



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 128**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 38/45** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02712879 .2**

96 Fecha de presentación : **31.01.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1355658**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2003**

54

Título: **Anticuerpo anti HER3 para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades hiperproliferativas.**

30

Prioridad: **31.01.2001 EP 01102236**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.08.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.08.2011**

73

Titular/es: **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN e.V.  
Hofgartenstrasse 8  
80539 München, DE**

72

Inventor/es: **Ullrich, Axel y  
Van der Horst, Edward, Htun**

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 364 128 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti HER3 para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades hiperproliferativas

La presente invención se refiere al uso de una proteína HER3 como una diana para la modulación de la ruta de proteína cinasas activadas por mitógenos (MAP). Además, se describe el uso de una proteína PYK2, y un ácido nucleico que la codifica, como una diana para la modulación de la ruta de MAP cinasas. Inhibiendo la actividad de cinasa de HER3, se inhibe la fosforilación de PYK2, y de este modo la estimulación de la ruta de MAP cinasas. La presente invención es preferiblemente adecuada para aplicaciones, particularmente aplicaciones de diagnóstico o médicas, en las que se desea una inhibición de la ruta de MAP cinasas. De este modo, la invención se refiere al uso de un inhibidor de HER3 para la fabricación de un medicamento para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa asociada con la fosforilación mediada, en el que el inhibidor es un anticuerpo anti HER3 o un fragmento del mismo.

El glioblastoma multiforme, el tumor más cancerígeno en el sistema nervioso central primario, surge de la transformación neoplásica de glioblastos, astrocitos tipo 1 y tipo 2. De manera desarrollada, los glioblastos migran fuera de la zona subventricular del cerebro a la materia blanca en desarrollo, diferenciándose y proliferando en la ruta (1, 2). Esta capacidad inherente de los astrocitos para migrar representa un rasgo clave de la malignidad de los gliomas, cuando células transformadas invaden el tejido circundante.

Entre los mitógenos y factores de supervivencia que están implicados en la activación de la migración de astrocitos, por ejemplo TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , b-FGF y EGF, las neuregulinas tienen un potente efecto sobre la proliferación y diferenciación activando la ruta de MAPK a través de SHC y fosfatidilinositol-3-OH-cinasa (PI<sub>3</sub>-K) (3, 4). Cuatro neuregulinas, NRG1 a HRG4, comprenden una familia de glucoproteínas estructuralmente relacionadas que son producidas mediante procesamiento proteolítico de precursores transmembránicos (5-11). La multitud de isoformas de NRG1, que incluye el factor de diferenciación neu (NDF), la proteína de actividad inductora del receptor de acetilcolina neuronal (ARIA), el factor de crecimiento glial (GGF), el factor derivado de neuronas sensorimotoras (SMDF), y las heregulinas (HRG) (12), refleja sus múltiples actividades reguladoras del crecimiento y de la diferenciación en una variedad de sistemas biológicos diferentes.

La expresión de las HRG se detectó en los sistemas nerviosos central y periférico (13), en los que ejercen actividades biológicas en las uniones de células neuromusculares y de Schwann neuronales, respectivamente. Las HRG representan ligandos para los miembros de la familia de erbB de proteína tirosina cinasas receptoras (RPTK) HER3 (erbB3) y HER4 (erbB4). La familia de HER también incluye HER1 (EGFR) y HER2/neu. HER3 representa una RPTK cuya actividad de cinasa está alterada presumiblemente debido a dos mutaciones en el dominio de cinasa (14). La transmisión de la señal mitogénica implica la unión de HRG a HER3 o a HER4, que a su vez se heterodimeriza con HER2 y se transfosforila en su término C mediante HER2 activada (4, 15). Las moléculas de señalización PI<sub>3</sub>-K, SHC y GRB7 se unen al término C fosforilado de HER3, y median la señal mitogénica para la ruta Ras/Raf (16). El complejo HER2/HER3 posee la mayor mitogenicidad entre los heterodímeros de HER, presumiblemente debido a su redirección a la ruta de reciclaje tras la unión del ligando, en lugar de ser degradado como HER1 (17).

Se demostró que un miembro recientemente identificado de la familia de cinasas de adhesión focal PYK2, también denominado como FAK2, CAK- $\beta$ , RAFTK o CADTK, es un enlace en la activación de MAPK inducida por receptores acoplados a proteínas G (18, 19, 20). La fosforilación de PYK2 conduce al reclutamiento de cinasas de la familia de Src, y a la activación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). PYK2 se expresa predominantemente en el sistema nervioso central, y en células y tejidos derivados de la estirpe hematopoyética, en los que se difunde principalmente a lo largo del citoplasma y se concentra en la región perinuclear (21). PYK2 se puede activar mediante una variedad de estímulos que incrementan los niveles de calcio intracelular (22), y también mediante factores de estrés (por ejemplo choque hiperosmótico, UV, factor  $\alpha$  de necrosis tumoral), induciendo de ese modo cinasa N-terminal Jun (23, 24). Sin embargo, se desconocen los detalles moleculares del mecanismo de activación de PYK2.

Zrihan-Licht et al. (26) demostraron la fosforilación de tirosina de PYK2 (RAFTK) con la estimulación con heregulina en células de cáncer de mama. La expresión de una PYK2 inactiva para cinasa mutada condujo a la supresión de la invasividad inducida por heregulina in vitro (Matrigel) de una estirpe de cáncer de mama. Los autores discuten la posibilidad de que PYK2 está implicada en la activación del receptor de HER2 (ErbB2) mediante heregulina, conduciendo a la activación de MAPK. Sin embargo, no existe ninguna descripción de que PYK2 es un sustrato de fosforilación de HER3.

El documento US 5837815 se refiere a PYK2 y a su papel en la activación de la ruta de señalización de MAPK intracelular. La estimulación, que da como resultado el influjo de calcio, condujo a la activación de PYK2 y a la activación de la MAPK.

También se describe aquí el uso de un ácido nucleico que codifica una proteína PYK2, o un ácido nucleico

complementario a ella, como una diana para la modulación de la actividad de MAP cinasa.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para identificar nuevos moduladores de la actividad de la ruta de MAP cinasa, identificando sustancias capaces de inhibir la fosforilación de HER3 y/o la actividad de HER3 cinasa.

- 5 Se observaron niveles elevados de expresión de PYK2 en células de cáncer de mama T47D, en células de leucemia promielocítica HL-60, y en células híbridas de neuroblastoglioma NO 108-15. Se pueden tratar enfermedades específicas que incluyen neuroblastoma.

En el documento US 5837815 no se puede encontrar ninguna descripción de que PYK2 puede ser fosforilada.

- 10 En este estudio se examina el papel de la fosforilación de la tirosina de PYK2 en estirpes celulares de glioma humano con la estimulación con HRG. Se investigó el mecanismo mediante el cual PYK2 se fosforila, su papel en la ruta de MAPK, y los efectos subsiguientes sobre la invasión tumoral. Se demuestra que una actividad de cinasa de HER3 fosforila directamente PYK2, lo que a su vez amplifica señales mitogénicas mediadas por la ruta de MAPK. Los datos sugieren un papel crítico para PYK2 como regulador de la capacidad invasiva de células de glioma. La materia objeto de la presente invención se describe en las reivindicaciones.

- 15 Un aspecto de la presente invención se refiere al uso de una proteína HER3 como una diana para la modulación de la ruta de MAP cinasa.

Se describe aquí el uso de una proteína PYK2 como una diana para la modulación de la ruta de MAP cinasa.

Se describe aquí un método para identificar nuevos moduladores de la actividad de la ruta de MAP cinasa, identificando sustancias capaces de inhibir la fosforilación de PYK2 y/o la actividad de cinasa de PYK2.

- 20 Las expresiones proteína "HR3" o "PYK2", como se usan en la presente solicitud, engloban particularmente proteínas de mamíferos tales como proteínas de ser humano, ratón, rata, hámster, mono, cerdo, etc. Se prefiere especialmente una proteína HER3 que comprende:

a) la secuencia de aminoácidos como se muestra en el Número de Acceso M34309 de Genbank o publicado en (51), o

- 25 b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 80%, particularmente de al menos 90%, y más particularmente de al menos 95% con ella, en la que la identidad de secuencia de aminoácidos se puede determinar mediante un programa de ordenador adecuado, tal como GCG o BLAST.

Se prefiere además especialmente una proteína PYK2 que comprende:

- 30 a) la secuencia de aminoácidos como se muestra en el Número de Acceso U33284 de Genbank y se publica en (18), o

b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 80%, particularmente de al menos 90%, y más particularmente de al menos 95% con ella, en la que la identidad de secuencia de aminoácidos se puede determinar mediante un programa de ordenador adecuado, tal como GCG.

- 35 Adicionalmente, las expresiones proteína "HER3" y "PYK2" engloban derivados recombinantes o sus variantes, así como sus fragmentos, que tienen actividad biológica. Estos derivados, variantes y fragmentos se pueden obtener como productos de expresión a partir de genes de variantes alélicas, o a partir de genes recombinantemente alterados, por ejemplo modificados o truncados, y/o como productos de escisión proteolítica. La expresión "actividad biológica", en el contexto de HER3, comprende preferiblemente una actividad de cinasa, por ejemplo una actividad de cinasa directa para PYK2, o la capacidad de actuar como un inhibidor, por ejemplo un inhibidor competitivo de HER3 nativa que tiene reducida o abolida la actividad de cinasa. Los restos particularmente importantes para la actividad de cinasa de HER3 son los restos de tirosina Y1257, Y1270 y/o Y1288. De este modo, los análogos de HER3 en los que estos restos se han suprimido o sustituido por otros restos de aminoácidos se pueden usar como inhibidores de HER3 nativa. En el contexto de PYK2, la expresión "actividad biológica" comprende preferiblemente la capacidad de ser fosforilada y actuar como un estimulador de la ruta de MAP cinasa, o la capacidad de actuar como un inhibidor, por ejemplo como un inhibidor competitivo para la estimulación de MAP cinasa que tiene reducida o abolida la actividad de cinasa. Un resto particularmente importante para la actividad de cinasa de PYK2 es lisina (K) en la posición 457 (sitio de unión a ATP). Tales derivados, variantes y fragmentos son obtenibles mediante expresión recombinante de ácidos nucleicos correspondientes en una célula hospedante adecuada, y obteniendo los productos de expresión resultantes mediante métodos conocidos. La actividad de los productos de expresión resultantes se puede determinar según los métodos descritos en la presente solicitud, particularmente en la sección de ejemplos.
- 40
- 45
- 50

La proteína HER3 es codificada por un ácido nucleico, que puede ser un ADN o un ARN. Preferiblemente, el ácido

nucleico comprende:

- 5 a) la secuencia de ácido nucleico como se muestra en el Número de Acceso M34309 de Genbank, o complementaria a ella,
- b) una secuencia de ácido nucleico que corresponde a la secuencia de (a) dentro del alcance de degeneración del código genético, o
- c) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones restrictivas con la secuencia de a) y/o b).

La proteína PYK2 es codificada por un ácido nucleico, que puede ser un ADN o un ARN. Preferiblemente, el ácido nucleico comprende:

- 10 a) la secuencia de ácido nucleico como se muestra en el Número de Acceso U33284 de Genbank, o complementaria a ella,
- b) una secuencia de ácido nucleico que corresponde a la secuencia de (a) dentro del alcance de degeneración del código genético, o
- c) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones restrictivas con la secuencia de a) y/o b).

15 La expresión "hibridación en condiciones restrictivas", según la presente solicitud, se usa como se describe en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press (1989), 1.101-1.104. En consecuencia, la hibridación en condiciones restrictivas se produce cuando todavía se detecta una señal de hibridación positiva después de lavar durante 1 h con 1 x SSC y 0,1% de SDS a 55°C, preferiblemente a 62°C, y lo más preferible 68°C, en particular durante 1 h en 0,2 x SSC y 0,1% de SDS a 55°C, preferiblemente a 62°C, y lo más preferible a 68°C. Una secuencia nucleotídica que se hibrida en tales condiciones de lavado con una secuencia como se muestra en el listado de secuencias, o una secuencia nucleotídica complementaria, o una secuencia dentro del alcance de degeneración del código genético, está englobada por la presente invención.

25 Las moléculas de ácido nucleico como se describen aquí pueden ser moléculas de ácido nucleico recombinantes, generadas mediante métodos recombinantes, por ejemplo mediante procedimientos de amplificación conocidos, tales como PCR. Por otro lado, las moléculas de ácido nucleico también pueden ser ácidos nucleicos sintetizados químicamente. Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico están presentes en un vector, que puede ser cualquier vector procariota o eucariota, en el que la secuencia de ácido nucleico está presente preferiblemente bajo el control de una señal de expresión adecuada, por ejemplo promotor, operador, potenciador, etc. Los ejemplos de vectores procariotas son vectores cromosómicos tales como bacteriófagos, y vectores extracromosómicos tales como plásmidos, en los que se prefieren vectores plasmídicos circulares. Los ejemplos de vectores eucariotas son vectores de levadura o vectores adecuados para células superiores, por ejemplo células de insectos o células de mamíferos, plásmidos o virus.

35 La proteína HER3 nativa es capaz de fosforilar directamente PYK2 y estimular de ese modo la actividad mitogénica mediada por la ruta de MAP cinasa. De este modo, una inhibición de la fosforilación puede conducir a una inhibición de la ruta de MPA cinasa. De este modo, una realización preferida de la presente invención comprende el uso del inhibidor de HER3, que es un anticuerpo anti HER3, para la fabricación de un medicamento para reducir la actividad de una proteína HER3 en una célula diana o en un organismo diana. Esta actividad reducida de HER3 se puede lograr administrando un inhibidor de HER3, particularmente un inhibidor de la actividad de cinasa de HER3. Este inhibidor es un anticuerpo anti HER3. El término "anticuerpo" engloba un antisuero policlonal, un anticuerpo monoclonal, por ejemplo un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano o un anticuerpo recombinante, por ejemplo un anticuerpo monocatenario. Además, el término engloba fragmentos de anticuerpos, por ejemplo fragmentos proteolíticos tales como Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', o fragmentos recombinantes tales como scFv. También se describe aquí la reducción de la expresión de HER3 en una célula diana o un organismo diana. Esta reducción se puede lograr, por ejemplo, inhibiendo la transcripción o traducción de un gen de HER3 nativa, por ejemplo administrando moléculas de ácido nucleico antisentido adecuadas.

45 Debido a su actividad biológica, HER3 es una diana adecuada para la fabricación de agentes para el diagnóstico, prevención o tratamiento de un trastorno asociado a la ruta de MAP cinasa, particularmente un trastorno asociado con la sobreactividad de la ruta de MAP cinasa. Más preferiblemente, HER3 es una diana para el diagnóstico, prevención o tratamiento de un trastorno asociado con la fosforilación de PYK2. Este trastorno es una enfermedad hiperproliferativa, que se puede seleccionar de procesos inflamatorios y tumores tales como cáncer de mama, leucemia mieloide aguda (AML), y particularmente gliomas. Lo más preferible, la presente invención comprende el uso de un inhibidor de HER3, que es un anticuerpo anti HER3, para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la actividad de cinasa de HER3 a fin de inhibir la invasión tumoral, particularmente en gliomas.

Se encontró que la fosforilación de la proteína PYK2 pone en marcha y amplifica la mitogenicidad mediada por la ruta de MAP cinasa. De este modo, una inhibición de la proteína PYK2, particularmente una inhibición de la

fosforilación de PYK2, puede conducir a una inhibición de la ruta de MAP cinasa. Esta inhibición se puede lograr administrando un inhibidor de PYK2, que puede ser una sustancia de bajo peso molecular o un anticuerpo anti-PYK2 como se describe anteriormente (para HER3), o un análogo de HER3 capaz de inhibir la actividad de cinasa de HER3 nativa. Como alternativa, la inhibición se puede lograr administrando un ácido nucleico, por ejemplo un ácido nucleico antisentido. De este modo, se puede reducir la cantidad y/o actividad de PYK2 en una célula diana o en un organismo diana, y/o se puede reducir la expresión de PYK2 en una célula diana o en un organismo diana. Como se describe aquí, se administra una proteína PYK2 mutada, o un ácido nucleico que la codifica, en la que dicha proteína PYK2 mutada muestra una pérdida al menos parcial de fosforilación y/o de actividad de cinasa.

La administración de inhibidores de HER3 se realiza preferiblemente en forma de una composición farmacéutica que comprende adicionalmente vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados. La composición puede ser una disolución inyectable, una suspensión, una crema, un ungüento, un comprimido, etc. La composición es adecuada para aplicaciones de diagnóstico o médicas, por ejemplo aplicaciones preventivas o terapéuticas, particularmente en el campo de cáncer. La dosis y modo de vía de administración dependen del tipo y gravedad del trastorno a tratar, y pueden ser determinados fácilmente por un experto.

Por ejemplo, la administración de anticuerpos se puede llevar a cabo según protocolos conocidos, por ejemplo como se describe en (52). La administración en forma de ácidos nucleicos también se puede llevar a cabo en forma de protocolos conocidos, tal como se describe en (53).

La administración de inhibidores de HER3 se puede combinar con la administración de otros agentes activos, particularmente agentes antitumorales, por ejemplo sustancias citotóxicas e inhibidores de MAP cinasa, tales como PD98059 y UO126.

Todavía una realización adicional de la presente invención es un método para identificar nuevos moduladores de la actividad de la ruta de MAP cinasa, que comprende identificar sustancias capaces de inhibir la fosforilación de HER3 y/o la actividad de cinasa de HER3. Los inhibidores de HER3 se seleccionan preferiblemente de anticuerpos anti-HER3 y compuestos de bajo peso molecular. Adicionalmente, se describe aquí un método para identificar nuevos moduladores de la actividad de la ruta de MAP cinasa, que comprende identificar sustancias capaces de inhibir la fosforilación de PYK2 y/o la actividad de cinasa de PYK2.

El método de identificación de la presente invención puede ser un ensayo de identificación de alto rendimiento, en el que se ensaya en paralelo una pluralidad de sustancias. El ensayo de identificación puede ser un ensayo celular o un ensayo molecular, en el que se determina una interacción de una sustancia a ensayar con la fosforilación o la actividad de cinasa de HER3. Las proteínas pueden estar provistas en un sistema celular, preferiblemente un sistema celular que sobreexpresa HER3, fracciones celulares que contienen HER3, o proteína HER3 sustancialmente aisladas y purificadas, o sus fragmentos, en las que las proteínas son capaces de ser fosforiladas y/o capaces de tener actividad de cinasa. Cualquier sustancia activa identificada mediante este método, por ejemplo cualquier sustancia que tenga actividad inhibidora, se puede usar como un agente farmacéutico o como una estructura líder, que se modifica posteriormente para mejorar las propiedades farmacéuticas.

La presente invención se explica con más detalle en las siguientes figuras y ejemplos.

#### Leyendas de las figuras

Figura 1: Efectos de un inhibidor de c-src PP1 y un inhibidor de HER2 AG825 sobre la fosforilación de tirosina de PYK2. **a**, La fosforilación de tirosina de PYK2 es independiente de c-src con la estimulación con HRG, en contraste con la estimulación con IONO. Se pretrataron gliomas SF767 con 5  $\mu\text{M}$  de PP1 durante 30 minutos, y se estimularon con 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de heregulina (HRG, panel izquierdo) o con 5  $\mu\text{M}$  de ionomicina (IONO, panel derecho) durante 20 min. y 5 min., respectivamente. **b**, La coprecipitación de PYK2 con HER3 depende de la actividad de cinasa de HER2, y la fosforilación de tirosina de PYK2 es proporcional a su unión a HER3. Se pretrataron gliomas SF767 con 10  $\mu\text{M}$  de AG825 durante 1 hora, y se estimularon con 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de heregulina durante 20 min. (HRG). Los lisados celulares se sometieron a inmunoprecipitación (IP) usando anticuerpos anti-PYK2 policlonal ( $\alpha$ -PYK2) o anti-HER3 monoclonal ( $\alpha$ -HER3). El nivel de fosforilación de tirosina se analizó mediante transferencia Western (WB) con un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina ( $\alpha$ -4G10) (**a**, paneles superiores, y **b**, panel superior). La carga igual de proteínas se comprobó volviendo a transferir con anticuerpos  $\alpha$ -PYK2 y  $\alpha$ -HER3, respectivamente (**a**, paneles inferiores, y **b**, paneles central e inferior). La coprecipitación de PYK2 con HER3 se detectó sondando la membrana con anticuerpo  $\alpha$ -PYK2 (**b**, panel central, líneas 1-4). Las células sin estimular se indican mediante NS.

Figura 2: Localización de PYK2 y HER3 en estirpes celulares de gliomas SF763 y SF767. **a**, **b**, En células SF767 (**a**) y en células SF763 (**b**), PYK2 muestra una distribución punteada a lo largo del citoplasma, y está enriquecida en la región perinuclear y en algunas proyecciones celulares prominentes (verde). HER3 (rojo) está muy colocalizada, como se muestra mediante distribuciones que solapan de las dos cepas en la mayoría de los puntos (**b**, recuadros) y en agregados más grandes (amarillo). La colocalización es independiente de la

estimulación con HRG. Las células se fijaron y se inmunotifieron frente a PYK2 (verde) y HER3 (rojo), ya sea sin estimular (NS) o tras la estimulación con  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de heregulina durante 20 min. (HRG). Se muestran secciones ópticas obtenidas mediante microscopía de barrido confocal mediante láser. La barra de escala representa  $10 \mu\text{m}$ .

5 Figura 3: Asociación de PYK2 con el dominio C-terminal de HER3. **a, b, c**, Se transfectaron fibroblastos HEK293 con combinaciones de proteínas de tipo salvaje (HER2, HER3, PYK2) y sus variantes dominantes negativas (HER2-KM, HER3-KM, PYK2-KM) (**a**), con HER2 y PYK2 de tipo salvaje combinadas con HER3 de tipo salvaje o su constructo truncado HER3 $\Delta$ ct (**b**), o con HER2 y PYK2 de tipo salvaje y mutantes de HER3 de restitución (**c**), como se indica. La fosforilación de tirosina de PYK2 depende de la actividad de cinasa de HER2 y de HER3 (**a**), y de la unión al dominio C-terminal de HER3 (**b**). La HER3 coprecipitada se indica mediante una flecha. La activación de PYK2 depende de Y1257, Y1270 e Y1288 en el dominio C-terminal de HER3 (**c**). PYK2 se marcó de forma expresada en su término C con la glucoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Las células se estimularon con  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de heregulina durante 20 min. (HRG), se lisaron y se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpo monoclonal anti-VSV ( $\alpha$ -VSV). Los inmunocomplejos se analizaron mediante transferencia Western (WB) con un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina ( $\alpha$ -4G10, paneles superiores). La carga igual de proteínas se determinó volviendo a transferir con anticuerpo  $\alpha$ -VSV (paneles inferiores).

Figura 4: Fosforilación de GST-PYK2-CT mediante HER3 con la estimulación con HRG. **a, b**, Gliomas SF767 se estimularon con  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de heregulina durante 20 min. (HRG) o con  $1 \mu\text{M}$  de 12-miristato-13-acetato de forbol durante 10 min. (PMA) (**a**), o se pretrataron con 100 nM de wortmanina durante 30 min. (WT) (**b**). La estimulación con PMA se usó como un control negativo. Obsérvese que la actividad de cinasa de HER3 está por debajo de 1% de la actividad de HER2 correspondiente cuando se usa MBP como sustrato, en contraste con GST-PYK2-CT (**a**). Con la estimulación con HRG se aumenta la fosforilación de GST-PYK2-CT mediante HER3, en contraste con la actividad de HER2. La influencia de WT es insignificante, excluyendo de este modo la implicación de  $\text{PI}_3\text{-K}$  en la fosforilación de PYK2 (**b**). **c**, Se transfectaron fibroblastos HEK293 con las combinaciones de proteínas de tipo salvaje (HER2, HER3) y sus variantes dominantes negativas (HER2-KM, HER3-KM) como se indica, y se estimularon con  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de heregulina durante 20 min. (HRG). Sólo los homodímeros de HER3 y los heterodímeros de HER3 con HER2 indujeron e incrementaron la fosforilación de GST-PYK2-CT (**c**, panel superior). La heterodimerización de HER3 con HER2 conduce a una fosforilación más potente del sustrato, indicando que HER2 es importante para la activación de HER3 (**c** y **d**). La transfosforilación de HER3 mediante HER2 se comprobó sondando la membrana con un anticuerpo anti-fosfotirosina  $\alpha$ -4G10 (**c**, panel central superior). La coprecipitación de HER2 con HER3 se excluyó sondando la membrana con anticuerpo anti-HER2  $\alpha$ -HER2 (**c**, panel central inferior). La carga igual de proteínas se comprobó sondando con anticuerpo anti-HER3 ( $\alpha$ -HER3) (**c**, panel inferior). La GST-PYK2-CT fosforilada se indica mediante una flecha. **d**, Cuantificación de la actividad de cinasa mostrada en el panel superior de la Fig. 4c.

Figura 5: PYK2 media la mitogenicidad con la estimulación con HRG. **a, b**, Se pretrataron gliomas SF767 con  $10 \mu\text{M}$  de AG825 durante 1 hora, o con 100 nM de wortmanina durante 30 min. (WT), y después se estimularon con  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de heregulina durante 20 min. (HRG). La fosforilación de tirosina de SHC se elevó mediante HRG, y se atenuó mediante pretratamiento con AG825, pero no se abolió completamente (**a**). Lo mismo se aplica también para la actividad de ERK-2, cuando las células se pretrataron con AG825 o con WT (**b**). Se usaron lisados celulares para la inmunoprecipitación con anticuerpo policlonal anti-SHC ( $\alpha$ -SHC) (**a**), o con anticuerpo policlonal anti-Erk-2 ( $\alpha$ -ERK-2) (**b**). Los inmunocomplejos de  $\alpha$ -SHC se transfirieron con un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina ( $\alpha$ -4G10) (**a**), mientras que los inmunocomplejos de  $\alpha$ -ERK-2 se sometieron a ensayos de MAP cinasa (**b**). MBP fosforilada se indica mediante una flecha. **c**, células PC12 de feocromocitoma inducibles mediante tetraciclina, que expresan de forma estable PYK2-KM (Tet-), o sólo PYK2 (Tet+) endógena, se pretrataron con 100 nM de wortmanina durante 30 min. (WT), o con  $10 \mu\text{M}$  de AG825 durante 1 hora antes de la estimulación con  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de heregulina durante 20 min. (HRG). La actividad de ERK-2 basal es independiente de HER2 y de  $\text{PI}_3\text{-K}$ , mientras que la actividad de ERK-2 estimulada con HRG depende de HER2,  $\text{PI}_3\text{-K}$  y PYK2. La sobreexpresión de PYK2-KM conduce a una atenuación general de la actividad de ERK-2 (compárense las bandas de Tet- con Tet+). La carga igual de proteínas se comprobó sondando con anticuerpo anti-ERK-2 ( $\alpha$ -ERK-2). MBP fosforilada se indica mediante una flecha. **d**, Cuantificación de la actividad de cinasa de ERK-2 mostrada en la Fig. 5c.

Figura 6: PYK2 potencia la actividad de  $\text{PI}_3\text{-K}$  con la estimulación con HRG. **a**, Células PC12 de feocromocitoma inducibles mediante tetraciclina, que expresan de forma estable PYK2-KM (Tet-), o sólo PYK2 (Tet+) endógena, se pretrataron con 100 nM de wortmanina durante 30 min. (WT), o con  $10 \mu\text{M}$  de AG825 durante 1 hora antes de la estimulación con  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de heregulina durante 20 min. (HRG). Los lisados se sometieron a inmunoprecipitación con  $\alpha$ -4G10, y se llevaron a cabo ensayos de  $\text{PI}_3\text{-K}$  (véase la sección de Métodos). La actividad de  $\text{PI}_3\text{-K}$  depende fuertemente de PYK2 con la estimulación con HRG, y es

disminuida por AG825. Se indica el fosfatidilinositol fosforilado. **b**, Cuantificación de la actividad de cinasa de PI<sub>3</sub>-K mostrada en la Fig. 6a.

Figura 7: PYK2-KM inhibe la invasión tumoral con la estimulación con HRG. **a**, Gliomas C6 se infectaron retrovíricamente con un vector de control pLXSN (falso), PYK2, mutante de PYK2 dominante negativo PYK2-KM, o se pretrataron con un inhibidor de MEK1 PD98059 (25  $\mu$ M) durante 30 min., y se llevaron a cabo ensayos de invasión tumoral (véase la sección de Métodos). **b**, La invasión es suprimida en el mismo grado por PD98059 y por la sobreexpresión de PYK2-KM ( $p > 0,95$ ). **c**, Gliomas SF767 se infectaron retrovíricamente con pLXSN o PYK2-KM. **b**, La invasión tumoral es suprimida por la sobreexpresión de PYK2-KM en SF767 ( $p < 0,008$ ), y también en la estirpe celular SF763 ( $p < 0,005$ ), como se muestra usando el mismo ensayo. Se muestran micrografías de campo brillante representativas de células que migraron a través de los filtros de 8  $\mu$ m en 16 h. Las barras de escala representan 100  $\mu$ m (**a**) y 50  $\mu$ m (**c**).

Figura 8: Papel de PYK2 en la señalización de HER2/HER3. El modelo indica una nueva ruta de transducción de señales, que conduce desde la estimulación con HRG hasta la activación de MAPK, e induce invasión tumoral. Para detalles, véase la discusión. TM indica el dominio transmembránico, JM la región yuxtamembránica. Las flechas con una B o una P dentro de un círculo indican unión y fosforilación, respectivamente.

Figura 9: PYK2 se asocia con el dominio C-terminal de HER3. Se transfectaron células HEK293 con constructos de tipo salvaje HER2, PYK2-VSV y mutantes de restitución de HER3. Con la estimulación con HRG, la PYK2 marcada con VSV y la HER3 se hicieron precipitar, se inmunotransfirieron y se sondaron frente a fosfotirosina (PY), PYK2 ( $\alpha$ -VSV) o HER3 ( $\alpha$ -HER3). Obsérvese que para detectar HER3 coprecipitada en inmunoprecipitados de PYK2-VSV, se necesitó una sobreexposición. La activación de PYK2 depende de Y1257, Y1270 e Y1288 en el dominio C-terminal de HER3.

Figura 10: Se transfectaron fibroblastos HEK293 con las combinaciones de proteínas de tipo salvaje (HER2, HER3) y sus variantes dominantes negativas (HER2-KM, HER3-KM) como se indica, y se estimularon con HRG. Sólo los homodímeros de HER3 y los heterodímeros de HER3 con HER2 indujeron una fosforilación incrementada de GST-PYK2-CT. La heterodimerización de HER3 con HER2 conduce a una fosforilación más fuerte del sustrato, indicando que HER2 es importante para la activación de HER3. A fin de elucidar el contenido de fosforilación de GST-PYK2-CT, la transferencia se sondó con anticuerpo anti-fosfotirosina ( $\alpha$ -PY), anti-fosfoserina ( $\alpha$ -PS) o anti-fosfotreonina ( $\alpha$ -PT). GST-PYK2-CT se fosforila en la tirosina con la estimulación con HRG, mientras que, con la estimulación con HRG, se detecta fosforilación constitutiva de serina y ninguna fosforilación de treonina, respectivamente.

Figura 11, 12: Se usaron c-SRC recombinante, GST-HER2-KD y GST-HER3-KD expresadas bacterianamente como enzimas, y GST-PYK2-CT (11) como sustrato. Se muestran geles teñidos con Coomassie, para confirmar una carga igual de proteínas (11, panel derecho). (12) Se usó el mismo procedimiento experimental como en (11), excepto que se usó MBP como sustrato. Obsérvese que GST-HER3-KD fosforila GST-PYK2-CT de forma más fuerte que GST-HER2-KD, mientras que, al usar MBP como sustrato, es a la inversa, demostrando especificidad de HER3 por el sustrato.

Figura 13, 14: Células PC 12 se dejaron sin tratar, o se pretrataron con 10  $\mu$ M de AG825, 50  $\mu$ M de PD98059, o con ambos, y se estimularon subsiguientemente con HRG. Las inmunoprecipitaciones de HER2 ( $\alpha$ -HER2) o de proteínas tirosilfosforiladas ( $\alpha$ -PY) se sondaron con anticuerpo anti-fosfotirosina ( $\alpha$ -PY). Este experimento demuestra que AG825 inhibe completamente la fosforilación de tirosina de HER2 y de SHC, puesto que SHC es incapaz de unirse a HER2 o a HER3 después del pretratamiento con AG825. El sondaje nuevamente de la transferencia con anticuerpo anti-HER2 confirma una carga igual de proteínas. SHC se indica mediante una flecha.

Figura 15, 16: Lisados de células completas (WCL) de células de glioma C6 se prepararon en paralelo al ensayo de invasión tumoral, y el contenido de ERK-2 fosforilada se evaluó sondando con un anticuerpo anti-fosfo-ERK2 específico (panel superior). Para confirmar una carga igual de proteínas, la transferencia se sondó nuevamente con un anticuerpo anti-pan-ERK. (16) Se usó el mismo procedimiento experimental como en (15) para las células SF767. ERK-2 fosforilada se indica mediante una flecha. PYK2-KM dominante negativo suprime la actividad de ERK-2 en el mismo grado que el inhibidor de MEK-1 PD98059.

## Ejemplos

### 1. Métodos

#### 1.1. Materiales y métodos generales

Los medios se adquirieron de Gibco; el suero fetal bovino (FBS) y el suero de caballo se adquirieron de Sigma. Las

membranas Hybond ECL y el  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP se adquirieron de Amersham, y PP1, AG825 (ref. 45), wortmanina (WT), PD98059 y la ionomicina (IONO) se adquirieron de Calbiochem. Se usaron anticuerpos provocados frente a las siguientes proteínas: PYK2 (anticuerpo policlonal de cabra N19, Santa Cruz, y anticuerpo policlonal de conejo (pAb) Upstate Biotechnology, Inc. (UBI)), ERK2 (pAb C14, K23, Signal Transduction), SHC (pAb (ref. 46), mAb, Affiniti), HER3 (anticuerpo monoclonal de ratón (mAb) 2F12, UBI), p85 (mAb UB93-3, UBI), VSV (mAb P5D4, Roche Diagnostics), y fosfotirosina (mAb 4G10, UBI). Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP se adquirieron de Biorad, y los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromo se adquirieron de Molecular Probes. Las cámaras Transwell (0,3 cm<sup>2</sup>, 8 μm) se adquirieron de Costar. Matrigel con contenido reducido de factor de crecimiento (GFRM) se adquirió de Collaborative Biomedical Products. Las placas de cromatografía de capa fina (gel de sílice 60) prerrevestidas con oxalato procedían de Merck. La proteína de fusión GST-HRG humana recombinante (HRG) y GST-PYK2-CT se produjeron en *E. coli*, y se purificaron como se describe (4) o usando métodos estándar. Las estirpes celulares HEK293 (ATCC CRL-1573), C6 de rata (ATCC CCL-107) y PC12 (ATCC CRL-1721), y SF763 (Sugen Inc.), SF767 (Sugen Inc.) y PhoenixA humanas (ATCC SD-3443) se cultivaron según el protocolo del proveedor. El sistema de PC12 inducible mediante tetraciclina, que expresa de forma estable PYK2-KM (Tet-off), se describió previamente (25).

### 1.2 Estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal

De forma breve, SF763 y SF767 (3 x 10<sup>5</sup> células) se hicieron crecer en cubreobjetos y no se alimentaron durante 24 h. Tras la estimulación con 5 μg/ml de HRG durante 20 min., las células se fijaron con formaldehído al 3,7%, y se permeabilizaron con saponina al 0,2% (Sigma) en BSA al 3% (Sigma). El bloqueo se llevó a cabo con BSA al 3% durante 1 h. Las proteínas PYK2 y HER3 se marcaron con los anticuerpos primarios indicados, y se tiñeron usando un anticuerpo secundario α-488 anti-cabra de burro acoplado a fluorocromo para PYK2, y anticuerpo secundario anti-ratón de conejo acoplado a TRITC para HER3 (Molecular Probes). La microscopía confocal se llevó a cabo usando un microscopio LSM 410 (Zeiss), como se describe (47).

### 1.3 Constructos plasmídicos y mutagénesis dirigida al sitio

Se generaron los constructos pcDNA3.1-PYK2-VSV y pcDNA3.1-PYK2-KM-VSV usando los constructos pRK5 y métodos estándar. PYK2-KM se generó como se describe (25). GST-PYK2-CT se generó usando el constructo pRK5 y amplificando el término C de PYK2 mediante PCR (posiciones 716-1009). El fragmento se subclonó en el vector de expresión procarriota pGEX-5X1 (Pharmacia). Se llevaron a cabo en HER3 mutaciones de tirosina por fenilalanina usando el constructo pcDNA3.1-HER3 y el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene), según el protocolo del fabricante. La incorporación correcta de las mutaciones se verificó mediante secuenciación de ADN.

GST-HER2-KD se generó usando el constructo pRK5-HER2, y amplificando los a.a. 676-963 mediante PCR. GST-HER3-KD se generó usando el constructo pcDNA3.1-HER3, y amplificando el dominio de cinasa de HER3 (a.a. 645-981). En ambos casos, se insertaron sitios de restricción de 5'-EcoRI y 3'-NotI, en los fragmentos de ADNc mediante PCR. Los fragmentos se subclonaron en el vector pGEX-4T1 (Pharmacia), y las proteínas se expresaron en el hospedante bacteriano BL21-CodonPlus.

Para la purificación de proteínas, se inoculó toda la noche una colonia recientemente transformada, se diluyó 1/10, se hizo crecer hasta OD<sub>600</sub> = 0,45, y se indujo con IPTG (conc. final 0,1 mM). Después de 3 h de inducción a 30°C y buena aireación a 225 rpm, las células se cosecharon, se lisaron, y las proteínas se purificaron según protocolos estándar.

### 1.4 Sobreexpresión transitoria de proteínas PYK2, PYK2-KM, HER2, HER2-KM, HER3, y HER3-KM en células eucariotas

Para la expresión proteica transitoria, se usó el sistema de células HEK293. Células HEK293 se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% de FCS, penicilina y estreptomocina (100 UI/ml) a 7,5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. Las transfecciones se llevaron a cabo usando un método de fosfato de calcio modificado (48). De forma breve, se incubaron 2,5 x 10<sup>5</sup> células toda la noche en 3 ml de medio de crecimiento. Se mezcló 1 μg de ADN superenrollado con disolución de CaCl<sub>2</sub> 0,25 M en un volumen final de 400 μl. La mezcla se añadió al mismo volumen de tampón de transfección 2x (50 mM de BES, pH 6,95, 280 mM de NaCl, 1,5 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), y se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente antes de que se añadiese gota a gota a las células. Tras la incubación durante 12 h a 37°C en 3% de CO<sub>2</sub>, el medio se eliminó, las células se lavaron dos veces con PBS, y después se les dejó en ayunas durante 24 h en DMEM suplementado con 0,1% de FCS.

### 1.5 Inmunotransferencia Western

Células SF763, SF767, o células HEK293 transfectadas, se dejaron sin tratar, o se pretrataron con PP1 (10 μM), AG825 (10 μM), wortmanina (WT) (100 nM) y PD98059 (25 μM) durante 30-60 min. tras la estimulación con 5 μg/ml de HRG humana recombinante durante 20 min., o con 5 μM de IONO durante 5 min. a 37°C. Con la estimulación



con HRG o con IONO, las células se lisaron en hielo en un tampón de lisis (50 mM de HEPES pH 7,5, que contiene 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 10% (v/v) de glicerol, 1% (v/v) de Triton X-100, 1 mM de fluoruro de sodio, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM de ortovanadato de sodio, 1 mM de  $\beta$ -fosfato de glicerol, 10 mg/ml de aprotinina). Los lisados brutos se centrifugaron a 12500 g durante 20 minutos a 4°C. Para las inmunoprecipitaciones, se añadió el antisuero apropiado y 30  $\mu$ l de proteína A-sefarosa (Pharmacia) al lisado aclarado, y se incubó durante 3 h a 4°C. Los inmunoprecipitados se lavaron con un tampón de lavado (20 mM de HEPES pH 7,5, que contiene 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de fluoruro de sodio, 10% (v/v) de glicerol, 1% (v/v) de Triton X-100). Se añadió tampón de muestra, que contiene SDS y 2-mercaptoetanol, y las muestras se desnaturalizaron calentando a 95°C durante 4 min.

Las proteínas se fraccionaron mediante SDS-PAGE, y se transfirieron electroforéticamente a filtros de nitrocelulosa. Para el análisis de inmunotransferencia, los filtros de nitrocelulosa se incubaron primero con anticuerpos primarios monoclonales de ratón o policlonales de conejo durante 3 h a 4°C. Después, se añadió un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra o anti-conejo de cabra acoplado a HRP (Biorad), seguido de una reacción del sustrato con quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham). La reacción del sustrato se detectó en una película Kodak X-Omat. Los filtros que se usaron más de una vez con diferentes anticuerpos se extrajeron según el protocolo del fabricante, se bloquearon y se volvieron a sondar.

#### 1.6 Generación de retrovirus recombinantes y transferencia génica mediada por retrovirus

De forma breve, se generaron pLXSN-PYK2 y pLXSN-PYK2-KM clonando un fragmento de EcoRI-XhoI a partir de pRK5 que posee los ADNc de PYK2 WT y PYK2 inactiva para cinasa, K457M (PYK2-KM), respectivamente, en pLXSN. El título de virus anfitriónico, que se generó mediante transfección transitoria de plásmidos de expresión de retrovirus en la estirpe celular productora de virus PhoenixA (ATCC), se determinó infectando células NIH-3T3 con diluciones en serie de sobrenadantes de PhoenixA libres de células, que contienen retrovirus, y contando el número de colonias resistentes a G418. Los títulos fueron aproximadamente  $1 \times 10^6$  cfu/ml tanto para los sobrenadantes del virus de PYK2 como de PYK2-KM. Se incubaron células C6, SF763 y SF767 subconfluentes ( $9 \times 10^5$  células) con sobrenadantes de células que liberan títulos elevados de los virus de pLXSN-PYK2 o pLXSN-PYK2-KM ( $1 \times 10^6$  G418 cfu/ml) durante 24 h en presencia de Polybrene (4 mg/ml, Aldrich).

#### 1.7 Ensayo de cinasa in vitro

Los ensayos de MAP cinasa y de PI3 cinasa se llevaron a cabo como se describe previamente (49, 50).

Los ensayos de cinasa de HER3 se llevaron a cabo usando inmunoprecipitados de HER2 o HER3, o 500 ng de GST-HER2-KD o GST-HER3-KD recombinante. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces en tampón de lisis, y una vez en tampón de reacción de cinasa (25 mM de HEPES pH 7,5, 7,5 mM de  $MgCl_2$ , 7,5 mM de  $MnCl_2$ , 1 mM de DTT, 100  $\mu$ M  $Na_3VO_4$ ). Antes de que comenzase la reacción de cinasa, los inmunoprecipitados o las fusiones con GST se equilibraron añadiendo 30  $\mu$ l de tampón de reacción de cinasa que incluye 10  $\mu$ g GST-PYK2-CT o MBP, durante 2 minutos a 30°C. La reacción de cinasa se inició añadiendo 10  $\mu$ M de ATP (que incluya 10  $\mu$ Ci de  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP), se incubó durante 30 minutos a 30°C y añadiendo 30  $\mu$ l de tampón de Lämmli.

#### 1.8 Ensayo de invasión tumoral

El ensayo de invasión tumoral se llevó a cabo como se describe previamente (31). De forma breve, se cultivaron en placas  $3 \times 10^5$  células en cámaras Transwell prerrevestidas con 100  $\mu$ g de GFRM. Como quimioatrayente, se usó medio de NIH-3T3 acondicionado. Las células se estimularon con 5  $\mu$ g/ml de HRG durante el experimento. Tras 16 h de incubación, las células no invasivas se eliminaron con tarugos de algodón, mientras que las células invasivas se fijaron, se tiñeron con violeta de cristal, y se contaron bajo iluminación de campo brillante usando un microscopio invertido Axiovert135 (Zeiss). Los recuentos procedentes de 4 filtros para cada cepa se reunieron y se compararon entre diferentes cepas usando la prueba de la t de dos colas.

### 2. Resultados

#### 2.1 La fosforilación de tirosina de PYK2 depende de HER2 y de HER3

La tirosina de PYK2 se fosforila en la estirpe celular de glioma humano SF767 con la estimulación con HRG (Fig. 1a). A fin de evaluar el mecanismo de la fosforilación de tirosina de PYK2 inducida por HRG, se inhibieron dos proteína tirosina cinasas candidatas, c-src y HER2. Se ha dado a conocer previamente que la c-src cinasa se asocia con HER2 tras la estimulación con HRG, y fosforila PYK2 con la estimulación mediante GPCR (20). La inhibición de c-src con PP1 antes de la estimulación con HRG indica que c-src no media la fosforilación de tirosina de PYK2 después del tratamiento con HRG. Por el contrario, la estimulación mediante ionomicina, que conduce a un influjo de iones  $Ca^{2+}$  de forma análoga a una estimulación mediante GPCR (25), induce una fosforilación de tirosina de PYK2 que depende de la actividad de c-src (Fig. 1a, panel izquierdo frente al panel derecho, líneas 3 y 4).

En la estirpe celular de carcinoma de mama MDA-MB-435, se ha demostrado que la activación de HER2 inducida

por HRG, que está mediada por la heterodimerización entre HER2 y HER3, conduce a la fosforilación de tirosina de PYK2 (26). Una proteína fosforilada en la tirosina, de  $M_r = 113$  kDa, que se identificó como PYK2, coprecipita con HER3 en células SF767 antes de la estimulación con HRG (Fig. 1b, paneles superior y central, líneas 1-4). Por el contrario, la precipitación de HER2 no revela asociación con PYK2. Con la estimulación con HRG, aumenta la fosforilación de tirosina de PYK2 (Fig. 1b, panel superior, líneas 5 y 7), pero se atenúa en presencia del inhibidor de HER2 AG825 (Fig. 1b, panel superior, líneas 6 y 8), indicando que la fosforilación de tirosina de PYK2 depende de la actividad de cinasa de HER2. La cantidad de PYK2 que coprecipita con HER3 no es elevada mediante la estimulación con HRG (Fig. 1b, panel central, líneas 1 y 3), pero disminuye tras la adición de AG825 (Fig. 1b, panel central, líneas 2 y 4). También se obtienen los mismos resultados en la estirpe celular de glioma SF763, y sugieren una asociación constitutiva de PYK2 con HER3, que depende de la HER2 cinasa.

Para analizar adicionalmente una colocación celular de PYK2 y HER3, se llevaron a cabo estudios de inmunofluorescencia en estirpes celulares SF763 y SF767 usando un microscopio confocal de barrido de láser (Fig. 2). En células no estimuladas, PYK2 está localizada principalmente en el citoplasma perinuclear en un patrón puntuado, y la distribución de HER3 es muy coincidente. Con la estimulación con HRG, la colocación de PYK2 con HER3 permanece sin cambio. De este modo, los estudios de inmunofluorescencia confirmaron una asociación constitutiva, independiente de HRG, entre PYK2 y HER3.

## 2.2 PYK2 se asocia con la región intracelular de HER3

Se usó un sistema de sobreexpresión ectópica para investigar con detalle cómo la fosforilación de tirosina de PYK2 depende de la unión a HER3. Se usaron fibroblastos HEK293 para expresar HER2, HER3 y PYK2 de tipo salvaje, o los constructos de mutantes dominantes negativos HER2-KM, HER3-KM y PYK2-KM, en los que la lisina crítica para la unión de ATP se intercambiaba por alanina, haciendo a la cinasa inactiva. La fosforilación de tirosina de PYK2 fue elevada con la estimulación con HRG de células que expresan todos los constructos de tipo salvaje (Fig. 3a, líneas 1 y 2). Sin embargo, en células que expresan HER3-KM (Fig. 3a, líneas 3 y 4) o HER2-KM (Fig. 3a, líneas 5 y 6), la estimulación con HRG no indujo la fosforilación de tirosina de PYK2. Esta observación es consistente con los datos de estirpes celulares de glioma (Fig. 1b), en los que la inhibición de HER2 abolió la activación de PYK2, pero implica además que la activación de PYK2 inducida por HRG depende de actividades de cinasas funcionales de HER2 y HER3.

Posteriormente, se usó un mutante de HER3, con una supresión C-terminal (HER3 $\Delta$ CT), para analizar la contribución del dominio C-terminal a la fosforilación de tirosina de PYK2 inducida por HRG (Fig. 3b). Se observó una proteína que coprecipita de  $M_r = 180$  kDa en inmunocomplejos de PYK2, que fue fosforilada y se confirmó que era HER3 (Fig. 3b, líneas 1 y 2). El mutante de supresión de HER3 abolió la fosforilación de tirosina de PYK2 y también la coprecipitación de HER3, indicando que PYK2 se asocia con la región C-terminal de HER3 (Fig. 3b, líneas 3 y 4). El dominio intracelular de HER3 aloja 13 sitios de fosforilación que son transfosforilados presumiblemente por HER2 después de la estimulación con HRG. Las tirosinas Y1035, Y1178, Y1203, Y1241, Y1257 e Y1270 son sitios de atraque potenciales para los dominios de homología 2 de src (SH2) del dominio regulador p85 de  $PI_3$ -K (27), mientras que Y1309 es un sitio de unión para SHC (28). Para identificar los sitios de unión putativos para PYK2 en el dominio C-terminal de HER3, se usaron 13 mutantes de restitución, que reemplazan todos los restos de tirosina por fenilalaninas, y que se intercambian entre sí nuevamente a una tirosina. Se llevaron a cabo experimentos de sobreexpresión en fibroblastos de HEK293, usando PYK2 y HER2 de tipo salvaje, y mutantes de restitución individuales de HER3 (Fig. 3c). Usando este enfoque, se identificaron tres restos de tirosina Y1257, Y1270 e Y1288, que son críticos para la fosforilación elevada de tirosina de PYK2 con la estimulación con HRG (Fig. 3c, líneas 13-18). Estas observaciones muestran que la estimulación de tirosina de PYK2, inducida por HRG, depende de su unión a Y1257, Y1270 e Y1288 en el dominio C-terminal de HER3.

## 2.3 La fosforilación de tirosina de PYK2 depende de la actividad de cinasa de HER3

Se ha dado a entender que, en contraste con HER2, la actividad de cinasa de HER3 está alterada (29), aunque HER3 se puede unir a ATP y a su análogo TNP-ATP (30). Para identificar la cinasa que es responsable de la fosforilación de tirosina de PYK2 con la estimulación con HRG, se realizaron ensayos de cinasa *in vitro*, precipitando HER2 o HER3, usando proteína básica de mielina (MBP) y una proteína de fusión con GST de la región C-terminal de PYK2 (GST-PYK2-CT), como sustratos (Fig. 4a). Con la estimulación de células SF767 con HRG o con 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA), MBP se fosforiló mediante HER2, pero no mediante HER3 (Fig. 4a, barras blancas). Sorprendentemente, sin embargo, GST-PYK2-CT fue fosforilada por HER3 de una manera dependiente de la estimulación con HRG, pero no por HER2 (Fig. 4a, barras negras). Puesto que se ha demostrado que  $PI_3$ -K se une a la cola citoplásmica de HER3, se investigó un papel potencial de  $PI_3$ -K en la fosforilación de PYK2 precipitando HER2 o HER3 en presencia o ausencia del inhibidor de  $PI_3$ -K wortmanina (WT) (Fig. 4b). Los resultados indican que  $PI_3$ -K no es responsable de la fosforilación directa de GST-PYK2-CT. Consistente con este hallazgo, la precipitación de PYK2 en las mismas condiciones experimentales mostró que su elevada fosforilación de tirosina con la estimulación con HRG depende de  $PI_3$ -K. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que HER3 es la cinasa que

fosforila la región C-terminal de PYK2.

Para verificar que HER3 fosforila directamente PYK2, se sobreexpresaron HER2 y HER3 separadamente, o juntas en combinaciones de constructos de tipo salvaje o mutantes dominantes negativos en células HEK293 (Fig. 4c). Los inmunocomplejos de los receptores se sometieron a un ensayo de cinasa *in vitro*, y revelaron que, tras la estimulación con HRG, HER3 fosforila GST-PYK2-CT, mientras que HER2 no lo hace (Fig. 4c, panel superior, líneas 3, 4, 5 y 6 frente a líneas 1 y 2). Los homodímeros de HER3 también fosforilaron GST-PYK2-CT, pero en un grado menor en comparación con HER3 transactivada (Fig. 4c, panel superior, líneas 3 y 4). Para demostrar que HER3 es transfosforilada por HER2 con la estimulación con HRG, se sondó con anticuerpo monoclonal antifosfotirosina  $\alpha$ -4G10 (Fig. 4c, panel superior central). También se demuestra que no hubo coprecipitación significativa de HER2 en el inmunocomplejo de HER3 en las condiciones de ensayo, confirmando que HER2 no es la cinasa que fosforila GST-PYK2-CT (Fig. 4c, panel inferior central). Se concluye que HER3 fosforila directamente PYK2 con la estimulación con HRG.

La cotransfección de fibroblastos HEK293 con PYK2, HER2 y mutantes de restitución individuales de HER3, identificaron tres restos de tirosina, Y1257, Y1270 e Y1288, que son críticos para la fosforilación elevada de tirosina de PYK2 y su unión a HER3 con la estimulación con HRG (Fig. 9). De este modo, parece que la unión de PYK2 a estos sitios es un prerrequisito para su fosforilación de tirosina y la asociación física con HER3.

Adicionalmente, se determinó sobre cuáles aminoácidos se produjo el suceso de fosforilación de GST-PYK2-CT. Se detectaron restos fosforilados de tirosina y de serina, pero no restos de treonina. Los restos de tirosina se fosforilaron de manera dependiente de la estimulación con HRG, mientras que la fosforilación en los restos de serina fue constitutiva e independiente de la estimulación con HRG, sugiriendo que una serina cinasa contaminante coprecipitó con HER3.

Para excluir la posibilidad de que una cinasa que se asocia fosforile de forma no específica GST-PYK2-CT en nuestros sistemas de mamífero, se purificaron fusiones con GST recombinantes expresadas bacterianamente de los dominios de cinasa de HER2 (GST-HER2-KD) y HER3 (GST-HER3-KD). Se llevaron a cabo ensayos de cinasa *in vitro* usando como enzimas GST-HER2-KD o GST-HER3-KD, como control positivo c-SRC recombinante, y como sustrato GST-PYK2-CT (Fig. 10). Mientras que c-SRC recombinante mostró la señal de fosforilación de GST-PYK2-CT más potente (Fig. 10, panel izquierdo, línea 1), también se observó una fosforilación de GST-PYK2-CT con GST-HER3-KD y con GST-HER2-KD, pero que fue más potente usando GST-HER3-KD (Fig. 10, panel izquierdo, compárense las líneas 2 y 3). Para mostrar especificidad de la reacción de cinasa, se repitió el experimento usando como sustrato MBP (Fig. 11, panel izquierdo). Nuevamente se observó la señal de fosforilación más potente con c-SRC (Fig. 10, panel izquierdo, línea 1), pero adicionalmente se observó que GST-HER2-KD también fosforiló MBP, mientras que GST-HER3-KD no lo hizo (Fig. 11, panel izquierdo, compárense las líneas 2 y 3). Este experimento demuestra claramente que GST-PYK2-CT es un sustrato específico de HER3, y confirma los datos obtenidos a partir de células SF767 y HER293.

Adicionalmente se examinaron en paralelo sucesos de fosforilación de ERK-2, y se midió una disminución en la fosforilación de ERK-2 en el mismo grado usando PD98059 o expresando PYK2-KM en ambas estirpes celulares (Fig. 15, 16, panel superior, compárense las líneas 6, 7 con 5).

#### 2.4 PYK2 amplifica la mitogenicidad de la ruta de señalización de HER2/HER3

Con la estimulación de HER3 y HER2,  $PI_3$ -K y SHC se unen al término C de HER3, y median la mitogenicidad a través de la ruta de Ras/Raf (15). Para ensayar la influencia de HER2 y  $PI_3$ -K sobre la activación de MAPK, se añadieron sus inhibidores específicos AG825 y wortmanina (WT), respectivamente, a células SF767 antes de la estimulación con HRG. Después, se precipitó SHC, o se llevaron a cabo ensayos de MAP cinasa. La fosforilación de tirosina de SHC estimulada por HRG, y la actividad de ERK-2, disminuyeron, pero no se abolieron por la inhibición de HER2 (Fig. 5a, 5b, panel izquierdo). El experimento análogo usando WT para la inhibición de  $PI_3$ -K reveló que la actividad de ERK-2 fue reducida por WT (Fig. 5b, panel derecho). Estos hallazgos indican que la mitogenicidad inducida por HRG depende sólo parcialmente de HER2 y  $PI_3$ -K.

Para caracterizar con más detalle el papel de PYK2 en la señalización aguas abajo de HER2/HER3, se usó un sistema inducible por tetraciclina (Tet-off) en la estirpe celular de feocromocitoma PC12. Las células PC12 son ricas en PYK2, de manera que, en presencia de Tet, se expresa predominantemente PYK2 endógena, mientras que su eliminación conduce a la sobreexpresión de PYK2 dominante negativa, PYK2-KM. Se inhibió HER2 o  $PI_3$ -K con AG825 y WT, respectivamente, antes de la estimulación con HRG, se precipitó ERK-2, y se sometió a los inmunocomplejos a ensayos de MAP cinasa (Fig. 5c). La actividad de ERK-2 basal no estuvo influida por AG825 ni por WT, pero fue abolida por la expresión de PYK2-KM. Sin embargo, la actividad de ERK-2 estimulada por HRG fue atenuada por los dos inhibidores, y también fue abolida por la expresión de PYK2-KM. Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en SF767 (Fig. 5b). Tomados en conjunto, estos resultados indican que la actividad de ERK-2 constitutiva depende de PYK2, y es independiente de HER2 y de  $PI_3$ -K, mientras que la actividad de ERK-2 estimulada con HRG depende de HER2 y de  $PI_3$ -K, y también de PYK2.

Además de su papel en la proliferación celular y en la prevención de la apoptosis, se ha demostrado previamente una influencia de PI<sub>3</sub>-K sobre la invasión de carcinoma (31). Por lo tanto, se investigó la potencia de PYK2 y su mutante dominante negativo PYK2-KM para regular la activación de PI<sub>3</sub>-K con la estimulación con HRG. Usando el sistema Tet-off en células PC12, se sometieron lisados celulares a ensayos de PI<sub>3</sub>-K, en los que se observó una activación de PI<sub>3</sub>-K dependiente de PYK2 con la estimulación con HRG (Fig. 6, panel superior, líneas 1 frente a 2 con 7 y 8). La inhibición de la actividad de cinasa de HER2 no abolió completamente la actividad de PI<sub>3</sub>-K, indicando un mecanismo de activación de PI<sub>3</sub>-K independiente de HER2 (Fig. 6, panel superior, líneas 8 y 12). Estos resultados suponen un papel importante de PYK2 en la mediación de la mitogenicidad de la ruta de señalización de MAPK, y en la activación de PI<sub>3</sub>-K con la estimulación con HRG.

## 10 2.5 PYK2-KM inhibe la invasión tumoral bloqueando la mitogenicidad de la ruta de señalización de HER2/HER3

Los gliomas representan un fenotipo de tumor cerebral altamente neoplásico, con un mal pronóstico (32). Se ha demostrado que PI<sub>3</sub>-K liga la señalización de  $\alpha$ 6 $\beta$ 4-integrina al comportamiento invasivo de células de tumor de mama (31). Además, se ha dado a conocer que la activación de MAPK a través de la señalización de  $\alpha$ 6 $\beta$ 4-integrina es relevante para la invasión, debido a su importancia en la migración y su capacidad para fosforilar miosina cinasa de cadena ligera (33). Usando gliomas C6 como un sistema modelo para la invasión tumoral (34), se ensayó si el mutante dominante negativo de PYK2, PYK2-KM, puede inhibir la invasión tumoral bloqueando la ruta de MAPK. Se infectaron retrovíricamente las células con PYK2-KM antes de la estimulación con HRG, y también se pretrataron las células con el inhibidor de MEK1 PD98059 (Fig. 7a). La inhibición de MEK1 atenuó fuertemente la invasividad, y se observó una abolición comparable del fenotipo invasivo con la infección de las células con PYK2-KM. Parece que la señal mitogénica del dímero HER2/HER3 es disminuida por PYK2-KM; sin embargo, la sobreexpresión de PYK2 en células C6 no alteró su fenotipo invasivo (Fig. 7b). La expresión de PYK2 en células C6 es comparablemente más débil que en células SF763 o SF767, pero parece que esto no interfiere con su potencia invasiva. También se ensayaron estirpes celulares de glioma SF763 y SF767 en el ensayo de invasión tumoral, tras la infección vírica con el constructo de PYK2-KM. Nuevamente, se observó una fuerte inhibición del comportamiento invasivo de células tumorales por PYK2-KM (Fig. 7d). Estos resultados demuestran que PYK2 puede mediar la mitogenicidad a través de la ruta de MAPK, que desempeña un papel importante en el comportamiento invasivo de gliomas con la estimulación con HRG.

## 3. Discusión

La proteína tirosina cinasa PYK2 citoplásmica está en el punto de convergencia de las rutas de transducción que transmiten señales desde integrinas estimuladas, receptores acoplados a proteína G y receptores de PTK hacia efectores aguas abajo. Un estímulo importante que activa PYK2 es HRG (25). Tanto PYK2 como HRG son expresados predominantemente en el sistema nervioso central, y los genes que codifican las dos proteínas están localizados muy próximos entre sí en el cromosoma 8 (34). HRG es un ligando promiscuo para HER3 y HER4, miembros de la familia de erbB de las RPTK, y el módulo de la señalización de erbB representa uno de los inductores más potentes de mitogenicidad (35). La unión de HRG conduce a la formación de heterodímeros de HER2/HER3 y de HER2/HER4, activando de ese modo HER2, que transfosforila HER3 o HER4 (35). Se sabe que las moléculas de señalización SHC y PI<sub>3</sub>-K se unen a la región C-terminal de HER3, y promueven la mitogenicidad (4, 15, 35). Estos trozos de información, obtenidos en varios sistemas modelo, nos alentaron a explorar una ruta de señalización estimulada con HRG que implique HER2/HER3 y PYK2 en estirpes celulares de glioblastoma que estén desprovistas de HER4. Basándose en los datos presentados, se propone un modelo en el que PYK2 es fosforilada por HER3 con la estimulación con HRG, e induce invasividad a través de la ruta de MAPK (fig. 8).

Los ensayos de inmunoprecipitación indican una asociación constitutiva de PYK2 con HER3, que es promovida por la actividad de HER2 (Fig. 1). Estudios de inmunofluorescencia confirmaron la asociación constitutiva, mostrando que las dos proteínas se colocan en un patrón puntuado a lo largo del citoplasma, independiente de la estimulación con HRG (Fig. 2). Se sabe que HER3 es internalizada a través de la ruta endocítica mediada por clatrina (17). Recientemente se han mostrado distribuciones puntuadas similares para varias proteínas asociadas con esta ruta, por ejemplo mHip1 r y EGFR (36, 37). El movimiento centrípeto de las vesículas revestidas con clatrina hacia la región perinuclear, que se produce en la escala de tiempo de varios minutos, ha sido demostrado directamente usando una fusión de GFP-clatrina en células de Dictyostelium y COS-1 (38, 39). Un estado de activación prolongado de los complejos de HER3/PYK2 en los endosomas durante el reciclaje permitiría la asociación recurrente de otras moléculas de señalización, y serviría así para amplificar la señal iniciadora. Esta accesibilidad prolongada de los complejos de HER3/PYK2 y su transporte hacia el sitio de actividad de MAPK podría explicar la mitogenicidad excepcionalmente potente de los heterodímeros de HER2/HER3, en comparación con otros miembros de la familia de erbB (35). De hecho, se ha demostrado que los heterodímeros de HER2/HER3 se reciclan, mientras que los dímeros que contienen HER1 se degradan vía la ruta de ubiquitinación (17).

Aunque la asociación de PYK2 con HER3 y su reciclaje parece ser independiente de HRG, la fosforilación de tirosina de PYK2 es inducida por la estimulación con HRG. La evaluación del mecanismo mediante el cual PYK2 es activada con la estimulación con HRG muestra que la actividad intacta de cinasa de HER3 es crítica para la activación de PYK2 (Fig. 3). Específicamente, se muestra que los restos de tirosina Y1257, Y1270 y/o Y1288 en la región C-

terminal de HER3 son importantes para la activación de PYK2. Finalmente, los ensayos de cinasa *in vitro* mostraron que HER3 fosforila directamente GST-PYK2-CT (Fig.4). Mediante experimentos de inhibición, se pudo excluir HER2, c-src y PI<sub>3</sub>-K como proteínas que fosforilan directamente PYK2. La actividad de cinasa de HER3 posiblemente no ha sido descubierta hasta ahora debido a que estudios previos usaron sustratos artificiales (28).

5 Se demuestra un efecto negativo de PYK2 dominante negativa, PYK2-KM, sobre la activación de MAPK, demostrando que la mitogenicidad depende de la actividad de PYK2 (Fig. 5). Se ha demostrado que las células que sobreexpresan PYK2 muestran SHC muy fosforilada en la tirosina, y actividad de ERK-2 subsiguiente (40). No se observó una interacción directa entre PYK2 y SHC, pero se ha propuesto recientemente que SHC se asocia con PYK2 a través de GRB2 en plaquetas dependientes de  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrina, ligando así la señal extracelular a la ruta de Ras/Raf (41). Es posible que GRF2 se una a PYK2 activada, conduciendo a la fosforilación subsiguiente de tirosina de SHC, lo que contribuye al aumento de la mitogenicidad. También se demuestra que PYK2-KM atenúa la actividad de PI<sub>3</sub>-K (Fig. 6). HER3 aloja seis sitios de atraque potenciales para el dominio de SH2 de la subunidad p85 de PI<sub>3</sub>-K, y la secuencia rica en una prolina que forma un sitio de unión de consenso para el dominio de SH3 de p85, contribuyendo todo potencialmente a una asociación de HER3 con p85 (26). También, se dio a conocer una asociación constitutiva entre PYK2 y p85 en plaquetas (42), en la que un motivo YXXM en PYK2 podría servir para la unión al dominio de SH2 de p85. De hecho, la inmunoprecipitación de p85 reveló la asociación, dependiente de HRG, de proteínas tirosil fosforiladas, de M<sub>r</sub> = 113 kDa y 180 kDa. Estas proteínas se identificaron como PYK2 y HER3, sugiriendo que HER3, PYK2 y PI<sub>3</sub>-K son constituyentes de un complejo multiproteico.

En nuestro modelo se propone que PYK2 es un elemento clave en la transmisión de la mitogenicidad inducida por HRG. Parece que parte de la señalización desde PYK2 a ERK-2 es transmitida a través de PI<sub>3</sub>-K y SHC, pero también hay una ruta más directa (Fig. 8). También parece que la activación de ERK-2 dependiente de PYK2 es parcialmente independiente de HER2 (Fig. 5). Estos hallazgos sugieren que PYK2 está implicada en el control de múltiples efectores aguas abajo, lo que a su vez influye todo en la ruta de MAPK (Fig. 8).

Se demuestra que el mutante de PYK2 dominante PYK2-KM suprime la invasividad tumoral en tres estirpes celulares de glioma (Fig. 7). Este resultado se correlaciona con su influencia sobre la actividad de ERK-2 (Fig. 6). También, PYK2-KM abolió la invasividad en el mismo grado que la inhibición de MEK1. Estos resultados indican fuertemente que PYK2 regula la invasividad en gliomas a través de la ruta de MAPK. Se ha demostrado que la actividad de ERK puede regular la fosforilación de miosina, conduciendo a la asociación de actina-miosina y a la contracción celular de la ECM (43), y que ERK puede facilitar la invasión celular y protege a las células de la apoptosis (44). En nuestro caso, una actividad aumentada de MAPK mostró un comportamiento invasivo mayor. Tomado en conjunto, se demuestra por primera vez que PYK2 es un sustrato directo de HER3, potencia la actividad de PI<sub>3</sub>-K, y aumenta la mitogenicidad a través de ERK2 y en gliomas, conduciendo a un fenotipo fuertemente invasivo.

#### Bibliografía

1. Altman, J. Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp. Neurol.* 15, 263-278 (1966).
2. Goldman, J.E. Regulation of oligodendrocyte differentiation. *Trends Neurosci.* 15, 359-362 (1992).
3. Faber-Elman, A., Solomon, A., Abraham, J.A., Marikovsky, M. y Schwartz, M. Involvement of wound-associated factors in rat brain astrocyte migratory response to axonal injury. *In vitro simulation.* *J. Clin. Invest.* 97, 162-171 (1996).
4. Wallasch, C. et al. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J.* 14, 4267-4275 (1995).
5. Busfield, S.J. et al. Characterization of a neuregulin-related gene, Don-1, that is highly expressed in restricted regions of the cerebellum and hippocampus. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4007-4014 (1997).
6. Carraway, K.L. III et al. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 387, 512-516 (1997).
7. Chang, H., Riese, D.J., II, Gilbert, W., Stern, D.F. y McMahan, U.J. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387, 509-512. (1997).
8. Fischbach, G.D. y Rosen, K.M. ARIA: a neuromuscular junction neuregulin. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 429-458 (1997).
9. Zhang, D. et al. Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9562-9567 (1997).
10. Ishiguro, H. et al. Structure and function of a novel ErbB ligand, NTAK. *Nihon Shinkei Seishin Yakarigaku*

- Zasshi 18, 137-142 (1998).
11. Harari, D. et al. Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18, 2681-2689 (1999).
- 5 12. Holmes, W.E. et al. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 256, 1205-1210 (1992).
13. Orr-Urteger, A. et al. Neural expression and chromosomal mapping of Neu dedifferentiation factor to 8p12-p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1867-1871 (1993).
14. Plowman, G.D. et al. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4905-4909 (1990).
- 10 15. Alroy, I. & Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS* 410, 83-86 (1997).
16. Fiddes, R.J. et al. Analysis of Grb7 recruitment by heregulin-activated erbB receptors reveals a novel target selectivity for erbB3. *J. Biol. Chem.* 273, 7717-7724 (1998).
- 15 17. Ceresa, B.P. & Schmid, S.L. Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12, 204-210 (2000).
18. Lev, S. et al. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca<sup>2+</sup>-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376, 737-745 (1995).
19. Girault, J.A., Costa, A., Derkinderen, P., Studler, J.M. y Toutant, M. FAK and PYK2/CAKbeta in the nervous system: a link between neuronal activity, plasticity and survival? *Trends Neurosci.* 22, 257-263 (1999).
- 20 20. Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S.A. y Schlessinger, J. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383, 547-50 (1996).
21. Andreev, J. et al. Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-GAP activity. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2338-2350 (1999).
- 25 22. Avraham, H., Park, S.-Y., Schinkmann, K. y Avraham, S. RAFTK/PYK2-mediated cellular signalling. *Cell. Signal.* 12, 123-133 (2000).
23. Yu, H. et al. Activation of a Novel Calcium-dependent Protein-tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 29993-29998 (1996).
- 30 24. Tokiwa, G., Dikic, I., Lev, S. y Schlessinger, J. Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway. *Science* 273, 792-794 (1996).
25. Zwick, E., Wallasch, C., Daub, H. y Ullrich, A. Distinct Calcium-dependent pathways of epidermal growth factor receptor transactivation and PYK2 tyrosine phosphorylation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 20989-20996 (1999).
- 35 26. Zrihan-Licht, S. et al. RAFTK/Pyk2 tyrosine kinase mediates the association of p190 RhoGAP with RasGAP and is involved in breast cancer cell invasion. *Oncogene* 19, 1318-1328 (2000).
27. Hellyer, N.J., Cheng, K. y Koland, J.G. ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J.* 333, 757-763, (1998).
28. Prigent, S.A. y Gullick, W.J. Identification of cerbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *EMBO J.* 13, 2381-2841 (1994).
- 40 29. Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A. y Carraway, K.L.III. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Sci. USA* 91, 8132-8136 (1994).
30. Sierke, S.L., Cheng, K., Kim, H.-H. y Koland, J.G. Biochemical characterization of the protein kinase homology domain of the ErbB3 (HER3) receptor protein. *Biochem. J.* 322, 757-763 (1997).
- 45 31. Shaw, L.M., Rabinovitz, I., Wang, H.H., Toker, A., y Mercurio, A.M. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 91, 949-60 (1997).

32. Berens, M.L. y Giese, A. Biology and oncology of invasive glioma cells. *Neoplasia* 3, 208-219 (1999).
33. Klemke, R.L. et al. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell. Biol.* 137, 481-492 (1997).
- 5 34. Kaye, A.H., Morstyn, G., Gardner, I. y Pyke, K. Development of a xenograft glioma model in mouse brain. *Cancer Res.* 46, 1367-1373 (1986).
35. Inazawa, J. et al. Precise localization of the human gene encoding cell adhesion kinase  $\beta$  (CAK $\beta$ /PYK2) to chromosome 8 at p21.1 by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.* 98, 508-510 (1996).
36. Klapper, L.N., Kirschbaum, M.H., Sela, M. y Yarden, Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res.* 77, 25-79 (2000).
- 10 37. Engqvist-Goldstein, Å.E.Y., Kessels, M.M., Chopra, V.S., Hayden, M.R. y Drubin, D.G. An actinbinding protein of the sla/huntington interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles. *J. Cell Biol.* 147, 1503-1518 (1999).
38. Sorkina, T., Bild, A., Tebar, F. y Sorkin, A. Clathrin, adaptors and eps15 in endosomes containing activated epidermal growth factor receptors. *J. Cell. Sci.* 112, 317-327 (1999).
- 15 39. Damer, C.K. y O'Halloran, T.J. Spatially regulated recruitment of clathrin to the plasma membrane during capping and cell translocation. *Mol. Biol. Cell* 11, 2151-2159 (2000).
40. Gaidarov, I., Santini, F., Warren, R.A. y Keen, J.H. Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nature Cell. Biol.* 1, 1-7 (1999).
- 20 41. Ohmori, T., Yatomi, Y., Asazuma, N., Satoh, K. y Ozaki, Y. Involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in platelet activation: tyrosine phosphorylation mostly dependent on  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin and protein kinase C, translocation to the cytoskeleton and association with Shc through Grb2. *Biochem. J.* 347, 561-569 (2000).
42. Sayed, M.R., Sheid, M.P., Stevens, C.M. y Durino, V. Thrombin-stimulated phosphatidylinositol3-kinase activity in platelets is associated with activation of PYK2 tyrosine kinase: Activation of both enzymes is aggregation independent. *J. Cell. Physiol.* 183, 314-320 (2000).
- 25 43. Brunet, A. A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868 (1999).
44. Nguyen, D.H. et al. Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activatorstimulated cells in an integrin-selective manner. *J. Cell. Biol.* 146, 149-164 (1999).
- 30 45. Chun-Ming, T. et al. Enhancement of chemosensitivity by Tyrphostin AG825 in high-p 185neu expressing non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 56, 1068-1074 (1996).
46. Seedorf, K. et al. Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase C gamma and GRB-2. *J. Biol. Chem.* 269, 16009-16014 (1994).
- 35 47. Weber, I. et al. Cytokinesis mediated through the recruitment of cortexillins into the cleavage furrow. *EMBO J.* 18, 586-594 (1999).
48. Chen, C. y Okayama, H. High efficiency transformation pf mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2745-2752 (1987).
49. Alessi, D.R. et al. Assay and expression of mitogen-activated protein kinase, MAP kinase kinase, and Raf. *Methods Enzymol.* 255, 279-290 (1995).
- 40 50. Morgan, S.J., Smith, A.D. y Parker, P. Purification and characterization of bovine brain type I phosphatidylinositol kinase. *Eur J Biochem.* 191,761-767 (1990).
51. Plowman, G.D. et al. Molecular Cloning and expression of another epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4905-4909 (1990).
52. Baselga, J. Current and planned clinical trials with trastuzumab. *Semin. Oncol.* 27, 27-32 (2000).
- 45 53. Monia, B.P. Antisense approaches for the treatment of cancer. *Cancer Invest.* 18, 635-650 (2000).

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un inhibidor de HER3 para la fabricación de un medicamento para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa asociada con la fosforilación mediada por HER3, en el que el inhibidor es un anticuerpo anti HER3 o un fragmento del mismo.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de HER3 es un inhibidor de la proteína de HER3.
3. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dicho inhibidor reduce la cantidad y/o actividad de una proteína de HER3.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho inhibidor de HER3 inhibe la fosforilación de la proteína de HER3.
- 10 5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha enfermedad hiperproliferativa se selecciona de procesos inflamatorios y tumores.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha enfermedad hiperproliferativa se selecciona de invasión tumoral, particularmente en gliomas.
- 15 7. Método de identificación para nuevos inhibidores de una enfermedad hiperproliferativa asociada con la fosforilación mediada por HER3, que comprende
  - (a) llevar a cabo un ensayo celular o molecular para la interacción de una sustancia a ensayar con la fosforilación o actividad de cinasa de HER3, y
  - (b) identificar una sustancia capaz de inhibir la fosforilación mediada por HER3.
- 20 8. Método de identificación de la reivindicación 7, en el que la enfermedad hiperproliferativa se selecciona de leucemia mieloide aguda y gliomas.



Fig. 1

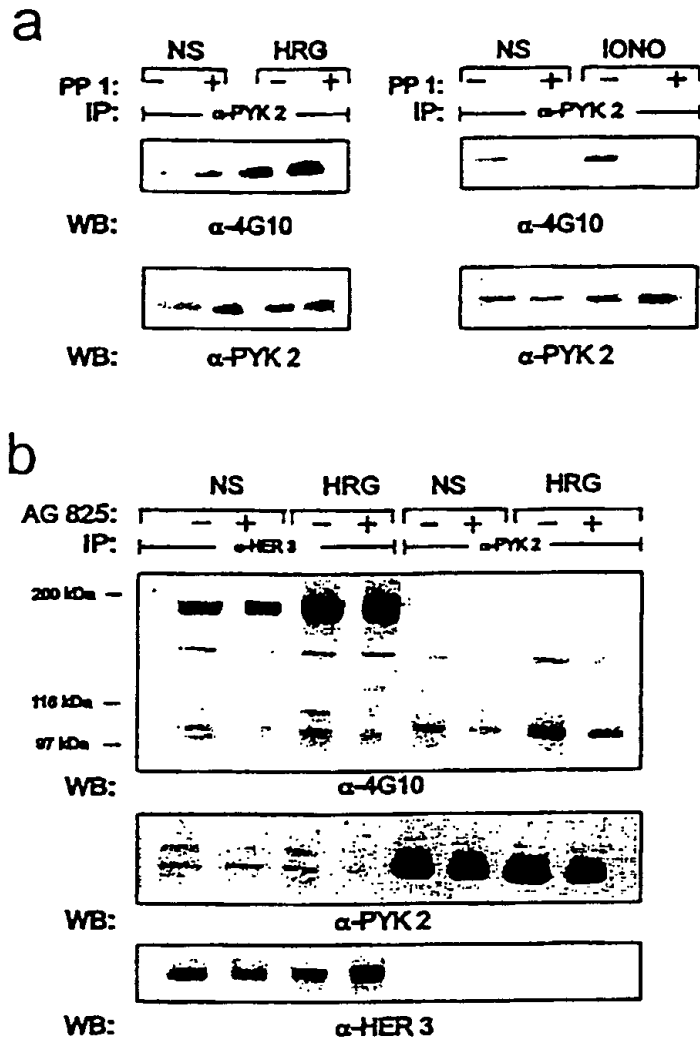


Fig. 2

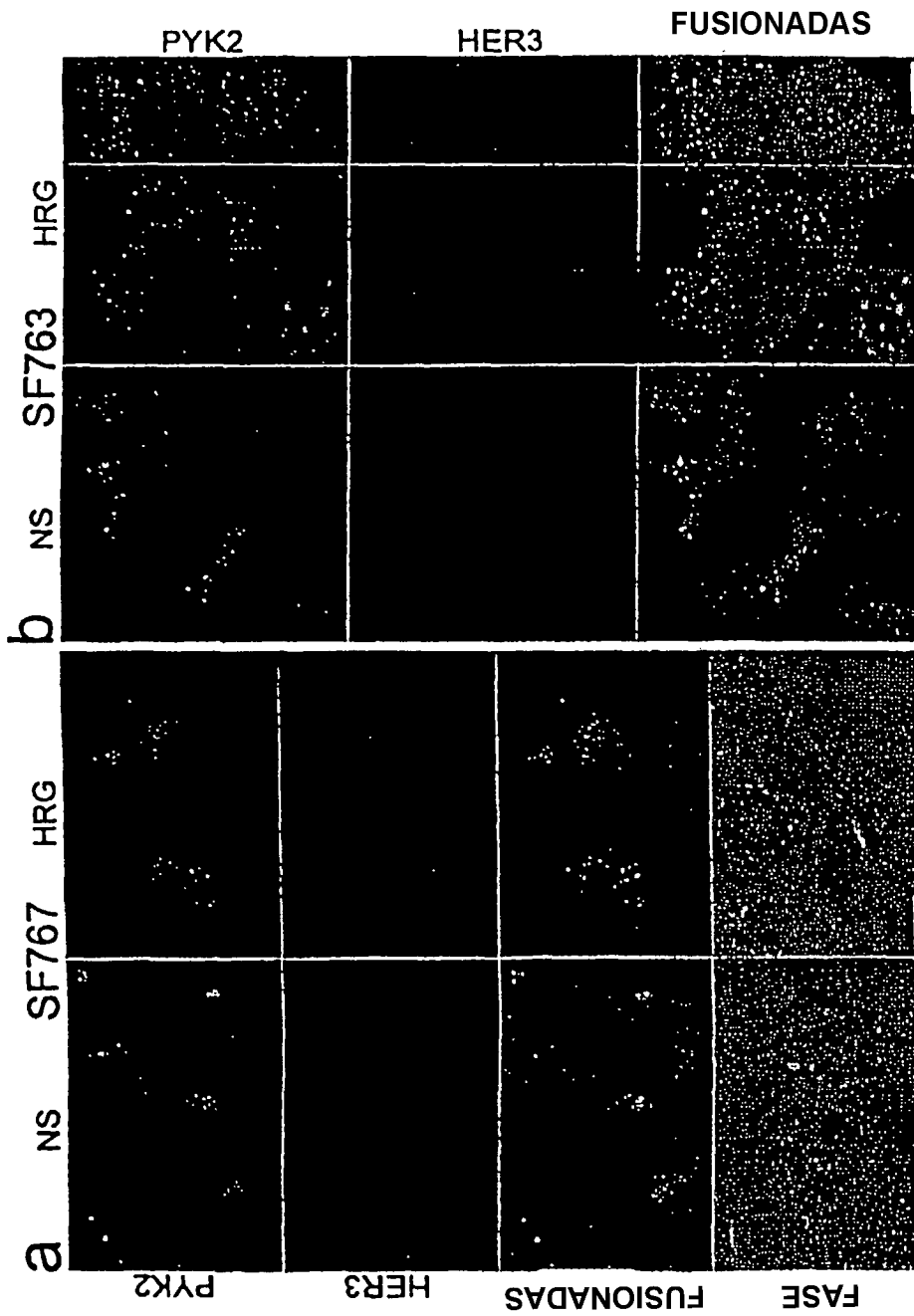


Fig. 3

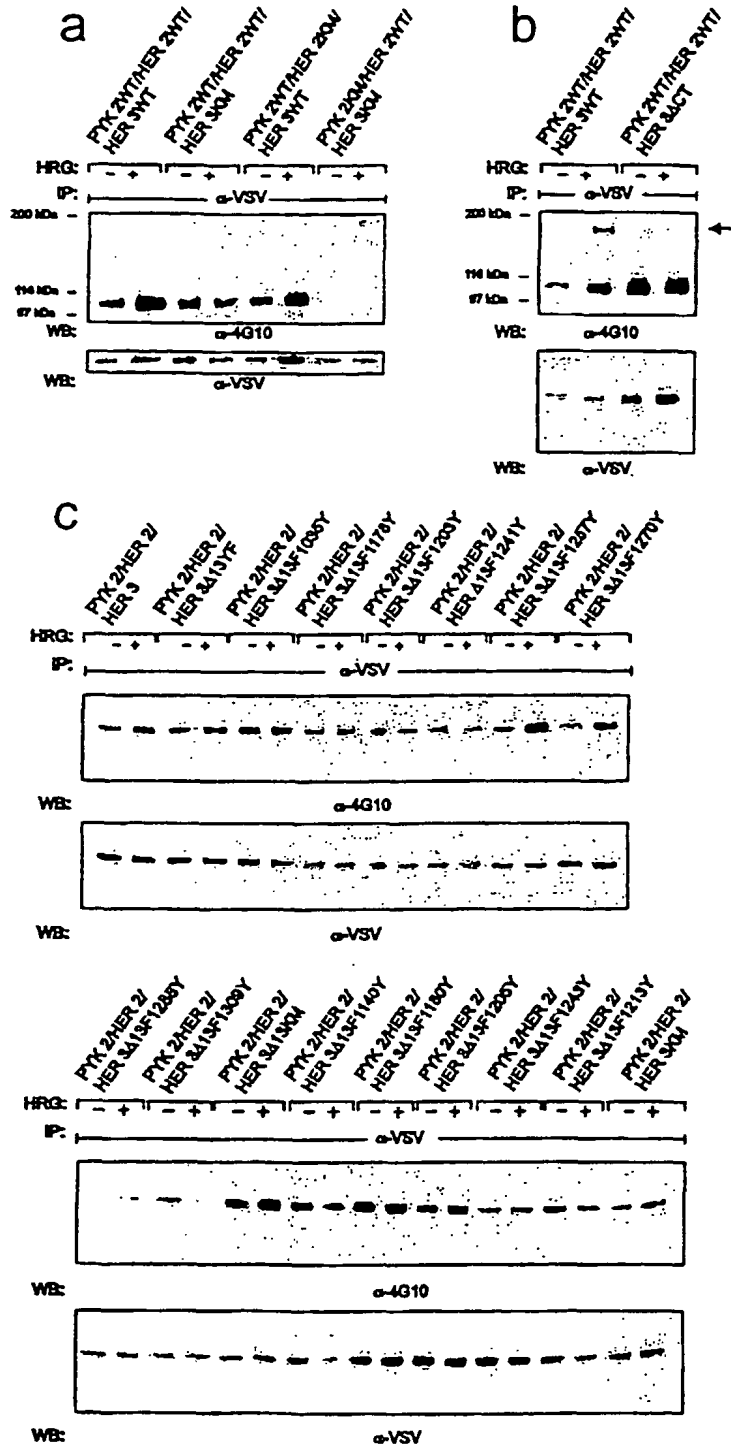


Fig. 4

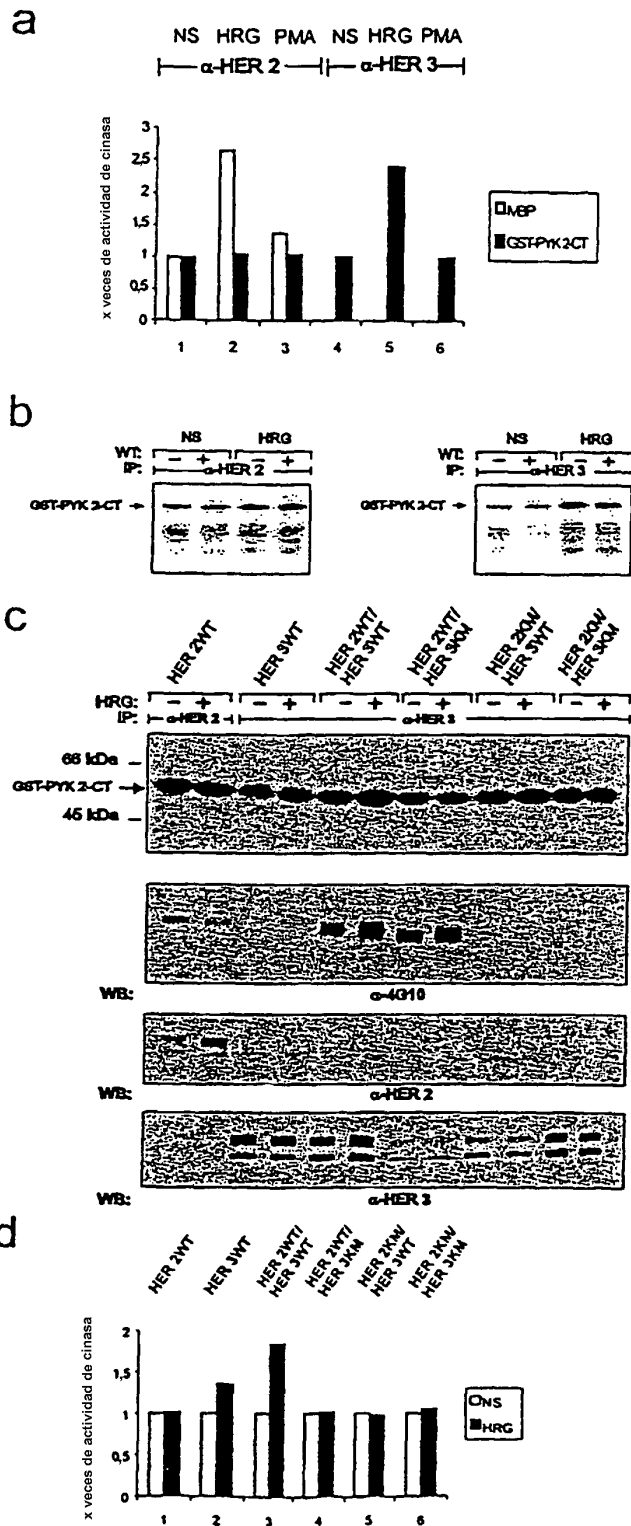


Fig. 5

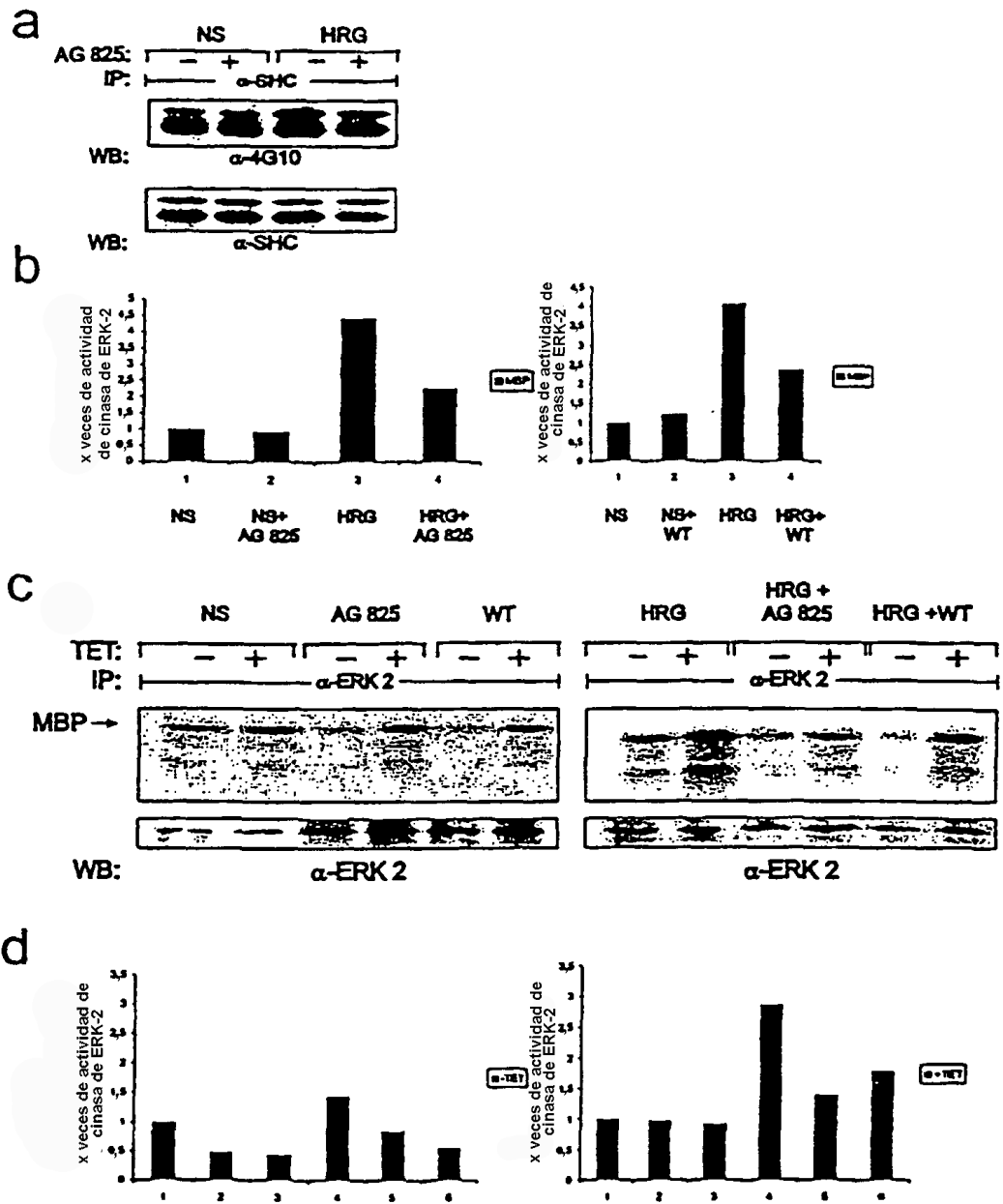


Fig. 6

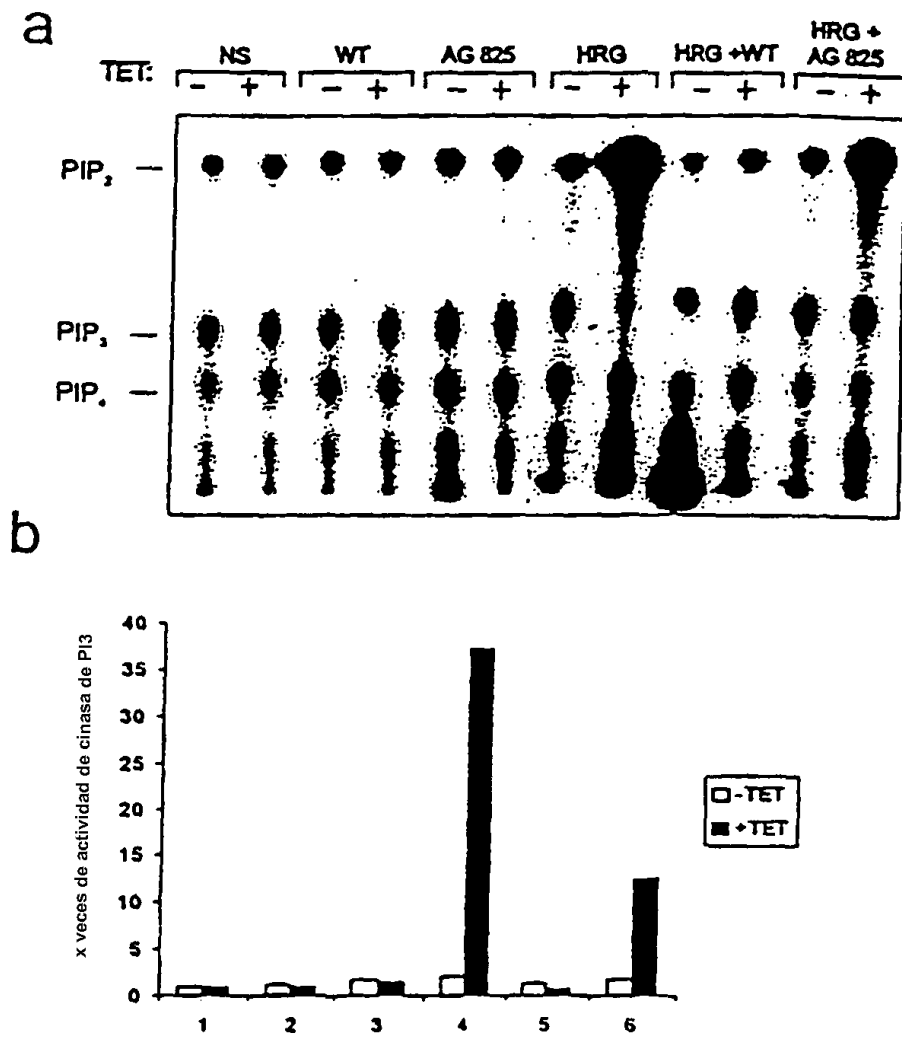


Fig. 7

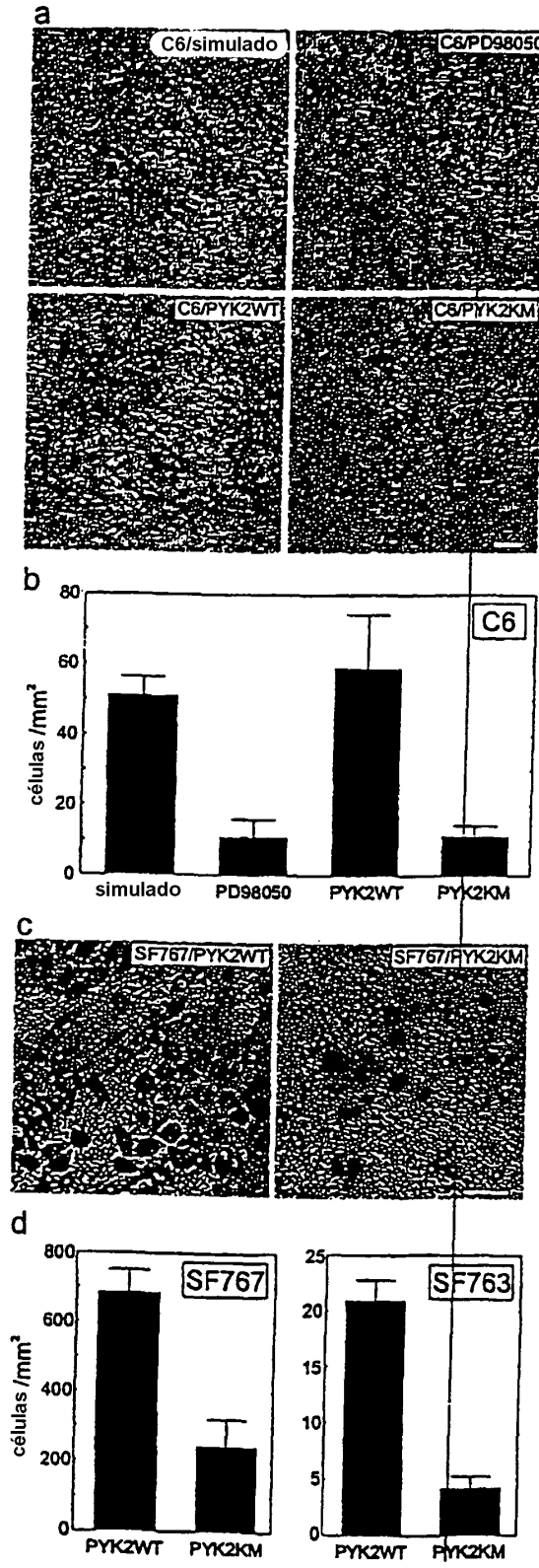


Fig. 8

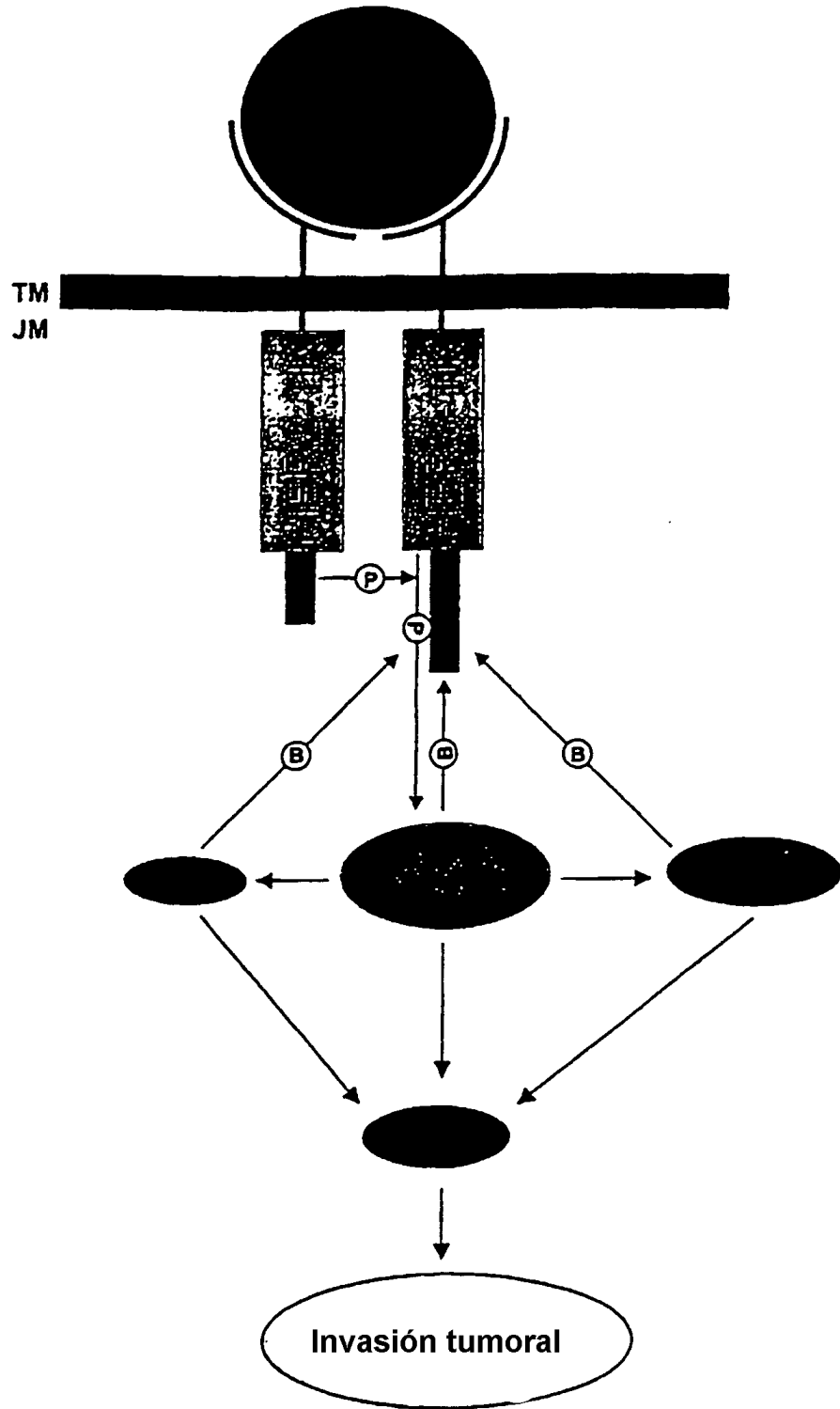




Fig. 9

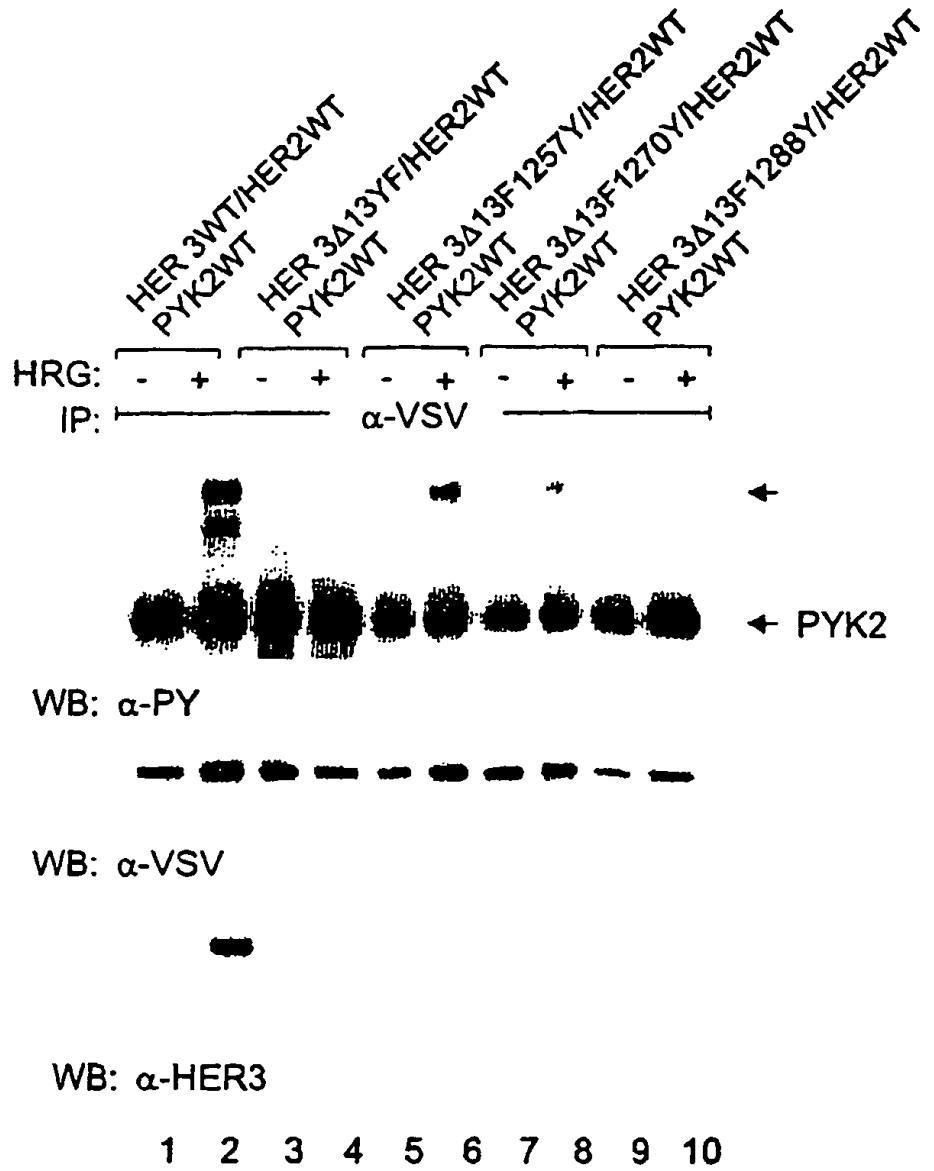


Fig. 10

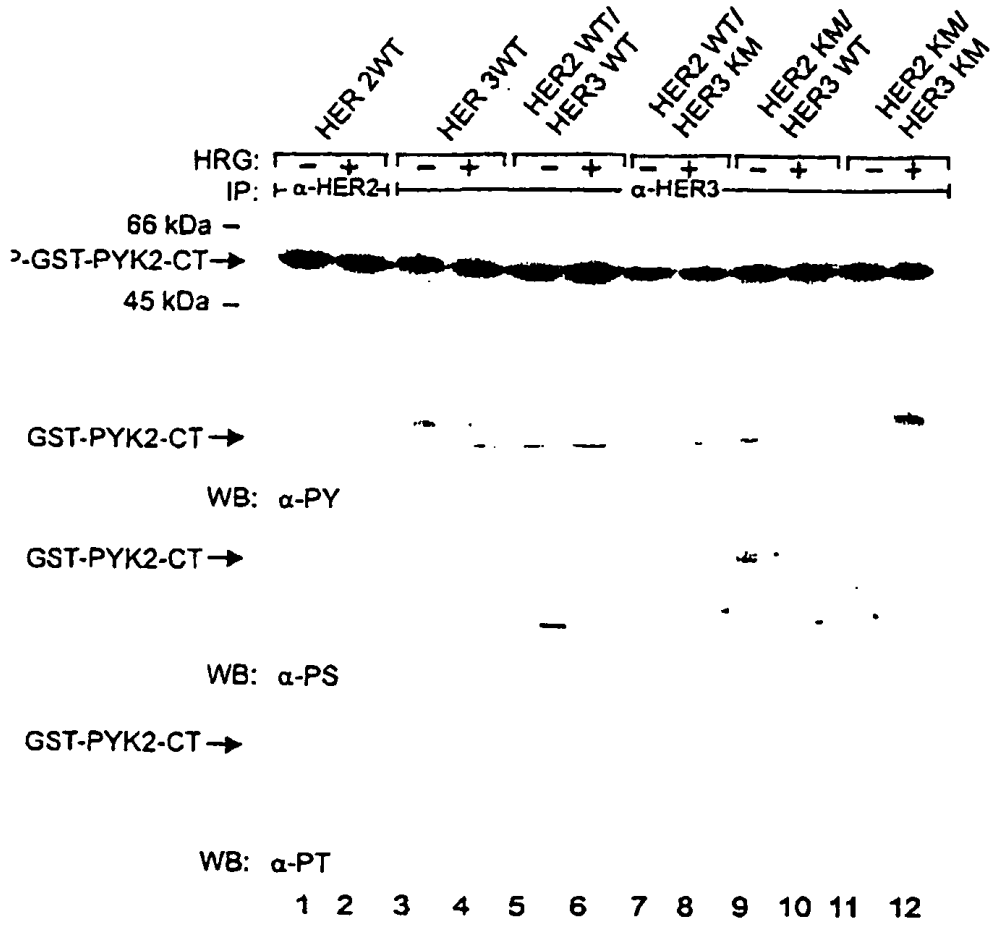
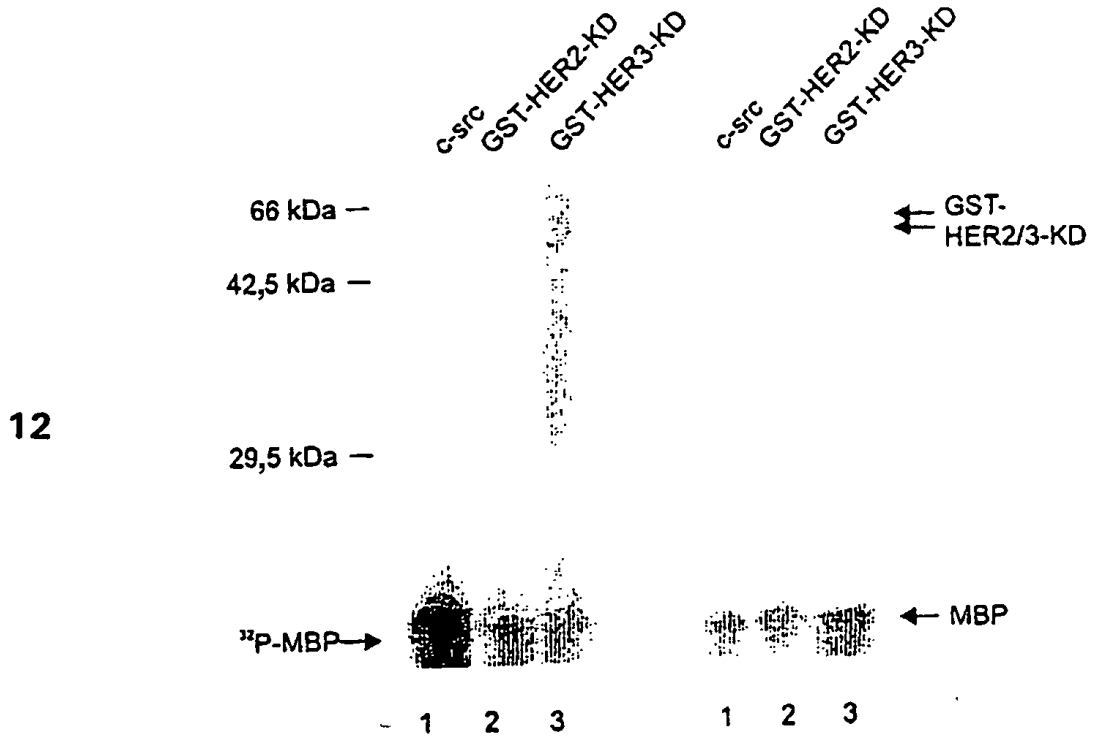
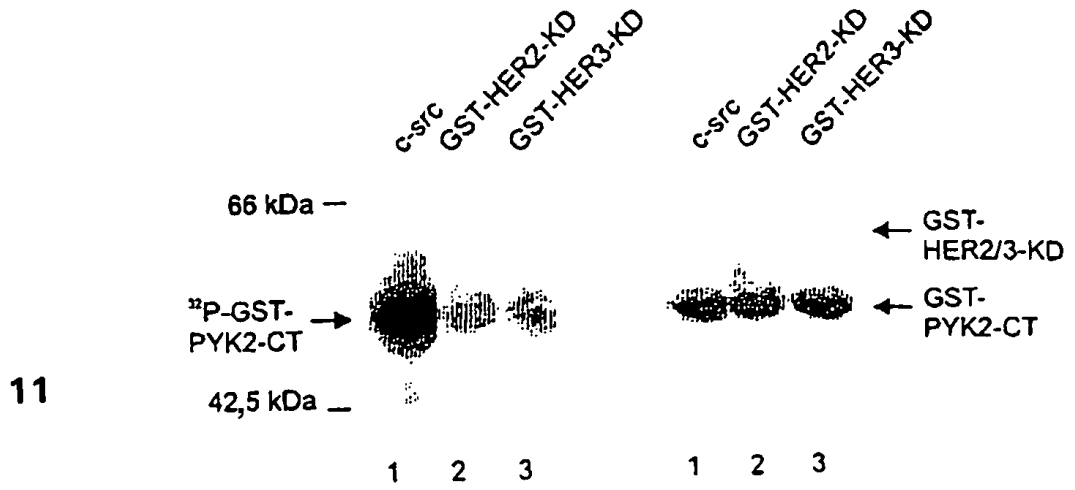


Fig. 11/12



**Fig. 13/14**

	NS				HRG			
PD98059:	-	-	+	+	-	-	+	+
AG825:	-	+	-	+	-	+	-	+
IP:	α-HER2							

**13**

WB: α-PY

WB: α-HER2

1 2 3 4 5 6 7 8

	NS				HRG			
PD98059:	-	-	+	+	-	-	+	+
AG825:	-	+	-	+	-	+	-	+
IP:	α-PY							



**14**

WB: α-PY

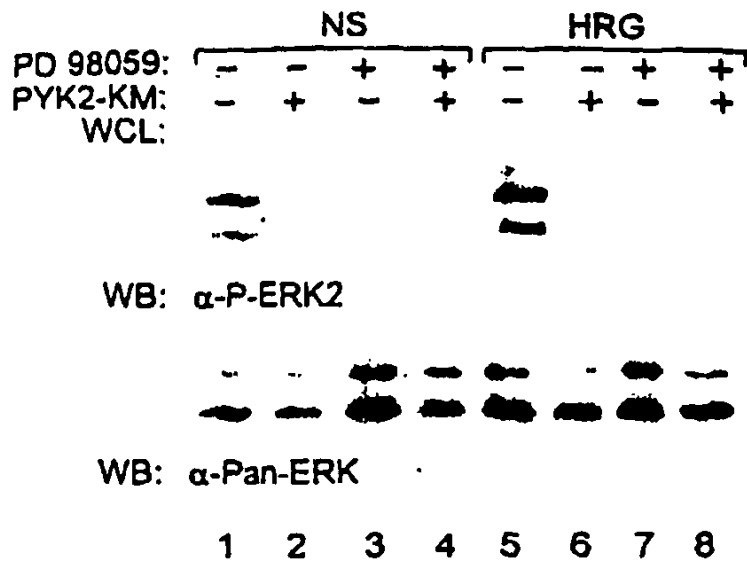


WB: α-SHC

1 2 3 4 5 6 7 8

Fig. 15/16

15



16

