39182-39192.
276. Muñoz-Guardiola, P., et al., *The anti-cancer drug ABTL0812 induces ER stress-mediated cytotoxic autophagy by increasing dihydroceramide levels in cancer cells*. Autophagy, 2020: p. 1-18.
277. Tsai, D.H., C.H. Chung, and K.T. Lee, *Antrodia cinnamomea induces autophagic cell death via the CHOP/TRB3/Akt/mTOR pathway in colorectal cancer cells*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 17424.
278. Ma, B., et al., *Corosolic acid, a natural triterpenoid, induces ER stress-dependent apoptosis in human castration resistant prostate cancer cells via activation of IRE-1/JNK, PERK/CHOP and TRIB3*.
279. Nishikawa, S., et al., *Kurarinone from Sophora Flavescens Roots Triggers ATF4 Activation and Cytostatic Effects Through PERK Phosphorylation*. Molecules, 2019. **24**(17).
280. Stefanovska, B., et al., *Rapalog-mediated repression of Tribbles pseudokinase 3 regulates pre-mRNA splicing*. Cancer Research, 2020.
281. Yu, J.-m., et al., *TRIB3 supports breast cancer stemness by suppressing FOXO1 degradation and enhancing SOX2 transcription*. Nature Communications, 2019. **10**(1).
282. Wuebben, E.L. and A. Rizzino, *The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview*. Oncotarget, 2017. **8**(27).
283. Hüser, L., et al., *Targeting SOX2 in anticancer therapy*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2018. **22**(12): p. 983-991.
284. Zanella, F., et al., *Human TRIB2 is a repressor of FOXO that contributes to the malignant phenotype of melanoma cells*. Oncogene, 2010. **29**(20): p. 2973-2982.
285. Hamzeloo-Moghadam, M., et al., *Cytotoxic effect of *Drimia maritima* bulb extract and induction of mitochondrial apoptotic signaling in human breast cancer cells, MCF-7 and MDA-MB-468*. OncoTargets and Therapy, 2018. **Volume 11**: p. 7669-7677.

286. *Transcriptomic Profiling of MDA-MB-231 Cells Exposed to Boswellia Serrata and 3-O-Acetyl-B-Boswellic Acid; ER/UPR Mediated Programmed Cell Death*. Cancer Genomics & Proteomics, 2017. **14**(6).
287. Tiwari, R.V., P. Parajuli, and P.W. Sylvester, *γ -Tocotrienol-induced endoplasmic reticulum stress and autophagy act concurrently to promote breast cancer cell death*. Biochemistry and Cell Biology, 2015. **93**(4): p. 306-320.
288. Aghaei, M., et al., *Pimpinellol, a novel atypical Sesquiterpene lactone from Pimpinella haussknechtii fruits with evaluation of endoplasmic reticulum stress in breast cancer cells*. Fitoterapia, 2018. **129**: p. 198-202.
289. Goldman, M.J., et al., *Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform*. Nature Biotechnology, 2020. **38**(6): p. 675-678.
290. Cortazar, A.R., et al., *CANCERTOOL: A Visualization and Representation Interface to Exploit Cancer Datasets*. Cancer Research, 2018. **78**(21): p. 6320-6328.
291. Uhlen, M., et al., *Tissue-based map of the human proteome*. Science, 2015. **347**(6220): p. 1260419-1260419.
292. Bradford, M., *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
293. Geoffrey M. Cooper, R.E.H., *The Cell: A Molecular Approach*. 2008.
294. Tsai, Y.-F., et al., *HER2 immunohistochemical scores provide prognostic information for patients with HER2-type invasive breast cancer*. Histopathology, 2019. **74**(4): p. 578-586.
295. Kohn, A.D., et al., *Expression of a Constitutively Active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translocation*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(49): p. 31372-31378.
296. Jacinto, E., et al., *SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity*. Cell, 2006. **127**(1): p. 125-137.
297. Scully, O.J., et al., *Breast cancer metastasis*. Cancer Genomics Proteomics, 2012. **9**(5): p. 311-20.
298. Schnelzer, A., et al., *Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b*. Oncogene, 2000. **19**(26): p. 3013-3020.
299. De, P., J.C. Aske, and N. Dey, *RAC1 Takes the Lead in Solid Tumors*. Cells, 2019. **8**(5).
300. Viale, G., et al., *Immunohistochemical versus molecular (BluePrint and MammaPrint) subtyping of breast carcinoma. Outcome results from the EORTC 10041/BIG 3-04 MINDACT trial*. Breast Cancer Research and Treatment, 2017. **167**(1): p. 123-131.
301. Roskoski, R., *Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update*. Pharmacological Research, 2020. **152**.
302. Wan, P.T.C., et al., *Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF*. Cell, 2004. **116**(6): p. 855-867.
303. Garnett, M.J., et al., *Wild-Type and Mutant B-RAF Activate C-RAF through Distinct Mechanisms Involving Heterodimerization*. Molecular Cell, 2005. **20**(6): p. 963-969.
304. Camps, M., *Catalytic Activation of the Phosphatase MKP-3 by ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinase*. Science, 1998. **280**(5367): p. 1262-1265.
305. Shapiro, P.S., et al., *Extracellular Signal-Regulated Kinase Activates Topoisomerase II α through a Mechanism Independent of Phosphorylation*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(5): p. 3551-3560.
306. Therrien, M., et al., *KSR modulates signal propagation within the MAPK cascade*. Genes & Development, 1996. **10**(21): p. 2684-2695.
307. Papa, F.R., *Bypassing a Kinase Activity with an ATP-Competitive Drug*. Science, 2003. **302**(5650): p. 1533-1537.
308. Goto, W., et al., *Significance of intrinsic breast cancer subtypes on the long-term prognosis after neoadjuvant chemotherapy*. Journal of Translational Medicine, 2018. **16**(1).

309. Kwon, J.H., et al., *Triple negativity and young age as prognostic factors in lymph node-negative invasive ductal carcinoma of 1 cm or less*. BMC Cancer, 2010. **10**(1).
310. Park, Y.H., et al., *Clinical relevance of TNM staging system according to breast cancer subtypes*. Annals of Oncology, 2011. **22**(7): p. 1554-1560.
311. Schwanhäusser, B., et al., *Global quantification of mammalian gene expression control*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 337-342.
312. Vogel, C. and E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. Nature Reviews Genetics, 2012. **13**(4): p. 227-232.
313. Chandra, D., et al., *Stress-Inducible Caspase Substrate TRB3 Promotes Nuclear Translocation of Procaspase-3*. PLoS ONE, 2012. **7**(8).
314. Snyder, V., et al., *Cancer Stem Cell Metabolism and Potential Therapeutic Targets*. Frontiers in Oncology, 2018. **8**.
315. Carraway, K.L., *E3 ubiquitin ligases in ErbB receptor quantity control*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2010. **21**(9): p. 936-943.
316. Xu, W., et al., *Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(20): p. 12847-12852.
317. Paul, I. and M.K. Ghosh, *The E3 Ligase CHIP: Insights into Its Structure and Regulation*. BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 1-12.
318. Nicholson, K.M. and N.G. Anderson, *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cellular Signalling, 2002. **14**(5): p. 381-395.
319. Hinz, N. and M. Jücker, *Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review*. Cell Communication and Signaling, 2019. **17**(1).
320. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-1274.
321. Dillon, R.L., et al., *Akt1 and Akt2 Play Distinct Roles in the Initiation and Metastatic Phases of Mammary Tumor Progression*. Cancer Research, 2009. **69**(12): p. 5057-5064.
322. Yang, W., et al., *Akt isoform-specific inhibition of MDA-MB-231 cell proliferation*. Cellular Signalling, 2011. **23**(1): p. 19-26.
323. Héron-Milhavet, L., et al., *Only Akt1 Is Required for Proliferation, while Akt2 Promotes Cell Cycle Exit through p21 Binding*. Molecular and Cellular Biology, 2006. **26**(22): p. 8267-8280.
324. Toulany, M., et al., *Akt1 and Akt3 but not Akt2 through interaction with DNA-PKcs stimulate proliferation and post-irradiation cell survival of K-RAS-mutated cancer cells*. Cell Death Discovery, 2017. **3**(1).
325. Wang, J., et al., *Reduction of Akt2 expression inhibits chemotaxis signal transduction in human breast cancer cells*. Cellular Signalling, 2008. **20**(6): p. 1025-1034.
326. Means, R.E., S.A. Santi, and H. Lee, *Ablation of Akt2 Induces Autophagy through Cell Cycle Arrest, the Downregulation of p70S6K, and the Dereglulation of Mitochondria in MDA-MB231 Cells*. PLoS ONE, 2011. **6**(1).
327. Irie, H.Y., et al., *Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition*. Journal of Cell Biology, 2005. **171**(6): p. 1023-1034.
328. Arboleda, M.J., et al., *Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(1): p. 196-206.
329. Grabinski, N., et al., *AKT3 regulates ErbB2, ErbB3 and estrogen receptor α expression and contributes to endocrine therapy resistance of ErbB2+ breast tumor cells from Balb-neuT mice*. Cellular Signalling, 2014. **26**(5): p. 1021-1029.
330. Stottrup, C., T. Tsang, and Y.R. Chin, *Upregulation of AKT3 Confers Resistance to the AKT Inhibitor MK2206 in Breast Cancer*. Molecular Cancer Therapeutics, 2016. **15**(8): p. 1964-1974.

331. Li, Y., et al., *MiRNA-29b suppresses tumor growth through simultaneously inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by targeting Akt3*. Cancer Letters, 2017. **397**: p. 111-119.
332. Faridi, J., et al., *Expression of constitutively active Akt-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsivity of these cells in vivo*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(8): p. 2933-9.
333. Dittmar, T., et al., *Downregulation of AKT3 Increases Migration and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Cells by Upregulating S100A4*. Plos One, 2016. **11**(1).
334. Suyama, K., et al., *An Akt3 Splice Variant Lacking the Serine 472 Phosphorylation Site Promotes Apoptosis and Suppresses Mammary Tumorigenesis*. Cancer Research, 2018. **78**(1): p. 103-114.
335. Cheng, K.K.Y., et al., *APPL1 Potentiates Insulin-Mediated Inhibition of Hepatic Glucose Production and Alleviates Diabetes via Akt Activation in Mice*. Cell Metabolism, 2009. **9**(5): p. 417-427.
336. Andreozzi, F., et al., *TRIB3 R84 Variant Is Associated With Impaired Insulin-Mediated Nitric Oxide Production in Human Endothelial Cells*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. **28**(7): p. 1355-1360.
337. Woelk, T., et al., *The ubiquitination code: a signalling problem*. Cell Division, 2007. **2**(1).
338. Patel, L., et al., *Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPAR γ agonists are mediated via upregulation of PTEN*. Current Biology, 2001. **11**(10): p. 764-768.
339. Bonofiglio, D., et al., *Estrogen Receptor α Binds to Peroxisome Proliferator–Activated Receptor Response Element and Negatively Interferes with Peroxisome Proliferator–Activated Receptor γ Signaling in Breast Cancer Cells*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(17): p. 6139-6147.
340. Hua, F., et al., *TRIB3 Interacts With β -Catenin and TCF4 to Increase Stem Cell Features of Colorectal Cancer Stem Cells and Tumorigenesis*. Gastroenterology, 2019. **156**(3): p. 708-721.e15.
341. Lu, Y., et al., *TRIB3 confers glioma cell stemness via interacting with β -catenin*. Environmental Toxicology, 2020. **35**(6): p. 697-706.
342. Marei, H. and A. Malliri, *Rac1 in human diseases: The therapeutic potential of targeting Rac1 signaling regulatory mechanisms*. Small GTPases, 2016. **8**(3): p. 139-163.
343. Saci, A., Lewis C. Cantley, and Christopher L. Carpenter, *Rac1 Regulates the Activity of mTORC1 and mTORC2 and Controls Cellular Size*. Molecular Cell, 2011. **42**(1): p. 50-61.
344. Shen, H.-j., et al., *Cigarette smoke-induced alveolar epithelial–mesenchymal transition is mediated by Rac1 activation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2014. **1840**(6): p. 1838-1849.
345. Chaigne-Delalande, B., et al., *Nonadherent cells switch to a Rac-mediated, SHIP regulated, Akt activation mode for survival*. Oncogene, 2007. **27**(13): p. 1876-1885.
346. Morrison Joly, M., et al., *Two distinct mTORC2-dependent pathways converge on Rac1 to drive breast cancer metastasis*. Breast Cancer Research, 2017. **19**(1).
347. Parri, M. and P. Chiarugi, *Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control*. Cell Communication and Signaling, 2010. **8**(1).
348. Aspenström, P., *Activated Rho GTPases in Cancer—The Beginning of a New Paradigm*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(12).
349. Bertos, N.R. and M. Park, *Breast cancer - one term, many entities?* J Clin Invest. **121**(10): p. 3789-96.
350. Kothari, C., C. Diorio, and F. Durocher, *The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(16).
351. Foulkes, D.M., et al., *Covalent inhibitors of EGFR family protein kinases induce degradation of human Tribbles 2 (TRIB2) pseudokinase in cancer cells*. Science Signaling, 2018. **11**(549).