



Caracterización de la muerte celular inducida mediante la inhibición del metabolismo de la glucosa

Silvia Ramírez Peinado

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesis adscrita a la Facultat de Medicina, Universidad de Barcelona.

Programa de Doctorado en Biología y Patología celulares, Biomedicina

Caracterización de la muerte celular inducida mediante la inhibición del metabolismo de la glucosa

Silvia Ramírez Peinado

Barcelona, 2012

Directora de la Tesis: Dra. Cristina Muñoz Pinedo

La presente tesis doctoral: “Caracterización de la muerte celular inducida mediante la inhibición del metabolismo de la glucosa” ha sido realizada en el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge. Este trabajo fue posible gracias a la financiación de una beca predoctoral por parte de la Fundació Institut d’Investigació Biomèdica de Bellvitge y los proyectos financiados por el Fondo de Investigación Sanitaria (PI10/00104,PI07/1027).



“ A traveller through a country would stop at a village and he didn't have to ask for food or for water. Once he stops, the people give him food, entertain him. That is one aspect of Ubuntu, but it will have various aspects. Ubuntu does not mean that people should not enrich themselves. The question therefore is: Are you going to do so in order to enable the community around you to be able to improve? ”

Nelson Mandela

Agradecimientos

Y por fin el capítulo que más ganas tenía de escribir que no es otro que el de los agradecimientos. Expresar mi sincera gratitud hacia todas las personas que me han ayudado será complicado en pocas líneas. Pero sin ellas hubiese sido del todo imposible afrontar el objetivo.

Una de las personas más influyentes durante mi tesis, sin duda es mi directora, Dra Cristina Muñoz. Es difícil saber por dónde empezar. Hay tantísimas cosas que agradecerle, incluido algún “regalito”. Pero no estaría aquí, de no ser por ella. Desde el primer día de entrevista me hice una idea del gran potencial científico y humano que tenía delante. Y me he dado cuenta en estos años que no me equivocaba. Cristina es el coraje personificado. Gracias por enseñarme que la valentía no necesariamente es la ausencia de miedo. Contigo he aprendido que el coraje se elige y todo radica en como reaccionas ante las situaciones. El mayor liderazgo de Cristina en diversos ámbitos es la renuncia a él. Gracias por tener el “poder” y transmitirlo. Por saber “gestionar” no solo proyectos sino también personas. Por dar libertad en el laboratorio, siempre desde atrás. Fijar el rumbo es igual o más importante que gobernar el barco. Y por tener el valor de coger Siempre el timón cuando ha sido necesario. Me siento muy orgullosa de haber hecho la tesis en tu grupo.

Quisiera también agradecer en especial al tribunal por aceptar el esfuerzo que supone leer y corregir esta tesis. A la Dra. Isabel Fabregat por aceptar ser mi tutora y al Grupo de Apoptosis y Cáncer, en especial al Dr. Joan Gil por ayudarme en la asistencia a los congresos.

Cuando reflexiono sobre estos cuatro años son muchas las personas que se han cruzado en mi camino, tanto en los buenos como en los no tan buenos momentos. Pero sin duda uno de los pilares necesarios para continuar esta tesis ha sido la gente de mi grupo.

Alfredo, mi referente en el laboratorio. Esta tesis es parte de ti también. Hemos construido una buena “diálectica” juntos. Hemos trabajado codo con codo, llorado, reído, nos hemos enfadado y vuelto a reconciliar mil veces. Me has enseñado a abrir los ojos a nivel científico y también en el personal. Me has ayudado a conocer y reconocer mis límites y también a abrir barreras. Nuestro gerundio continúa. Alfredo: yo también.

Clara Lucía León. Mijita, como agradecerle tantas cosas. Gracias por las risas y las lágrimas que también las ha habido, por tu mirada, tus consejos, tu generosidad infinita, tu amor que tantas veces me has ofrecido y me ha ayudado en este camino. Me has enseñado a relativizar, a tener paciencia, que todo llega. Aquí y allí, estaré a tu lado.

A Nadia y Doro por haber representado un input continuo en el laboratorio y estar siempre dispuestas a ayudar, tanto fuera como dentro. Y a los nuevos fichajes del equipo: Raffa y Javi. Raffa, de verdad ¡eres genial! Me transmites muchísima fuerza, siempre tan positiva. Gracias, “bastarda”. Y Javi, te agradezco la confianza que has mostrado. Gracias por intentar poner lo mejor de ti.

A los tres mosqueteros! Mireia, t’estimo. Els teus detalls et fan única. Sempre disposada a donar un cop de mà i a escoltar. Tot un referent de superació a molts nivells. Gràcies per ajudar-me a continuar endavant. A Roberta, Brava Roberta! Un terremoto de mujer. Gracias por tu transparencia en todo momento. Por transmitir las ganas de vivir y la alegría en el laboratorio. Y a Magdiel, una persona extraordinaria, me siento feliz de haber podido disfrutar esta aventura juntos. ¡Muchas gracias!

Además, quiero agradecer a todas esas personas que de un modo u otro han puesto su granito de arena al castillo. Esta tesis, también es vuestra.

A Ignasi y Montse por enseñarme a volver a mi Centro. A vosotros os agradezco varias cosas, pero en los últimos tiempos recojo dos de vuestros “mantras” que me lo ponen mucho más fácil en algunas situaciones. Porque nada es bueno o malo, simplemente Es. Y porque siempre es mucho tiempo y todo es demasiado. Mil Gracias.

A Clara. Con ella necesito diez páginas más. Gracias por darme las herramientas para encontrar el camino. Por haberme dado Luz en tanta oscuridad. Gracias al grupo: Soy lo que soy por lo que *todos somos*.

A mis mitades, Maribel y Amalia. No hay día que no aprenda de vosotras. Os agradezco el haberme dado mucha vida. Hemos compartido tantos momentos juntas, entre ellos el haber aparcado la tesis y haber vuelto. Ahora se que siempre podemos reinvertarnos y que a veces necesitamos “olvidar”, no una, sino varias veces para recordar al final quienes somos. Chicas, os quiero.

A Charlie, una de las personas más maravillosas que conozco. Gracias por acompañarme en las duras y también en las maduras. Sin ti, no lo hubiera conseguido.

A quién fue compañero de piso y de trabajo, Jordi. Ha sido genial compartir contigo tanto tiempo, incluido los principios en el PEBC. Te agradezco el haber podido reirnos juntos hasta llorar cuando más lo necesitaba. Por aguantar las mil charlas en el sofá tan cómodo que teníamos. Por haber ido a recogerme aquel día a Plaza Cataluña. Sin duda, la tesis y otras tantas se han hecho más cuesta abajo contigo. Te quiero muchísimo.

Y a mis compañeras de máster Marta, Laura, Laia y Elena por estar siempre a mi lado. Gracias chicas.

Tampoco quiero olvidar a todos aquellos que me ayudaron en mis principios. A las que fueron mis profesoras y ahora amigas, Rocío y Sandra. A Gemma Aiza, Agnés y Nadia por toda la ayuda y apoyo moral durante el primer año en el ICO. A los compañeros de los servicios técnicos de la UB: Éster, Benja y Eva, gracias por enseñarme el mundo del citómetro y ser siempre tan pacientes. Y al servicio de Estabulario del Idibell, os agradezco el apoyo que siempre me habéis mostrado.

A los que me han ayudado durante la estancia en Dublín, en especial a Eugenia, Amaya y Ujval. Todo ha sido mucho más fácil con vosotros, dentro y fuera del laboratorio.

Querría agradecer el soporte incondicional de mis compañeros del LOM.

A Laia, Ester y Patricia por haberme ayudado dentro del laboratorio y por darme ánimos y comprensión cada vez que lo he necesitado. A Joan, por ayudarme a crecer como persona ;). La tesis se hace más fácil con tus chistes. Pero recuerda que el cristal violeta... es muy tóxico!. Joaquim, por la capacidad que tiene de sacarme una sonrisa en el momento que menos me lo espero. A Eva, gracias por escucharme y apoyarme en cualquier momento. A Judith, gracias por estar siempre tan dispuesta a ayudar y por la buena onda que transmites. Y a Jéssica por su generosidad.

Al grupo de Óscar. Primero empezaré por él mismo. Gracias por tus consejos, por tu respeto... y por el par que le echas a la vida! A Laura y a Miguel, por su paciencia. A los compañeros del laboratorio del fondo, Ana García, Ana Roig y Naiara. Compartir la etapa Idibell con vosotras también se hace más fácil. Gracias por estar siempre que lo he necesitado.

A mis nuevas compañeras de laboratorio: Adri, Ana y Helena. ¿Qué os puedo decir?... doncs, Perfecte! Habéis significado muchísimo en los últimos tiempos. Siempre he encontrado en vosotras palabras de apoyo y consejos y sobretodo muchas risas. Muchas Gracias chicas! Y a Mariona, te agradezco sin duda el coraje que transmites a cada minuto.

Por supuesto, a mi madre, mi hermana y Juán, por darme todo sin esperar nada a cambio, por disfrutar y sufrir conmigo. Sin vosotros, me hubiera perdido hace tiempo. Y a mi abuelo, gracias por enseñarme a caminar esta vida.

Y por último, sin duda, a ti Carlos. Gracias por transmitirme tus ganas de conocer y tu forma de Vivir en mayúsculas. Por apoyarme y animarme cuando los ánimos decaían. Mi compañero de viaje. Te quiero.

A mi madre

Tabla de contenido

RESUMEN.....	5
ABREVIATURAS	9
I INTRODUCCIÓN	17
1.1 ¿Qué entendemos como muerte celular?	19
1.1.1 Muerte celular programada: apoptosis y necrosis	19
1.1.2 Caspasas	20
1.1.3 Tipos de caspasas	22
1.1.3.1 Caspasas iniciadoras	22
1.1.3.2 Caspasas efectoras	23
1.1.4 Apoptosis por la ruta extrínseca	23
1.1.5 Apoptosis mitocondrial o ruta intrínseca	26
1.2 Proteínas Bcl-2.....	27
1.2.1 Dinámicas de grupo	28
1.2.1.1 La escasez de nutrientes regula a las proteínas Bcl-2	28
1.2.1.2 Relación entre las proteínas Bcl-2 y la regulación de las señales del retículo endoplasmático	31
1.2.1.3 Elementos clave de la respuesta mediada por proteínas mal plegadas UPR	32
1.3 Autofagia	36
1.3.1 Proceso de macroautofagia	37
1.3.2 Activación de autofagia en respuesta a privación de nutrientes ..	40
1.4 Metabolismo de la glucosa como una terapia anti-tumoral	43
1.5 Sarcomas	45
1.5.1 Rabdomiosarcoma	46
1.5.2 Tratamiento	46
II OBJETIVOS.....	49
III RESULTADOS.....	53
3.1 Metabolismo de la glucosa.....	55
3.1.1 La privación de glucosa puede inducir apoptosis o necrosis dependiendo de la línea celular	55

3.1.2 La privación de glucosa induce actividad caspasa en los fibroblastos Bax Bak deficientes	59
3.1.3 La caspasa iniciadora de la apoptosis en DKO, inducida por privación de glucosa es la caspasa-8.....	61
3.2 La 2-deoxiglucosa como inhibidor del metabolismo glicolítico	64
3.2.1 Las células de rdbdomiosarcoma alveolares son sensibles a la 2-deoxiglucosa	64
3.2.2 El factor inducible de hipoxia(HIF-1) no es el responsable de la resistencia a la 2-DG en células de rdbdomiosarcoma embrional	70
3.2.3 La 2-deoxiglucosa induce diferenciación en las células de rdbdomiosarcoma alveolar Rh4 y Rh30.....	72
3.2.4 La 2-dg induce muerte celular apoptótica en las Rh4	74
3.2.5 La 2-deoxiglucosa induce diferenciación en las células de rdbdomiosarcoma alveolar Rh4 y Rh30.....	76
3.2.4 La 2-dg induce muerte celular apoptótica en las Rh4	3
3.2.5 La apoptosis inducida por la 2-DG en las Rh4 se produce a través de la ruta mitocondrial	76
3.2.5.1 La sobre-expresión de Bcl-xL y Mcl-1 en Rh4 protege a las Rh4 de la 2-DG	80
3.2.5.2 La reducción de los niveles de Mcl-1 y Bcl-xL en Rh4 sensibiliza a la muerte por 2-DG.....	82
3.2.5.3 La 2-DG promueve la bajada de la expresión de Mcl-1.....	85
3.2.5.4 La muerte inducida por 2-DG se produce a través de Noxa	86
3.2.5.5 El estrés reticular, no la pérdida de ATP es el responsable de la regulación de Noxa y Mcl-1	93
3.3 Autofagia y Metabolismo	99
3.3.1 Las células Rh4 responden de forma diferente al tratamiento con privación de glucosa o 2-DG añadiendo 3-metiladenina o cloroquina .	100
3.3.2 La 3-MA y la cloroquina producen efectos contradictorios en las células DKO y Hela tratadas con privación de glucosa	102

3.3.3 El flujo de LC3 se ve aumentado tras el tratamiento con 2-DG pero no tras la privación de glucosa	105
3.3.4 LC3 punteado no aumenta tras el tratamiento sin glucosa	109
IV MATERIALES Y MÉTODOS	113
4.1 Líneas celulares	115
4.2 Cultivo de Células y Tratamientos.....	115
4.2.1 Tratamiento de retirada de glucosa	116
4.3 Western blot.....	117
4.3.1 Preparación de extractos proteicos totales para análisis....	117
4.3.2 Electroforesis de proteínas.....	118
4.3.3 Detección de proteínas en la membrana transferida.....	118
4.4 Inmunocitoquímica	121
4.5 Inmunoprecipitación	122
4.5.1 Preparación de muestra	122
4.5.2 Acoplamiento de las bolas magnéticas al anticuerpo	122
4.5.3 Inmunoprecipitación	122
4.6 Medición de los niveles de ATP.....	124
4.7 Medidas de detección de muerte	124
4.7.1 Análisis del ciclo celular por subG1	124
4.7.2 Análisis de células vivas y muertas por incorporación de yoduro de propidio	125
4.7.3 Análisis por tamaño celular	125
4.7.4 Actividad caspasa	126
4.8 Transfecciones de ADN y ARN, plásmidos y generación de líneas celulares	127
4.8.1 Transfecciones transitorias.....	127
4.8.2 Transfecciones estables.....	130
4.9 Transformación de bacterias y purificación de ADN plasmídico.....	131
4.10 RT-PCR	133

4.10.1	Retrotranscripción de ARN	133
4.10.2	Amplificación de los genes de interés	134
4.11	Microscopía electrónica	136
V	DISCUSIÓN.....	137
5.1	La privación de glucosa induce apoptosis y necrosis dependiendo de la línea celular	139
5.2	La casapasa iniciadora, caspasa-8, está implicada en la muerte tras privación de glucosa.....	141
5.3	La 2-DG como inhibidor del metabolismo glicolítico en rabdomiosarcomas.....	142
5.3.1	Diferentes respuestas al tratamiento por 2-DG entre rabdomiosarcoma alveolares y embrionales	142
5.3.2	Muerte apoptótica y estrés reticular en células de rabdomiosarcoma tras el tratamiento por 2-DG	146
5.3.3	Proteínas BH3 y muerte por 2-deoxiglucosa	148
5.4	Autofagia y metabolismo	150
VI	CONCLUSIONES	153
VII	BIBLIOGRAFÍA	157
VIII	ANEXO	169

Resumen

Las células tumorales presentan alteraciones metabólicas. Una de las diferencias con las células no transformadas es que los tumores usan más glucosa incluso en condiciones de normoxia, lo que se utiliza actualmente para visualizar tumores mediante la técnica de PET. En los últimos años se están desarrollando terapias basadas en estas particularidades metabólicas de las células tumorales, que las hacen más sensibles a la inhibición del metabolismo glicolítico.

En esta tesis estudiamos la muerte producida por la falta de glucosa en sarcomas y otros tipos tumorales. La privación de glucosa induce apoptosis o necrosis dependiendo de la línea celular. Mostramos cómo la privación de glucosa induce actividad caspasa en células deficientes de Bax y Bak, mientras que en las líneas de rhabdomyosarcoma induce necrosis. Además la caspasa iniciadora 8 está implicada en la muerte por ausencia de glucosa en estas células deficientes en Bax/Bak y también en células humanas HeLa.

Investigamos el uso de 2-deoxiglucosa como inductor de muerte celular frente a líneas de rhabdomyosarcoma alveolar y embrional. La 2-deoxiglucosa promueve muerte celular en líneas de rhabdomyosarcoma alveolar. También induce diferenciación acompañada por una bajada de PAX3/FOXO1a, una proteína surgida de la translocación cromosómica en las células de rhabdomyosarcoma alveolar y crítica en el desarrollo oncogénico de las mismas. Caracterizamos la muerte celular apoptótica inducida por 2-deoxiglucosa en líneas de sarcoma, in vitro. Estudiamos las moléculas de las rutas de apoptosis que determinan la sensibilidad de estas células a la 2-deoxiglucosa, con especial interés en las proteínas de la familia del oncogén Bcl-2. La muerte celular inducida por el tratamiento está asociada a la activación de Bax y Bak. Observamos que la sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 como Bcl-xL y de Mcl-1 previene la apoptosis, indicando que la muerte sucede a través de la ruta mitocondrial. Enseñamos que la bajada de Mcl-1 y la subida de Noxa son críticos en la

muerte por 2-DG. Además, la 2-DG promueve estrés reticular acompañado de la inducción de ATF4 y chaperonas. Al bajar los niveles de ATF4, protegemos a las células de la muerte inducida por 2-DG y prevenimos la pérdida de Mcl-1. Incubamos células en presencia de manosa, que revierte el estrés inducido por la 2-DG y prevenimos la muerte sin subir los niveles de ATP. Así, el estrés energético causado por la 2-DG no es la principal causa de muerte celular. También la 2-DG promueve la fosforilación de eIF2 α , un inductor de ATF4, y la inactivación de mTOR. Nuestros resultados sugieren que el uso de inhibidores glicolíticos como la 2-DG pueden ser efectivos en el tratamiento de los rhabdomiomas alveolares y que Noxa podría ser un marcador pronóstico de la eficiencia de estas drogas.

Por otro lado, caracterizamos las respuestas a la falta de glucosa y 2-DG, en particular la respuesta autofágica que puede determinar que las células mueran o no en respuesta a la falta de nutrientes. Observamos que las células están sensibilizadas al tratamiento con 2-DG tras el uso de cloroquina. Sin embargo, la presencia de cloroquina no afecta a la privación de glucosa. Intentamos clarificar si la falta de glucosa está induciendo macroautofagia. El flujo de LC3 por western blot nos indica que no hay más macroautofagia ni en células DKO ni en las Rh4 en ausencia de glucosa. Por microscopía confocal y analizando células HeLa y Rh4, tampoco vemos mayores acúmulos de GFP-LC3 tras la retirada de glucosa comparando con tratamientos clásicos de inducción de autofagia como la retirada de aminoácidos o con rapamicina. Estos datos sugieren que la combinación de 2-DG con inhibidores de la autofagia podría ser útil en el tratamiento contra rhabdomiomas y que la falta de glucosa no induce autofagia.

Abreviaturas

3-MA: 3-Metiladenina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AMP: Adenosina monofosfato

AMPK: (del inglés, 5' AMP-activated protein kinase)

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.

ATF4, ATF6: Factor de transcripción activador 4 o 6 (del inglés, Activating Transcription Factor 4 or 6)

Atg: Genes relacionados con autofagia (del inglés, Autophagy related genes)

ATP: Adenosín trifosfato

Bak: (del inglés, Bcl-2 homologous antagonist/killer)

Bax: (del inglés, Bcl-2-associated X protein)

Bcl-2: (del inglés, B-cell lymphoma 2)

Bcl-xL: (del inglés, B-cell lymphoma-extra large)

BH: Dominio de homología a Bcl-2 (del inglés, Bcl-2 homology domain)

BH3-only (proteínas): Proteínas con dominio (3) de homología a Bcl-2

BIM: (del inglés, Bcl-2 interacting mediator of cell death)

Bmf: (del inglés, Bcl2 modifying factor)

BrEt: Bromuro de etidio

CARD: Dominios de reclutamiento y activación de caspasas (del inglés, Caspase activation and recruitment domain)

ciAP: (del inglés, Cellular inhibitor of apoptosis protein)

CHOP: (del inglés, CCAAT/-enhancer-binding protein homologous protein)

CHX: Cicloheximida

CMA: Autofagia mediada por chaperonas (del inglés, Chaperone mediated autophagy)

DAP1: (del inglés, Death-associated protein 1)

DAPI: Diaminofenilindol, (del inglés, 4',6-diamidino-2-phenylindole)

- DD: Dominio de muerte (del inglés, Death domain)
- DED: Dominio efector de muerte (del inglés, Death effector domain)
- 2-DG: 2-deoxiglucosa
- DISC: Complejo inductor de muerte (del inglés, Death-inducing signaling complex)
- DKO: Doble Knock out. Hace referencia a las células deficientes en Bax y Bak.
- DMEM: (del inglés, Dubelco's modified Eagle's medium)
- DMSO: Dimetilsulfóxido.
- EBSS: (del inglés, Earle's Balanced Salt Solution)
- ECL: Reactivo quimioluminiscente (del inglés, Enhanced chemiluminescence)
- EDTA: Etilendiaminotetraacetato.
- eIF: Factor de iniciación eucariota (del inglés, Eukaryotic Initiation Factor)
- EM: Microscopía electrónica (del inglés, Electron microscopy)
- ERAD: Degradación de proteínas asociada al retículo endoplasmático (del inglés, Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation)
- FACS: Citometría de flujo (del inglés, Fluorescence activated cell sorting)
- FADD: (del inglés, Fas Associated Death Domain)
- FBS: Suero bovino fetal (del inglés, Foetal bovine serum)
- FIP200: (del inglés, Focal adhesion kinase [FAK] family interacting protein of 200 kD)
- GADD34: (del inglés, Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein)
- GFP: Proteína fluorescente verde (del inglés, Green fluorescent protein)
- GLUT: Transportadores de glucosa
- Grp 58, 78, 94: Proteína regulada por glucosa, 58, 79 o 94 (del inglés, Glucose regulate protein)

HBSS: (del inglés, Hank's buffered salt solution)

HRP: Peroxidasa de rábano (del inglés, Horseradish peroxidase)

HSP-70, -90: Proteínas de shock térmico-70 y 90. (del inglés, Heat shock protein)

ICQ: Inmunohistoquímica

IP: Inmunoprecipitación

IRE-1: Proteína reclutadora de inositol (del inglés, Inositol-requiring protein 1)

JNK: Quinasa c- Jun (del inglés, c- Jun N-terminal Kinases)

Kda: KiloDalton

LDH: Lactato deshidrogenasa

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

Mcl-1: (del inglés, Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1)

MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón (del inglés, Murine embryonic fibroblasts)

MOMP: Permeabilización de la membrana mitocondrial externa (del inglés, mitochondrial outer membrane permeabilization).

MPT: Transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, (del inglés, Mitochondrial membrane permeability transition)

mTOR: (del inglés, Mammalian target of rapamycin)

mRNA: ARN mensajero

NK: (del inglés, Natural killer)

P70S6K: Proteína ribosomal S6 quinasa

PBS: Solución salina fosfato (del inglés, Phosphate-buffered saline)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction)

PMAIP1: o Noxa, (del inglés, Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)

PE: Fosfatidiletanolamina (del inglés, Phosphatidylethanolamine)

PET: Tomografía por emisión de positrones (del inglés, Positron Emission Tomography)

PERK: (del inglés, protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase)

PI: Yoduro de propidio (del inglés, Propidium iodide)

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa (del inglés, Phosphoinositide 3-Kinase)

PS: Fosfatidilserina (del inglés, Phosphatidylserine)

PUMA: (del inglés, p53 upregulated modulator of apoptosis)

RE: Retículo endoplásmico o endoplasmático

RIDD: (del inglés, Rapid Ire1-Dependent Decay pathway)

RIPK1: (del inglés, Receptor-interacting protein kinases-1)

RNA: ARN (del inglés, Ribonucleic acid)

Rnase: Ribonucleasa

ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés, Reactive Oxygen Species)

RT-PCR: Transcripción reversa de ARN y amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, Reverse transcriptase polymerase chain reaction)

SDS: Dodecil sulfato sódico (del inglés, Sodium dodecyl sulfate)

SEM: Error estándar de la media

shRNA: (del inglés, Short hairpin RNA)

siRNA: ARN de interferencia (del inglés, Small interfering RNA)

SV40: (del inglés, Simian vacuolating virus 40)

TAE: Tris acetato EDTA.

TBS: Solución salina de Tris (del inglés, Tris-buffered saline)

TE: Tris EDTA

TEMED: Tetrametiletileno diamina (del inglés, N-N-N'-N'-Tetramethylethylene diamine)

TNF α : Factor de necrosis tumoral alpha, (del inglés, Tumor Necrosis Factor alpha)

TRAIL: (del inglés, TNF Related Apoptosis Inducing Ligand)

TRADD: (del inglés, TNFR-associated death domain)

TRIS: (del inglés, Trishydroxymethylaminomethane)

ULK1: (del inglés, unc-51-like kinase 1 (C. elegans))

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés, Unfolded protein response)

WB: Técnica de Western blot

WT: Fenotipo silvestre (del inglés Wild Type)

XPB1: (del inglés, X-box binding protein-1)

XIAP: (del inglés, X-linked inhibitor of apoptosis protein)

z-VAD-fmk: (del inglés, Z-Val-Ala-Ala-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone)

I. Introducción

1.1 ¿Qué entendemos como muerte celular?

Diversas clasificaciones han sucedido desde las primeras descripciones en los años 60, sobre los mecanismos de la muerte celular programada. Durante los años 2005 hasta 2009, el comité de nomenclatura en muerte celular unificó los criterios de muerte. Uno de los avances relevantes, ha sido el invalidar la necrosis como una forma de muerte meramente accidental. Y definen muerte cuando una célula ha perdido la integridad de la membrana plasmática, su núcleo está fragmentado o bien los cuerpos apoptóticos han sido fagocitados. Con esta definición una célula senescente, que ha perdido su viabilidad y su capacidad de multiplicarse, lo que llamamos como clonogenicidad, es considerada viva (Galluzzi, Vitale et al. 2011).

Nosotros clasificaremos muerte en necrosis y apoptosis. E incluimos muerte por autofagia, como esa muerte definida como una de las dos anteriores acompañada de vacuolización del citoplasma.

1.1.1 Muerte celular programada: apoptosis y necrosis

La muerte celular programada (PCD), o regulada por un programa genético es esencial para mantener la homeostasis de los tejidos. Puede ocurrir como consecuencia de una lesión grave y patológica en forma de necrosis, o de una forma controlada, a través de la activación de una serie de eventos bioquímicos ordenados. La forma de muerte celular programada más conocida es la apoptosis. En la apoptosis, tales cambios, se suceden de forma “silenciosa”. Lo que quiere decir, que se mantiene la integridad de la membrana plasmática, evitando la inflamación. Se induce a un encogimiento de las células, fragmentación nuclear e hidrólisis del ADN, condensación citoplasmática, llevando a la separación y formación de pequeñas porciones rodeadas de membrana o cuerpos apoptóticos, que son inmediatamente fagocitados. Todo este proceso apoptótico se sucede en diferentes fases: Una primera fase de iniciación, dónde se dan lugar diversos estímulos que

tras traspasar un umbral determinado se continua el proceso de apoptosis. Una segunda, de inducción. En esta fase se induce la activación de caspasas. El proceso apoptótico continuará si el estímulo es capaz de inducir por un lado la liberación de citocromo c, formación del apoptosoma y activación de caspasa-9 o por otro la activación de receptores de muerte que promueven la actividad caspasa. La tercera fase es de ejecución dónde se da lugar la fragmentación del ADN, la proteólisis de substratos, formación de cuerpos apoptóticos y la externalización de fosfatidilserina de la membrana celular que es señal para fagocitosis. Y por último el reconocimiento y fagocitosis por macrófagos. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre en la apoptosis, en situación de daño traumático e incontrolado como ocurre en la necrosis, existe una incapacidad de mantener íntegra la membrana plasmática y el escape de todos los elementos citoplasmáticos lleva a cabo una inflamación.

Encontramos diferentes casos en los que la PCD es fundamental. Como hemos comentado al principio, la muerte celular programada es importante para mantener la homeostasis. Es crucial para el mantenimiento de un número determinado de células y establecer un equilibrio entre muerte y división. En defensa a patógenos, bajo una célula infectada por virus o bacterias, se disparan procesos apoptóticos induciendo al suicidio celular. Además, es muy importante en el desarrollo de órganos y sistemas. Por ejemplo, en el desarrollo de las conexiones sinápticas entre neuronas; También en el remodelado durante la fase embrionaria como ocurre en la eliminación de las zonas interdigitales.

1.1.2 Caspasas

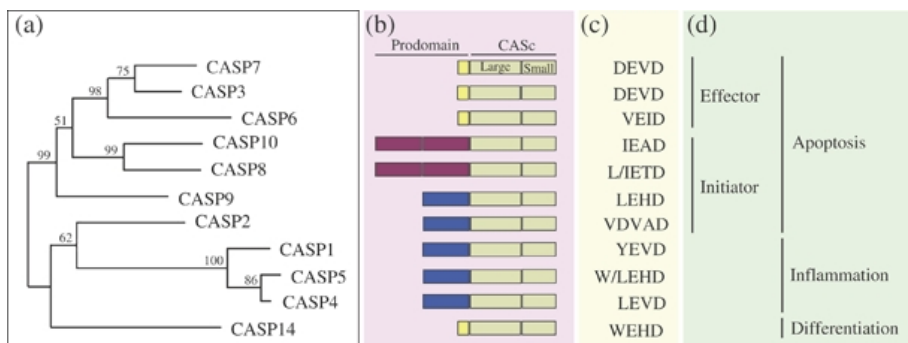
Las caspasas son las grandes ejecutoras del proceso apoptótico y como indica el acrónimo en inglés (cysteine aspartyl-specific proteases)(Thornberry 1997), son cisteín proteasas que cortan diferentes substratos. Permanecen en el citosol de la célula como zimógenos o procaspasas inactivas hasta que

un estímulo, digamos pro-muerte, las activa. Los zimógenos inactivos contienen un prodominio seguido de dos subunidades, una larga (p20) y otra pequeña (p10) (Fig 1). Estos zimógenos pueden ser cortados dando lugar a la forma activa, produciéndose la oligomerización y el corte. Las caspasas activadas, activan a la vez a otras, dando lugar a una cascada que finaliza en la muerte. Pero el proceso en absoluto es lineal, e implica activaciones e inhibiciones.

Durante las primeras fases de la apoptosis, las caspasas llevan a cabo el desmantelamiento de las estructuras celulares a través del corte de substratos y en conjunto estos eventos proteolíticos producen los cambios fenotípicos de la célula.

Figura 1. Esquema de las caspasas humanas.

A) Relación filogenética de caspasas humanas, según el alineamiento de secuencias de aminoácidos en su región catalítica. **B)** Estructura proteica. Las procaspasas presentan un prodominio unido a su región catalítica (CASC) compuesta por la subunidad grande y pequeña. Las Caspasas-3, -6, -7 and -14 contienen un prodominio corto (amarillo) mientras que las demás lo tienen más largo que contienen los dominios CARD (azul) o DED (lila). **C)** Especificidad de sustrato, secuencias que reconoce cada caspasa. **D)** Papel fisiológico, las caspasas se dividen en inflamatorias, iniciadoras y efectoras. A diferencia de la caspasa 14, que tiene un papel clave en la diferenciación (Sakamaki and Satou 2009)



Por ejemplo, el corte de diferentes componentes del citoesqueleto, como la actina, y proteínas asociadas a ésta, como la miosina, contribuyen al redondeo, a la retracción de la célula y al típico “blebbling” o globulización de la membrana. También el corte de laminina debilita la membrana y

posibilita la fragmentación nuclear. Otra característica de la apoptosis temprana, es la pérdida de contacto de las células con la matriz extracelular, por lo que las caspasas también atacan las adhesiones con la matriz y células vecinas. Otra característica de la apoptosis, es la destrucción de orgánulos como el Golgi, el retículo o la mitocondria. Después, las caspasas se dirigen a proteínas que están implicadas en funciones de mantenimiento esenciales dentro de la célula. Por ejemplo proteínas con función en la transcripción (NF κ B/p65 entre otros) y traducción como factores de la iniciación de la traducción eIF2, eIF3 y eIF4 y proteínas ribosomales como p70S6K, inhibiendo la transcripción y la traducción. Con el corte de estos substratos las caspasas aseguran la muerte de la célula (Taylor, Cullen et al. 2008).

1.1.3 Tipos de caspasas

Existen 11 caspasas en humanos. Pero no todas están relacionadas con la apoptosis. Este es el caso de la caspasa-1, 4 y 5 que juegan un papel en la inflamación e inmunidad (Schmitz, Owyang et al. 2005). Por otro lado, la caspasa 14 no está relacionada ni con apoptosis ni inflamación, sino en diferenciación epidérmica (Denecker, Ovaere et al. 2008).

Además, también podemos clasificar las caspasas en dos grupos teniendo en cuenta el papel en la cascada apoptótica: iniciadoras y efectoras.

1.1.3.1 Caspasas iniciadoras

Las caspasas iniciadoras, como la caspasa-8 y 9 en mamíferos, tienen un dominio N-terminal, pro-dominio, responsable de las interacciones entre las caspasas iniciadoras y las proteínas que cortan. Este dominio en el caso de la caspasa-8, se llama DED (Death Effector Domains) y en la caspasa-9, CARD (Caspase Recruitment Domain).

Tras un estímulo, interacciones entre proteínas que tienen el mismo dominio, es decir CARD-CARD o DED-DED, dan lugar a la oligomerización de caspasas iniciadoras, su activación y el consecuente corte de moléculas.

1.1.3.2 Caspasas efectoras

Las caspasas efectoras, caspasa-3 y caspasa-7 en mamíferos, son necesarias para el proceso apoptótico. Se activan a través de las caspasas iniciadoras. A diferencia de las caspasas iniciadoras, las efectoras no tienen un prodominio, y su activación es irreversible.

La activación de caspasas es un proceso bastante similar en vertebrados. Un estímulo proveniente de dentro o fuera de la célula, lleva a la formación de un complejo multi-proteico, podemos llamarlo “pro-muerte” que recluta y activa a las caspasas iniciadoras, con ayuda de moléculas adaptadoras. Después, estas caspasas iniciadoras activan a las efectoras induciendo así la muerte celular. Estas plataformas de reclutamiento, son: el DISC (Death Inducing Signaling Complex) para la caspasa-8 y caspasa 10 (Peter and Krammer 2003), el PIDDosoma para la caspasa-2 (Tinel and Tschopp 2004) y apoptosoma para la caspasa-9 (Cain, Bratton et al. 2002).

1.1.4 Apoptosis por la ruta extrínseca o de receptores de muerte

Mientras que la vía intrínseca de la apoptosis es importante para la homeostasis y respuesta a estrés, la vía extrínseca juega un papel importante en la respuesta inmune y en tumorigénesis.

La vía extrínseca o de receptores de muerte es activada a través de la inducción de los receptores relacionados con el receptor de TNF.

El TNF α es una citoquina muy potente producida mayoritariamente por macrófagos y monocitos activados, pero también por otras células importantes del sistema inmune como linfocitos B y T, células NK (natural killer), neutrófilos así como células tumorales (Vassalli 1992). El papel principal del TNF α es la regulación de las células inmunitarias a través de la activación de las vías del factor nuclear κ B (NF- κ B) y la quinasa Jun N-terminal (JNK), que protege a las células de la apoptosis (Hehlgans and Pfeffer 2005). Ahora bien, el TNF α , junto con proteínas relacionadas con

éste, pueden inducir en situaciones concretas muerte celular y entonces, se denominan ligandos de muerte. Estos ligandos son además del TNF α , Fas ligando (CD95L) y TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing-ligand).

La mayor parte de estas moléculas se sintetizan como proteínas de membrana y son liberadas en forma soluble tras proteólisis específica. Algunos ligandos como el TNF, son activos tanto en la forma transmembrana como también en la soluble. Y su liberación se produce a través de un corte proteolítico realizado por metaloproteasas de matriz (MMP). Los ligandos de muerte actúan como citoquinas que regulan la inflamación y otros procesos inmunes.

De hecho la pérdida de la regulación de algunos ligandos de la superfamilia, como el TNF o FasL, tiene consecuencias graves en procesos de tolerancia inmunitaria. Además, las alteraciones en sus vías contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias como la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple entre otras (Mackay and Kalled 2002).

Tras un estímulo concreto, los ligandos de muerte inducen a la oligomeración y cambio conformacional de los receptores de muerte. Estos receptores contienen un dominio de muerte (Death Domain, DD) en sus colas citoplasmáticas que están relacionados evolutivamente con los dominios CARD presentes en diversas caspasas, como la caspasa-9. La familia de receptores de muerte incluye, entre otros, a Fas/CD95, TNF- α R y dos receptores de TRAIL, el DR4 y DR5.

La interacción de los receptores con sus ligandos induce a la formación del DISC a través de una molécula adaptadora que también contiene un Dominio de muerte, DD. El DISC (Death Receptor Signaling Complex) constituye la plataforma formada por el receptor de muerte, la molécula adaptadora y caspasa-8.

Las dos moléculas adaptadoras principales relacionadas con la señal por receptores de muerte son: FADD (Fas Associated Death Domain) y TRADD

Una vez que la caspasa-8 está activa, y se ha superado el umbral de señal, o bien corta y activa a la caspasa-3, induciendo apoptosis o corta la proteína “BH3-only” Bid, lo que conlleva una acumulación de tBid, desencadenándose apoptosis por la vía mitocondrial. Dependiendo si la célula activa una u otra vía, se diferencia en apoptosis extrínseca de tipo I y II, respectivamente.

Existen otras proteínas asociadas al DISC, como FLIP o IAPs.

cFLIP es una proteína homóloga a la caspasa-8, con una mutación en su lugar catalítico, por lo que no tienen actividad caspasa. Compite con FADD y actúa inhibiendo a la caspasa-8. FLIP actúa como un inhibidor de la apoptosis, y también es esencial para la activación de NF- κ B en células inmunes.

Las proteínas IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins) fueron identificadas por primera vez en baculovirus basados en su habilidad por suprimir apoptosis en células de insectos (Bump, Hackett et al. 1995). El principal papel de las IAPs también reside en inmunidad y activación de NF- κ B. De hecho, la pérdida de estas proteínas en mamíferos, no induce a activación de caspasas y muerte celular generalmente. En mamíferos, IAPs incluyen XIAP, cIAP-1, cIAP-2 y Survivina entre otros. Y de las ocho proteínas IAPs en humanos, solo una, XIAP, se considera un inhibidor directo de caspasas. cIAP 1 y 2 son evolutivamente similares a XIAP e inhiben apoptosis sin inhibir actividad caspasa. Son reclutadas al DISC a través de interacciones con receptores TNF.

1.1.5 Apoptosis mitocondrial o ruta intrínseca

El eje principal de la apoptosis mitocondrial es, como su nombre indica, la mitocondria. Las mitocondrias son orgánulos que proveen energía y metabolitos a la célula, pero también participan en la apoptosis ya que contienen proteínas que activan caspasas cuando su membrana externa se permeabiliza. Los estímulos para activar esta vía no necesariamente provienen del interior de la célula. La privación de nutrientes, de factores de crecimiento o el daño al ADN pueden activarla.

La permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) está principalmente controlada por las proteínas Bcl-2 que discutiremos más adelante. Una vez que MOMP ocurre, el citocromo c se libera al citoplasma y se une a Apaf-1 (Apoptosis Protease-Activating Factor-1). La unión de siete moléculas de Apaf-1, formará un complejo citosólico, similar al DISC en la ruta extrínseca, llamado apoptosoma que reclutará y activará a caspasa-9. Caspasa-9 una vez activa, permitirá a la vez, el procesamiento de las caspasas efectoras caspasa-3, 6 y 7, dando lugar a la cascada de procesos celulares que de forma irreversible inducirán a muerte celular.

La polimerización de Bax y Bak, dos miembros de la familia de Bcl-2, induce a la formación del poro por el que se liberarán proteínas del espacio intermembranal de la mitocondria, como el citocromo c. Este proceso está inhibido por las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL o Mcl-1).

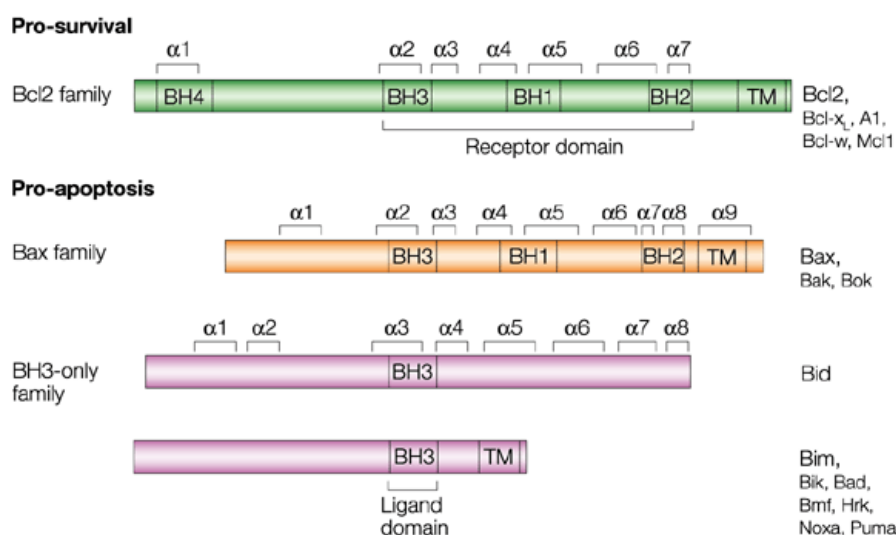
1.2 Proteínas Bcl-2

En vertebrados, la muerte celular se controla por un grupo de proteínas llamadas Bcl-2. Las proteínas de la familia Bcl-2 son importantes en la regulación de la muerte por la vía intrínseca, ya que controlan la permeabilización de la membrana mitocondrial y la salida de citocromo c. La familia Bcl-2 comprende tres grupos clasificados según la homología en los 4 dominios helice- α BH1-BH4 de Bcl-2 (Fig3). La primera familia contiene los cuatro dominios BH1-BH4 y está compuesta por miembros anti-apoptóticos como Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-B entre otros. Muchas proteínas de esta familia como Mcl-1 o Bcl-2 están sobre-expresadas en muchos tumores y protegen a las células tumorales de la apoptosis. El segundo grupo de proteínas contienen los dominios entre BH1, BH2 y BH3. Bax y Bak forman parte de este grupo. Son responsables de formar el poro en la membrana mitocondrial, y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y cómo hemos dicho antes, la proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1

inhiben la formación de ese poro, inhibiendo la liberación de citocromo c. El tercer grupo de proteínas pro-apoptóticas tienen un dominio corto BH3 y la interacción de estos dominios es necesaria y suficiente para su actividad pro-muerte (Cory and Adams 2002).

Figura 3. Familia de proteínas Bcl-2.

Se indican las regiones α -hélice (BH1-4) más conservadas entre los miembros (Cory and Adams 2002).



1.2.1 Dinámicas de grupo

En los nuevos enfoques a la terapia del cáncer, las proteínas de la familia Bcl-2 son cruciales para inducir muerte. Por ello, en este capítulo explicaremos algunos ejemplos de como las proteínas Bcl-2 regulan diversos aspectos claves en la supervivencia de la célula.

1.2.1.1 La escasez de nutrientes regula a las proteínas Bcl-2

Diversos estudios indican que la muerte inducida por privación de nutrientes, especialmente la glucosa, es mediada por la vía mitocondrial. Un ejemplo lo encontramos en células hematopoyéticas FL5.12, en las que una bajada de los niveles de glucosa induce a translocación de Bax, una caída en el potencial de

la membrana mitocondrial y liberación de citocromo c (Vander Heiden, Plas et al. 2001).

Sin embargo, a pesar de que las células frecuentemente mueren por apoptosis mitocondrial cuando son privadas de nutrientes, muchos tumores adquieren resistencia a esta vía tras la sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-xL, Bcl-2 y Mcl-1, mutaciones en las proteínas “BH3-only” pro-apoptóticas o en Bax y Bak. Por ejemplo, E. White y colaboradores estudiaron en células de riñón con Akt sobre-expresada, que algunos estímulos apoptóticos (como la privación de glucosa en situación de hipoxia) podían inducir necrosis, en condiciones de ausencia de Bax y Bak. Demostraron además, que las células deficientes en Bax y Bak, resisten a la muerte tras periodos largos de privación de nutrientes (o más bien de interleuquinas) a través de la activación de autofagia que ayudaría en el uso de fuentes de energía alternativas y a mitigar el estrés metabólico (Lum, Bauer et al. 2005) (Degenhardt, Mathew et al. 2006).

Otra manera en que la sobre-captación de glucosa incide en la apoptosis es a través de la regulación de Puma, previniendo su inducción en condiciones de escasez de factores de crecimiento (Zhao, Coloff et al. 2008).

Entre las proteínas Bcl-2, también Mcl-1 puede desempeñar un papel importante en las respuestas de muerte celular a los cambios en el metabolismo de la glucosa. Existen estudios donde demuestran que en condiciones donde la presencia de glucosa es la adecuada, la activación de Akt y la sobre-regulación de la glicólisis, previene la pérdida de expresión de Mcl-1. En este caso la supervivencia también está relacionada con la inhibición de Bim (Coloff, Macintyre et al. 2011). Además, la sobre-expresión de transportadores de glucosa y una hexoquinasa es suficiente para prevenir la muerte bloqueando la pérdida de Mcl-1 a través de la inhibición de GSK (Glycogen synthase kinase 3) una quinasa que lleva a la degradación de Mcl-1 cuando está activa (Zhao, Altman et al. 2007; Bhaskar, Nogueira et al. 2009).

Por el contrario, se ha descrito que la privación de glucosa y la 2-deoxiglucosa bajan los niveles de Mcl-1. En un reciente estudio realizado en diversas células tumorales (HeLa y Jurkat entre otras), la inhibición de la glicólisis inducida por 2-deoxiglucosa, sensibiliza a la apoptosis inducida por receptores de muerte. La activación de AMPK, resulta en la inhibición de mTOR y el bloqueo de la traducción de Mcl-1 (Pradelli, Beneteau et al. 2009). De hecho, el sinergismo de inhibidores del metabolismo glicolítico y receptores de muerte se ha podido observar en otros sistemas. Por ejemplo en células de melanoma, la 2-deoxiglucosa sensibiliza a la muerte inducida por los receptores de TRAIL acompañado con la reducción en los niveles de Mcl-1 y Bcl-2 (Munoz-Pinedo, Ruiz-Ruiz et al. 2003; Qin, Xin et al. 2010).

Como decíamos con anterioridad, también se han descrito proteínas “BH3-only” relacionadas con la muerte en condiciones de privación de nutrientes. Una de ellas es Bad, que se ha visto implicada en la muerte por privación de glucosa. Bad está presente en el complejo mitocondrial que incluye a la hexoquinasa IV que permite la fosforilación de la glucosa. La privación de glucosa induce a la de-fosforilación de Bad y a la inducción de muerte celular dependiente de esta proteína (Danial, Gramm et al. 2003).

Otra de las proteínas importantes es Puma, que se induce en respuesta al daño en el DNA y a la privación de factores de crecimiento (Jabbour, Daunt et al. 2010). Recientemente, como decíamos anteriormente, se ha descrito la inducción de Puma, tras la privación de glucosa en células hematopoyéticas murinas (Zhao, Coloff et al. 2008). Esta inducción es dependiente de p53. Un aumento del metabolismo de la glucosa puede contrarrestar e inhibir la actividad de p53 y la sobre-regulación de Puma.

Noxa es otra de las proteínas que puede inducir apoptosis por privación de glucosa y estrés reticular como describiremos más adelante. Se ha visto que el silenciamiento de Noxa, protege a linfocitos T en condiciones de baja glucosa (Alves, Derks et al. 2006). Los autores indican que la acción de Noxa

es a través de la inhibición de Mcl-1, ya que al silenciar Mcl-1 las células se vuelven más sensibles a la privación de glucosa. Lo que sugiere que los niveles de Mcl-1/Noxa pueden ser relevantes para la apoptosis en situaciones de escasez de glucosa.

1.2.1.2 Relación entre las proteínas Bcl-2 y la regulación de las señales del retículo endoplasmático

La familia de proteínas Bcl-2 es capaz de impactar en las señales y funciones del retículo endoplasmático a través de la regulación directa de los niveles de calcio (Ca^{2+}) en su interior.

El calcio en el retículo está regulado tanto a nivel de entrada, a través de la bomba ATPasa localizada en la membrana, como en la salida via el receptor inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3R). Bcl-2 y Bcl-xL localizadas en el retículo están implicadas en la inhibición directa de la función del receptor IP_3R . De esta manera, se reducen las oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} citosólico que podrían llevar a estímulos proapoptóticos (Rong, Bultynck et al. 2009).

Existen estudios que también sugieren el impacto directo en la señal mediada por calcio en el retículo de las proteínas Bak y Bcl-2. Éstas, promueven el almacenamiento de calcio posiblemente inactivando las funciones inhibitorias de Bcl-2 y Bcl-xL en el receptor de inositol (Scorrano, Oakes et al. 2003; Oakes, Scorrano et al. 2005).

Por otro lado, existe otro nivel complejo de regulación de la homeostasis de calcio por parte de las proteínas Bcl-2 y es a través de la inducción de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés).

En todas las células, las proteínas deben estar plegadas y ensambladas de forma correcta y en algunos casos glicosiladas, para su incorporación a la vía secretora. Este plegamiento se realiza en el retículo endoplasmático y depende de diferentes proteínas localizadas en el mismo compartimento, como son chaperonas, enzimas de glicosilación, disulfuro isomerasas. A

veces, el proceso falla dando lugar irreversiblemente a proteínas mal plegadas. La célula, es capaz entonces de dar soluciones al problema de dos formas. Bien, induciendo a la degradación de proteínas (vía ERAD) o bien activando la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).

A través de la vía ERAD, la célula transloca las proteínas defectuosas al citoplasma, e induce la degradación proteosomal vía ubiquitinación.

Los inhibidores de la respuesta ERAD, por ejemplo como el inhibidor del proteosoma bortezomib y otros, son capaces de activar Noxa a través de la activación de los factores de transcripción ATF4 y ATF3 que explicaremos más adelante (Fritsch, Schneider et al. 2007; Gomez-Bougie, Wuillme-Toumi et al. 2007; Wang, Mora-Jensen et al. 2009)

La UPR en cambio es más compleja. Implica una situación de estrés, en la que se induce la expresión de genes como respuesta a un aumento en la síntesis de chaperonas del retículo y de otras proteínas que intervienen en el plegamiento, para promover la recuperación y devolver la homeostasis.

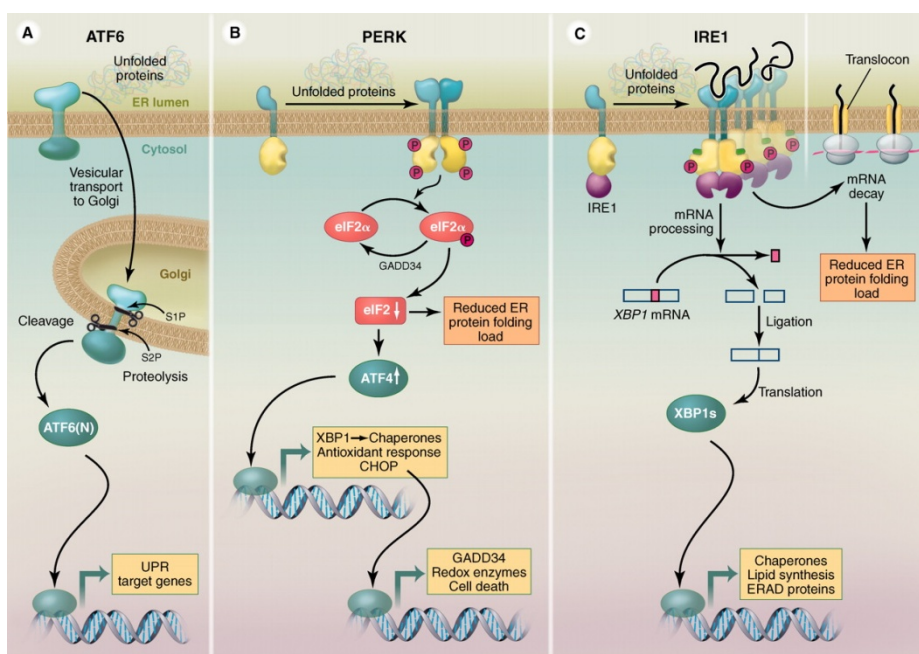
1.2.1.3 Elementos clave de la respuesta mediada por proteínas mal plegadas (UPR)

Existen tres ramas que operan en paralelo en la UPR: IRE-1, PERK y ATF6.

La activación de estos sensores tras el estrés reticular produce factores de transcripción (XBP1, ATF4, ATF6 (N) respectivamente) que activan genes dirigidos a incrementar la capacidad de plegamiento de proteínas en el retículo. Además IRE1 (via RIDD) y PERK (via fosforilación de eIF2-alfa) también disminuyen la traducción de proteínas que entran en el retículo. Todas estas respuestas trabajan retroalimentándose para mitigar el estrés reticular. Si las células no consiguen reestablecer la homeostasis, y se prolonga el estrés, se inducirá apoptosis.

Figura 4. Vías de UPR

(A-C) Las tres vías de transducción de señal (ATF6, PERK y IRE1) detectan las condiciones de plegamiento de proteínas en el lumen del RE y transmiten la información a través de la producción de reguladores de la transcripción que entran en el núcleo para transcribir genes diana de la UPR. Cada vía utiliza diferentes mecanismos de transducción de la señal: ATF6 regulado por proteólisis, PERK por control de la traducción e IRE1 a través de plegamiento de mRNA. Además de las respuestas a nivel transcripcional que sirven para incrementar la capacidad de plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático, PERK e IRE1 reducen el estrés reduciendo la carga de proteínas a plegar en el retículo bajando su traducción. (Walter and Ron 2011)



ATF6 es una proteína transmembrana que actúa como factor de transcripción. Tras la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo, se internaliza en vesículas de transporte, dirigiéndose hacia el aparato de Golgi. Allí, dos proteasas S1P y S2P, se encargan de cortar el dominio luminal y el anclaje transmembrana, liberando el fragmento N-terminal citosólico ATF6(N). ATF6(N) se dirige al núcleo para activar genes de la UPR. Entre los diferentes genes diana de ATF6, encontramos a GRP-78 y GRP-94,

chaperonas de la familia HSP70 y HSP90 respectivamente. Se conoce más bien poco acerca de cómo ATF6 responde al estrés del retículo. Por un lado, Bip/GRP 78 puede contribuir a su activación. También, el dominio luminal de ATF6 contiene enlaces disulfuro que pueden actuar como sensores redox, monitoreando el medio ambiente del retículo (Schindler and Schekman 2009).

Recientemente se ha estudiado, la implicación de ATF6 como mediador de la apoptosis. En células de leucemia mieloide y tras la activación del estrés reticular con inductores clásicos se induce una bajada de los niveles de Mcl-1, y no de Bcl-xL (Morishima, Nakanishi et al. 2011).

La segunda vía de la respuesta a proteínas mal plegadas es a través de PERK, una quinasa transmembrana del retículo. Cuando se activa tras el estrés reticular, PERK oligomeriza y se fosforila a sí misma y al factor de iniciación de la traducción eIF2 α , induciendo la inactivación de la traducción y la inhibición de la transcripción del mRNA de eIF2. De esta forma, PERK alivia el estrés, ayudando a reducir el flujo de entrada de más proteínas en el retículo. Pero cuando los niveles de eIF2 son limitantes, también se induce la transcripción de ARNs mensajeros concretos, incluido el de ATF4. ATF4, es un factor de transcripción que activa a varios genes relacionados con el estrés, como por ejemplo CHOP y GADD34, y genes relacionados con la apoptosis. CHOP es a la vez un factor de transcripción que controla genes relacionados con la muerte apoptótica. Por otro lado, GADD34 es capaz de de-fosforilar a eIF2 α . Se ha demostrado que la inhibición de GADD34, protege del estrés reticular prolongando bajos niveles de fosforilación de eIF2 α (Tsaytler, Harding et al. 2011). De esta manera, la vía de PERK puede actuar con un efecto protector del estrés reticular o si la señal persiste, como un inductor de la muerte celular.

Existen diversos estudios explicando el posible papel de las proteínas BH3 en la modulación de la muerte celular bajo condiciones de estrés irreversible

(Rodríguez, Rojas-Rivera et al. 2010), aunque los mecanismos no han sido del todo indentificados. La transcripción de algunas proteínas BH3, aumentan tras el estrés del retículo, como por ejemplo Noxa y Puma (Reimertz, Kogel et al. 2003). Algunos trabajos sugieren que CHOP regula la expresión de Puma (Cazanave, Elmi et al. 2010). Otros estudios revelan que Noxa puede inducirse a través de ATF4, independientemente de CHOP o la expresión de IRE1 (Armstrong, Flockhart et al. 2010). En fibroblastos de ratón, el silenciamiento de Puma y Noxa protege ligeramente de la muerte inducida por estrés reticular, indicando de que existen otras BH3 implicadas en la respuesta (Li, Lee et al. 2006). Por ejemplo, en células mieloide, y tras un estrés reticular, Puma y Noxa se ven aumentados, pero la subida de Mcl-1 es crítica para la supervivencia de las células (Jiang, Lucas et al. 2008). También Bim es otra de las proteínas reguladas transcripcionalmente en la apoptosis mediada por estrés reticular, a través del factor de transcripción CHOP (Puthalakath, O'Reilly et al. 2007). Y también BMF se regula por estrés reticular (Zagorodna, Martin et al. 2012)

IRE1 es la tercera vía de la respuesta a proteínas mal plegadas. Es una proteína serina-treonina quinasa transmembrana, que a la vez tiene una función endoribonucleasa. Tras una señal activadora, IRE1 es capaz de cortar el ARN mensajero de un factor de transcripción específico, XBP1, dando lugar a su forma activa de traducción.

XBP1 está relacionado con la regulación de síntesis de lípidos y la transcripción de proteínas encargadas de mitigar el estrés del retículo, como las chaperonas.

Pero, tras un estrés crónico en el retículo, tal y como explicamos anteriormente con PERK o ATF6, existe una regulación de IRE1 con las proteínas BH3, relacionadas con apoptosis. Por ejemplo, se ha estudiado la unión directa de Bax y Bak a IRE1 pudiendo tener un papel tanto en la fase de recuperación o bien como iniciadores de la permeabilización mitocondrial

tras un estrés reticular (Hetz, Bernasconi et al. 2006). De hecho, las células Bax/Bak deficientes, DKO, tienen bajos niveles de fosforilación de IRE1 y de diversas señales inducidas por ésta, como la activación de JNK y XBP1 bajo situaciones de estrés. Por otro lado, recientemente se ha descrito el papel de Bim y Puma en la regulación sostenida de IRE1. En un primer momento, tras un estrés del retículo medio, BIM y PUMA actuarían como activadores de la respuesta adaptativa, manteniendo y aumentando la activación de IRE1 y modulando su actividad ribonucleasa. Cuando el estrés es crónico, Bim y Puma actuarían activando apoptosis mitocondrial (Rodríguez, Zamorano et al. 2012).

Todos estos hallazgos sugieren un nuevo papel para los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 en la señalización de UPR.

1.3 Autofagia

La autofagia es un proceso dinámico y podríamos decir de “canibalismo” propio. Las células engloban parte de su citoplasma asegurando la eliminación de proteínas disfuncionales y orgánulos alterados que son degradados en lisosomas. La autofagia no sólo se activa en respuesta al daño celular, de hecho, uno de sus estímulos más fuertes es la privación de nutrientes. Cuando los nutrientes son escasos, la autofagia permite a las células la reutilización de sus propios componentes (Singh and Cuervo 2011).

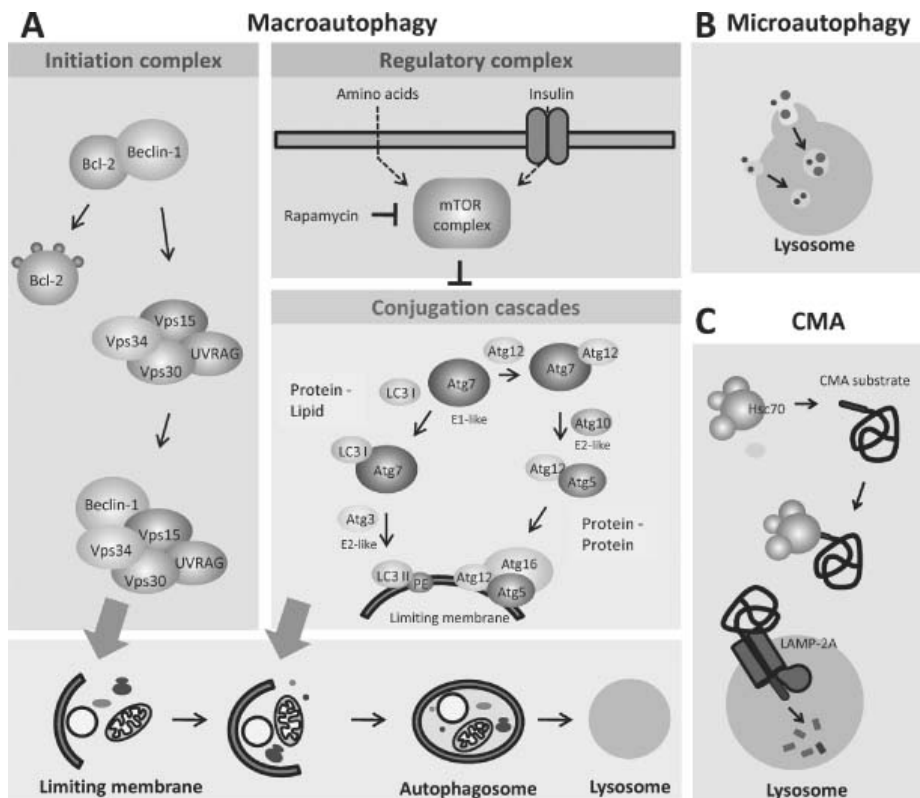
Existen diversos mecanismos por los que la carga es entregada a los lisosomas. Por un lado, la carga puede ser internalizada en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, que adquieren las hidrolasas necesarias para la degradación con la unión de endosomas tardíos o lisosomas. Esta forma de autofagia, se llama macroautofagia y es la más conocida. Pero presenta variantes, según el dónde y el cómo es secuestrada la carga: macroautofagia, si es en volumen, en el citosol con parte del contenido presente en este lugar o bien si la carga es recogida selectivamente en el

caso de mitofagia (mitocondrias), ribofagia (ribosomas), lipofagia (lípidos)...(Kadandale and Kiger 2010). También existe el proceso de microautofagia. En este caso pequeñas cantidades de carga se internalizan directamente en vesículas de una sola membrana que se originan por la invaginación de la membrana lisosomal y rápidamente son degradadas en el lumen. Por otro lado, encontramos la autofagia mediada por chaperona (CMA). En este tipo, las proteínas son reconocidas por un complejo de chaperonas en el citosol y entregadas una por una en la membrana lisosomal donde son internalizadas mediante un complejo de translocación (Arias and Cuervo 2010).

1.3.1 Proceso de macroautofagia

Figura 5. Diferentes vías de autofagia en células de mamíferos.

La principal vía es la de macroautofagia (**A**) que está relacionada con el secuestro de regiones del citoplasma en membranas formadas de nuevo que acaban transformándose en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas. La fusión de autofagosomas con lisosomas es necesario para la degradación de la carga. La inducción de macroautofagia lleva a la movilización del complejo de PI3K III (complejo de iniciación) al lugar de formación del autofagosoma. La fosforilación lipídica de este complejo es necesaria para reclutar en este lugar los componentes de las cascadas de conjugaciones necesarias para la elongación de la membrana del autofagosoma. El principal regulador negativo de este proceso es el complejo de mTOR que responde a privación de nutrientes, sobretodo aminoácidos. **B** Microautofagia que media la internalización del cargo citoplasmático a través de invaginaciones de la membrana lisosomal. Las moléculas que participan en el proceso en mamíferos aún son desconocidas. **C**, CMA o Autofagia mediada por chaperonas, dónde proteínas citosólicas son selectivamente dirigidas a la membrana lisosomal a través de chaperonas citosólicas que ayudan a desplegar las proteínas antes de llegar al lumen lisosomal. La internalización de las proteínas se realiza a través de chaperonas y la proteína de membrana LAMP-2A esencial en la función de recepción y de translocación (Kaushik, Singh et al. 2010).



Como hemos descrito al principio, en la macroautofagia, las membranas formadas en el citosol secuestran regiones citoplasmáticas. Las vesículas de doble membrana, llamadas autophagosomas se movilizan hacia los lisosomas y tras la fusión, los enzimas lisosomales degradan el cargo interior. Este proceso fue caracterizado por primera vez en mamíferos a nivel del hígado (Seglen and Bohley 1992), pero posteriores estudios, mayoritariamente en levaduras, han ayudado a comprender mejor el proceso.

La ejecución y la regulación de la macroautofagia está regida por los productos que codifican los genes llamados Atg o “autophagy-related genes”. Las proteínas Atg organizan complejos que median los diferentes pasos de la autofagia: inducción/iniciación, nucleación, elongación de la membrana, reconocimiento del cargo y fusión con lisosomas.

El complejo esencial en la iniciación de la autofagia lo forman Beclina-1 (en levaduras Atg6), vps15 y vps34. Su función está modulada por la interacción con otras proteínas. Por ejemplo, la interacción de Beclina-1 y Vps34 se refuerza con UVRAG un supresor de tumor que sobre-regula la autofagia, pero también es inhibida por Bcl-2, un inhibidor de la autofagia. La interacción entre Beclina-1 y Bcl-2 está bloqueada por privación de nutrientes y señales de supervivencia a través de JNK1. Cómo el complejo Beclina1/Vps34 regula la autofagia aún no queda del todo claro. Probablemente juega un papel importante en la formación del autofagosoma, la expansión de la membrana y la producción de PtIns3P. La movilización del complejo de iniciación hacia el lugar de formación del autofagosoma lleva lugar a la nucleación y generación de una membrana limitante que requiere de dos cascadas de conjugación de proteínas. Estos sucesos se asemejan a la conjugación de ubiquitinas porque requieren de ligasas que activan a sus substratos y ligandos que enzimáticamente catalizan su conjugación.

Así pues, como consecuencia de estos procesos en cascada se forman dos complejos unidos covalentemente entre sí: Atg5-12, y LC3-fosfatidiletanolamina (LC3II en su forma lipídica). Estas uniones ocurren en la superficie de la membrana que se está formando y median su elongación. Otras proteínas atgs participan en los últimos pasos de fusión, pero el cómo no está del todo definido.

Como hemos comentado, la macroautofagia también está regulada negativamente. El complejo más conocido que inhibe la autofagia es el formado por mTORC1, "mamalian target of rapamycin complex1. El complejo está formado por diversas unidades que incluyen a Raptor y a mTOR, una serina-treonina quinasa sensible a cambios energéticos y de nutrientes. TORC1 interactúa con los efectores ULK1 y FIP200 previniendo la macroautofagia. Cuando los nutrientes decrecen y la actividad de TORC1

baja, los efectores son liberados del complejo y reclutados en el lugar de formación del autofagosoma para su nucleación y elongación (Patingre, Espert et al. 2008).

1.3.2 Activación de autofagia en respuesta a privación de nutrientes

La relación entre autofagia y el estado nutricional de la célula tuvo sus inicios ya en los años 70 en células de humanas HeLa, en las que la privación de suero y aminoácidos del medio activaba la macroautofagia (Mitchener, Shelburne et al. 1976). En los años 80 se realizaron también numerosos estudios sobre autofagia y privación de nutrientes, específicamente de aminoácidos, como un inductor de macroautofagia en el hígado de roedores (Surmacz, Poso et al. 1987). Además se demostró que los cambios hormonales asociados con la ingesta de nutrientes regulan la actividad de la autofagia en el hígado, así el glucagón actuaba como un efecto estimulante de la macroautofagia y la insulina con efecto inhibitorio en la vía (Mortimore and Mondon 1970). Estudios más recientes utilizando ratones transgénicos indicaron que la privación de comida inducía autofagia o más bien aumento de LC3-GFP punteado, en diferentes órganos no únicamente en hígado, sino también en músculo esquelético o corazón (Mizushima, Yamamoto et al. 2004). Sin embargo, en este mismo estudio observaron que en órganos como el hígado, la autofagia se mantiene bastante activa incluso en condiciones normales sin privación de nutrientes, lo que ayudaría a proveer de componentes esenciales a la célula incluso en esta situación y al mantenimiento de una buena “limpieza” celular.

Como mencionamos en la anterior sección, el complejo mTORC1 es el sensor crítico de regulación de macroautofagia. En levadura, la activación de TORC, hiperfosforila a Atg13 previniendo su interacción con Atg1. Este complejo Atg1-Atg13 es necesario para el anclaje de otras Atgs y consecuente formación del autofagosoma (Huang and Klionsky 2002). En mamíferos,

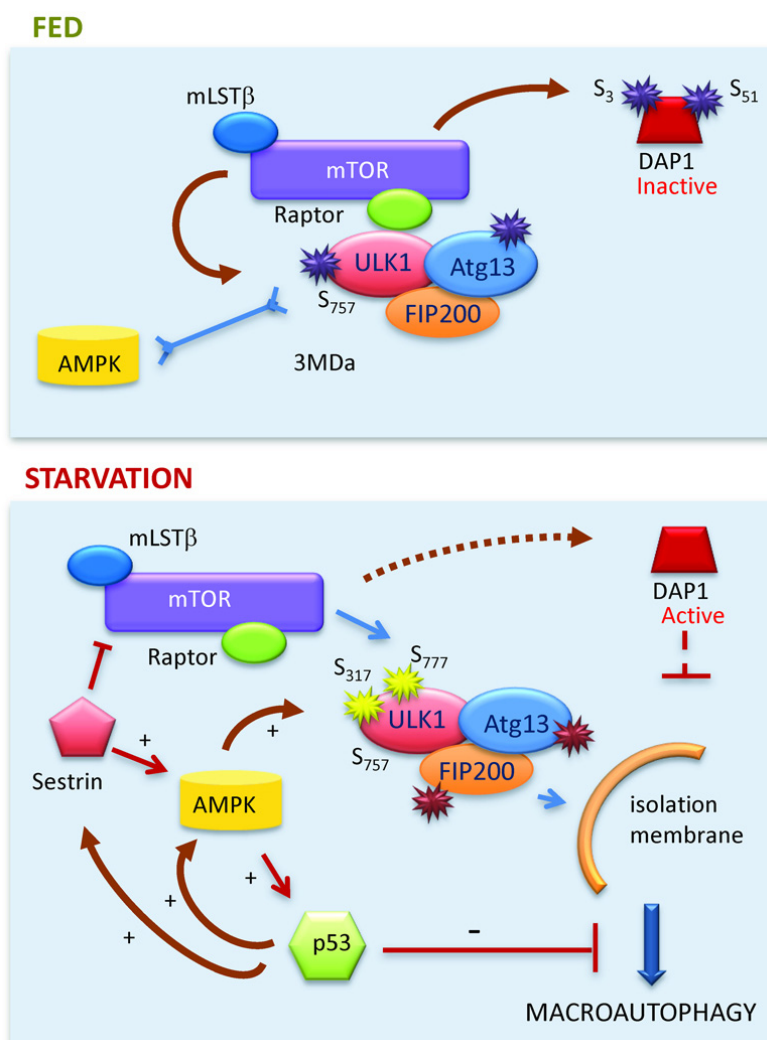
mTORC1 fosforila y secuestra al homólogo de Atg1, ULK1 en el complejo formado por Atg13 y FIP200, inactivándolo (ver figura 6). Después, otro de los sensores energéticos de la célula, AMPK, durante privación de nutrientes, inactiva a mTOR provocando una bajada de la fosforilación en ULK1 y promoviendo su liberación de mTORC1 (Jung, Jun et al. 2009; Kim, Kundu et al. 2011). Además AMPK es capaz de fosforilar a ULK1 en otros residuos favoreciendo la movilización del complejo hacia la región de formación del autofagosoma.

Existen recientemente estudios que apoyan la existencia de otros mediadores de la macroautofagia. Por ejemplo DAP1, es un inhibidor de la macroautofagia, pero el mecanismo aún está por descifrar. En condiciones normales, DAP1 permanece inactivo tras la fosforilación por mTOR. Tras la privación de nutrientes, mTOR se inhibe dando lugar a la defosforilación de DAP1 y su activación. De esta manera DAP1 contribuye a prevenir un exceso de macroautofagia en estas condiciones (Koren, Reem et al. 2010). Por otro lado, las células tumorales son capaces de evadir la posible activación crónica de mTOR aumentando los niveles de sestrinas, unas proteínas capaces de activar directamente a AMPK permitiendo la activación de macroautofagia (Lee, Budanov et al. 2010).

También p53 juega un papel importante regulando el metabolismo energético de la célula. La activación de p53 tras la privación de nutrientes es a través de AMPK e inhibición de la vía de Akt. Además p53 es capaz de activar también a AMPK directamente o indirectamente a través de las sestrinas. De esta manera se induce a la inhibición de mTOR y activación de la autofagia. También conlleva a una disminución del crecimiento y la proliferación dependiente de p53. Sin embargo, p53 citosólico también puede inhibir el proceso de autofagia pero el mecanismo aún está por determinar (Vousden and Ryan 2009).

Figura 6. Regulación nutricional de macroautofagia

En condiciones normales de nutrientes, mTOR fosforila a ULK1, lo que conlleva al secuestro del complejo ULK1-Atg13-FIP200 con mTOR formando el complejo mTORC1 e impidiendo la interacción con AMPK. Por otro lado, mTOR fosforila a DAP1 inactivándolo. Durante privación de nutrientes, AMPK fosforila a ULK1 facilitando su disociación de TORC1 y la asociación con el lugar de formación del autofagosoma. También, la bajada de actividad de mTOR lleva a la disminución de fosforilación de DAP1, activándolo y previniendo una sobre-activación de macroautofagia. También se muestra retroalimentación positiva de autofagia a través de AMPK, sestrinas y p53. Sin embargo, también p53 localizado en el citoplasma puede actuar como regulador negativo de la vía (Singh and Cuervo 2011).



1.4 Metabolismo de la glucosa como una terapia anti-tumoral

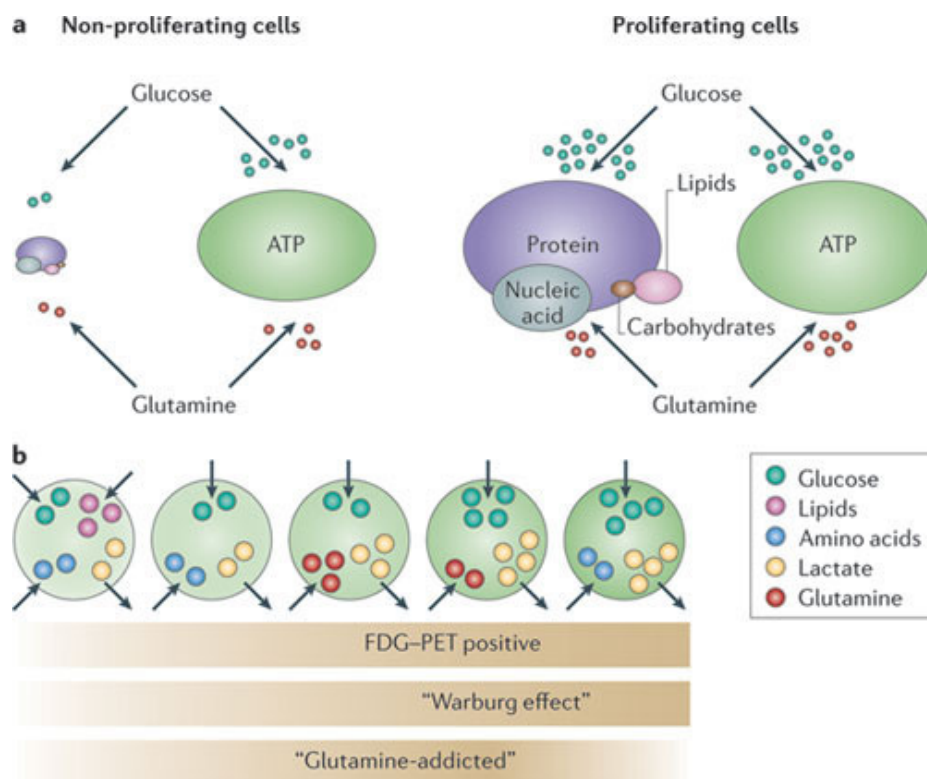
Sabemos que las células cancerígenas tienen unos requerimientos metabólicos diferentes a las células normales. De hecho muchas células tumorales presentan lo que llamamos “efecto Warburg”. Altos niveles de glicólisis (metabolismo de glucosa a lactato) incluso en presencia de oxígeno, lo que es descrito como glicolisis aeróbica. La glicólisis aeróbica está acompañada por un incremento de la captación de glucosa en muchas células tumorales. Este fenómeno puede observarse en tumores comparándolos con tejido normal en pacientes, a través de una tomografía de positrones utilizando 2-deoxi-(¹⁸F)-fluoro-D-glucosa, un análogo de la glucosa (FDG-PET)(Gambhir 2002). A pesar de que Warburg describía que defectos en la mitocondria es lo que incrementaba los niveles de glicólisis en las células cancerígenas, estudios recientes indican algo diferente. Vander Heiden indica que es la activación de protooncogenes como Myc, factores de transcripción como HIF-1 o mutaciones en factores supresores de tumores como p53 sería lo que ayudaría a las células tumorales a incrementar estos niveles de glicolisis (Vander Heiden 2011).

La glicolisis genera poco ATP en comparación con la fosforilación oxidativa, pero en condiciones de rápida velocidad como tienen las células cancerígenas podría ayudar a generar más cantidad de ATP. Sin embargo, las células tumorales principalmente utilizan los nutrientes para la síntesis de biomasa, nucleótidos, lípidos, aminoácidos y NADPH necesario para crecer, manteniendo unos niveles de ATP adecuados (Lunt and Vander Heiden 2011).

Figura 7. Metabolismo de la célula tumoral

A, Glutamina y glucosa son los dos nutrientes básicos necesarios para producción de ATP y precursores biosintéticos en las células proliferantes y normales, a pesar de que lípidos o aminoácidos puedan ser utilizados. Pero las células cancerígenas cambian el flujo metabólico de la glucosa que es metabolizada por fosforilación oxidativa y glicólisis aeróbica, generando más proteínas, lípidos y ácidos nucleicos

necesarios para crecer y manteniendo los niveles adecuados de ATP. **B**, No todos los tumores tienen el mismo fenotipo y diferentes células cancerígenas presentan diferente utilización de nutrientes. Estas diferencias se pueden observar en una imagen de FDG-PET en tumores que aumentan los niveles de utilización de glucosa o un acetato-PET si son tumores más “adictos a la glutamina” (Vander Heiden 2011).



Debido a estas adaptaciones metabólicas de la célula cancerígena, focalizarse en el metabolismo de las mismas puede ser una nueva vía importante para la terapia contra el cáncer. Diferentes estudios han demostrado la relación entre alteraciones en el metabolismo del cuerpo y desarrollo del cáncer. Por ejemplo, niveles altos circulantes de insulina o del factor de crecimiento IGF, está relacionado con cáncer, por lo que la obesidad o situaciones de resistencia a la insulina podrían inducir cáncer principalmente al activar las vías de crecimiento (Pollak 2008). De la misma manera se han estudiado algunos fármacos anti-diabéticos para el tratamiento tumoral, como la

metformina que empeora el crecimiento de células tumorales deficientes en p53 (Buzzai, Jones et al. 2007). Además, existen diversos candidatos potenciales relacionados con el metabolismo de la glucosa que se encuentran sobre-expresados en algunos cánceres como GLUT1, Hexoquinasa II o fosfoglicerato deshidrogenasa (PHGDH).

En nuestro modelo nos centramos en el uso de 2-deoxiglucosa, un análogo de la glucosa que es fosforilada en el primer paso de la glicólisis por la hexoquinasa II produciendo 2-deoxiglucosa-6-fosfato (2-DG-6-P). Esta 2-deoxiglucosa-6-fosfato es un inhibidor competitivo de los enzimas que metabolizan glucosa-6-fosfato, de forma que no puede ser metabolizada, inhibiendo así la glicólisis en la célula. Además, afecta a la glicosilación de las proteínas, afectando a la N-glicosilación e induciendo una acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático promoviendo estrés.

Sabemos que la 2-DG induce muerte tumoral, arresto de ciclo y que sus efectos son mayores en condiciones de hipoxia. Además existen algunos ensayos clínicos en cáncer de próstata y metástasis intercraneal que demuestran un moderado éxito de la 2-DG y aparte de ser poco tóxica para los tejidos normales, es bien tolerada en pacientes (El Mjiyad, Caro-Maldonado et al. 2010).

1.5 Sarcomas

Los sarcomas constituyen un grupo heterogéneo de tumores con diferentes características biológicas e histológicas. Se desarrollan tanto en tejido blando como en hueso. Se pueden dividir en dos grupos, aquellos que tienen alteraciones genéticas específicas o aquellos que no presentan un patrón molecular determinado. Aproximadamente un tercio de los sarcomas presentan alteraciones genéticas claramente definidas. Éstas se diferencian molecularmente en alteraciones cromosómicas o mutaciones de genes específicos.

Las alteraciones cromosómicas se detectan en un 15-20% de los sarcomas. Se desarrollan en un estadio muy temprano del proceso tumoral y son causa de algunos procesos que llevarán a la aparición del cáncer. Por otro lado, dentro de las anomalías genéticas que se encuentran en los sarcomas, la más común parece ser la inactivación de p53 (Sainz-Jaspeado, Martin-Liberal et al. 2011).

1.5.1 Rbdomiosarcomas

Rbdomiosarcoma son un tipo de sarcoma de células de músculo esquelético. Representan el sarcoma de tejido blando más común en niños, constituyendo un 4-5% de los tumores pediátricos. Teniendo en cuenta sus características histológicas, existen dos subtipos, rbdomiosarcoma alveolares y embrionales. Los embrionales son mucho más predominantes y tienen un mejor pronóstico. Se desarrollan en zonas del cuello, la cabeza o el tracto genitourinario. Los alveolares ocurren tanto en niños como en adultos y se localizan en las extremidades, lo que conlleva una peor prognosis. El pronóstico de supervivencia de los rbdomiosarcoma alveolares que se tratan es a cinco años. Los rbdomiosarcoma alveolares están asociados a una translocación en el cromosoma 2 y 13, y menos frecuente en el 1 y el 13. Cada translocación conlleva la codificación de las proteínas PAX3/FOXO1 y PAX7/FOXO1, respectivamente.

Ambos tipos presentan marcadores de diferenciación miogénica como MyoD, miogenina o actina, pero no tienen marcadores tardíos de diferenciación y las células no forman miofibrilos (De Giovanni, Landuzzi et al. 2009).

1.5.2 Tratamiento

El primer caso de rbdomiosarcoma fue descrito por Webber en 1854 y era el de un paciente de 21 años de edad con un tumor de la lengua. Durante los primeros años, la cirugía fue el único tratamiento disponible, y la extirpación radical fue la norma. Las tasas de supervivencia eran bajas en general,

excepto en aquellos casos donde la extirpación total era posible. El tratamiento con radioterapia tras una cirugía incompleta se inició en 1950, demostrando una mejoría en los tumores de cabeza y cuello. Y en los años 60, se comenzó la estrategia multimodal para tumores sólidos, incluyendo quimioterapia después de la extirpación quirúrgica completa y radioterapia postoperatoria (Hayes-Jordan and Andrassy 2009). La terapia más común se desarrolla con la combinación de actinomicina-D y ciclofosfamida, como alquilantes del DNA. De hecho el uso de quimioterapia ha ayudado a aumentar la supervivencia, lo que demuestra la importancia de estudiar nuevos fármacos (Dasgupta and Rodeberg 2012; O'Brien, Jacob et al. 2012).

II. Objetivos

Objetivo 1: Caracterización de la muerte celular de diversas líneas tumorales por retirada de glucosa.

- Identificación de los tipos tumorales en que la privación de glucosa induce necrosis y apoptosis
- Averiguar la caspasa iniciadora implicada en la muerte celular por privación de glucosa

Objetivo 2: Estudiar in vitro la muerte celular de líneas tumorales de rhabdomiosarcoma en condiciones de inhibición del metabolismo glicolítico

- Estudio de la de la forma de muerte celular inducida por 2-deoxiglucosa. Determinación de las moléculas implicadas.

Objetivo 3: Estudio de la autofagia como determinante de la muerte por falta de glucosa.

III. Resultados

3.1 Metabolismo de la glucosa

3.1.1 La privación de glucosa puede inducir apoptosis o necrosis dependiendo de la línea celular

Puesto que los tumores presentan una mayor dependencia de la glicólisis anaerobia que los tejidos normales para generar energía de metabolitos, se decidió caracterizar el efecto de la privación de glucosa en diferentes líneas celulares. Está descrito que la inhibición del metabolismo glicolítico a través de la 2-deoxiglucosa, un análogo de la glucosa, generalmente mata a las células por apoptosis y que la privación de glucosa puede llegar a inducir muerte celular por necrosis (Suzuki, Kusakai et al. 2003) (Yuneva, Zamboni et al. 2007) o también por apoptosis a través de la ruta mitocondrial (Vander Heiden, Plas et al. 2001).

Las células cancerosas requieren bloquear la muerte para la oncogénesis y el mantenimiento del fenotipo maligno (Green and Evan 2002). Por lo que muchos tumores sobre-expresan proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 o inhiben la actividad de proteínas proapoptóticas como Bax y Bak.

Bax y Bak son dos moléculas necesarias para la ruta apoptótica mitocondrial. Los fibroblastos murinos embrionarios deficientes en las proteínas proapoptóticas Bax y Bak (DKO) inmortalizados con SV40 son resistentes a muchos estímulos apoptóticos que inducen la vía mitocondrial. Como estas células podrían parecerse en términos de sensibilidad a las células tumorales, empezamos a estudiar la privación de glucosa en estas células.

Cuando privamos de glucosa a las DKO (Fig1A), las células sufren apoptosis. Además el Z-VAD, un inhibidor de caspasas, protege totalmente a las células

de la muerte, tanto en el análisis de subG1 como por incorporación de yoduro de propidio, indicando que mueren de forma dependiente de caspasas. En cambio, en fibroblastos silvestres (MEF WT, Fig 1B), cuando son privados de glucosa, el Q-VD protege de sub-G1 pero no de yoduro de propidio. Es algo que no entendemos, las células parecen estar muriendo por necrosis, mueren de forma independiente de caspasas, porque probablemente no pueden activar caspasas tras un estímulo apoptótico, pero obtenemos un perfil sub-G1. Lo discutiremos más adelante. Tanto las wt como las DKO son líneas celulares de fibroblastos inmortalizados con SV40 (simian virus 40) que codifica el antígeno TSV40. Este antígeno, inhibe al gen supresor de tumores p53, responsable de la parada de ciclo y apoptosis. Podríamos pensar que esto pudiera estar afectando a las células Bax Bak deficientes, y que el que mueran de forma dependiente de caspasas tras privación de glucosa sea solo una característica propia de los fibroblastos inmortalizados con SV-40.

Por ello quisimos ver la muerte inducida por la privación de glucosa en varias líneas celulares.

Figura 1. La privación de glucosa induce muerte apoptótica o necrótica según el tipo celular.

A–B, Los fibroblastos murinos deficientes en Bax y Bak (DKO, A) o fibroblastos murinos silvestres (wt, B) se trataron sin glucosa en presencia de los inhibidores de caspasas, Z-VAD (50 μ M con las DKO) o Q-VD (20 μ M, en las células wt) y DMSO (1:1000) para las muestras control. Las células se recogieron a los tiempos indicados para su análisis por sub-G1 o bien por incorporación de yoduro de propidio (PI). Los datos presentan la media de 2 experimentos.

C, La línea tumoral humana HeLa fue tratada en ausencia de glucosa en presencia de Q-VD o DMSO. Se recogieron a los tiempos indicados y se fijaron para el análisis por citometría. Se representa el porcentaje de células con un tamaño menor que las no tratadas.

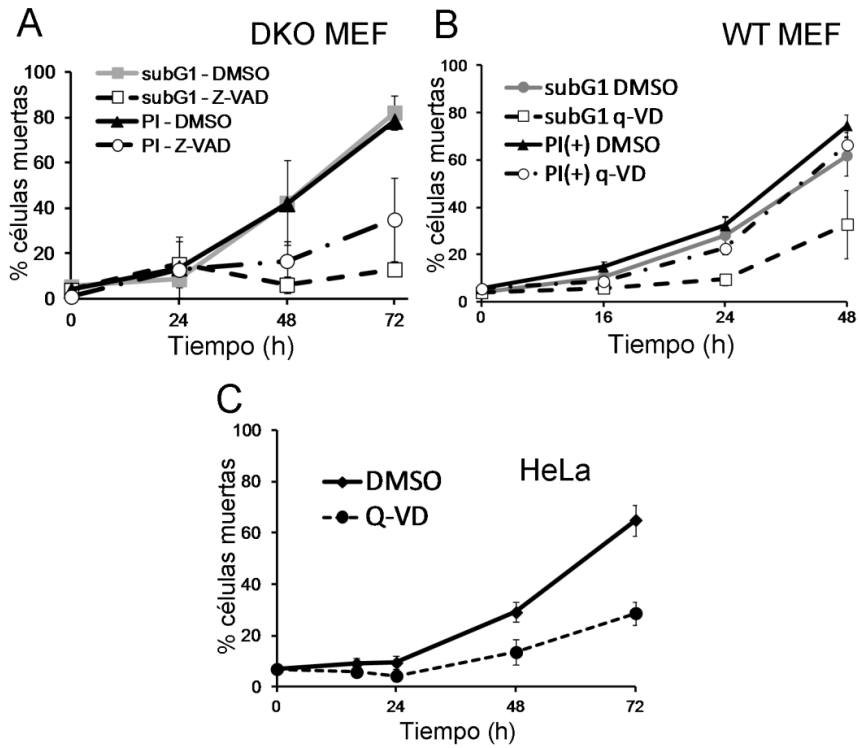
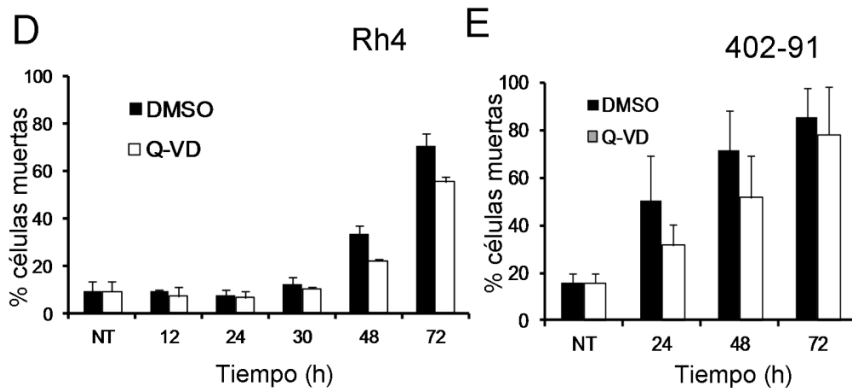
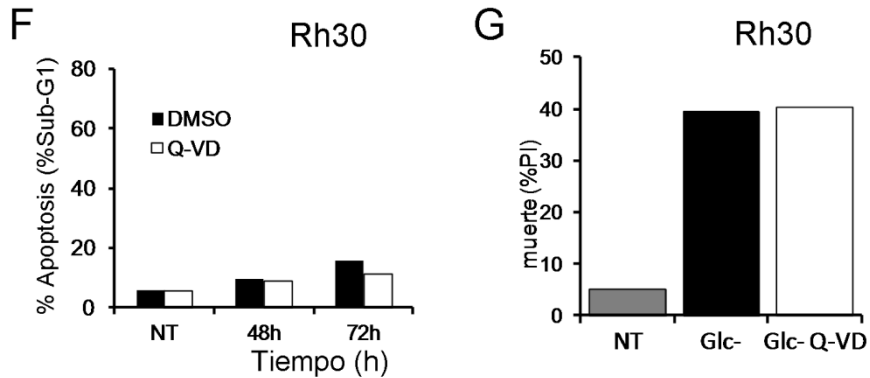


Fig 1 D-G, Las líneas Rh4, 402-91 y Rh30 se trataron en ausencia de glucosa durante los tiempos indicados en presencia o ausencia de Q-VD y DMSO en las muestras controles. Las células se recogieron para su análisis por incorporación de yoduro de propidio (D,E,G) o bien para su análisis por sub-G1 (F). D, se muestra la media de 2 experimentos independientes, E, se muestra la media de 4 experimentos.





Cómo observamos en la figura 1C, en HeLa el Q-VD protege de la muerte inducida por la privación de glucosa. Por lo que mueren de manera dependiente de caspasas, de igual forma que lo hacen los fibroblastos murinos. Uno de los problemas que observamos con las células HeLa, es que no conseguimos detectar sub-G1 en el análisis por citometría. Es posible que no todas las células que morfológicamente están muertas sufren degradación del ADN. Por eso, tuvimos que medir la muerte analizando aquellas células cuyo tamaño era menor que las no tratadas y asegurándonos de que el Q-VD era capaz de prevenir el cambio morfológico.

También privamos de glucosa a las células de liposarcoma mixoide 402-91 (Fig1E), rhabdomyosarcoma alveolar Rh4 (Fig1D) y Rh30 (Fig1E-G). Todas mueren de forma independiente de caspasas a las 24h y 72h. El Q-VD protege ligeramente de la privación de glucosa a las Rh4 y 402-91 o nada a las Rh30. Además, estas últimas no presentan sub-G1 (Fig1F). El porqué unas células mueren por necrosis o por apoptosis tras privarlas de glucosa está aún por descifrar. El estado metabólico previo así como el balance de

proteínas y complejos proapoptóticos y antiapoptóticos, y su localización en la célula determinaría su forma de muerte. Una hipótesis podría ser porque tras privarlas de glucosa se producirían especies pro-oxidantes, ROS, pero bajos niveles de poder reductor NADPH. Si a la vez tuvieran altos niveles de proteínas antiapoptóticas, no podrían permeabilizar la membrana y acabarían muriendo por necrosis. Existen varios estudios que así lo demuestran. Por ejemplo, cuando células de riñón inmortalizadas mediante la expresión constitutiva de Akt, son privadas de glucosa en condiciones de hipoxia, mueren por apoptosis. Sin embargo, cuando son deficientes en Bax y Bak mueren por necrosis (Degenhardt, Mathew et al. 2006). Todo ello sugiere que las células mueren a través de la ruta mitocondrial, pero cuando no pueden permeabilizar las mitocondrias, acaban muriendo por necrosis. Sin embargo tal y como hemos observado, las células DKO mueren de forma dependiente de caspasa al privarlas de glucosa. Por ello quisimos estudiar más a fondo el mecanismo de muerte.

3.1.2 La privación de glucosa induce actividad caspasa en los fibroblastos Bax Bak deficientes

En el capítulo anterior habíamos observado que, tras el tratamiento sin glucosa, el Z-VAD inhibía la muerte en las células DKO. Pudimos observar la protección, tanto por la disminución de células observadas en sub-G1 como por la reducción en la proporción de células positivas para yoduro de propidio. Quisimos determinar actividad caspasa en estas células y utilizamos la técnica de DEVDasa. Tal y como explicamos en el apartado de Materiales y métodos, utilizamos un substrato de caspasas, el DEVD, que al ser cortado por éstas, emite fluorescencia. Se puede observar en figura 2, que las DKO

tienen actividad caspasa tras tratarlas sin glucosa. La máxima actividad se presenta a las 48 horas, coincidiendo con el tiempo en el que observamos mayor pico sub-G1.

Quisimos analizar la actividad caspasa también por western blot. Las caspasas, con actividad proteasa tienen afinidad por diferentes sustratos, como por ejemplo PARP. Al tratar las células DKO sin glucosa, observamos el corte de estos sustratos y que el Z-VAD es capaz de retrasar o de inhibir en su totalidad el corte. Además observamos la degradación de la procaspasa-3 tras la privación de glucosa y que el Z-VAD es capaz de retrasar el corte.

Figura 2. La privación de glucosa induce actividad caspasa en las células deficientes en bax bak .

A, Las células DKO fueron tratadas sin glucosa en presencia o ausencia de Q-VD a los tiempos indicados. Los lisados celulares fueron incubados con el sustrato de caspasas AC-DEVD-amc (Pharmingen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados muestran la media y SEM de 3 experimentos. Los valores de fluorescencia, corresponden a unidades arbitrarias y se dividen por los valores de fluorescencia de las muestras no tratadas.

A

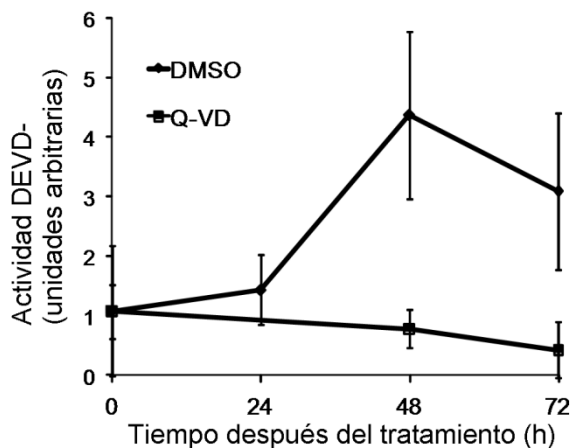
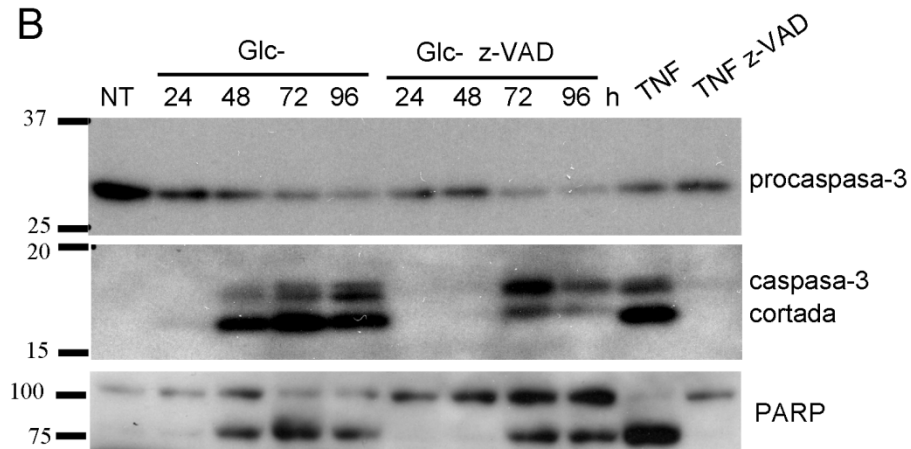


Fig2 B, DKO fueron tratadas hasta 96 horas sin glucosa, en presencia o ausencia de Z-VAD. Una muestra fue tratada con TNF 1ng/ml y CHX 5µM durante 24h, como control positivo de apoptosis, en ausencia o presencia de Z-VAD. Los lisados celulares de células DKO se prepararon como se describe en Materiales y métodos y se realizó un western blot para las proteínas indicadas.



3.1.3 La caspasa iniciadora de la apoptosis en DKO, inducida por privación de glucosa es la caspasa-8

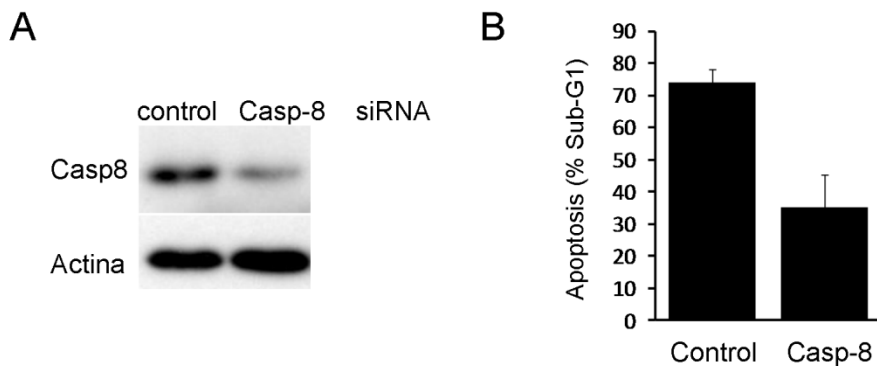
Antecedentes en el grupo demostraron que la vía mitocondrial no estaba implicada en la muerte por privación de glucosa en las DKO (Caro-Maldonado, Tait et al. 2010) y que la caspasa-9 no estaba implicada en la apoptosis. También, se demostró que células DKO transfectadas con CrmA, una proteína del virus de la viruela bovina que inhibe selectivamente a la caspasa-8 y 1, estaban protegidas tras la retirada de glucosa. Puesto que la caspasa-1 posee un papel más focalizado en respuesta inmunológica, nos centramos en determinar si era la caspasa-8, la caspasa iniciadora por la respuesta inducida tras la privación de glucosa.

Para ello transfectamos las células DKO con oligonucleótidos siRNA contra caspasa-8 y un control en paralelo. La disminución en los niveles de caspasa-8 protegió de la privación de glucosa, confirmando que esta caspasa está relacionada con la muerte apoptótica inducida por la privación de glucosa en las células (fig 3).

Además, en el grupo se realizaron líneas estables con shRNA para caspasa-8 y éstas también estaban protegidas tanto de TNF como de la privación de glucosa (Caro-Maldonado, A).

Fig 3. El silenciamiento temporal de los niveles de caspasa 8 en células DKO, protege de la muerte inducida por privación de glucosa.

A-B, Células DKO fueron transfectadas con un oligonucleótido control o siRNA contra caspasa-8. Después de 48horas de la transfección, se recogió proteína para el western blot (**A**) o se trataron en ausencia de glucosa durante 72 horas más. Después se recogieron para su análisis por sub-G1 (**B**). La figura muestra la media y SEM de 3 experimentos independientes. Adaptado(Caro-Maldonado, Tait et al. 2010).



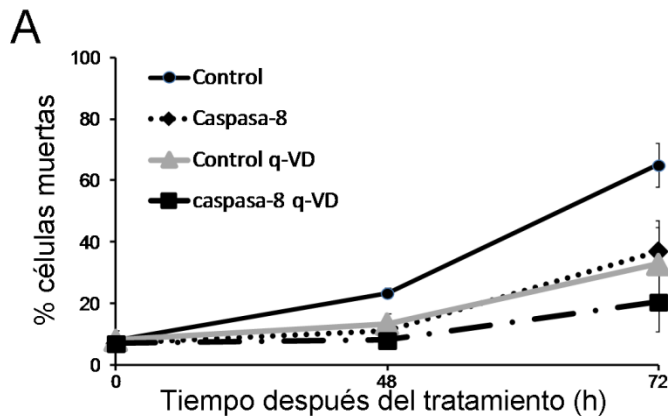
Aún así quisimos estar seguros de que los resultados observados en los fibroblastos murinos deficientes en Bax y Bak no eran una característica específica de estas células.

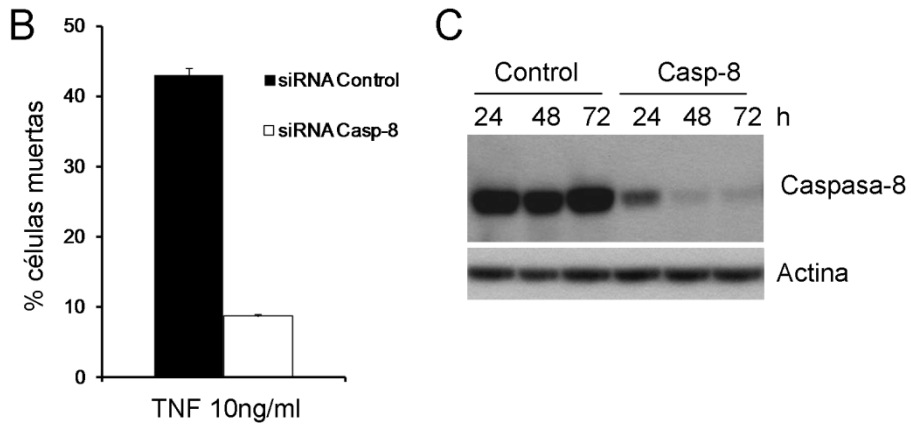
Para ello transfectamos células humanas HeLa con el siRNA para caspasa-8 humana (Fig 4A y B). Después de 72 horas tras la transfección, tratamos a las células con medio sin glucosa y analizamos la muerte celular. Las HeLa que han sido transfectadas con el siRNA para caspasa-8 estaban protegidas tanto del tratamiento de TNF como de la privación de glucosa.

Fig 4. La bajada de los niveles de caspasa-8 en células HeLa protege de la muerte apoptótica inducida después de la privación de glucosa.

A, Células HeLa fueron transfectadas con el siRNA control o contra caspasa 8 durante 72 horas. Después se privaron de glucosa en presencia o ausencia de Q-VD y se analizaron por citometría a los tiempos indicados. Una muestra como control positivo fue tratada durante 24 horas con TNF 10ng/ml y CHX 5 μ M (**B**)

C, Se muestra el western blot con la cinética de silenciamiento del siRNA de caspasa 8, comparado con el control en estas células. Adaptado (Caro-Maldonado, Tait et al. 2010)





Todos estos resultados indicaban que la muerte apoptótica inducida por la privación de glucosa en las DKO y en las HeLa se produce a través de la caspasa-8, como caspasa iniciadora.

3.2 La 2-deoxiglucosa como inhibidor del metabolismo glicolítico

3.2.1 Las células de rabdomiosarcoma alveolares son sensibles a la 2-deoxiglucosa

Nuestros resultados mostraban que la inhibición de la glicolisis puede ser eficaz frente a células tumorales muy resistentes a otros tratamientos. Puesto que no es posible privar de glucosa a un paciente, quisimos analizar el efecto de la 2-DG, como inhibidor de la glicólisis, en células de rabdomiosarcoma in vitro. Estos tumores están poco estudiados y la quimioterapia no es del todo eficiente. Por ello es importante estudiar otras terapias más eficaces.

Existen diferentes trabajos que estudian los efectos inhibitorios de la 2-DG en células cancerígenas. Por ejemplo, sabemos que disminuye el crecimiento

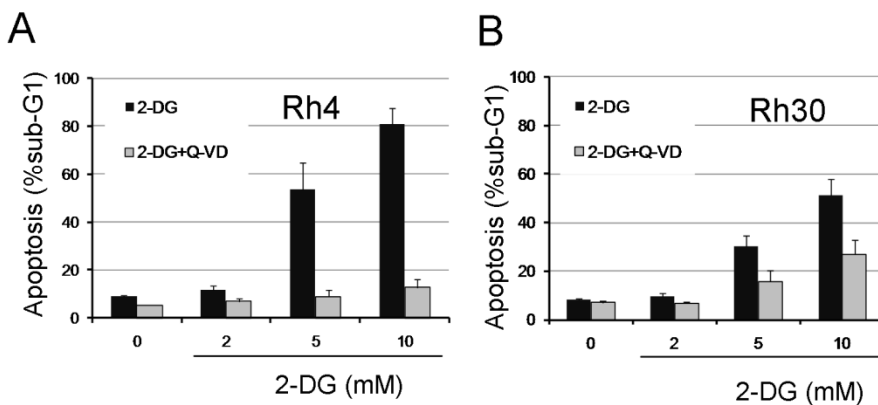
celular, inhibiendo la proliferación celular, para el ciclo celular o promueve muerte celular (Zhang, Deslandes et al. 2006).

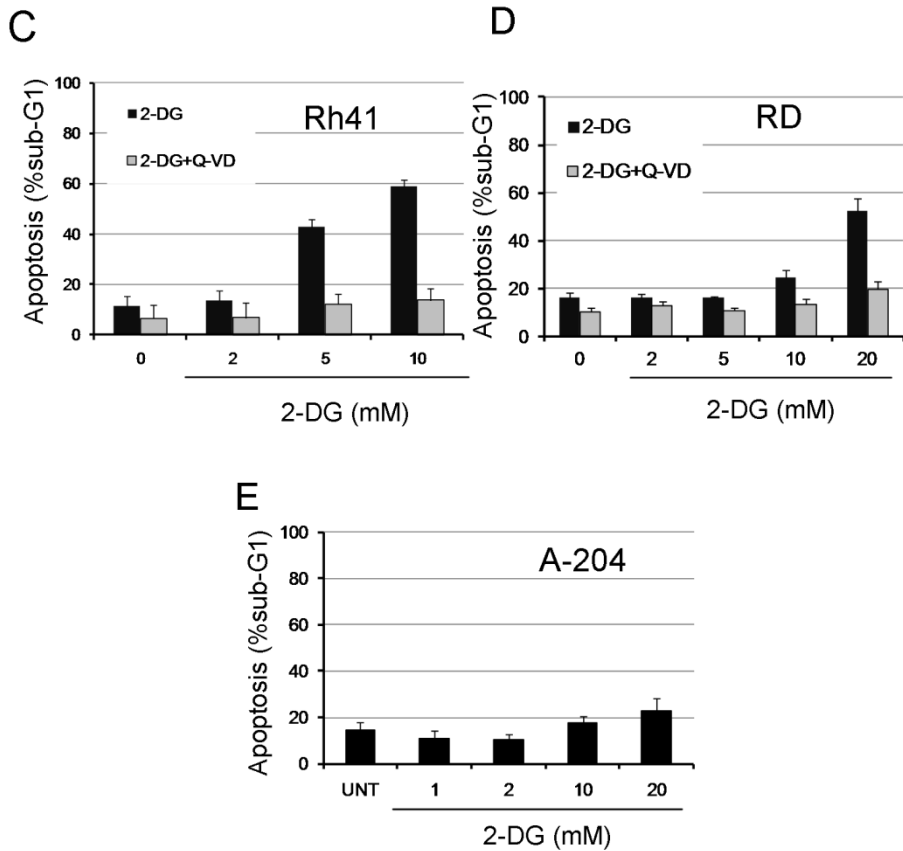
Hemos observado anteriormente (Fig 1D, F, G) que la privación de glucosa en células de rbdomiosarcoma induce necrosis. Así que quisimos estudiar los efectos de la 2-DG en líneas celulares de rbdomiosarcoma alveolar y embrional.

En la figura 5, se observan diferentes líneas de rbdomiosarcoma alveolar y embrional que han sido tratadas con 2-DG a diferentes dosis entre 2mM y 20 mM.

Figura 5. Las células de rbdomiosarcoma alveolar son sensibles a la 2-DG.

Células Rh4 (A), Rh30 (B), Rh41 (C), RD (D) y A204 (E) fueron tratadas a las dosis indicadas con 2-DG en presencia de 20 μ M de Q-VD o DMSO. Después de 72h de tratamiento, se fijaron y se analizó sub-G1 por citometría. El control se sembró a la mitad de células para evitar el sobre-crecimiento en placa. UNT: no tratadas





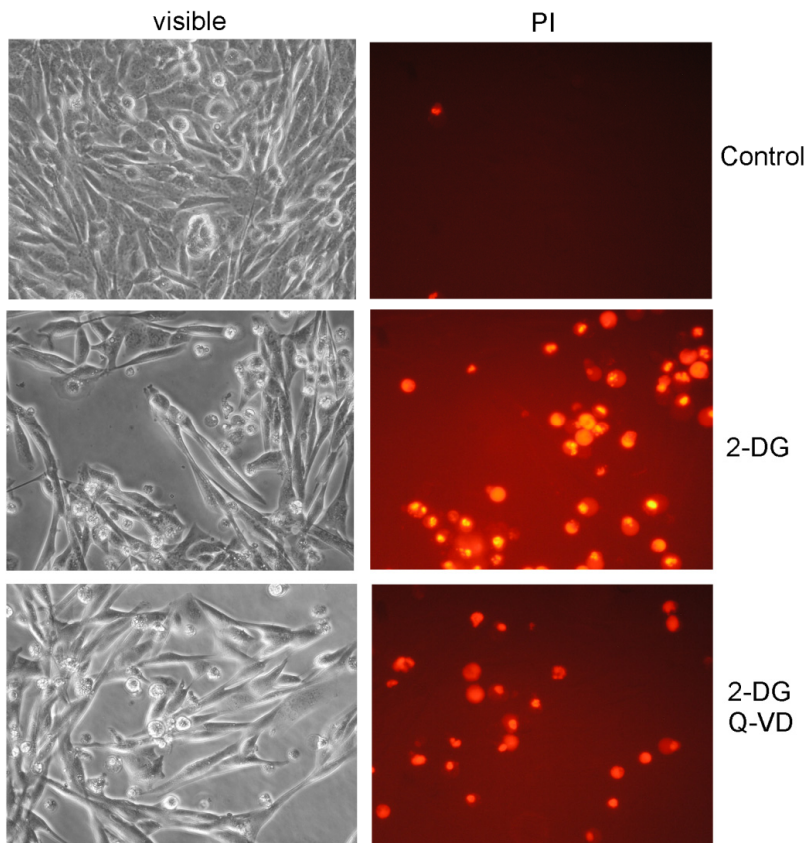
La droga inhibe el crecimiento en todas las líneas de rbdomiosarcoma alveolar, siendo Rh4 la línea que más respuesta presenta al tratamiento.

Observamos muerte incluso cuando tenemos grandes cantidades de glucosa en el medio (25 mM), indicando que las Rh4 son las más sensibles a la 2-DG. Si comparamos las cinéticas de muerte de las 4 líneas de rbdomiosarcoma alveolar, Rh4, Rh30 y Rh41, en todas ellas, observamos que tenemos muerte a partir de 5 mM de 2-DG. Estas células sufren apoptosis después del tratamiento con 2-DG, puesto que el ADN se degrada y las células presentan sub-G1 tras el análisis en el citómetro. Igualmente, en presencia de Q-VD, las

células están protegidas de la 2-DG. Indicando que mueren de manera dependiente de caspasas.

En la figura 6, se muestran imágenes de células de rbdomiosarcoma alveolar, Rh30, tratadas con 2-DG e incorporación de yoduro de propidio. Claramente se observa que el Q-VD protege de la muerte inducida por 2-deoxiglucosa, aunque la protección es más obvia en las Rh4 y Rh41.

Figura 6. Las células de rbdomiosarcoma alveolar son sensibles a la 2-DG (Línea Rh30). Las células fueron tratadas con 10mM de 2-DG en presencia de 20 μ M de Q-VD o DMSO. Después de 72h de tratamiento, se realizó un marcaje con yoduro de propidio (PI) 0,5 μ g/ml para determinar la muerte celular. Se tomaron imágenes al microscopio de fluorescencia con un objetivo de 20X. Las células control fueron sembradas a la mitad para evitar el sobre-crecimiento en placa.

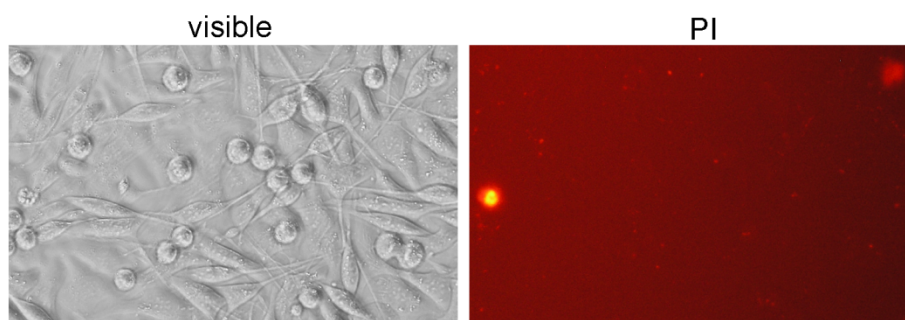


En comparación con los rhabdomyosarcoma alveolares, los embrionales tienen un mejor pronóstico de cara al tratamiento en pacientes. Nosotros observamos que las líneas celulares de RD y A-204 son mucho más resistentes que las células alveolares de rhabdomyosarcoma. Tal y como se observa en la figura 5D, únicamente la línea celular RD presenta muerte a altas dosis de 2-DG, 20 mM de 2-DG, casi equimolar con las dosis de glucosa que hay en el medio. Pero el Q-VD no es capaz de revertir esta muerte.

Curiosamente, la línea A-204 es prácticamente resistente a las dosis utilizadas de 2-DG, tal y como se observa en la figura de análisis de la muerte celular en el citómetro (fig 5E) o tras el marcaje con yoduro de propidio (fig 7). Sin embargo, el tratamiento a altas dosis inhibió la proliferación. En este caso, quisimos saber si la parada del crecimiento celular era irreversible. Para ello, después de 72 horas del tratamiento con 2-DG, le cambiamos el medio a las células y las cultivamos en ausencia de la droga.

Figura 7. Las células de rhabdomyosarcoma embrional son resistentes a la 2-DG (Línea A204).

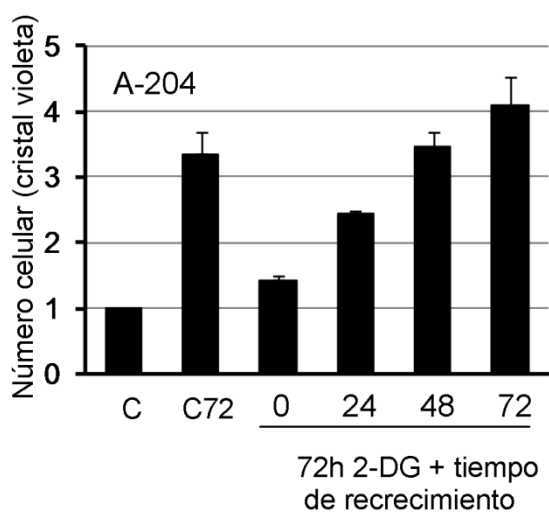
Las células fueron tratadas con 20mM de 2-DG. Después de 72h de tratamiento, se realizó un marcaje con yoduro de propidio (PI) a 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para determinar la muerte celular. Se tomaron imágenes al microscopio de fluorescencia con un objetivo de 20X.



En la figura 8, se observa que la parada de la proliferación es reversible, ya que las células empezaron a crecer inmediatamente después de sacar la droga. Estos resultados indicarían la resistencia al tratamiento con 2-deoxiglucosa en las células A-204.

Figura 8. La 2-DG no impide que las células A-204 continúen proliferando.

24 horas después de sembrar las células A-204, uno de los pocillos fue teñido con cristal violeta (C, control) y el resto creció en ausencia (C72) o presencia de 20 mM de 2-DG durante 72h. Las células fueron lavadas e incubadas con medio fresco a los tiempos indicados. Las células adheridas fueron teñidas con cristal violeta al 0.2% con 2% de etanol durante 20 minutos y solubilizadas en un 10% de SDS. La absorbancia fue medida a 595nm.



3.2.2 El factor inducible de hipoxia (HIF-1) no es el responsable de la resistencia a la 2-DG en células de rhabdomiocarcinoma embrionario

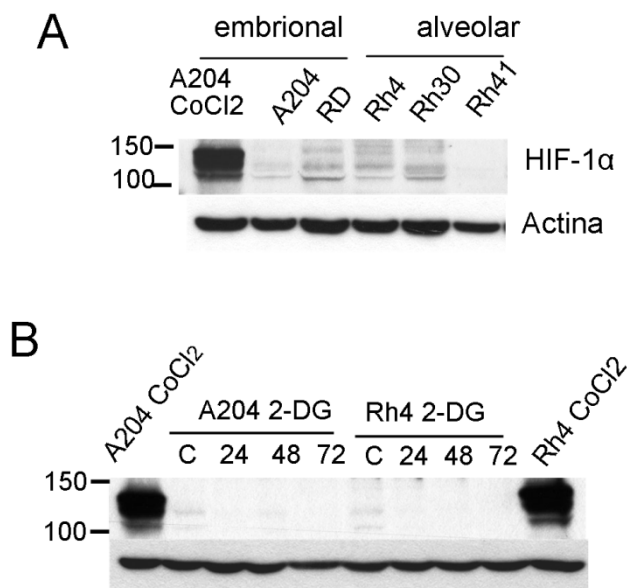
El oxígeno es necesario para la producción de ATP por OXPHOS, pero en condiciones de hipoxia, las células suelen hacer más glicólisis para sintetizarlo. Esta dependencia en la glicólisis las hace más sensibles a la 2-deoxiglucosa. Generalmente, la manera de responder a condiciones bajas de oxígeno es sobre-expresando el factor HIF, que a su vez aumenta enzimas glicolíticas y transportadores de glucosa (Johnson and Perkins 2012). Así pues, cabe la posibilidad en nuestro sistema que los niveles de expresión de HIF1- α sean diferentes en las células embrionales que en las alveolares y que esto regule la captación y toxicidad de la 2-DG.

Por este motivo, para comprobarlo, analizamos la expresión de los niveles de HIF en las 5 líneas de rhabdomiocarcinoma estudiadas. Como se observa en la figura 9A, no pudimos detectar esta proteína en células sin tratar en ninguna de las líneas celulares. A pesar de ello, para descartar que HIF fuera responsable del fenotipo diferente en alveolares y embrionales, silenciamos la proteína HIF mediante dos secuencias de siRNA de HIF tanto en células Rh4 de (fig 9B y C), como en células A204 (fig 9B y D). Los resultados de la figura 9C indican que el silenciamiento de HIF en las Rh4 sensibiliza ligeramente a la muerte inducida por 2-DG a las 48 horas. Mientras que en las A204, tal y como se observa en las imágenes, no hay diferencias con ninguna de las secuencias del siRNA de HIF probadas.

Figura 9. La expresión de HIF-1 α no explica la sensibilidad diferente a la 2-DG entre células alveolares y embrionales.

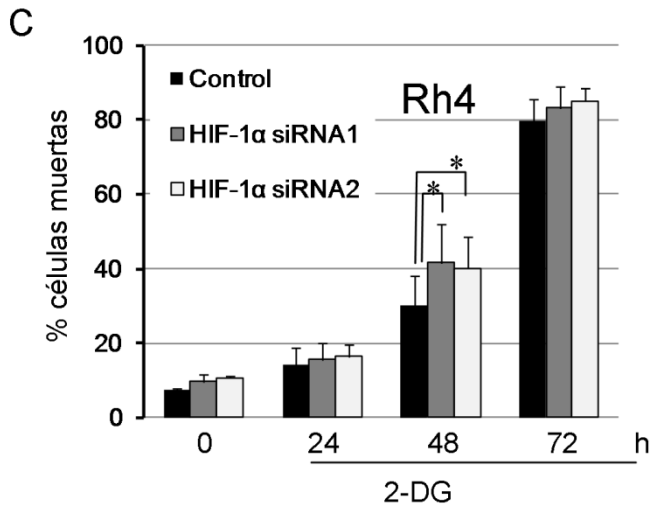
A, Las líneas celulares indicadas fueron analizadas para la expresión de HIF-1 α . Utilizamos células A204 como control positivo tratadas con CoCl₂ 200 μ M durante 4 horas.

B, A204 y Rh4 fueron tratadas con CoCl₂ 200 μ M durante 4 horas o con 10mM de 2-DG a los tiempos indicados y recogidas para el análisis de la expresión de HIF-1 α por western blot.



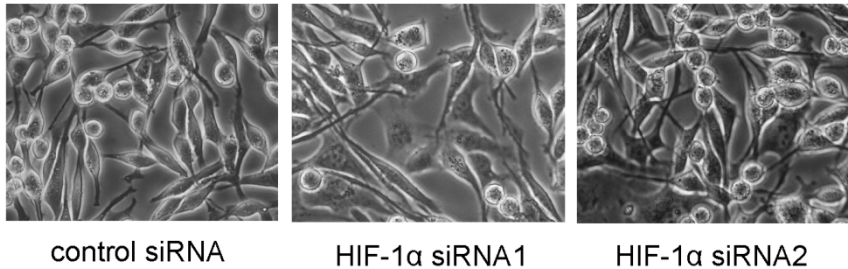
C, Las células Rh4 fueron transfectadas con el control o el siRNA de HIF-1 α . Después de 72h, fueron tratadas con 2-DG 10mM a los tiempos indicados y recogidas para el análisis de subG1. El test t-student test pareado indica que el siRNA contra HIF-1 α produce una pequeña sensibilización significativa a la 2-DG a 48h ($p=0.049$, $n=4$ experimentos)

D, Las A204 no son sensibles a la 2-DG tras el pretratamiento con siRNAs contra HIF-1 α . Los mismos resultados se obtuvieron en el análisis para subG1 de células tratadas con siRNA tras 48h y 72h.



D

A204 (embrional) 72h 2-DG



3.2.3 La 2-deoxiglucosa induce diferenciación en las células de rabdomyosarcoma alveolar Rh4 y Rh30.

Puesto que las células diferenciadas dejan de proliferar, uno de los puntos clave en la terapia es promover la diferenciación de las células de rabdomyosarcoma. Después del tratamiento con 2-DG, observamos que las células Rh4 y Rh30 de rabdomyosarcoma alveolar, presentaban fusiones entre ellas, características de la formación de miotubos y diferenciación

terminal (fig 10A). El western blot indicaba que la 2-DG induce una bajada de la proteína de fusión PAX3/FOXO1 α que mantiene el estado desdiferenciado en estas células (Kikuchi, Tsuchiya et al. 2008). El efecto fue bastante más pronunciado cuando las células se cultivaron con medio de diferenciación (sin suero, DM)(fig10B). Además, no fue inhibido por el Q-VD, indicando que el proceso de diferenciación no es consecuencia de la actividad caspasa.

Fig 10. La 2-DG promueve diferenciación en células de rhabdomyosarcoma alveolar.

A, Un total de 4×10^5 de células Rh4 o 1.8×10^5 células de Rh30 fueron sembradas en placas de 6 pocillos tratadas con 10mM de 2-DG en presencia de $20 \mu\text{M}$ Q-VD con medio completo (RPMI + 10%FBS) o medio de diferenciación (DM, RPMI sin suero) durante 48h. Se muestran imágenes de microscopio de contraste de fase. Las flechas señalan células fusionadas con una morfología típica de microtúbulo.

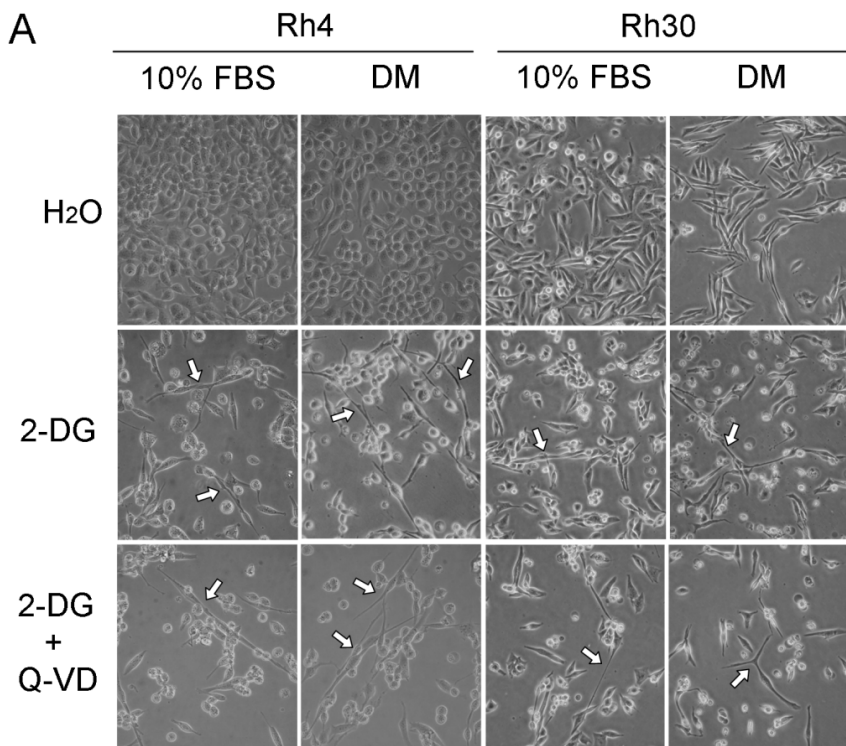
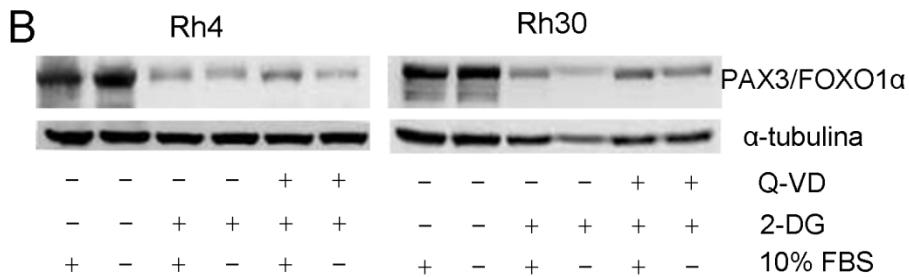


Fig 10 B, Los western blots muestran unos niveles reducidos de PAX3/FOXO1 α en Rh4 y Rh30 en presencia de 2-DG durante 72 o 55h respectivamente. Los lisados celulares se hicieron con RIPA para el análisis de expresión con el anticuerpo de FOXO-1.



3.2.4 La 2-dg induce muerte celular apoptótica en las Rh4

Como hemos comentado en el capítulo anterior, la inhibición del metabolismo de la glucosa puede inducir muerte celular necrótica o apoptótica, dependiendo del tipo celular (Caro-Maldonado A, Munoz-Pinedo C, 2011).

Habíamos observado en la figura 5 que la 2-DG induce apoptosis en las células de rhabdomyosarcoma alveolar ya que el inhibidor de caspasas Q-VD inhibía tanto la producción del pico hipodiploide sub-G1, como las células que eran positivas para yoduro de propidio. Para poder demostrar que efectivamente se produce apoptosis, quisimos verificar la actividad caspasa por western blot.

Las caspasas, al ser proteasas, cuando están activas cortan diferentes proteínas substrato y tanto la consecuencia de las primeras, como de las segundas puede ser analizada por "western blot". Nosotros no pudimos detectar el fragmento cortado de la caspasa-3 tras el tratamiento. Pero la 2-DG promueve el corte del substrato de caspasas PARP y el Q-VD es capaz de inhibir el corte (fig 11A). Además, la 2-DG induce actividad caspasa medida

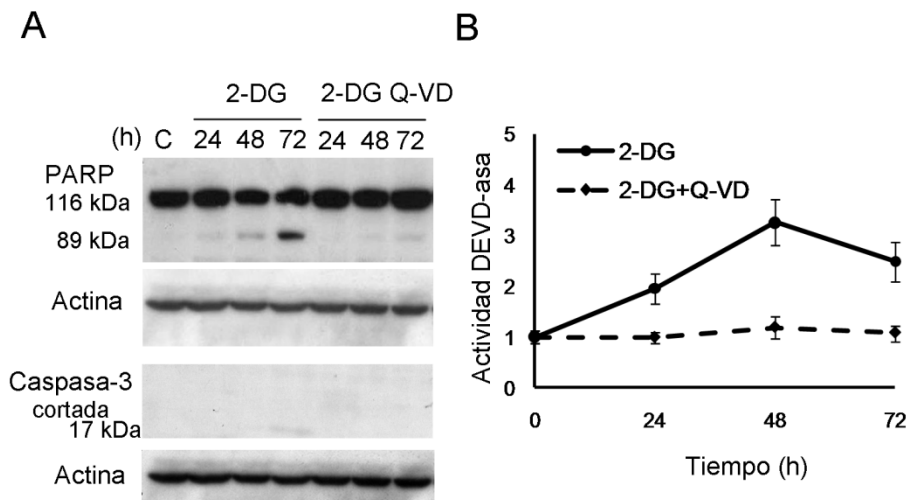
por el corte del sustrato peptídico que emite fluorescencia. Pudimos observar que la máxima actividad de caspasa se produce a las 48 horas, y que el Q-VD es capaz de revertir esta actividad (fig 11B).

Fig 11. La 2-DG promueve apoptosis en las células Rh4.

Las Rh4 fueron cultivadas a los tiempos indicados con 10mM de 2-DG en presencia o ausencia de Q-VD o DMSO.

A, Los lisados celulares fueron preparados con tampón de lisis y las proteínas se resolvieron por western blot.

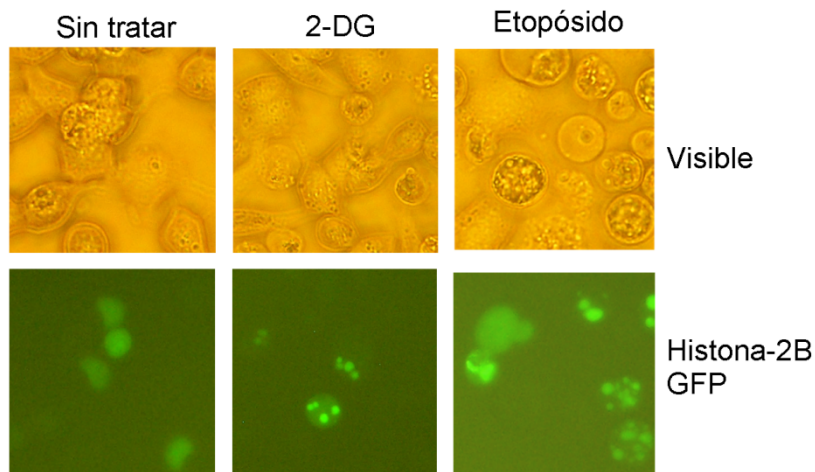
B, Los lisados fueron incubados con el sustrato AC-DEVD-amc (Pharmingen) según las instrucciones del fabricante. Se muestra la media y SEM de 3 experimentos. Los valores de fluorescencia (unidades arbitrarias) fueron normalizados por los valores de fluorescencia de las células no tratadas.



También estudiamos la morfología nuclear en las células Rh4. Transfectamos las células con un plásmido que expresa histona-2B unida a GFP y tras tratar con 2-deoxiglucosa las observamos en el microscopio de epifluorescencia. Utilizamos etopósido como un inductor de apoptosis en estas células. Pudimos observar que la 2-DG induce una clásica condensación y fragmentación cromatínica (fig 12).

Fig 12. La 2-DG induce condensación clásica de la cromatina en Rh4.

Las Rh4 fueron transfectadas con 2 μ g de un plásmido que contiene histona-2B GFP fluorescente con lipofectamina durante 24h. Después fueron cultivadas con medio normal, 10mM de 2-DG o 10 μ M de etopósido durante 48horas. Se muestran imágenes con microscopio de fluorescencia a 40 aumentos.



3.2.5 La apoptosis inducida por la 2-DG en las Rh4 se produce a través de la ruta mitocondrial

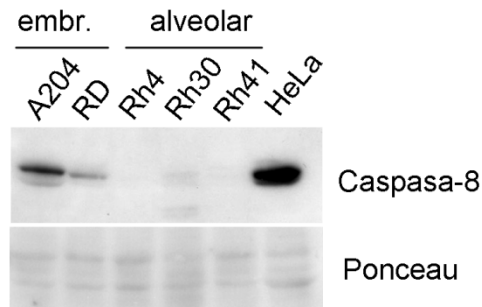
Existen varios estudios que indican que la muerte inducida por privación de nutrientes, y principalmente la privación de glucosa, induce apoptosis por la vía mitocondrial en diferentes tipos celulares. Por ejemplo, en células hematopoyéticas linfocíticas FL5.12, los bajos niveles de glucosa inducen la translocación de Bax a la mitocondria con la consecuente liberación de citocromo c. Otro ejemplo sería que la sobreexpresión de genes antiapoptóticos como Bcl-2 protegen de la muerte apoptótica por privación de glucosa a células de cáncer de mama MCF7 (Lee, Galoforo et al. 1997), (Vander Heiden MG, Plas DR et al, 2001). Pero tal y como observamos en el

capítulo 1, la privación de glucosa induce apoptosis a través de la caspasa-8 y no requiere que la vía mitocondrial esté funcionando en fibroblastos murinos deficientes en Bax y Bak.

La caspasa-8 está también implicada en la muerte por privación de glucosa en células HeLa. Puesto que estas células pueden morir a través de la vía mitocondrial, podría ser que la caspasa-8 estuviera mediando la muerte, induciendo el corte directo de caspasa-3 o bien el corte de la proteína BH3-only, Bid, que puede activar a su vez a las proapoptóticas Bax y Bak en la mitocondria. La caspasa-8 también está implicada en la muerte de las células deficientes en Bax y Bak. Por ello, quisimos saber si las células de rdbomiosarcoma morían de forma dependiente de la caspasa-8 y en primer lugar determinamos si expresaban la caspasa-8. Tal y como se ve en la figura 13, las células de rdbomiosarcoma alveolar estudiadas, y sobretodo Rh4, que es la más sensible a la 2-DG, no presentan niveles detectables de caspasa-8.

Fig 13. Las células de rdbomiosarcoma expresan bajos niveles de caspasa-8.

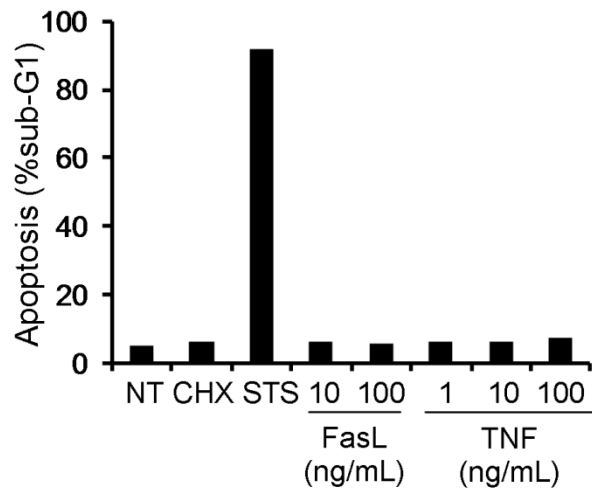
Los extractos de lisados de células embrionales (embr.) o alveolares fueron analizados para la expresión de caspasa-8 por western blot. HeLa fue utilizada como control positivo de expresión de caspasa-8.



A pesar de no detectar expresión de caspasa-8 en las Rh4 sin tratar, quisimos descartar totalmente la implicación de la ruta extrínseca de la apoptosis en la muerte por 2-DG y tratamos las células Rh4 durante 20 horas con los ligandos de muerte FasL y TNF para asegurarnos de que no había activación, utilizando como control positivo la estaurosporina. Como vemos en la figura 14, no observamos muerte a diferentes dosis utilizadas.

Fig 14. Las células Rh4 no mueren a través de la ruta extrínseca.

Las células fueron preincubadas durante 30 minutos con 5 μ M de cicloheximida (CHX) en presencia del ligandos de Fas y TNF a las concentraciones indicadas durante 48 horas. Se trató una muestra con estaurosporina (STS) 1 μ M como control de apoptosis. Después, se recogieron las células y se analizó la muerte por citometría.

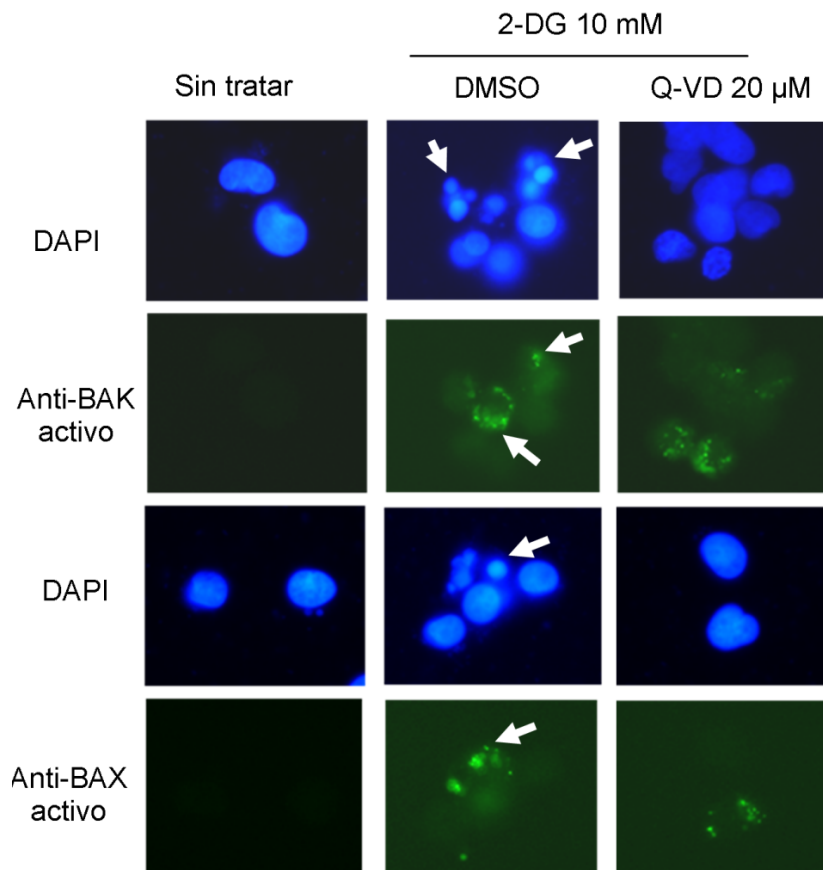


Además, quisimos analizar la ruta mitocondrial detectando las formas activas de Bax y Bak en la mitocondria utilizando inmunofluorescencia. Para ello tratamos las células Rh4 durante 48 horas con 2-DG, en presencia o ausencia de Q-VD (Fig 15). Utilizamos anticuerpos de Bax y Bak que únicamente detectan la forma activa de estas proteínas. Como observamos en la figura 15, la 2-DG promueve la activación de Bax y Bak incluso cuando

las células son tratadas con Q-VD. El Q-VD, únicamente es capaz de inhibir la condensación de cromatina, indicando que la activación de Bax y Bak no es una consecuencia de la actividad caspasa.

Fig 15. La 2-DG activa a Bax y Bak en las células Rh4

Detección de Bax y Bak activo y condensación de la cromatina. Las células fueron no tratadas (panel izquierdo) o tratadas con 2-DG (panel derecho) en presencia o ausencia de Q-VD durante 48 horas. DAPI, 40,6-diamidino-2-fenilindol; DMSO, dimetil sulfoxido. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio de fluorescencia a 40X de aumentos.



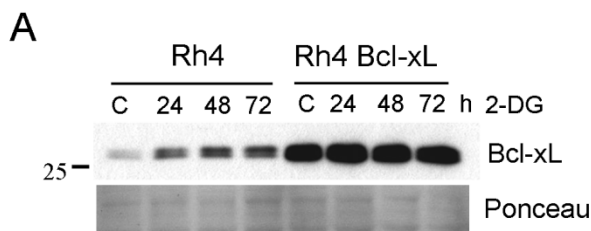
3.2.5.1 La sobre-expresión de Bcl-xL y Mcl-1 en Rh4 protege a las Rh4 de la 2-DG

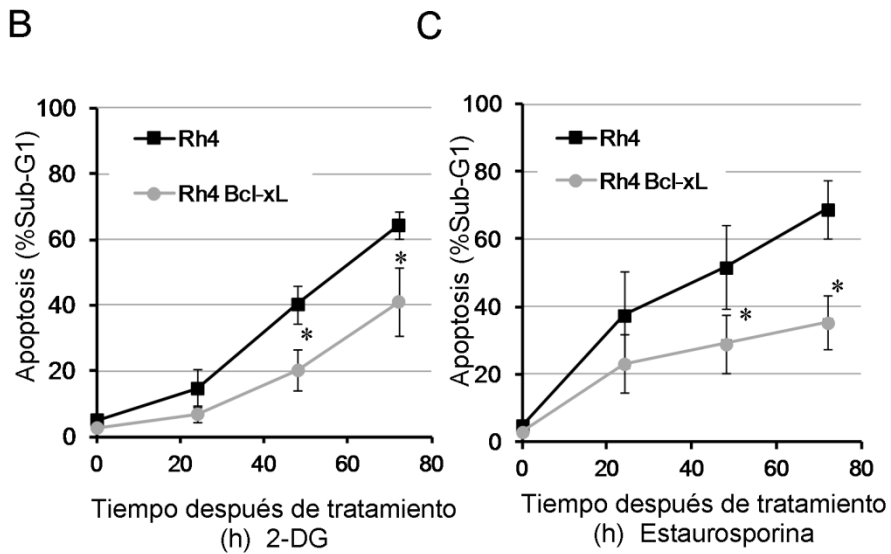
Con el fin de seguir demostrando que la vía intrínseca mitocondrial es la responsable, nos centramos en el papel de las proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2: Bcl-xL y Mcl-1. Estas proteínas poseen dominios BH3 que les permiten unirse a otras proteínas Bcl-2, como por ejemplo a Bax y Bak, impidiendo su activación y polimerización en la membrana mitocondrial externa.

Primero estudiamos la implicación de Bcl-xL en la muerte tras el tratamiento con la 2-deoxiglucosa. Para ello, las células Rh4 fueron transfectadas con un plásmido portando Bcl-xL. Después de seleccionarlas con el antibiótico para generar estables, las células fueron tratadas con 2-DG o bien con estaurosporina, como inductor de apoptosis. Tal y como se observa en la figura 16, las células que sobre-expresan Bcl-xL están protegidas de la muerte inducida tanto por 2-DG como por estaurosporina, indicando la implicación de la ruta mitocondrial en la muerte por 2-DG.

Fig 16. Las células que sobre-expresan establemente Bcl-xL están protegidas de la muerte inducida por 2-DG.

Células procedentes de la línea parental y Rh4 que expresan establemente Bcl-xL fueron analizadas por western blot (A) o cultivadas con 2-DG a 10mM (B) o estaurosporina 300nM (C) y recogidas a los tiempos indicados para el análisis de la muerte por sub-G1. Los resultados muestran una media y SEM de 5 experimentos.



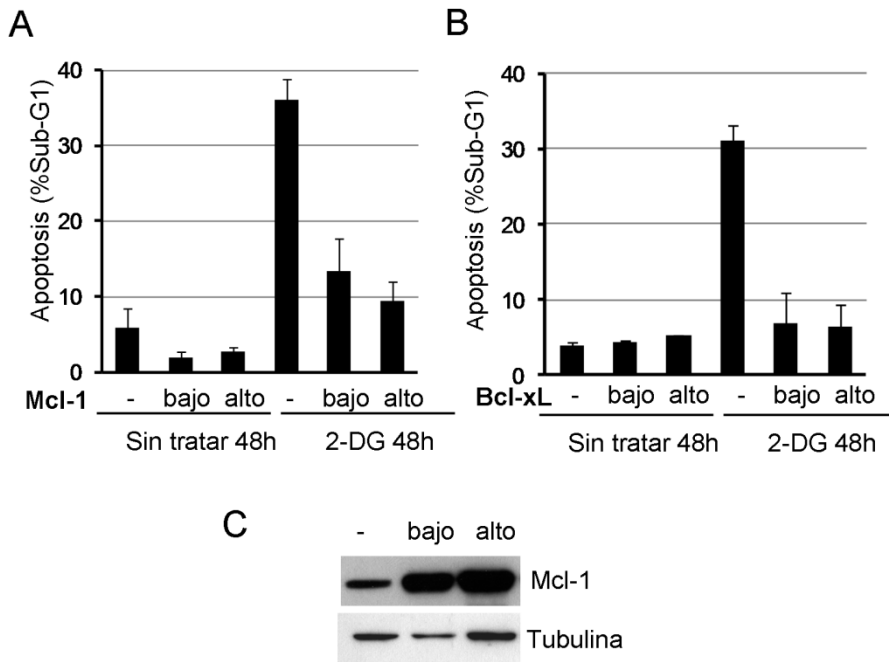


Además, quisimos asegurarnos de la implicación de Bcl-xL y Mcl-1 en la muerte por 2-DG. Las células Rh4 (Fig 17 A-C), fueron transfectadas con un plásmido que expresa GFP fluorescente y con dos concentraciones diferentes del vector que codifica para Mcl-1 y Bcl-xL. Como control negativo transfectamos con el vector vacío hasta igualar la concentración final de ADN total en las diferentes condiciones. El análisis de Sub-G1 de células GFP positivas, reveló que la sobre-expresión de Bcl-xL y de Mcl-1 protegía de la muerte inducida por la 2-DG.

Fig 17. Las células que sobre-expresan Mcl-1 y Bcl-xL están protegidas de la muerte inducida por 2-DG.

A-B, Rh4 fueron transfectadas con 2.5 mg del vector que codifica para la proteína de membrana GFP o con el vector vacío (-), 2.5mg (bajo) o 7.5 mg (alto) del vector que codifica para Mcl-1 (A) o Bcl-xL (B). El vector vacío corresponde a 10 mg del total de ADN. Después de 2 horas, las células se tripsinizaron y se sembraron de nuevo. Quince horas más tarde, se puso medio fresco y se dejaron sin tratar o se trataron con 10 mM de 2-DG durante 48 horas. Se muestra el análisis de sub-G1 de las células GFP positivas que corresponden a un 10-15%.

C, Se muestra el western blot de la sobre-expresión de Mcl-1 tras 24 horas de transfección.



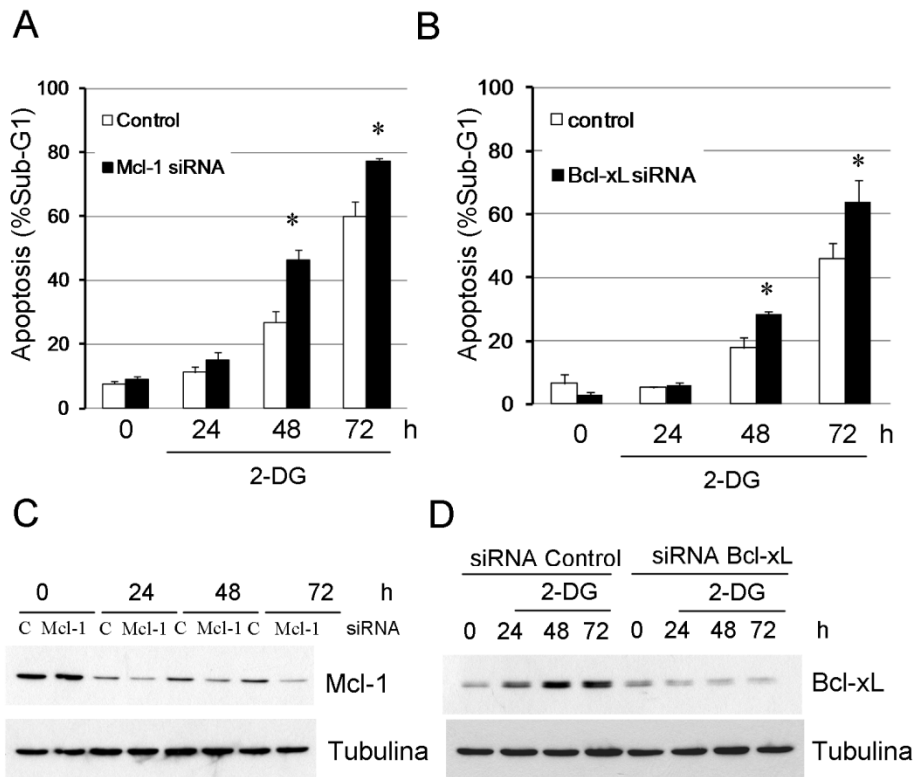
3.2.5.2 La reducción de los niveles de Mcl-1 y Bcl-xL en Rh4 sensibiliza a la muerte por 2-DG

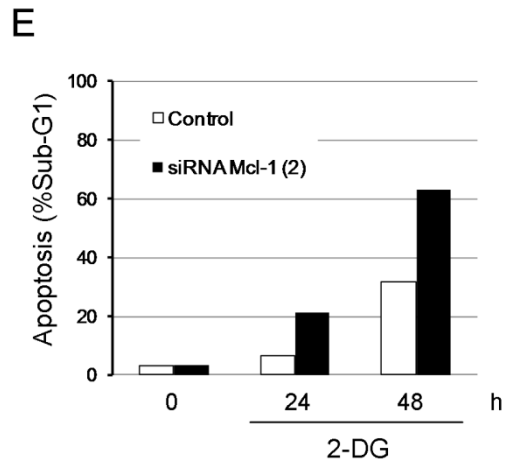
Con el fin de seguir corroborando la ruta mitocondrial y los resultados que teníamos sobre el papel de las proteínas Bcl-xL y Mcl-1 en la muerte mitocondrial inducida por 2-DG, silenciamos dichas proteínas mediante siRNA. En la misma tónica de lo que encontramos en los experimentos de sobre-expresión, la bajada de la expresión de dichas proteínas sensibiliza a las células Rh4 al tratamiento con 2-DG.

Fig 18. La reducción de los niveles de Mcl-1 y Bcl-xL en Rh4 sensibiliza al tratamiento por 2-DG.

Las células Rh4 fueron transfectadas con ARN de interferencia (siRNA) contra Bcl-xL (B) o Mcl-1 (A) durante 8 y 6 horas respectivamente (tiempos 0 en la figura), tratadas después con 2-DG a los tiempos indicados y recogidas para su análisis por sub-G1. La expresión de las proteínas después de tratar con 2-DG se muestra en los western blots C y D, mostrando un silenciamiento óptimo de ambas. * muestra diferencias significativas respecto al control de ($P < 0.05$).

E, Para corroborar los resultados sobre Mcl-1, las células Rh4 fueron tratadas igual que en la figura 18A, pero con una secuencia diferente de siRNA para Mcl-1.



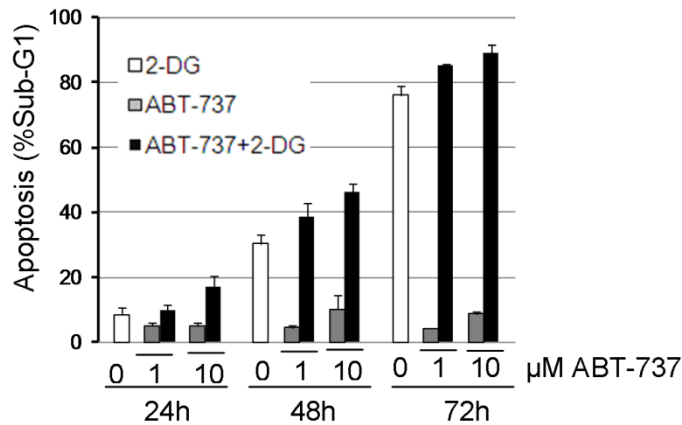


Para seguir abordando el papel de la ruta mitocondrial, quisimos inhibir selectivamente las proteínas Bcl-xL y Bcl-2 al mismo tiempo. Para ello, utilizamos el compuesto ABT-737, que mimetiza a las proteínas “BH3 only” e inhibe a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL.

La presencia de ABT-737 durante el tratamiento con la 2-DG en células Rh4 sensibilizó un poco a las muerte, aunque no de una forma claramente sinérgica. Por ello es necesario estudiar el papel de otros antiapoptóticas como Mcl-1, que no pueden ser inhibidos por el ABT-737.

Fig 20. La combinación de 2-DG y ABT-737 no sinergiza con la muerte inducida por 2-deoxiglucosa sola.

Rh4 fueron cultivadas durante los tiempos indicados con 10mM de 2-DG, ABT-737 (1 y 10 μ M) o ambos compuestos al mismo tiempo y recogidas para análisis sub-G1. El gráfico muestra media y SEM de 5 experimentos.



3.2.5.3 La 2-DG promueve la bajada de la expresión de Mcl-1

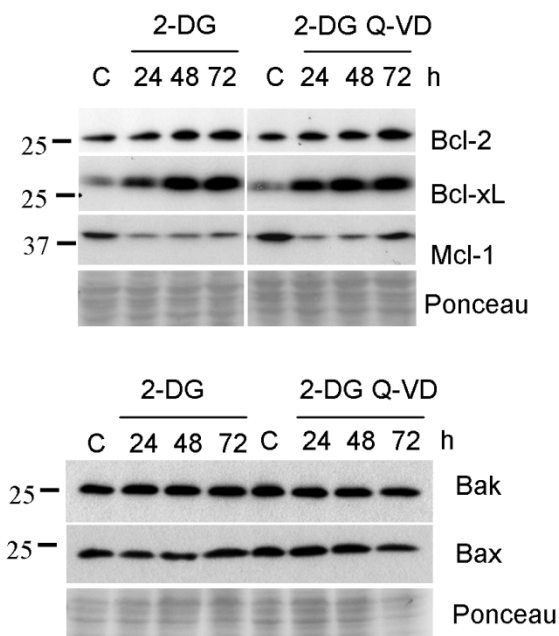
Existen diversos estudios donde se demuestra que la inhibición del metabolismo de la glucosa, ya sea a través de la privación de glucosa o por el tratamiento con 2-DG, promueve la bajada de los niveles de la proteína antiapoptótica Mcl-1. Por ejemplo, en células de linfoma la expresión de dicha proteína es esencial para la supervivencia de las células (Wensveen, Alves et al. 2011). Además, la bajada de los niveles de Mcl-1 en condiciones de privación de nutrientes induce apoptosis en linfocitos (Opferman, Letai et al. 2003).

En nuestro modelo, como observamos en la figura 21 de western blot, en células Rh4, el tratamiento con 2-DG redujo los niveles de Mcl-1, además esta bajada no se previno con Q-VD. También, Bcl-2 o Bcl-xL incrementaban tras el tratamiento.

Por otro lado, queríamos asegurarnos de los niveles absolutos de las proteínas Bax y Bcl-2 tras el tratamiento. En el panel, los niveles de expresión de éstas no cambian significativamente.

Fig 21. La 2-DG induce una bajada de los niveles de Mcl-1 en las células Rh4.

Rh4 fueron cultivadas durante los tiempos indicados con 10mM de 2-DG en presencia o ausencia de Q-VD a una concentración de 20 μ M y recogidas para el análisis de las proteínas indicadas mediante western blot.



3.2.5.4 La muerte inducida por 2-DG se produce a través de Noxa

Por otro lado, nos centramos en saber cuál es la “BH3-only” responsable de la muerte inducida por 2-DG. Para ello, tratamos las células Rh4 a diferentes tiempos con la 2-DG y observamos por “western blot” que el tratamiento no induce Puma. Sin embargo, los niveles de Bim y Noxa se veían incrementados (Fig 22A).

A

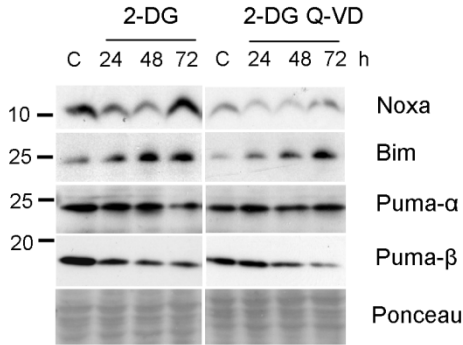
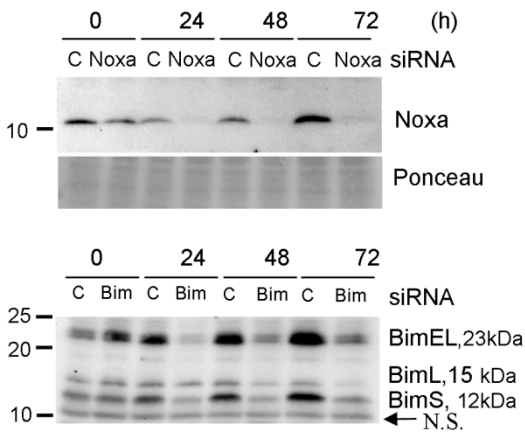


Fig 22. La 2-DG regula las proteínas "BH3-only" e induce apoptosis dependiente de Noxa.

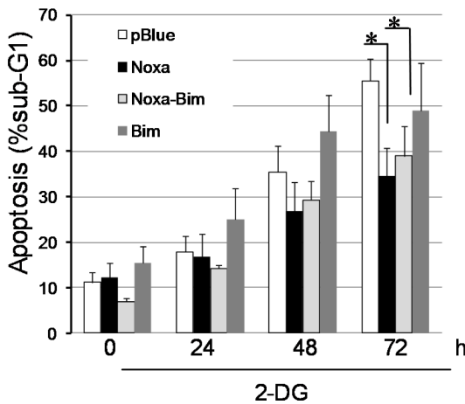
A, Células Rh4 fueron cultivadas a los tiempos indicados con 2-DG en presencia o ausencia de Q-VD. Las proteínas indicadas fueron resueltas por western blot. Los controles (C) fueron incubados con medio normal durante 24h.

B



B, Las células fueron transfectadas en "transient" durante 8 horas con el oligonucleótido control (C) o con RNA de interferencia (siRNA) contra Noxa o Bim y tratadas después durante los tiempos indicados con 2-DG. Los western blot contra las proteínas se indican en la figura B. N.S. bandas no específicas detectadas por el anticuerpo de Bim.

C



D

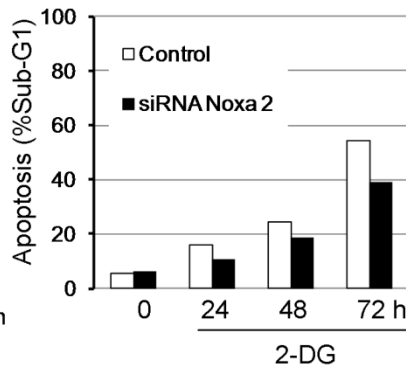


Fig 22 C-D (página 87)

C, Las células transfectadas con los siRNA de Bim, Noxa o la combinación de ambas, fueron analizadas por sub-G1 tras el tratamiento con 2-DG. ** P <0.01 (n=4).

D, Las células Rh4 fueron tratadas igual que en la figura B, pero con una secuencia diferente de ARN de interferencia para Noxa.

Para analizar la posible implicación de estas proteínas, las silenciamos de forma transitoria mediante ARN de interferencia. Tal y como observamos en la figura 22C, el silenciamiento de Noxa, pero no el de Bim, confiere una resistencia significativa a la muerte inducida por el tratamiento de 2-DG. Cuando realizamos el silenciamiento de la expresión de ambas proteínas a la vez, no encontramos una mayor protección a la muerte comparándola con el silenciamiento de Noxa únicamente. Estos datos sugieren que es Noxa, y no Bim, la principal “BH3-only” mediadora en la muerte inducida por 2-DG. Para confirmar del resultado, utilizamos una segunda secuencia de ARN de interferencia para silenciar Noxa, (Fig 22D) y volvimos a observar protección a la muerte inducida por 2-DG en las Rh4.

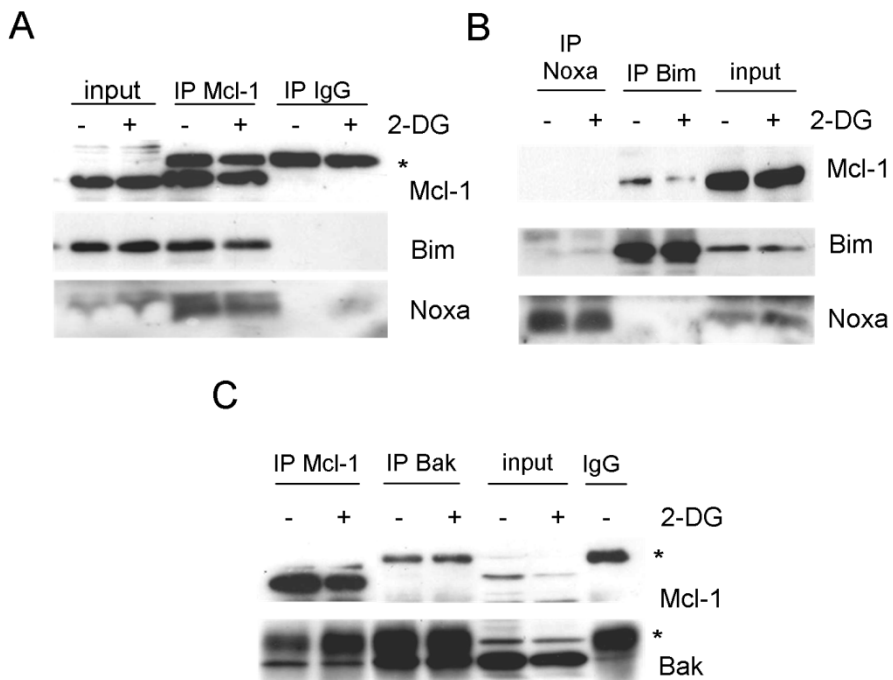
Noxa está constitutivamente unido a Mcl-1 en muchos tipos celulares (Alves, Derks et al. 2006) y también se ha descrito estar unido a Bcl-xL (Zhang, Lopez et al. 2011). Además estas proteínas antiapoptóticas son capaces de secuestrar a Bax y Bak, inhibiendo su activación. Por otro lado, las proteínas proapoptóticas como Noxa, son capaces de liberar a Bax/Bak en la mitocondria promoviendo la liberación de citocromo c. Por ello, quisimos estudiar las interacciones entre estas proteínas por inmunoprecipitación tras el tratamiento con 2-DG (Fig 23).

Observamos que Mcl-1 está constitutivamente unida a Bim y Noxa, sin ver grandes diferencias tras el tratamiento con 2-DG (Fig 23A y B). Por otro lado,

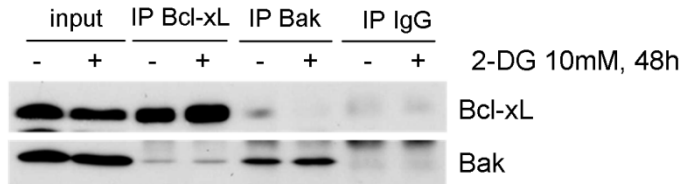
observamos interacciones entre Mcl-1 y Bak (Fig 23C) e interacciones muy débiles entre Bak y Bcl-xL (Fig 23D). No detectamos interacciones entre Bcl-xL y Noxa o Bim (Fig 23E). Intentamos co-immunoprecipitar, sin éxito, Bcl-2 y Bax con Bak o con Bcl-xL/Mcl-1, respectivamente.

Fig 23. Interacciones entre miembros de la familia Bcl-2.

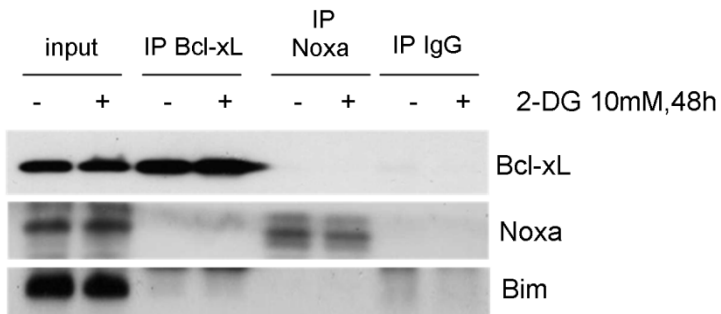
A-D, Las células Rh4 fueron tratadas con 2-DG 10mM durante 48 horas. Y la inmunoprecipitación (IP) y el “western blot” con los anticuerpos indicados se realizó según Materiales y Métodos. *, bandas inespecíficas. Input, corresponde a un 5% del inmunoprecipitado de proteína. IgG, inmunoglobulina G



D



E



Se ha descrito que Noxa es una diana transcripcional de p53. Sin embargo las Rh4 son deficientes en p53 (Oda, Ohki et al. 2000). Otros estudios han demostrado que Noxa puede estar sobreexpresada por daño en el ADN, estrés reticular o inhibición del proteosoma de una forma independiente de p53 (Fernandez, Verhaegen et al. 2005), (Qin, Stennett et al. 2004). Algunos estudios recientes muestran que Noxa se une preferiblemente a Mcl-1, pero no a Bcl-xL o Bcl-2 (Chen, Willis et al. 2005) y que neutraliza la actividad antiapoptótica de Mcl-1, promoviendo su degradación (Willis, Chen et al. 2005).

Nuestros resultados parecen indicar que el balance de Noxa/Mcl-1 es clave en la muerte celular inducida por inhibición del metabolismo. Además, los niveles de estas dos proteínas y la actividad se han demostrado ser regulados por múltiples mecanismos transcripcionales y postranscripcionales (Pradelli, Beneteau et al. 2010).

Por ello, quisimos estudiar la regulación transcripcional (Fig 24) de Mcl-1 y Noxa. Tratamos las células con 2-DG a 10mM y recogimos ARN a diferentes tiempos, para hacer RT-PCR. Como se observa en la figura 24A, pudimos ver que los niveles de ARN mensajero de Mcl-1 y Noxa no varían demasiado tras el tratamiento con 2-DG.

Quisimos analizar la estabilidad de estas proteínas para ver si variaba durante el tratamiento y vimos que al bloquear la síntesis proteica con cicloheximida, un inhibidor general de la traducción, la estabilidad de Mcl-1 y Noxa se aumentaba cuando las células fueron tratadas con 2-DG (Fig 24B). Ésto podría indicar una posible regulación traduccional de las proteínas, pero no explica cómo bajan los niveles de Mcl-1.

Puesto que Mcl-1 es muy sensible a la inhibición de la traducción, nosotros quisimos analizar dos de las vías que permiten la inhibición de la traducción. Por un lado la fosforilación de la serina 51 del Factor de iniciación 2-alpha (eIF2 α) (Fig 24C). EIF2 α es una subunidad del complejo proteico de eIF2 esencial para el reclutamiento del ARN de transferencia a la subunidad 40S ribosomal e iniciar así la traducción del ARN mensajero. La fosforilación de únicamente una fracción de eIF2 α es suficiente para dificultar el inicio de traducción. Y por otro lado, la inhibición de mTOR que impide la traducción inhibiendo a 4EBP1 e eIF-4E, de forma que no reconocen la estructura de mRNA (Fig 24D)(Mills, Hippo et al. 2008); (Iglesias-Serret, Pique et al. 2003).

Tratamos las células a diferentes tiempos con 2-DG (fig 24C-D) y tras el análisis por western blot pudimos observar tanto la fosforilación de eIF2 α como la inactivación de mTOR, a través de la defosforilación de una de sus proteínas diana indirecta, S6. Además, analizamos los niveles de Mcl-1 tras el

siRNA de Noxa, y pudimos ver que Noxa contribuye modestamente a la bajada de Mcl-1.

Concluimos que los niveles de Noxa y Mcl-1 se regulan post-transcripcionalmente, probablemente Noxa podría estar regulando los niveles de Mcl-1 y que Mcl-1 se regula mediante inhibición de su traducción.

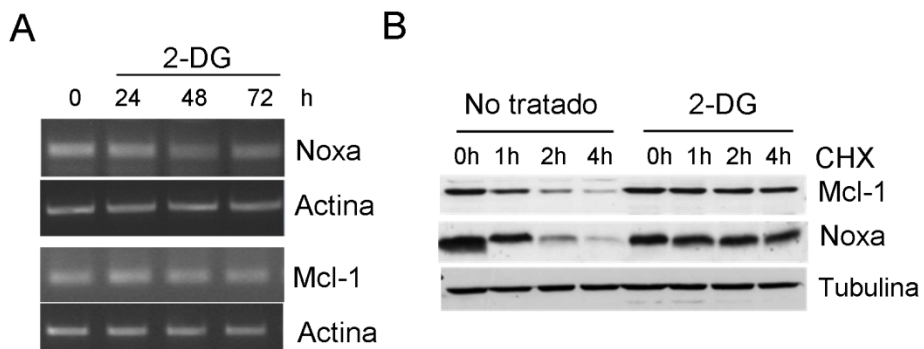
Fig 24. Los niveles de Noxa y Mcl-1 se regulan postranscripcionalmente.

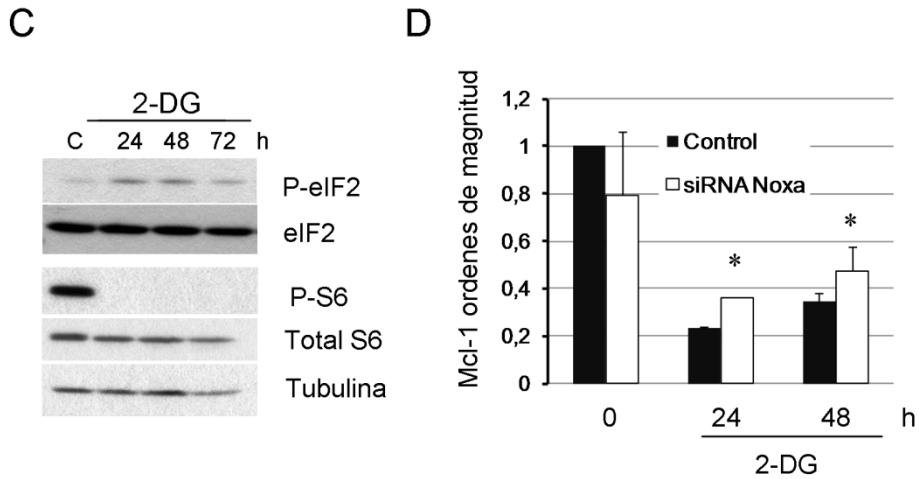
A, Las células Rh4 fueron tratadas con 10mM de 2-DG y recogidas a los tiempos indicados para hacer la RT-PCR. Los resultados indican 3 experimentos independientes.

B, Las Rh4 fueron cultivadas con medio normal (control) durante 24 horas o tratadas durante 72horas con 2-DG en presencia o ausencia de Q-VD para prevenir la degradación que pueda ser mediada por caspasas. Después se trataron con 100 mg/mL de cicloheximida (CHX) para inhibir la traducción de proteínas, durante los tiempos indicados y recogidas para “western blot”. Los resultados muestran un experimento representativo de 2 independientes.

C, Rh4 se trataron a los tiempos indicados con 10mM de 2-DG, se enseñan los “western blot” de eIF2 α (P-eIF2) y S6 (P-S6)

D, Rh4 se transfectaron con siRNA de Noxa, tratadas igual que en C y recogidas para “western blot”. Los niveles de Mcl-1 comparado con tubulina se analizaron por densitometría.





3.2.5.5 El estrés reticular, pero no la pérdida de ATP, es el responsable de la regulación de Noxa y Mcl-1

La privación de glucosa y la 2-deoxiglucosa dificultan la generación de ATP, la síntesis de macromoléculas, así como las modificaciones de proteínas como la acetilación y la glicosilación. En algunos tipos celulares, la 2-DG desencadena la muerte celular, no por la inhibición de la glicólisis y causando estrés energético, sino a través de la interferencia con los procesos de N-glicosilación, impactando en las respuesta de proteínas mal plegadas y el estrés del retículo endoplasmático (Kurtoglu, Gao et al. 2007).

Quisimos determinar la principal causa de muerte celular inducida por la 2-DG en nuestro sistema. Para ello utilizamos el azúcar manosa. Se asemeja estructuralmente a la 2-DG de tal manera que la competencia entre ambas moléculas implica alteraciones en la síntesis de oligosacáridos y del proceso de N-glicosilación; y en algunas líneas celulares la manosa es capaz de rescatar a las células de la toxicidad inducida por la 2-DG, restaurando la

glicosilación (Datema and Schwarz 1978). Además, en lo que al estrés reticular se refiere la manosa es crítica en el transporte de proteínas dentro y fuera del retículo (Vembar and Brodsky 2008).

Primero incubamos las células con 2-DG y manosa a diferentes tiempos, y observamos que la manosa previene completamente la muerte inducida por la 2-deoxiglucosa en las células Rh4 (Fig 25A). Puesto que la 2-deoxiglucosa inhibe la glicólisis, y la manosa revierte la muerte, podríamos pensar que la muerte está provocada por un empeoramiento en la glicosilación de las proteínas en el retículo, con el consecuente estrés reticular.

Quisimos analizar la inducción de diferentes marcadores de estrés reticular como por ejemplo ATF4/CREB2, GRP58 y las chaperonas del retículo GRP94/endoplasmína y GRP78/BiP (Fig. 25B). Estas dos últimas se unen a las proteínas mal plegadas a través del dominio de unión a péptidos y promueven el adecuado plegamiento, previniendo la agregación de proteínas. Además, muchas de ellas, tienen la capacidad de unirse al calcio manteniendo la homeostasis del retículo. Tal y como se observa en la figura de "western blot" Fig 25B, el tratamiento de 2-deoxiglucosa, provoca la acumulación de las proteínas marcadoras de estrés reticular GRP58, GRP94, GRP 78 y ATF4. Además, la manosa no solamente previene la inducción de estas proteínas, sino que también impide la acumulación de Noxa y la pérdida de Mcl-1. A su vez, reduce un poco la inducción de Bim. Estos resultados indicarían que el complejo Noxa/Mcl-1 está relacionado en la apoptosis inducida por estrés reticular.

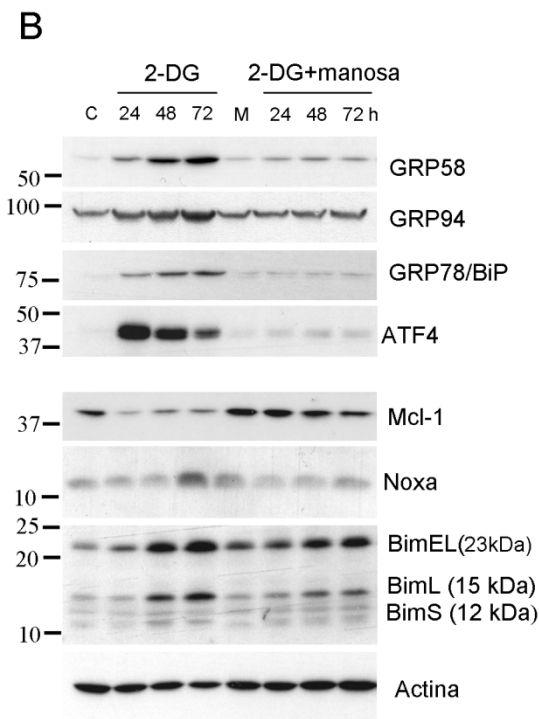
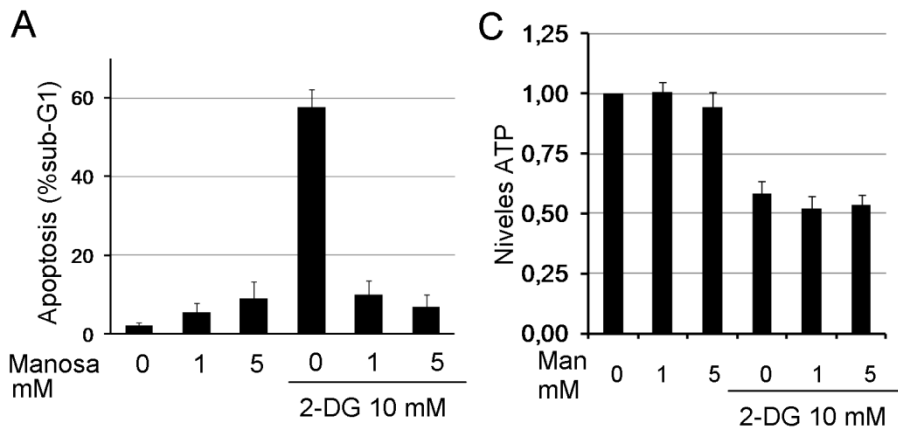


Fig 25. El estrés reticular media la apoptosis inducida por 2-DG.

A, Rh4 se cultivaron durante 72h con 10mM de 2-DG en presencia o ausencia de la concentración indicada de manosa (man) y recogidas para sub-G1. El gráfico muestra la media y SEM de 4 experimentos.

B, Rh4 se tratan con 10mM de 2-DG en ausencia o presencia de 5mM de manosa durante los tiempos indicados. La muestra control (c) se deja en medio normal o se trata con manosa (M) durante 24h.

C, Se cultivan un total de 2×10^3 células de Rh4 en placas de 96 pocillos durante 20 horas. Los niveles de ATP se miden con el kit ATPlite (Perlin Elmer). Los valores que se muestran son relativos a los controles no tratados. Media y SEM de 4 experimentos.

Además existen diversos estudios que lo demuestran con otras drogas, como el bortezomib, en concreto la activación del factor eIF2 α permite la inducción de ATF4 y ATF3, miembros de la familia de CREB. Se ha demostrado la unión de estos complejos al promotor del gen de noxa (a través de CRE reporter element), aumentando su expresión (Wang, Morajensen et al. 2009).

Por otro lado, para verificar que la manosa no está interfiriendo en todos los efectos de la 2-deoxiglucosa, por ejemplo, reduciendo su captación o bien, aportando metabolitos para oxidación mitocondrial, analizamos los efectos de este azúcar en la bajada de ATP. Para ello medimos los niveles de ATP en las Rh4 tras el tratamiento de 2-DG y la combinación con diferentes concentraciones de manosa. Como se muestra en la figura 25C, la 2-deoxiglucosa promueve la reducción de los niveles de ATP, y la manosa no es capaz de revertirlos. Estos resultados sugieren que la manosa no está siendo utilizada para producir energía.

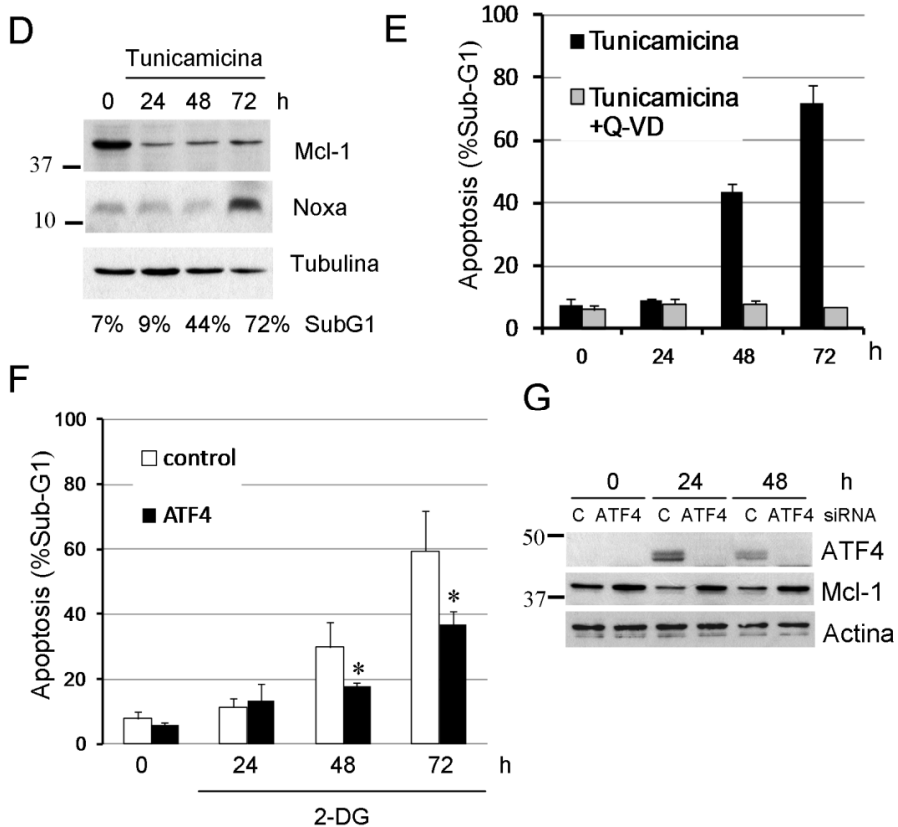
Para seguir analizando el efecto del estrés reticular, tratamos las células con un inductor de estrés reticular, la tunicamicina, a la dosis que promueve muerte celular con la misma cinética que lo hace la 2-DG (Fig 25E). Pudimos observar tras el análisis por western blot que la tunicamicina también promueve el incremento a tiempos tardíos de los niveles de Noxa y la bajada de los niveles de Mcl-1, de igual forma que lo hace la 2-DG (Fig 25D). Significaría que el estrés reticular podría estar promoviendo la inducción de Noxa.

Fig 25 D-G

D, Las células Rh4 son tratadas con 20ng/ml de tunicamicina y recogidas para su análisis por “western blot” y sub-G1. Media de al menos 3 experimentos.

E, Rh4 se trataron con 20 ng/ml de tunicamicina en ausencia o presencia de Q-VD y se recogieron para el análisis por sub-G1. La cinética con tunicamicina es similar a la que encontramos con 2-DG en estas células y el Q-VD protege de igual forma.

F-G, Las células se transfectaron con el siRNA de ATF4 o con el siRNA control durante 8 horas, se trataron con 10 mM de 2-DG durante los tiempos indicados y se recogieron para el análisis por sub-G1 (F) o para western blot (G). *P < 0.05. La subida de los niveles basales de Mcl-1 tras la transfección del siRNA de ATF4 es reproducible y se enseña un experimento representativo de 3 réplicas (G).



Por otro lado, puesto que sabíamos que el factor de transcripción de ATF4 es un inductor de la expresión de Noxa en otros sistemas, quisimos saber si bajando la expresión de ATF4 protegíamos a las células de la muerte celular.

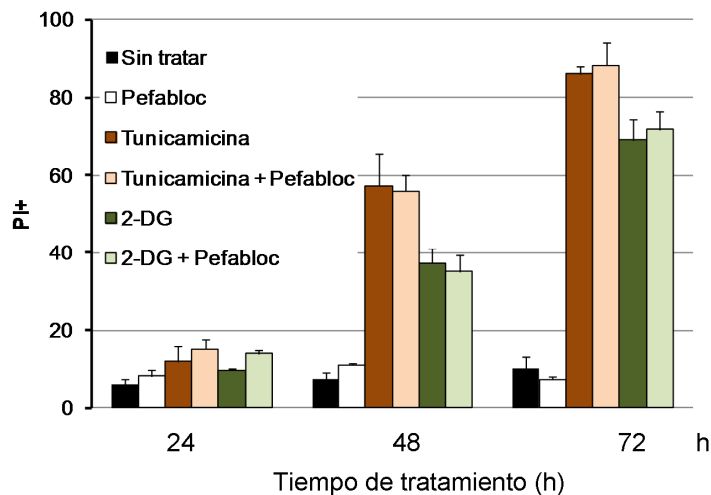
Tal y como observamos en la figura 25F y 25G, la bajada de ATF4 previene la muerte celular, y la pérdida parcial de los niveles de Mcl-1.

Por otro lado, y para seguir estudiando el estrés en estas células, quisimos determinar si la apoptosis inducida por estrés reticular era bloqueada por pefabloc, un inhibidor general de la actividad serina proteasa. Se ha demostrado que el pefabloc inhibe la muerte mediada por estrés reticular (Egger, Schneider et al. 2003). Además, bloquea la degradación de substratos que son degradados vía proteosoma.

Tratamos las células Rh4 con 2-deoxiglucosa o tunicamicina, combinando con pefabloc a diferentes dosis. En la figura 26, el pefabloc no es capaz de proteger a las células de la 2-deoxiglucosa, pero tampoco de la tunicamicina.

Fig 26. El pefabloc no protege del estrés reticular en las células Rh4 inducido por tunicamicina, ni 2-DG.

Las células Rh4 son tratadas con 20ng/ml de tunicamicina o 10mM de 2-DG en ausencia o presencia de 0.3mM de pefabloc y recogidas a los tiempos indicados para su análisis por yoduro de propidio. La muestra no tratada, corresponde a células que han sido cultivadas en medio normal.



3.3 Autofagia y Metabolismo

En los últimos años, uno de los procesos homeostáticos más estudiados es la autofagia. La autofagia es un proceso dinámico de “canibalismo” de la propia célula. Se activa en respuesta a estrés metabólico, con el fin de reciclar en los lisosomas, proteínas y orgánulos dañados de la célula. En un primer momento, el papel de la autofagia es promover adaptación al estrés y supervivencia en condiciones de privación de nutrientes. Se han observado diversos estudios en células humanas que demuestran un empeoramiento en la supervivencia al estrés cuando son deficientes en genes clave para la autofagia como atg3, atg5, atg7, o beclina-1 (Mizushima and Komatsu 2011). Por otro lado, existen publicaciones que muestran, que tras un estrés metabólico prolongado en las células tumorales, la autofagia permite a éstas continuar vivas en un estado de latencia, en el que pueden reanudar la proliferación gracias a la restauración continua de nutrientes (Degenhardt et al. 2006). Pero también hay trabajos que consideran la autofagia no como un proceso protector sino como una forma de muerte celular en sí (Wang, Singh et al. 2008; Mathew and White 2012). Además, un reciente estudio demuestra la inducción de autofagia dependiente de Noxa en células que sobre-expresan Ras en ausencia de oncogenes transformantes (Elgendy, Sheridan et al. 2011). En este contexto, las células que inducen Noxa promueven autofagia y muerte celular. Recordamos que la autofagia dependiente de Noxa requiere el desplazamiento de Mcl-1 de Beclina-1. Por ello quisimos estudiar el papel de la autofagia en nuestro sistema.

3.3.1 Las células Rh4 responden de forma diferente al tratamiento con privación de glucosa o 2-DG añadiendo 3-metiladenina o cloroquina.

Para abordar el papel de la autofagia en la muerte celular inducida por privación de glucosa, utilizamos dos inhibidores clásicos de la autofagia como son la 3-metiladenina y la cloroquina.

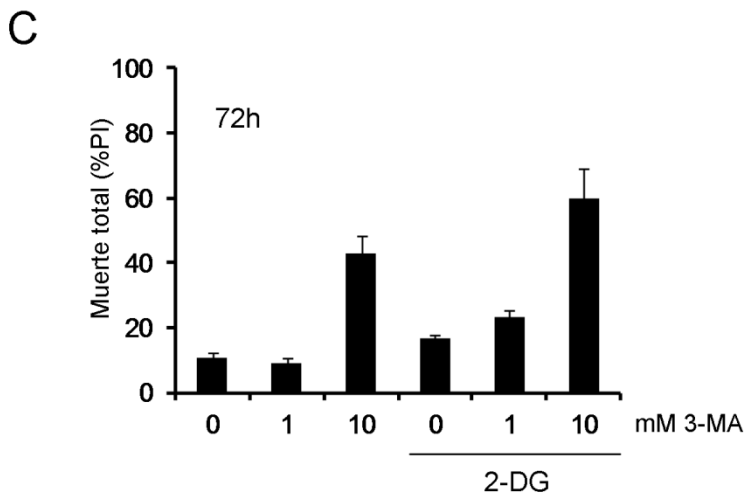
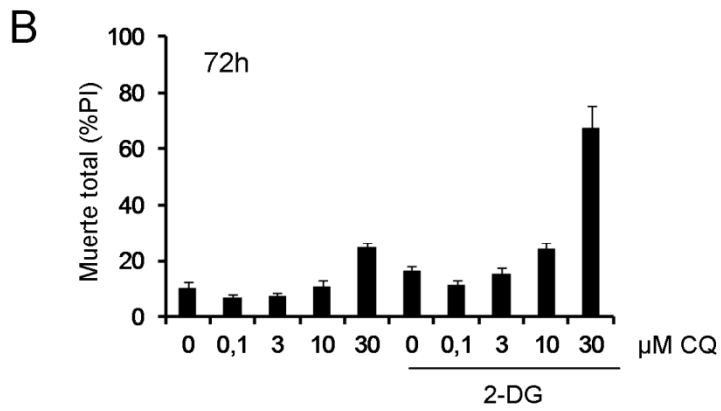
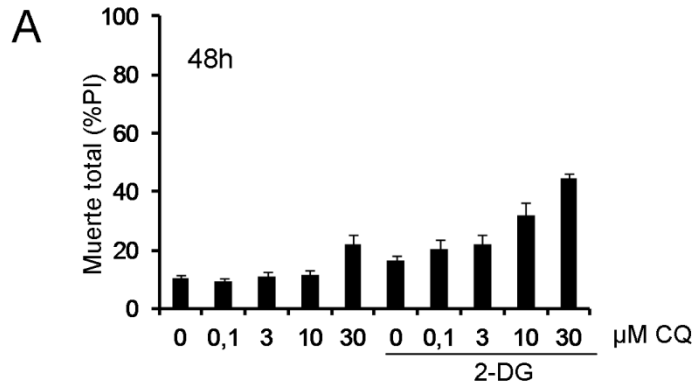
Estudios anteriores habían demostrado que el estrés reticular y la bajada de los niveles de ATP consecuencia del tratamiento con 2-DG, inducía la activación de la autofagia (Xi, Kurtoglu et al. 2010). Además, la adición de manosa, inhibía el proceso de autofagia pero no recuperaba los niveles de ATP.

Así que estudiamos lo que sucedía en nuestro modelo. Tratamos células Rh4 con 2-DG, en presencia de cloroquina a diferentes concentraciones, durante 48 o 72 horas (Fig 27). Lo que observamos es que la presencia de cloroquina a las dosis más altas, sensibilizaba a la muerte inducida por 2-DG sobretodo después de 72 horas del tratamiento. En cambio, el efecto de la 3-MA en combinación con la 2-DG a 37 horas es más bien aditivo, puesto que es bastante tóxica a las dosis más altas.

Fig 27. La cloroquina sensibiliza a dosis altas a la muerte inducida por 2-DG, mientras que la 3-MA el efecto es aditivo.

A-B, Células Rh4 fueron tratadas en presencia o ausencia de 2-DG (2mM) con diferentes dosis de cloroquina durante 48 y 72 horas y recogidas para su análisis por incorporación de yoduro de propidio. Media y SEM de al menos 3 experimentos

C, Células Rh4 fueron tratadas en presencia o ausencia de 2-DG con diferentes dosis de 3-metiladenina durante 37 horas y recogidas para su análisis por incorporación de yoduro de propidio. Media y SEM de al menos 3 experimentos.

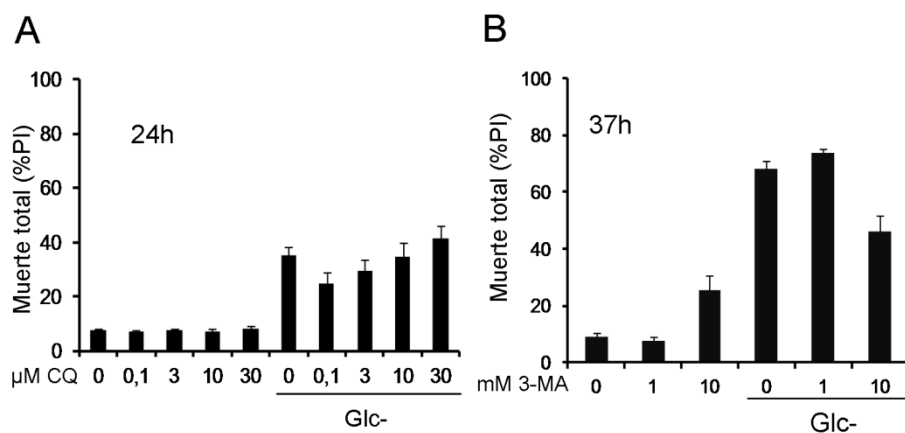


Por otro lado, tratamos las células Rh4 con privación de glucosa a diferentes concentraciones de cloroquina y 3-MA. Como se observa en la figura 28, el tratamiento con cloroquina parece no causar ningún efecto en la muerte inducida por privación de glucosa. En cambio, con 3-MA a altas dosis, protege, obteniendo lo contrario de lo que observábamos con 2-DG.

Fig 28. La cloroquina no tiene ningún efecto en la muerte inducida por privación de glucosa, mientras que la 3-MA protege.

A, Células Rh4 fueron privadas de glucosa o no, tratadas con diferentes dosis de cloroquina y recogidas a 24h para su análisis por incorporación de yoduro de propidio. En la figura se muestran media y SEM de 4 experimentos.

B, Rh4 fueron tratadas o no, con privación de glucosa, más las dosis indicadas de 3-MA y recogidas a las 37 horas para su análisis por incorporación de yoduro de propidio. Media y SEM de 3 experimentos.



3.3.2 La 3-MA y la cloroquina producen efectos contradictorios en las células DKO y Hela tratadas con privación de glucosa

Por otro lado quisimos saber qué ocurría en otros tipos celulares y empezamos a estudiar el efecto de estos dos inhibidores, 3-MA y

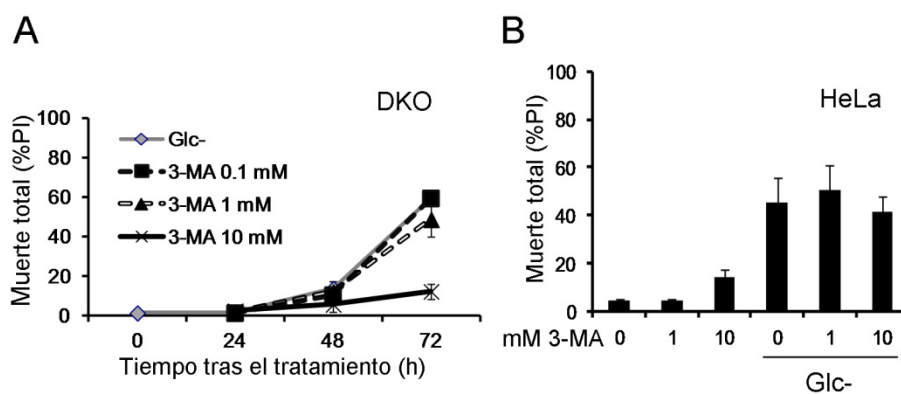
cloroquina, en las células DKO y las HeLa a la muerte inducida por privación de glucosa.

Para ello, las células DKO y HeLa se trataron con privación de glucosa a diferentes concentraciones de 3-MA. Como podemos observar en la figura 29, la 3-MA protege a ambas células de la muerte inducida por privación de glucosa. Lo mismo que encontrábamos con las células Rh4.

Figura 29. La 3-metiladenina protege de la privación de glucosa en células deficientes en Bax y Bak y a las células HeLa

A, Células DKO fueron privadas de glucosa en presencia de 3-metiladenina a las concentraciones indicadas y analizando la muerte total por incorporación de yoduro de propidio a los tiempos indicados. Se enseña la media y desviación estándar de 2 experimentos.

B, Células HeLa fueron privadas de glucosa o no, en presencia de 3-metiladenina a diferentes dosis y recogidas tras 24 horas de tratamiento para su análisis por incorporación de yoduro de propidio. Se enseña la media y SEM de al menos 3 experimentos.



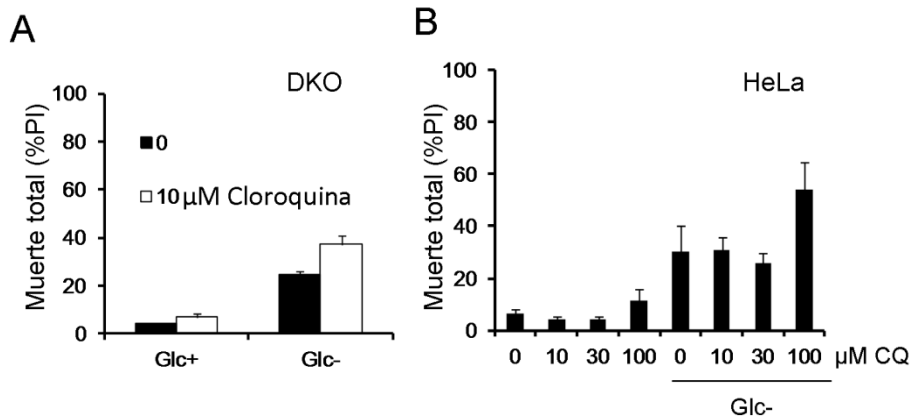
Ahora bien, existen diversos estudios que demuestran el papel confuso de la 3-MA como inhibidor de la autofagia. La 3-MA inhibe también la PI3K I que activa a su vez a AKT. AKT actúa sobre el complejo TSC1-TSC2 que permite la activación de mTOR, suprimiendo así la autofagia. Mientras que la PI3K III es una reguladora positiva de la autofagia. Dependiendo del estímulo y del tiempo de tratamiento, la 3-MA puede tener efectos contradictorios como inhibidor de la autofagia (Wu, Tan et al. 2010). Además tiene efectos en el metabolismo induciendo una bajada de la producción de lactato o de glicógeno (CARO, Plomp et al. 1988). Por lo que los resultados obtenidos con la 3-MA deben ser analizados de forma diferente, ya que podemos tener una visión artefactual de lo que está sucediendo.

Por otro lado tratamos las células DKO y las HeLa tras privación de glucosa en presencia de cloroquina. Como se observa en la figura 30, la cloroquina sensibiliza ligeramente a la muerte inducida por retirada de glucosa en ambos casos.

Figura 30. La cloroquina sensibiliza a la privación de glucosa en células deficientes en Bax y Bak y en HeLa

A, Células DKO fueron privadas de glucosa o no, en presencia de cloroquina a la concentración indicada. Tras 48h de tratamiento, se recogieron para analizar la muerte total por incorporación de yoduro de propidio. Media y SEM de al menos 3 experimentos.

B, Células HeLa fueron privadas de glucosa o no, tratadas a diferentes dosis de cloroquina y recogidas tras 24 horas de tratamiento para su análisis por incorporación de yoduro de propidio. Media y SEM de al menos 3 experimentos.



Así, el uso de inhibidores de la autofagia, nos ofrece resultados contradictorios o no del todo claros, respecto al papel de la autofagia en la muerte inducida por privación de glucosa en las células Rh4, HeLa y DKO. Por ello empezamos a estudiar el papel de la autofagia por otros métodos.

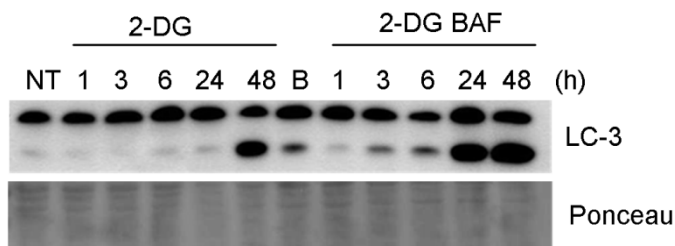
3.3.3 El flujo de LC3 se ve aumentado tras el tratamiento con 2-DG pero no tras la privación de glucosa

Uno de los métodos más fiables para detectar autofagia es monitorizando el flujo autofágico. La conversión de LC3-I a LC3-II puede ser determinada por western blot con anticuerpos anti LC3. Este método está basado en la observación de la degradación de LC3-II en autolisosomas. Si las células son tratadas con reactivos que inhiben la acidificación dentro del lisosoma o inhiben la fusión de autofagosomas con lisosomas como la cloroquina o bafilomicina A1, la degradación de LC3-II se bloquea. Teniendo en cuenta las diferencias entre LC3-II en muestras en presencia o ausencia de inhibidores lisosomales obtenemos una idea de la cantidad de LC3 que es degradada en los lisosomas, es decir el flujo autofágico.

Sabíamos por otros estudios que la 2-deoxiglucosa induce autofagia en células de cáncer de próstata (DiPaola, Dvorzhinski et al. 2008). En nuestro caso, habíamos observado que en las células Rh4 la cloroquina sensibilizaba a la muerte inducida por 2-DG y protegía de la muerte por privación de glucosa. Así, quisimos observar el flujo autofágico por western blot. Tal y como observamos en la figura 31, la adición de bafilomicina A1 en el tratamiento con 2-DG provoca una acumulación de LC3-II, en comparación con el tratamiento con 2-deoxiglucosa o bafilomicina sola. Esto indica que la 2-DG está promoviendo un mayor flujo autofágico.

Figura 31. Se observa flujo de LC3-II en células Rh4 tras el tratamiento con 2-DG.

Células Rh4 fueron tratadas a los tiempos indicados con 2-DG 20nM en presencia o ausencia de bafilomicina durante las últimas 3 horas, excepto la muestra de 1 hora. NT corresponde a la muestra control sin tratar y B a la muestra con bafilomicina 3 horas en medio normal. Después las muestras fueron recogidas para su análisis por western blot del anticuerpo LC3.



Pero cuando tratamos las células Rh4 con privación de glucosa y bafilomicina A1, los resultados son opuestos (Fig 32A). No observamos acumulación de LC3-II en presencia de bafilomicina y sin glucosa comparando con bafilomicina sola. Y lo mismo ocurre en células DKO (Fig 32B). Además, en estas últimas, utilizamos p62 como control, ya que es una proteína diana a ser degradada por autofagia. El hecho de que se acumule en presencia de privación de glucosa indicaría que no se está induciendo macroautofagia y es

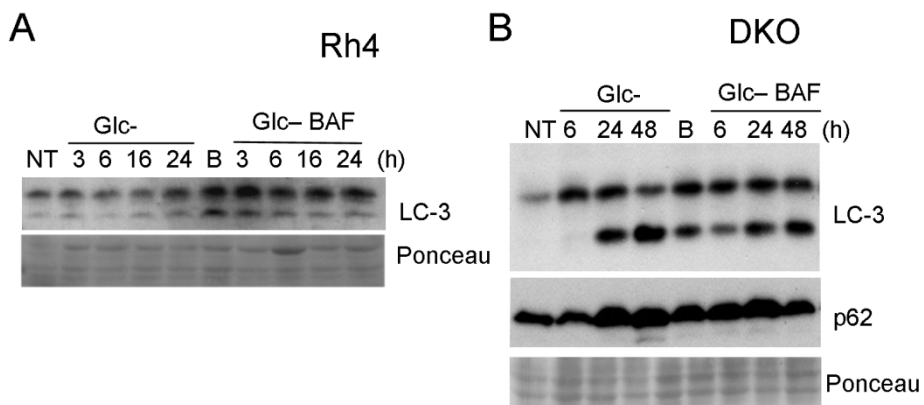
lo que encontramos en la figura 32 A. Con células Rh4 nos fue difícil detectar p62.

Figura 32. Flujo de autofagia en células deficientes de Bax y Bak y Rh4.

A, Células DKO fueron tratadas con y sin glucosa en ausencia y presencia de 20nM de bafilomicina durante las últimas 6 horas.

B, Células Rh4 fueron tratadas con y sin glucosa en ausencia o presencia de 20nM de bafilomicina durante las últimas 3 horas.

Las células control fueron cultivadas en medio normal (NT) o tratadas con 20nM de bafilomicina por 6h (B). Las proteínas indicadas fueron resueltas por western blot.

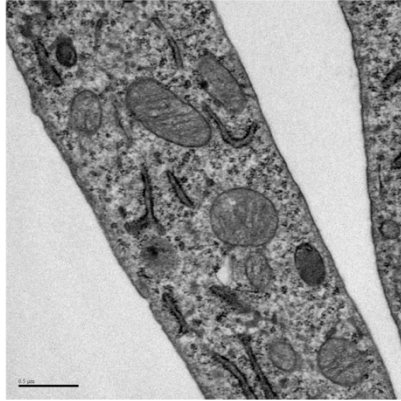


Además hicimos microscopia electrónica en células DKO tratadas sin glucosa y no observamos autofagolisosomas, lo que concuerda con la hipótesis de que la privación de glucosa no aumenta la autofagia en las células.

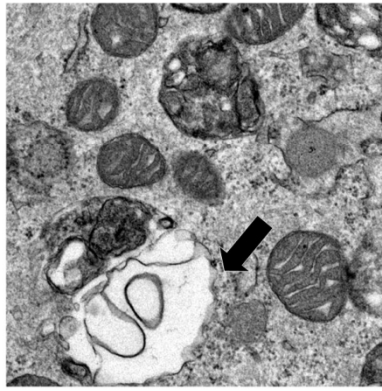
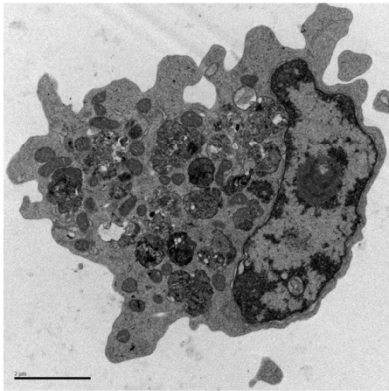
Figura 33. No se observan autofagosomas en células DKO tras privación de glucosa.

Las células DKO fueron analizadas por microscopía electrónica como se indica en el apartado de Materiales y métodos. Se observan células no tratadas (NT) y privadas de glucosa durante 48h. Las flechas indican la ausencia de doble membrana. El panel inferior muestra dos imágenes extraídas de la figura s2 de (Ullman, Fan et al. 2008). Son células DKO tratadas con tunicamicina durante 48 horas en la que se observan numerosos autofagosomas.

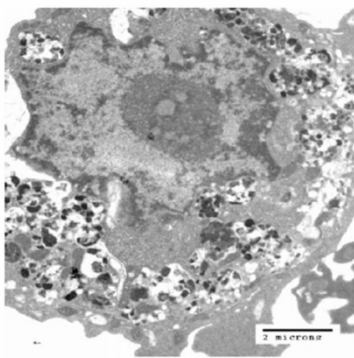
No tratadas



Glucosa (-)



Tunicamicina



3.3.4 LC3 punteado no aumenta tras el tratamiento sin glucosa.

Para continuar investigando la autofagia en condiciones de privación de glucosa, nos fijamos en la distribución de LC3 en el citoplasma. Para ello utilizamos células transfectadas establemente con LC3-GFP y las tratamos con diferentes tratamientos en presencia o ausencia de bafilomicina. Así, visualizamos LC3 por microscopía de fluorescencia como una distribución difusa en el citoplasma o en estructuras punteadas que representan autofagosomas.

Como se observa en la figura 34 en Rh4, LC3 se encuentra mayoritariamente en una distribución difusa por toda la célula en los diferentes tratamientos. Por ello es necesario el uso de bafilomicina que nos ayude a determinar el nivel de punteado que existe en las diversas condiciones. Tal y como observamos en la figura 34, las células Rh4-LC3 tratadas sin glucosa y bafilomicina no presentan más LC3 punteado comparándolo con el control de bafilomicina con glucosa. Además si observamos los controles positivos de autofagia como rapamicina o EBSS con bafilomicina, podemos concluir que LC3 punteado es mucho mayor en estos casos, comparándolo con la privación de glucosa.

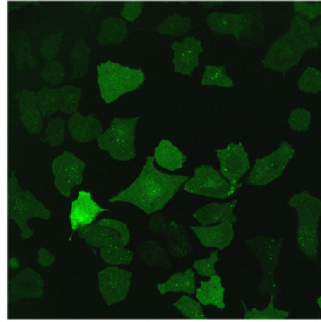
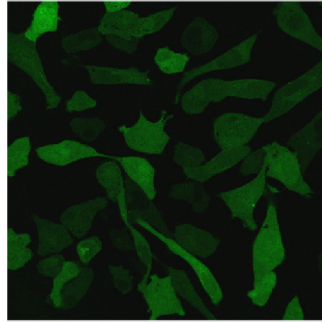
Figura 34. Distribución de LC3 en células Rh4-LC3-GFP con diferentes tratamientos.

Células Rh4 fueron transfectadas establemente expresando LC3-GFP con retrovirus. Después fueron tratadas durante 6 horas con los tratamientos de Glc+, Glc- y EBSS+25nM de Hepes en ausencia o presencia de 20nM de bafilomicina A1 para inhibir la fusión del autofagosoma/lisosoma. Las células con rapamicina (rap), 2 μ M, fueron cultivadas durante 24 horas y las últimas 6 horas con bafilomicina.

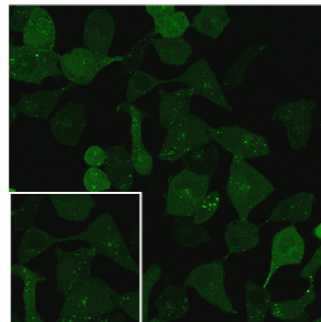
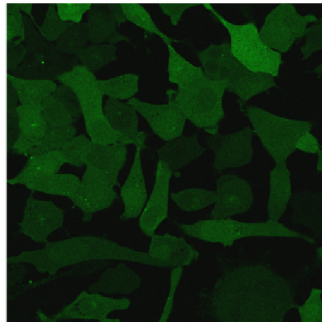
Rh4-LC3

Bafilomicina

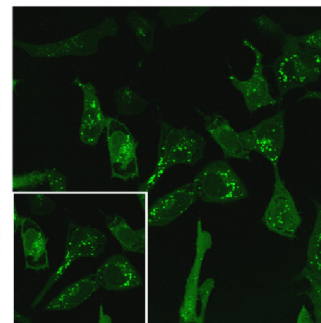
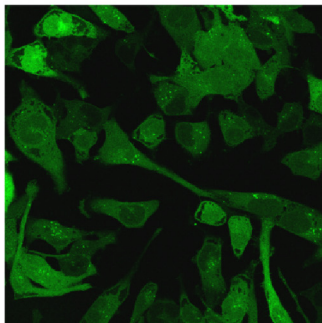
Glc+



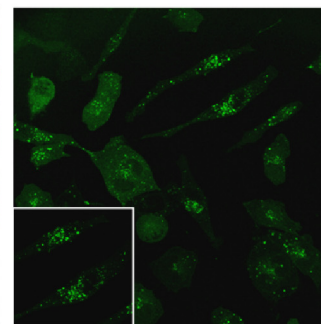
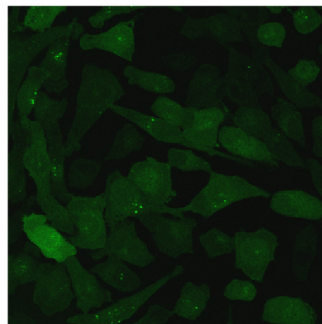
Glc-



EBSS



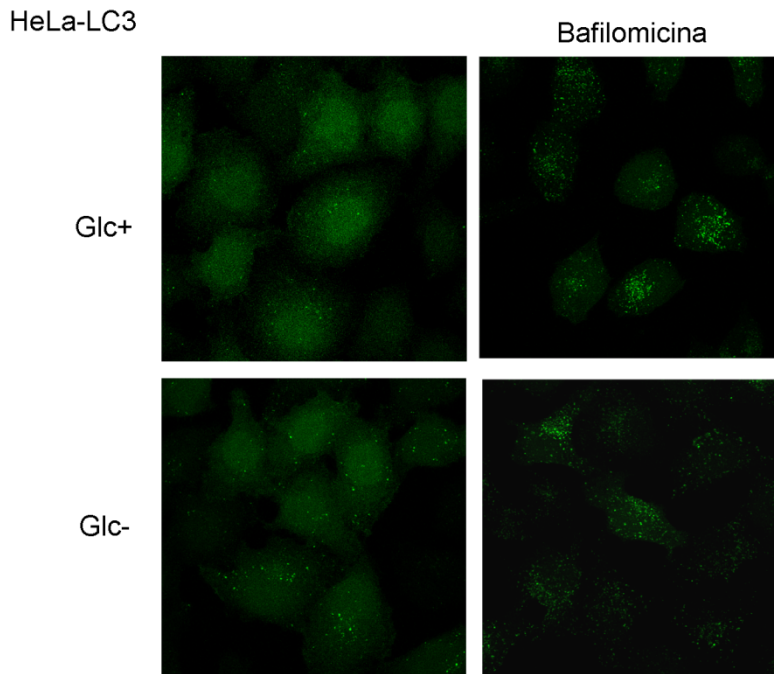
Rap

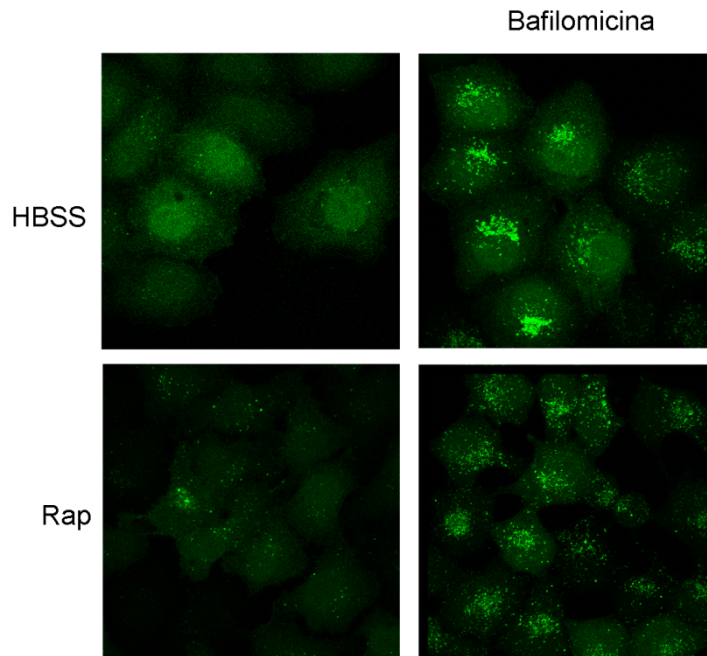


Hicimos lo mismo en células HeLa, transfectamos establemente con LC3 y tratamos con y sin glucosa, HBSS y rapamicina en ausencia y presencia del inhibidor bafilomicina. Claramente en la figura 35 observamos que LC3 punteado es mucho mayor en los tratamientos de HBSS y rapamicina con bafilomicina comparando con el tratamiento sin glucosa y bafilomicina. Esto sugiere que la privación de glucosa no parece aumentar la macroautofagia en las células.

Figura 35. Distribución de LC3 en células HeLa-LC3-GFP con diferentes tratamientos.

Células HeLa fueron transfectadas establemente expresando LC3-GFP con retrovirus. Después fueron tratadas durante 6 horas en los tratamientos de Glc+, Glc- y HBSS+25nM de Hapes en ausencia o presencia de 20nM de bafilomicina A1 para inhibir la fusión del autofagosoma/lisosoma. Las células con rapamicina (rap), 2 μ M, fueron cultivadas durante 24 horas y las últimas 6 horas con bafilomicina.





IV. Materiales y Métodos

4.1 Líneas celulares

- Líneas celulares de rhabdomyosarcoma alveolar

Rh4 y Rh30: Originarias del laboratorio de Peter Houghton, 2008.

Rh41: Proviene de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, 2008.

- Líneas celulares de rhabdomyosarcoma embrionarias

RD: Obtenidas de la HPACC Europea, 2009.

A204: Proviene de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, 2008.

- Línea de liposarcoma mixoide

402-91: Originarias del laboratorio de Óscar Martínez, 2011

- Líneas celulares de fibroblastos murinos embrionales, MEFs

Estos fibroblastos proceden de ratones silvestres (WT) o deficientes en los genes Bax y Bak (DKO). Ambas líneas celulares provienen de la misma inmortalización mediante SV-40 (Wei, Zong et al. 2001).

- Línea celular de cáncer cérvico-uterino

HeLa: Originarias de la ATCC (American Type Culture Collection), obtenidas del laboratorio de Douglas R Green, 2006.

4.2 Cultivo de Células y Tratamientos

Todas las líneas celulares crecieron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) con alta concentración de glucosa (25mM), enriquecido con 2mM de glutamina (Invitrogen), penicilina (200mg/ml, Invitrogen), estreptomycin (100mg/ml) y un 10% de suero bovino fetal inactivado (Invitrogen). Se mantuvieron a 37°C en placas de petri para cultivo celular (BD), en una humedad atmosférica del 5% de CO₂. Las líneas celulares

se expanden, se congelan durante las dos primeras semanas de pases y las alícuotas se utilizan en cultivo como máximo durante dos meses después de su descongelación.

Para los tratamientos, las células de sarcoma se plaquean a una concentración de 200,000 células/ml y son tratadas con medio fresco 24 horas después, correspondiendo a un 70% de confluencia (600,00 células/ml). Para células de fibroblastos murinos y HeLa se plaquean a una concentración de 150,000 células/ml y son tratadas 24 horas después al alcanzar una concentración de 500,000 células/ml.

Q-VD-OPH (SM Biochemicals LLC, CA) se utiliza a 20 μ M y se añade en el mismo momento que añadimos el tratamiento. Las mismas cantidades de DMSO son utilizados para el control.

4.2.1 Tratamiento de retirada de Glucosa

Se utiliza el medio de cultivo DMEM sin glucosa ni piruvato (11966-025, Invitrogen), con 2mM de glutamina añadida como máximo una semana antes del tratamiento. Las células se lavan con el medio de cultivo sin glucosa, y se tratan con este medio DMEM enriquecido con un 10% de suero bovino fetal inactivado y dializado.

- Diálisis de suero

Primero, la membrana de diálisis se lava tres veces con agua miliQ caliente y en agitación. Después se rellena la membrana con FBS normal, y se sumerge en un volumen de PBS 10 veces más que el de la tripa. Se lava durante una hora en agitación. Después se cambia el PBS y se deja en agitación durante otra hora. La tercera vez, se vuelve a cambiar el PBS y se deja toda la noche en agitación a 4°C. Después, se recoge el suero y se filtra con un filtro de 0,22 μ m.

4.3 Western blot

4.3.1 Preparación de extractos proteicos totales para análisis

Después del tratamiento, las células fueron tripsinizadas, lavadas con PBS y centrifugadas a 500g (factor centrífugo). El pellet es lisado con tampón de lisis con cóctel completo de anti-proteasas en frío y es congelado a -20°C . Para el análisis de fosfoproteínas y HIF-1 α , las células son lisadas en tampón RIPA con ortovanadato (1mM) y 2-glicerolfosfato (30mM).

Posteriormente, se descongelaron en hielo, se sonicaron con el fin de degradar el ADN y se determinó la concentración de proteína por BCA (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Tampones de lisis

Tampón de Lisis 4X
12,5 ml 4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8 (6.,5 g Tris base en 40 ml agua miliQ, ajustar pH, añadir 0,4 g de SDS, completar hasta 100 ml agua miliQ) 2 g SDS (final 8%) Agua Mili Q 1L hasta 25ml
Tampón de Lisis RIPA, Thermo Scientific
25mM Tris HCl pH 7.6 150mM NaCl 1% NP-40, 1% Deoxicolato sódico, 0.1% SDS

4.3.2 Electroforesis de proteínas

Se mezclaron cantidades iguales de proteína (40-50 μ g /40 μ l) con tampón Laemmli para electroforesis, y se cargaron entre 30-40 μ g de proteína. Las muestras fueron hervidas durante 5-10 minutos a 95°C.

La separación de proteínas se realizó en función de su peso molecular en geles de poliacrilamida con mini cubetas para electroforesis de proteínas (Mini-protean, Bio-Rad).

Después de la electroforesis, la proteína fue transferida a una membrana de PVDF (Millipore) siguiendo la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad), a 200 mA por membrana durante una hora o bien con transferencia húmeda a 60V durante dos horas.

La transferencia se verificó tiñendo la membrana mediante el colorante rojo de Ponceau S. El tampón de transferencia, con un 20% de metanol en ambos casos, se hizo según la receta de Bio-Rad.

Tampón Laemmli 5X
4 ml de Tris HCl 1.5M pH 6.8
10 ml Glicerol
5 ml β -mercaptoetanol
2g SDS
1% Bromofenol azul

4.3.3 Detección de proteínas en la membrana transferida

La membrana fue bloqueada con 5% de leche desnatada en polvo en TBS/0,1% Tween durante 1 hora a T^a ambiente.

Después se incubaba con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante 1-2 horas a Tª ambiente o toda la noche a 4°C en agitación suave. A continuación se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS/ 0,1% Tween.

Posteriormente, la membrana es incubada con el anticuerpo secundario (1/5000) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y preparado en solución de bloqueo, durante 1 hora a Tª ambiente en agitación suave. Se realizan 3 lavados de 10 minutos con TBS/ 0.1% Tween.

Se revela mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Pierce). La mezcla del ECL era fresca para cada revelado.

a.- Anticuerpos Primarios

Proteína	Especie/Purificación	Casa comercial	Técnica utilizada
Actina	Monoclonal ratón	ICN clone C4	WB
ATF4/CREB2	Policlonal conejo	Santa Cruz, sc-200	WB
Bax	Policlonal de conejo	Santa Cruz, SC-493	WB
Bax-activo	Monoclonal ratón	BD Pharmingen, 6A7, 556467	ICQ
Bak	Policlonal conejo	Upstate, clone NT	WB,IP
Bak-activo	Monoclonal ratón	Calbiochem /Merck Ab-1/ TC100	ICQ
Bcl-2	Monoclonal conejo	Becton, 550847	WB,IP
Bcl-xL	Monoclonal conejo	Cell Signaling, 2764	WB, IP
Bim	Policlonal conejo	BD, Pharmingen, 559685	WB,IP
Caspasa-8	Monoclonal ratón	MBL, 5F7	WB

eIF2- α	Policlonal conejo	Santa Cruz, sc-11386	WB
fosfo-eIF2- α	Monoclonal conejo	Cell signaling, 3597	WB
FOXO1a	Monoclonal conejo	Cell Signaling, 2880	WB
GRP58	Policlonal conejo	Acris antibodies, SP5391	WB
GRP78	Policlonal cabra	Santa Cruz, sc-1050	WB
GRP 94	Policlonal cabra	Santa Cruz, sc-1794	WB
HIF-1 α	Policlonal cabra	RD, aF1935	WB
Mcl-1	Policlonal conejo	Santa Cruz, sc-819	WB,IP
Noxa	Monoclonal ratón	Calbiochem, OP180	WB,IP
Puma	Policlonal conejo	Abcam, ab9643	WB
fosfo-S6	Policlonal conejo	Cell Signalling, 2211	WB
S6	Policlonal conejo	Upstate, 05-781R	WB
alfa-tubulina	Monoclonal ratón	Abcam, ab28439	WB
PARP	Policlonal conejo	Cell Signaling, 9542	WB

b.- Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Casa comercial	Técnica utilizada
Anti-ratón/HRP	Sigma	WB
Anti-conejo/HRP	Sigma	WB
Anti-ratón IgG-FITC	Sigma	ICQ

4.4 Inmunocitoquímica

Después del tratamiento, tanto las células en suspensión como las células adheridas a la placa, fueron recogidas por tripsinización, se lavaron con PBS y fijadas en suspensión con un 4% de paraformaldehído en PBS durante 20 minutos a T^a ambiente. Después, se lavaron tres veces con solución de bloqueo (PBS + 0.1% BSA + 0.1% Triton X-100), descartando el sobrenadante después de centrifugar a 400g durante 6 minutos. Posteriormente, las células se bloquean en 500µl de solución bloqueante, durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Se centrifugan a 400gs durante 6 minutos y se descarta el sobrenadante.

Después se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario preparado en 200µl de solución de bloqueo.

Al día siguiente, las células se lavaron tres veces con solución de bloqueo (centrifugando y descartando el sobrenadante de igual forma que la vez anterior) y fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación, con un IgG-FITC de ratón (Sigma) como anticuerpo secundario en 200µl de solución bloqueo. Por último, se realizan tres lavados más con la solución de bloqueo.

Las células se montaron en los portaobjetos con medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector laboratories). Las imágenes de inmunofluorescencia se visualizan en un microscopio Olympus BX-60 y las imágenes de contraste de fase fueron tomadas con un Olympus (Center Valley, PA, EE.UU.), microscopio invertido IX70 con un objetivo de 20x y una cámara Olympus C-5060.

4.5 Inmunoprecipitación

4.5.1 Preparación de la muestra

Después del tratamiento, las células adheridas en la placa fueron tripsinizadas y lavadas con PBS junto con las células en suspensión. Después fueron lisadas con 500µl de solución CHAPS de inmunoprecipitación con inhibidor de proteasas (Complete protein inhibitors, Roche) durante 30 minutos en hielo. Después se centrifugan 15 minutos a 15000 g y se recoge el sobrenadante para cuantificar la concentración de proteína. Una concentración 1/10 fue guardada para el control (input).

4.5.2 Acoplamiento de las bolas magnéticas al anticuerpo

Por otro lado, se lavan 30 µl de proteína G en bolas magnéticas (Millipore) con solución de inmunoprecipitación sin CHAPS por tres veces. Después se incuban con 1ml de solución CHAPS con 2µg de anticuerpo durante 4 horas a 4°C y en agitación.

4.5.3 Inmunoprecipitación

Las bolas se lavan una vez con tampón de lavado.

Se incubó un extracto total de 500 µg por condición con la solución de bolas y los 2 µg de anticuerpo, hasta llegar a un volumen final de 1ml a 4°C en agitación.

Al día siguiente, las bolas se lavaron por tres veces con solución de lavado descartando el sobrenadante y después se incubaron con 45 µl de tampón de inmunoprecipitación que contiene un 2% SDS (400 µl tampón de lavado + 100 µl SDS 10%) y 15 µl de tampón de carga Laemmli, durante 10 minutos a 95°C. Las proteínas eluidas se cargaron en un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida.

- Anticuerpos utilizados para inmunoprecipitación (2µg/condición)

Proteína	Origen	Concentración	µl /2µg	Casa comercial
Mcl-1	Conejo	0.2 µg/µl	10	Santa Cruz, sc-819
Bak	Conejo	1 µg/µl	2	Upstate, clone NT
Bcl-xL	Conejo	1 µg/µl	2	Cell Signaling, 2764
Bcl-2	Conejo	0.2 µg/µl	10	Becton, 550847
Noxa	Ratón	1 µg/µl	2	Calbiochem, OP180
Bim	Conejo	0.5 µg/µl	4	BD, Pharmingen, 559685

- Tampones utilizados para inmunoprecipitación

Tampón CHAPS	Tampón de lavado
2% CHAPS	20 mM Tris/HCl (pH 7.4)
20 mM Tris/HCl (pH 7.4)	137 mM NaCl
137 mM NaCl	2 mM EDTA
2 mM EDTA	10% glicerol
10% glicerol	

4.6 Medición de los niveles de ATP

Las células se sembraron a dos concentraciones diferentes al 80% y al 60% en placas de pocillos de 96. Tratamos y se realizó la medida siguiendo el protocolo de ATP1lite de Perkin Elmer.

4.7 Medidas de detección de muerte celular

El citómetro utilizado es un Becton Dickinson (FACScalibur) en los servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona, Campus de Bellvitge y FACS Gallios de Beckman Coulter de los servicios del IDIBELL.

4.7.1 Análisis del ciclo celular mediante sub-G1

Hay ciertas características de las células apoptóticas que pueden ser identificadas y utilizadas para la detección de células apoptóticas dentro de una población de células sanas. Técnicamente, lo más fácil de detectar es la pérdida de ADN de las células permeabilizadas debido a la fragmentación del ADN.

Cuando las células se permeabilizan, con etanol al 70%, los fragmentos de ADN salen de la célula. El resultado es una población de células con un contenido de ADN reducido. Después, si las células se tiñen con un intercalante de ADN como el yoduro de propidio, en el perfil de ADN que representa el citómetro (células en G1, fase S y G2/M) se observa que las células apoptóticas se representan en una población que se ve a la izquierda del pico de G0/G1.

Para el análisis de sub-G1, tanto las células en suspensión como las células adheridas a la placa, fueron recogidas por tripsinización, lavando antes con PBS + EDTA 0.5M. Posteriormente, se centrifugan a 450 g durante 7 minutos, se lavan con PBS una vez y se resuspenden en 100µl de PBS, añadiendo

etanol al 70% (900 μ l, echándolo gota a gota, vorteando cuidadosamente). Después, se incuban durante 1-10 días a -20°C .

Para los experimentos de transfección transitoria con proteínas fluorescentes, previo al lavado, la fijación se realizó en paraformaldehído al 4% disuelto en PBS, durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Posterior a la fijación, las células fueron lavadas dos veces en PBS, centrifugando a 550 rcf's durante 7 minutos, y se resuspendieron en PBS con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNAsa A durante 30 minutos a 37°C antes de analizarlas en el FACS.

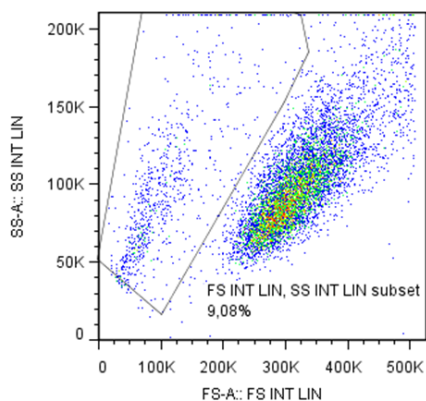
4.7.2 Análisis de células vivas y muertas por incorporación de Yoduro de propidio

Tras el tratamiento, tanto las células en suspensión como las células adheridas a la placa se recogen, se centrifugan a 450 g, 7 minutos y se resuspenden en PBS.

Cinco minutos antes de analizarlas en el citómetro se les añade 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio en un volumen de 300 μ l de PBS. El yoduro de propidio, un intercalante de ADN, es internalizado únicamente en las células muertas, por lo que todas las células positivas para yoduro estarán muertas. Con este método se mide muerte total.

4.7.3 Análisis por tamaño celular

No todas las líneas celulares producen corte de ADN a pesar de sufrir muerte apoptótica, por lo que no es posible medir la muerte a través del pico sub-G1. En estos casos se puede obtener un porcentaje de células muertas en función del tamaño, es decir FSC (forward scatter o dispersión frontal) y complejidad celular (side scatter o dispersión lateral).



4.7.4 Actividad caspasa

La caspasa-3 es un miembro de la familia de las caspasas que juega un importante papel como mediador de la muerte celular programada. Después de su activación, la caspasa-3 corta una gran variedad de proteínas celulares, causando cambios morfológicos y funcionales en las células que llevan a cabo la apoptosis.

El ensayo de la Caspasa-3 permite una cuantificación rápida y eficaz de la actividad de ésta enzima. Para ello se utiliza un sustrato no fluorescente para la enzima, que produce un producto fluorescente si está activa.

Ac-DEVD-AMC es un sustrato sintético tetrapéptido fluorogénico para caspasa-3 y contiene la secuencia de aminoácidos del lugar de escisión para PARP en Asp-216. PARP comprende una familia de proteínas implicadas en diferentes procesos celulares, principalmente en la reparación del ADN.

El sustrato tetrapéptido se puede utilizar para identificar y cuantificar la actividad de la caspasa-3 en las células apoptóticas. Cuando la caspasa corta el tetrapéptido entre D y AMC, libera el fluoróforo AMC que se puede cuantificar en el espectrofluorómetro.

Tras el tratamiento, las células fueron tripsinizadas, lavadas en PBS y centrifugadas a 4500 rpm 10 minutos a 4°C. Después se lisaron con el tampón de lisis (ver tabla), incubando 10 minutos en hielo. Se centrifugan a

13000 rpms otros 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se alicuota y se guarda a -80 °C. 20 µg de proteína se mezclan en un volumen de 150 µl de tampón de reacción más el substrato (AC-DEVD-amc) a una concentración final de 20 µM.

Tras incubar dos horas a 37°C en oscuridad, se miden en el fluorímetro. AMC se excita a una longitud de onda de 300 nm, y emite en el rango de 430-460 nm.

Se define una unidad de actividad Caspasa 3 como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de 1 unidad arbitraria en el fluorímetro después de 2 horas de incubación con la mezcla de reacción. El resultado se expresa en unidades de actividad caspasa-3 por µg de proteína.

- Tampones utilizados para la técnica de medición de Actividad caspasa-3

Tampón de lisis	Tampón de reacción
5 mM Tris-HCl pH 8	Hepes 1 M pH 7'5
20 mM EDTA	Glicerol 87 %
0'5 % TRITÓN- x 100	DTT 1M
Agua Mili Q	Agua Mili Q

4.8 Transfecciones de ADN y ARN, plásmidos y generación de líneas celulares

4.8.1 Transfecciones transitorias

a.-Transfecciones transitorias de ADN exógeno

Para transfectar las diversas líneas celulares, las células al 50% de confluencia, fueron lavadas con DMEM sin suero ni antibiótico e incubadas 6 horas con

una mezcla de 2µl/ml de Lipofectamina 2000 y plásmido (cantidad variable dependiendo del plásmido) en medio DMEM sin antibiótico y sin suero. La mezcla se incuba durante veinte minutos a temperatura ambiente antes de añadirla a las células. La mezcla de transfección se incuba con las células durante 6-7 horas a 37°C y 5% CO₂. Después se llevan a cabo los ensayos correspondientes.

b.-Transfecciones transitorias de ARN de interferencia

Estos ARNs de interferencia o siRNAs, consisten en moléculas de ARN bicatenario perfectamente complementarias de aproximadamente 20 o 21 nucleótidos (nt) con 2 nucleótidos desemparejados en cada extremo 3'; Basándonos en la secuencia complementaria de un gen en particular, son transfectados con la finalidad de reducir significativamente su expresión.

Sembramos las células en placas de 6 o 10 cm de diámetro, dependiendo de la cantidad de células transfectadas que necesitemos. La confluencia de las células dependerá de la línea celular. Si son de rhabdomyosarcoma se siembran a un 30% de confluencia para transfectarlas a un 50%, ya que crecen más lento. Si son HeLa o fibroblastos embrionarios de ratón, se siembran al 10% de confluencia para transfectarlas al 50%.

Diferenciamos las transfecciones según el reactivo que utilizemos para transfectar, ya sea mediante Lipofectamina o con Dharmafect 1.

- Transfecciones con Lipofectamina 2000 (Invitrogen):

Las células sembradas en placas de 6 cm, se lavan con medio DMEM sin suero y sin antibióticos. Mientras, en un eppendorf se mezclan durante 5 minutos a temperatura ambiente, 150 µl de DMEM con 3 µl de Lipofectamina (1µl/0.5ml). En otro eppendorf, se mezclan 150 µl DMEM con 100 nmol/L del oligo. Después se juntan ambas mezclas durante 20 minutos y se añade a las células que tendrán 1200 µl de DMEM con 10% de FBS. A las

6 horas de incubación, se cambia el medio por medio completo, con suero y antibióticos.

- Transfecciones con DharmaFECT 1 (Dharmacon) :

Después de lavar las células con DMEM sin antibiótico y sin suero, las células son incubadas con DMEM sin antibióticos durante 8 horas (6 horas para Mcl-1) con el ARN de interferencia a una concentración de 100 nmol/L premezclado con DharmaFECT 1 (Dharmacon) a una concentración de 1.5µl/0.5ml.

- siRNAs utilizados para el estudio de silenciamiento de proteínas

Proteína a silenciar	Secuencia de ARN de interferencia
Bim	5'-GCACCCAUGAGUUGUGACA-3'
Noxa	5'-GGUGCACGUUJUCAUCAAUU-3'
Noxa (2)	5'-GCTACTCAACTCAGGAGATTT-3'
Mcl-1	5'-AUAACACCAGUACGGACGGG'-3'
Mcl-1 (2)	5'-UCAAAAAGAAACGCGGUAAU-3'
Bcl-xL	5'-ACAAGGAGAUGCAGGUUUUU-3'
HIF-1alpha	5'-GCCACTTCGAAGTAGTGCT-3' 5'-CCTATATCCCAATGGATGATG-3'
ATF4	5'-GCCUAGGUCUCUUAGAUGA-3'
pBlue (oligonucleótido irrelevante como control)	5-GUAAGACACGACUUAUCGC-3
pBlue-FITC	La misma secuencia unida a un fluorocromo para medir la eficiencia de transfección

4.8.2 Transfecciones estables

a.-Por selección con antibiótico

Tras 24h de una transfección transitoria, las células se tratan con el antibiótico de selección específico del plásmido. De esta manera se selecciona la población de células positivas que contienen el plásmido de interés.

Las células transfectadas siguiendo este método fueron las Rh4-Bcl-xL seleccionadas con puromicina.

b.-Por infección retroviral

Para infectar las células, primero es necesario producir partículas víricas. Para ello se transfectaba, de forma transitoria, la línea celular empaquetadora de virus 293T con el plásmido de interés que lleva un promotor retroviral, más dos plásmidos necesarios para empaquetar Hit 60 (plásmido de expresión MoMuLV-gagpol) y pCG (VSV-G expresión de la cápside). A las 24h y 48h se recogían los sobrenadantes que contienen las partículas infectivas y se filtraban con un filtro de 0,45 μm . El sobrenadante se puede alicuotar y congelar a -80°C .

El protocolo de infección para una placa de 10 cm con un 50-60% de confluencia se realizaba mezclando 5 ml de medio DMEM con 10% v/v FBS, con 1ml de sobrenadante infeccioso y 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *polybrene* (*Hexadimethrine bromide*, Sigma). A las 4 o 6 horas se retiraba el medio y se substituía por medio normal. También se puede dejar la incubación con polybrene toda la noche. A la mañana siguiente se les cambia por medio fresco, y se vuelve a incubar con el sobrenadante que recogimos a las 48 horas de la transfección.

Para seleccionar las células infectadas con el plásmido de interés, después de 48 horas de la infección, se realiza mediante un antibiótico de selección (zeocina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, invitrogen) durante 48 horas.

Las células transfectadas de esta manera fueron HeLa-LC3 y Rh4-LC3.

4.9 Transformación de bacterias y Purificación de ADN plasmídico

La transformación de células competentes se realizaba por choque térmico para introducir el ADN plasmídico en células procariontas. El protocolo consiste en mezclar el ADN, unos 10ng de plásmido, con 50 μ l de células competentes incubándolo durante 30 minutos en hielo. A continuación se realizaba un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos y se enfriaba inmediatamente en hielo durante 2 minutos. Después se añadía 450 μ l de LB sin antibiótico y se dejaba a 37°C durante 1 hora a 250 rpm. A continuación se sembraba una décima parte de un ml de cultivo en placas de LB con el antibiótico determinado para seleccionar. El crecimiento bacteriano en las placas se realizaba en una estufa de 37°C toda la noche.

Los antibióticos se preparaban según indicaciones de la casa comercial:

-Ampicilina, (Sigma) fue preparada a un stock de 100 mg/ml (1000X) en ddH₂O, o 50 mg/ml stock (500x)

-Kanamicina (Sigma) fue preparada a un stock de 50 mg/ml (1000X) en ddH₂O.

Al día siguiente, se pica una colonia y se introduce en 2ml de LB con el antibiótico apropiado. Se deja en agitación a 37°C durante 6horas o toda la noche, hasta llegar al crecimiento exponencial de las bacterias. Se reservaba una alícuota de bacterias transformadas a una concentración final de 20% de glicerol y se almacenaba a -80°C.

Con el fin de conseguir más material, se realizaba un cultivo de 100ml de LB con el antibiótico determinado. Se inoculaban 100 μ l del cultivo anterior y se crecían a 37°C durante toda la noche a 250 rpm. Al día siguiente se realizaba

la extracción de ADN con *PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Cepas bacterianas utilizadas en el proceso de transformación.

Bacterias competentes	Casa comercial
HB101 competentes	Promega
JM-109	Promega

- Construcciones utilizadas

Construcción	Línea utilizada	Técnica	Selección	Proteína
pBABE-Bcl-xL de Dr. J. Goldstein	Rh4	Transfección estable con selección antibiótico	Puomicina 0.5µg/ml	Bcl-xL
LZRS-IRES-GFP LC3	HeLa Rh4	Transfección estable con retrovirus	Zeocina 1µg/ml	LC3-GFP
pcDNA- Bcl-xL de Dr. J-E. Ricci (Inserm, Niza)	Rh4	Transfección transitoria		Bcl-xL
pcDNA-Mcl1 de Prof. Seamus Martin (TCD, Irlanda),	Rh4	Transfección transitoria		Mcl1
Histona 2B-GFP de Dr.R Agami de (TheNetherlands Cancer Institute, Amsterdam)	Rh4	Transfección transitoria		Histona 2B-GFP

4.10 RT-PCR

- Cebadores utilizados para amplificar los productos de PCR

ADN	Secuencia
α -actina	Sentido 5'-CGGGACCTGACTGACTACCTC-3' Antisentido 5`-CTTCATTGTGCTGGGTGC-3'
Noxa	Sentido 5' CTCGACAAAAGCGTGGTCTC-3' Antisentido 5`-CAACTGGAGCACCTCGGAC-3'
Mcl-1	Sentido 5' GAGGAGGACGAGTTGTACCGG-3' Antisentido 5`-CAGACCTGCCATTGGCTT-3'

4.10.1 Retrotranscripción de ARN

La retrotranscripción es el proceso por el cuál se sintetiza una cadena simple de ADN complementario (cDNA) a partir de una cadena simple de ARN utilizando una transcriptasa inversa. Se retrotranscribieron 3 μ g de ARN total utilizando la transcriptasa reversa SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). El ARN total se extrajo mediante el Nucleospin RNA II Kit (MACHEREY-NAGEL)

Condiciones generales de retrotranscripción:

Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de Ciclos
Desnaturalización de ARN	65°C	5 minutos	1
Síntesis cDNA	50°C	60 minutos	1
Inactivación de la transcriptasa	85°C	5 minutos	1

El cDNA resultante de la reacción se utilizó como molde para las PCRs.

Para cada conjunto de cebadores, el número de ciclos se ajustó de modo que los extremos de la reacción cayeron dentro de la fase exponencial de amplificación del producto, proporcionando así una estimación semicuantitativa de la abundancia de ARNm relativa.

4.10.2 Amplificación por PCR de los genes de interés

La *Polymerase Chain Reaction* es una técnica desarrollada por K.Mullis en 1984, que permite amplificar ADN a partir de pocas copias y aumentar la cantidad varios órdenes de magnitud. Se produce a través de una polimerasa termoestable y cebadores específicos que limitan la extensión de amplificación.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 μ l y las concentraciones finales de los componentes de la mezcla de reacción dependían de la polimerasa utilizada.

Concentraciones generales de la reacción con Pfu ADN polimerasa
(Promega)

cDNA < 250 ng

0,2 μ M de cada uno de los cebadores

0,4 mM dNTP

Agua libre de nucleasas hasta 50 μ l

Condiciones generales de amplificación de los genes

Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94°C	15 segundos	25-35
Hibridación	X°C(1)	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión Final	72°C	7 minutos	1
Mantenimiento	4°C	∞	1

X°C(1) La temperatura de hibridación varía según la secuencia de cebadores que se utiliza, la temperatura de hibridación se aproxima a través de la fórmula: $T_a(^{\circ}\text{C}) = (4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})) + (2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}))$

Los productos de PCR se corrieron en 50 ml de gel de agarosa al 1%, disuelto en solución TAE al 1X, con 5µl BrEt 1mg/ml.

Tampón TAE 50X
242 g Tris Base
100 ml EDTA 0,5 M pH 8
57,1 ml Ácido Acético Glacial (Panreac)
Agua Mili Q 1L

4.11 Microscopía electrónica

Se sembraron las células al 10% para tratar al 60% aproximadamente. Tras el tratamiento se recogieron las células en suspensión, se fijaron con glutaraldehído al 5% en un tampón 0.1M pH 7.4 a 4°C durante 10 minutos y después 2 horas con glutaraldehído al 2.5%. Después de la fijación las muestras se pusieron en un tampón con un 1% de tetraóxido de Osmio, deshidratadas en gradiente de etil alcohol y embebidas en resina Spurr.

V. Discusión

5.1 La privación de glucosa induce apoptosis o necrosis dependiendo de la línea celular

Se ha descrito que la privación de glucosa puede inducir necrosis o apoptosis dependiendo de la línea celular. La apoptosis es una muerte controlada y necesita de actividad caspasa. Cuando las células mueren por apoptosis, éstas son fagocitadas evitando la extravasación del contenido citoplasmático. Sin embargo, durante la necrosis, la rotura de la membrana plasmática de la célula induce a inflamación. Durante muchos años se creyó que la necrosis consistía en un proceso totalmente pasivo. Recientemente han surgido estudios que evidencian lo contrario. Sabemos que la necrosis no puede ser bloqueada por inhibidores de caspasas. Pero existe la necroptosis, una forma de muerte necrótica independiente de caspasas y dependiente de RIPK1/3 (Christofferson and Yuan 2010). Así las nuevas clasificaciones (Galluzzi, Vitale et al. 2011) consideran también a la necrosis como un proceso controlado en algunos casos. Como decíamos en la introducción, muchas células mueren por apoptosis mitocondrial tras ser privadas de nutrientes. Pero los tumores han ido adquiriendo diferentes mecanismos de adaptación a través de la sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas o mutaciones en Bax y Bak. Por ello pensamos en empezar a estudiar la privación de glucosa en células DKO.

Como hemos visto en los resultados, la privación de glucosa induce muerte dependiente de caspasas en estas células y están protegidas totalmente en presencia de Q-VD. Mientras que en fibroblastos silvestres (WT), el Q-VD es incapaz de proteger totalmente la producción de sub-G1. ¿Por qué? Los cardiomiocitos adultos humanos, durante el desarrollo bajan los niveles de algunas proteínas apoptóticas como Bax o Apaf-1 lo que les hace ser más resistentes a apoptosis (Bahi, Zhang et al. 2006). Los cardiomiocitos que son expuestos a isquemia mueren de una forma necrótica, independiente de

caspasas pero con permeabilización mitocondrial y liberación de endonucleasa G responsable de la degradación del ADN. Otra forma de muerte independiente de caspasas pero con permeabilización mitocondrial es lo que ocurre tras isquemia en células neuronales. Una de las proteínas liberadas a través de los poros mitocondriales es AIF (apoptosis inducing factor). La muerte inducida por AIF en neuronas es un proceso independiente de caspasas y podría servir como una muerte alternativa después de la caída de energía. De hecho la bajada de ATP promueve la liberación de AIF, que se transloca al núcleo y causa fragmentación del ADN y condensación de cromatina periférica (Broughton, Reutens et al. 2009), algo diferente a la condensación global de cromatina que observamos tras actividad caspasa.

Entonces, podría ser en nuestro caso, que algunas células wt de fibroblastos murinos, promovieran liberación de endonucleasa G tras la permeabilización mitocondrial o AIF. Éstas serían responsables del perfil subG1 que observamos, pero sin actividad caspasa.

Además de estudiar la muerte en células de fibroblastos murinos deficientes o no en Bax y Bak, también nos interesó la muerte tras privación de glucosa en otros tipos celulares. Sorprende ver como cada línea actúa de manera distinta. Mientras que las HeLa mueren por apoptosis, las células de rhabdomyosarcoma Rh4 y Rh30 mueren de forma independiente de caspasas. No sabemos qué es lo que hace inducir apoptosis o necrosis en las células tras la privación de glucosa y habría que estudiar cada situación en concreto para descifrarlo. Pero es probable que los niveles de ROS, el balance de antioxidantes, y la bajada de ATP sean determinantes para que una célula vaya hacia un proceso u el otro. Se conoce que las especies reactivas de oxígeno, ROS que frecuentemente se producen tras la privación de nutrientes, son causa de necrosis (Ahmad, Aykin-Burns et al. 2005; Broughton, Reutens et al. 2009). De hecho es lo que ocurre en algunas

situaciones de isquemia. Además la falta de nutrientes también induce a una bajada en los niveles de NADPH como poder reductor. Por ello, el balance entre $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}$ y la producción masiva de ROS tras la privación de nutrientes podría determinar que una célula se dirigiera hacia apoptosis o hacia necrosis.

También la bajada de ATP puede hacer que una célula muera por necrosis tras un estímulo propiamente apoptótico. Digamos que la apoptosis se describe como una forma de muerte más activa, dependiente de ATP, mientras la necrosis es más pasiva. La muerte por apoptosis o necrosis dependería del ATP disponible en la célula tras la privación de nutrientes. Un ejemplo lo tenemos en un estudio con células Jurkat (Leist, Single et al. 1997; Ferrari, Stepczynska et al. 1998), dónde al privarlas de glucosa y bloquear la respiración, las células morían por necrosis tras el tratamiento con inductores apoptóticos como la estaurosporina. Pero posiblemente en este caso tan extremo, el ATP no sea el único componente y la concentración de ROS sea realmente alta lo que haría promover el cambio de apoptosis hacia necrosis. También podría ser que la muerte que observamos fuese un tipo de necrosis, independiente de caspasas, por autofagia, pero lo discutiremos más adelante (Elgendy, Sheridan et al. 2011).

5.2 La caspasa iniciadora, caspasa-8, está implicada en la muerte tras privación de glucosa

Los estudios que realizamos con el siRNA de caspasa-8 nos indican que esta caspasa está implicada en la muerte por privación de glucosa tanto en las DKO como en las HeLa. A ello se suman otros experimentos realizados en el grupo previamente que corroboran la hipótesis. Se realizaron experimentos con shRNA y selección de clones que expresaban menos caspasa-8. Éstos quedaban protegidos totalmente por TNF y bastante tras el tratamiento por privación de glucosa. Además se expresó la proteína viral CrmA, que inhibe

selectivamente a las caspasas-1 y 8 y también estaban protegidas de la privación de glucosa. Sin embargo no sabemos qué es lo que activa caspasa-8. Se realizaron diversos experimentos. La sobre-expresión de FLIP, un inhibidor competitivo de la caspasa-8, no protegía (Caro-Maldonado, Tait et al. 2010). Se silenció RIPK1, sin tener tampoco ningún efecto. Y sobre cIAP1, se observó una bajada de los niveles. También se estudió otra plataforma de activación de caspasa-8, FADD. Pero a pesar del uso de varias secuencias de ARN de interferencia, fue difícil bajar en su totalidad los niveles de la proteína. Así, el siRNA de FADD no protegía de la privación de glucosa, pero tampoco de TNF. De modo que es necesario el estudio de otras posibles plataformas responsables de la activación de caspasa-8 (Caro-Maldonado, Tait et al. 2010).

5.3 La 2-DG como inhibidor del metabolismo glicolítico en rabdomyosarcomas

5.3.1 Diferentes respuestas al tratamiento por 2-DG entre rabdomyosarcomas alveolares y embrionales

Los rabdomyosarcomas constituyen los sarcomas de tipo pediátrico más comunes (23%) y un 7% de los tumores pediátricos. Son muy agresivos y una quimioterapia efectiva sería necesaria (Stevens 2005). Como decíamos en la introducción, se dividen según sus características histológicas en dos, embrionales un 60% con mejor prognosis y alveolares un 30% con peor prognosis. Estos últimos tienden a desarrollar metástasis, lo que hace disminuir la eficiencia del tratamiento y la supervivencia de los pacientes. En nuestro estudio describimos la eficiencia de la 2-deoxiglucosa como inhibidor del metabolismo glicolítico contra los rabdomyosarcomas alveolares. Los rabdomyosarcomas alveolares están asociados en muchos casos con una única translocación recurrente, fusionando los factores de transcripción

PAX3 o PAX7 con genes FKHR (Foxo1). La fusión de PAX-FKHR característica de los rhabdomiomas alveolares se ha visto que altera la expresión de múltiples enzimas metabólicas y de diferenciación que podría explicar la diferencia de sensibilidad que observamos al compararlos con los embrionales. Por ejemplo CNR1, el receptor de cannabinoides 1 necesario en el desarrollo del cerebro y el tubo neurona. Diferentes genes relacionados con la diferenciación miogénica como enolasa 3 o el receptor de α -2A adrenérgico. Genes relacionados con la señal miogénica de la familia TGF β como BMP5. Genes relacionados con el metabolismo como arginosuccinato sintetasa o la proteína O-manosil transferasa 1 (POMT1) necesaria para transferir residuos de manosa en el retículo y que se encuentra mutada en otros desordenes musculares. Todos estos genes se encuentran sobre-expresados en rhabdomiomas alveolares (Lae, Ahn et al. 2007).

Otra posibilidad que nos podría explicar la diferencia de sensibilidad a la 2-DG entre alveolares y embrionales sería p53. p53 está asociado al daño al ADN y también a otros estreses de la célula como cambios metabólicos, privación de nutrientes, o concentraciones de oxígeno reducidas (Johnson and Perkins 2012). Por ejemplo, p53 puede activarse a través de AMPK en respuesta a los niveles de ATP/ADP o por el enzima del ciclo de Krebs, malato deshidrogenasa en respuesta a la privación de glucosa. p53 promueve la fosforilación oxidativa y decrece la glicolisis de diferentes formas. Por ejemplo promoviendo a TIGAR, (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator), un gen que bloquea el paso de fructosa-6-fosfato a fructosa-2,6-bifosfato, bloqueando así la glicolisis y reduciendo los niveles de ROS internos. p53 también incrementa la fosforilación oxidativa a través de la sobre-expresión del gen SCO2, o citocromo c oxidasa 2. Y regula otros genes del metabolismo de la glucosa como la hexoquinasa II o los transportadores de glucosa GLUT 1, 3 y 4 (Kawauchi, Araki et al. 2008; Vousden and Ryan 2009). Y lo más importante es que en ausencia de p53 las células se mueren

al no poder parar el ciclo en el punto de control (“check point”) metabólico. Las 3 líneas de rhabdomiocarcinoma alveolar utilizadas son mutantes en p53 (Ganjavi, Gee et al. 2005) y esto concuerda con la idea de que p53 protege a las células del estrés metabólico (Jones, Plas et al. 2005). También, uno de los genes sobre-expresados en rhabdomiocarcinoma embrionario es VRK3 (Vaccia-related kinase 3) que forma parte de una familia de quinasas que regula la estabilidad de p53 durante la proliferación (Vega, Sevilla et al. 2004). Para comprobar si el estado de p53 podría explicar las diferencias, utilizamos las células de rhabdomiocarcinoma embrionario RD que son deficientes en p53. Aún así son todavía insensibles al tratamiento con 2-DG. Este resultado tiene que ser estudiado más a fondo. Pueden existir propiedades intrínsecas de cada línea de sarcoma, por ejemplo en un estudio realizado recientemente sobre las diferencias en expresión génica de alveolares y embrionales, destacan que la mitad de los genes sobre-expresados en líneas de tumores alveolares, también lo están en las células RD y viceversa, genes-sobreexpresados en líneas embrionales no lo están en RD y eso podría también estar afectando también a la sensibilidad de estas células en concreto (Lae, Ahn et al. 2007). Sería interesante realizar otros experimentos como la sobre-expresión de p53 en las células de rhabdomiocarcinoma alveolar y ver qué ocurre tras el tratamiento con 2-DG.

Otra de las proteínas determinantes que podría explicar la diferencia entre alveolares y embrionales es HIF1- α . HIF no solo actúa como un regulador de los cambios de oxígeno, también se activa con alteraciones de los niveles de ROS y cambios en el metabolismo. HIF también regula la glicólisis, sobre-expresando algunos transportadores de glucosa como GLUT1, 3 y hexoquinasa 1 y 2 y enzimas como la lactato deshidrogenasa (Semenza 2010). Según nuestros resultados, HIF no parece ser responsable de la diferente respuesta a 2-DG en las células. Ninguna de las líneas observadas, ni alveolares ni embrionales presentaba niveles diferentes de HIF sin

tratamiento ni tras el tratamiento con 2-DG. Cuando hicimos el silenciamiento de HIF en A204 no observamos nada de muerte. Sin embargo sí que observamos una muy pequeña sensibilización a la 2-DG en células Rh4 cuando silenciamos HIF-1 α . Ésto concuerda con los resultados observados por otros investigadores donde HIF-1 confiere resistencia al tratamiento antitumoral (Piret, Mottet et al. 2002; Unruh, Ressel et al. 2003) y protege a las células de la muerte inducida por 2-DG en situaciones de hipoxia (Maher, Wangpaichitr et al. 2007). En este estudio explican que como HIF incrementa los enzimas glicolíticos, y algunos son diana de la 2-DG, es necesario más cantidades de 2-DG para inhibir la glicolisis y eso es lo que confiere resistencia al tratamiento. Sin embargo podríamos haber esperado el resultado inverso, puesto que HIF aumenta los transportadores de glucosa, más 2-DG sería capaz de entrar en la célula, provocando más muerte.

Podríamos haber estudiado otras vías que podrían explicar la diferencia que observamos, como NF-kB. Por ejemplo, Mauro y sus colegas demostraron que tras la privación de glucosa en fibroblastos murinos de ratón MEFs, RelA la subunidad de NF-kB activa el promotor de p53 incrementando la fosforilación oxidativa y disminuyendo la glicolisis (Mauro, Leow et al. 2011). Pero en este caso, sería necesario que p53 fuera funcional y no es el caso de las células que hemos estudiado. Sin embargo, RelA, también puede promover la glicolisis pero en situaciones de pérdida de p53. En estas condiciones, NF-kB promueve la expresión de transportadores de glucosa GLUT3 en células tumorales resultando en un incremento del consumo de glucosa y producción de lactato (Kawauchi, Araki et al. 2008; Vousden and Ryan 2009). Sería interesante estudiar la vía de NF-kB, así como los transportadores de glucosa para determinar diferencias entre las células. Pero son objetivos muy amplios para abarcar en mi tesis.

5.3.2 Muerte apoptótica y estrés reticular en células de rabdomiosarcoma tras el tratamiento por 2-DG

La privación de glucosa y la 2-deoxiglucosa promueven muerte de diferente manera. En relación a la muerte de los rabdomiosarcoma, cabe destacar una idea bastante importante. Las células responden de forma diferente a la privación de glucosa o a la 2-DG. Mientras que en la primera situación los rabdomiosarcoma Rh4 o Rh30 mueren por necrosis, tras el tratamiento con 2-DG la muerte es por apoptosis. La 2-deoxiglucosa es ampliamente utilizada como un mimético de privación de glucosa. Sin embargo, creemos que la toxicidad de la 2-DG puede llevar a efectos que son diferentes a los encontrados por ausencia de glucosa. Sabíamos por otros estudios que la 2-DG y la privación de glucosa no eran igual (Kang and Hwang 2006). En este último, las células HeLa respondían diferente a nivel de O-glicosilación de proteínas, que corresponde a un 2-3% de la glucosa de la célula. Mientras que la 2-DG inhibe la N-glicosilación, incrementa la O-glicosilación. También la actividad del proteosoma variaba dependiendo si eran tratadas con 2-DG o bajos niveles de glucosa.

Sin embargo, en general la 2-DG produce los mismos efectos a nivel de activación de AMPK e inactivación de mTOR. Nosotros hemos mirado la actividad de mTOR por western blot tras el tratamiento con 2-DG en las Rh4 y observamos esa inactivación. Aunque sería interesante también ver qué sucede con AMPK y mTOR tras la privación de glucosa.

La 2-DG inhibe la glicolisis y la utilización de glucosa para ATP y ácidos grasos, pero puede ser metabolizada en algunos casos por la vía de pentosas fosfatos (Zabos, Kyner et al. 1978). Pero el bloqueo catalítico no puede explicar por si solo la toxicidad de la 2-DG. Por ejemplo Ralser y sus colegas demostraron que cambios en la concentración de azúcares-fosfato eran

iguales tanto en células humanas resistentes a la 2-DG como en células que no lo eran (Ralsler, Wamelink et al. 2008).

Nuestros experimentos indican que el estrés reticular media la muerte por 2-DG en los rhabdomyosarcoma, por que la manosa, que revierte los efectos de la 2-DG en la glicosilación de proteínas, protege de la muerte.

Cuando exploramos la vía de PERK, una de las vías de la UPR, observamos que el tratamiento con 2-DG provocaba la fosforilación de eIF2 α , la inducción de ATF4 y un incremento en chaperonas Grp58, Grp78 y Grp94. Aunque no hemos podido detectar PERK. La fosforilación de eIF2 α puede provocar la inhibición de la síntesis proteica, aunque favorece la traducción de ATF4 (ver introducción). Así pues, la vía de PERK podría estar minimizando el estrés, provocando una inhibición transitoria de la síntesis de proteínas y reduciendo la cantidad de proteínas que entran en el lumen del retículo. Además la inhibición de ATF4 parcialmente previene de la apoptosis, posiblemente al estabilizar los niveles de Mcl-1. En relación a esto último, no sabemos como ATF4 regula los niveles de Mcl-1. Un reciente estudio en células mieloides indican que la inhibición del proteosoma promueve la activación de ATF4 que induce la transcripción de Mcl-1 (Hu, Dang et al. 2012), sin embargo en nuestro caso, ATF4 inhibe la acumulación de Mcl-1. Sería interesante hacer experimentos inhibiendo el proteosoma y ver si los niveles de Mcl-1 se ven alterados.

Por otro lado, y siguiendo con lo anterior, el hecho de que la manosa no revierta los niveles de ATP nos indicaría que no está siendo metabolizada. De hecho otros estudios realizados también indican que la citotoxicidad de las células al tratamiento por 2-DG viene dado por su interferencia en la N-glicosilación y no únicamente por la inhibición de la glicolisis (Kurtoglu, Gao et al. 2007). Siguiendo esta línea, mostramos que la tunicamicina, que como la 2-DG induce a estrés reticular inhibiendo la N-glicosilación, también promueve la pérdida de Mcl-1 y la inducción de Noxa.

5.3.3 Proteínas BH3 y muerte por 2-deoxiglucosa

A pesar de ser utilizada en ensayos clínicos, el mecanismo apoptótico de la 2-DG nunca había sido estudiado.

Como decíamos en el apartado de introducción la privación de glucosa en algunas células como las hematopoyéticas es inhibida por Bcl2 y Bcl-xL y mediada por Noxa, Puma o Bim (Alves, Derks et al. 2006; Zhao, Coloff et al. 2008). Además, Strasser y sus colegas indicaron que Bim era esencial para la apoptosis inducida por estrés reticular en muchos tipos celulares, como en timocitos, o celulares epiteliales de mama y riñón (Puthalakath, O'Reilly et al. 2007). Pero es posible que otras proteínas BH3 sean necesarias en este proceso. Por ejemplo, Puma y no Bim, se sobre-expresa en células de neuroblastoma tras el estrés reticular (Steckley, Karajikar et al. 2007); también se ha demostrado que la supresión de Puma protege, aunque no completamente, de la muerte inducida por taspigargina, en células de cáncer de hígado, HCT116 (Reimertz et al, 2003). También, Puma, al igual que Noxa son críticos mediadores de la muerte inducida por estrés reticular en fibroblastos murinos de ratón (Li et al 2006).

Consistentemente con estos datos, nosotros observamos una inducción en Bim tras el tratamiento con 2-DG. Pero el ARN de interferencia que evitaba la acumulación de Bim, no afectaba a la muerte observada tras el tratamiento. En relación a Puma, nosotros no observamos una inducción de la proteína tras el tratamiento con 2-DG. Además parece que la inducción de Puma suele ser dependiente de p53 (Zhao, Coloff et al. 2008) y nuestras células de rhabdomyosarcoma alveolar son deficientes. Pero aún así, hubiese sido interesante estudiarla.

En nuestro estudio, la 2-deoxiglucosa induce estrés reticular a través de la activación de Noxa que también es crítico en la muerte celular.

Tanto la inducción de Noxa como la bajada de Mcl-1 parece ser consecuencia del estrés reticular ya que la manosa revierte ambos eventos y también la

muerte inducida por 2-DG. Este dato concuerda con otros donde se ha visto, que Noxa media también la muerte inducida por estrés reticular (Zhang, Lopez et al. 2011). También que el balance entre Noxa y Mcl-1 es crítico para la muerte y es algo observado por otros en células hematopoyéticas en situación de ausencia de glucosa (Alves, Derks et al. 2006).

Sabemos que Noxa se activa en células hematopoyéticas en respuesta a estrés en el metabolismo de la glucosa, influyendo en la captación y el flujo de glucosa (Lowman, McDonnell et al. 2010; Wensveen, Alves et al. 2011). Por ello nos surge aquí una pregunta, ¿Noxa está matando interfiriendo en el metabolismo o con su función de BH3? Posiblemente ambas. Noxa regula la entrada de glucosa en las células y puede derivarla a la vía de pentosas fosfato. Podría ser que también lo hiciera con la 2-DG. Sería interesante, por ejemplo medir los niveles de ATP tras el siRNA de Noxa.

Respecto a la regulación, nosotros no pudimos observar cambios en el mRNA de Mcl-1 ni de Noxa tras el tratamiento con 2-DG, a pesar de que otros colegas habían descrito la inducción del mRNA de Noxa/PMAIP1 en respuesta a 2-DG por mecanismos aún no descritos (Heminger, Jain et al. 2006). Los resultados tras el tratamiento con cicloheximida, un inhibidor de la traducción, indican que la regulación es post-transcripcional. La bajada de Mcl-1 podría ser debido a la inhibición de la traducción. Observamos la fosforilación de eIF2 α , que puede estar regulando los niveles de Mcl-1 (Fritsch, Schneider et al. 2007). También quisimos estudiar la contribución de mTOR en la bajada de Mcl-1. En otros estudios, se ha visto que la privación de glucosa activa AMP-K e inactiva a mTOR (Pradelli, Beneteau et al. 2010), lo que lleva a una bajada en los niveles de Mcl-1. Nuestros experimentos indican la bajada de los niveles de Mcl-1 acompañada de la inhibición de mTOR en respuesta a 2-DG.

En relación a las interacciones entre proteínas, según la figura de inmunoprecipitaciones, la función anti-apoptótica de Mcl-1 podría ser a

través del secuestro de Noxa y Bak. Podría ser que la bajada de Mcl-1 y su inactivación por Noxa, liberara a Bak. También Bcl-xL promueve la protección cuando es sobre-expresada, y además pudimos detectar una muy leve interacción de Bak con Bcl-xL. Sin embargo, tras el tratamiento con 2-DG no pudimos ver la liberación de Bak de Mcl-1 o de Bcl-xL. Es posible que exista una pequeña liberación pero el uso de anticuerpos nos detecte igualmente las interacciones.

Estos resultados evidencian por primera vez la implicación entre proteínas de la familia BH3 en la muerte inducida por 2-DG. La expresión de Noxa podría predecir la sensibilidad a las drogas anti-glicolíticas. Es posible que la 2-DG sea más eficiente en combinación con otras drogas y está siendo probada in vivo actualmente en el laboratorio.

5.4 Autofagia y metabolismo

Quisimos averiguar el papel de la autofagia tras el tratamiento con 2-DG y la privación de glucosa. Observamos que el uso de inhibidores de la autofagia como la cloroquina sensibilizaban a la muerte inducida por 2-DG y no lo hacían tras privar de glucosa a las células Rh4. Por otro lado utilizamos también la 3-metiladenina y observamos resultados contradictorios. El efecto de la 3-MA sobre la muerte al tratamiento por 2-DG en células Rh4 era más bien aditivo. Sin embargo, la 3-MA protegía de la ausencia de glucosa. Resultados similares encontramos en células DKO y HeLa. Cabe destacar que la 3-metiladenina es un inhibidor de la PI3K III, pero también de la PI3K I. La 3-MA suprime la autofagia a través de la inhibición de PI3KIII. Sin embargo la 3-MA puede actuar sobre otras quinasas y afectar otros procesos celulares, como el metabolismo del glicógeno o la acidificación lisosomal. Además, la 3-MA puede suprimir la proteólisis incluso en células deficientes en Atg5, lo que sugiere que los efectos sobre la degradación de proteínas no se quedan en su papel como

inhibidor de la autofagia. Existen estudios donde demuestran el papel dual de la 3-MA en la modulación de la autofagia (Wu, Tan et al. 2010). Aunque es capaz de suprimir la autofagia en condiciones de privación de nutrientes, el tratamiento continuado puede inducir autofagia. La 3-MA inhibe también como decíamos a la PI3K I, responsable de la activación de Akt y activación de mTOR, con la consecuente inhibición de la autofagia.

También la cloroquina podría sensibilizar a causa de afectar a otros procesos aparte de la macroautofagia. Esta droga es un inhibidor de la *bomba* H⁺/K⁺ ATPasa lisosomal, por lo que podría estar alterando las funciones lisosomales de otros procesos de la vía endosómica/lisosomal, como la autofagia mediada por chaperonas.

Puesto que teníamos resultados contradictorios con el uso de los dos inhibidores de la autofagia, quisimos ver si realmente existía flujo autofágico tras la privación de glucosa. Sorprendentemente, pudimos observar que mientras la 2-DG aumentaba el flujo de macroautofagia, la privación de glucosa no. Para determinar qué está sucediendo deberíamos hacer diferentes experimentos. Por un lado podríamos corroborar los resultados de flujo con ayuda de la construcción RFP-GFP-LC3. Esta construcción fusiona la molécula LC3 con RFP y GFP en tándem. La señal del GFP se pierde por el ambiente ácido de los lisosomas, mientras que la señal RFP continúa. Dependiendo de si el autofagosoma se fusiona o no con el lisosoma se puede determinar el flujo de macroautofagia. Por otro lado deberíamos realizar estudios a nivel genético. Es decir bloquear la autofagia mediante silenciamientos con siRNA de Beclina o Atg5/Atg7 y ver si sensibiliza a la muerte inducida tras el tratamiento con privación de glucosa o 2-DG.

Por otro lado, una hipótesis de lo que podría estar ocurriendo en nuestras células privadas de glucosa es que no hubiera suficiente ATP para iniciar o bien continuar el proceso de macroautofagia. Podríamos determinar los niveles de ATP en ambas situaciones, con 2-DG y privación de glucosa y ver si encontramos diferencias que podrían darnos una idea del porqué tras privación de glucosa parece no haber macroautofagia en comparación con 2-DG.

En este contexto tendríamos que analizar el estado de activación de mTOR, la proteína que actúa como sensor energético que regula la macroautofagia. Así podríamos determinar los niveles de fosforilación de proteínas diana como P-S6/P-S6K y ver si mTOR está activo o no. De esta manera podríamos saber si la autofagia ha sido iniciada o no.

Si bien, los resultados obtenidos hasta ahora en relación a la sensibilización con inhibidores de la autofagia a la muerte inducida por 2-DG, sugieren la posible combinación de 2-DG con inhibidores de la autofagia como terapia anti-tumoral.

IV. Conclusiones

1. La privación de glucosa induce apoptosis en fibroblastos murinos deficientes en Bax y Bak.
2. La privación de glucosa induce apoptosis dependiente de la caspasa-8 en fibroblastos murinos deficientes en Bax y Bak y en células humanas HeLa, pero otras líneas tumorales mueren por necrosis.
3. La 2-DG induce apoptosis por la vía mitocondrial en células de rhabdomiosarcoma alveolar.
4. La muerte apoptótica inducida en células de rhabdomiosarcoma alveolar es dependiente de Noxa.
5. La 2-DG provoca estrés reticular y como consecuencia activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).
6. La activación de ATF4 participa en la muerte celular.
7. La 2-DG induce autofagia protectora en células de rhabdomiosarcoma alveolar, mientras que la privación de glucosa no induce flujo autofágico.

VII. Bibliografía

- Ahmad, I.M., N. Aykin-Burns, J.E. Sim, S.A. Walsh, R. Higashikubo, G.R. Buettner, S. Venkataraman, M.A. Mackey, S.W. Flanagan, L.W. Oberley, and D.R. Spitz. 2005. Mitochondrial O₂*⁻ and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *J Biol Chem.* 280:4254-63.
- Alves, N.L., I.A. Derks, E. Berk, R. Spijker, R.A. van Lier, and E. Eldering. 2006. The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity.* 24:703-16.
- Arias, E., and A.M. Cuervo. 2010. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol.* 23:184-9.
- Armstrong, J.L., R. Flockhart, G.J. Veal, P.E. Lovat, and C.P. Redfern. 2010. Regulation of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by ATF4 in neuroectodermal tumor cells. *J Biol Chem.* 285:6091-100.
- Bahi, N., J. Zhang, M. Llovera, M. Ballester, J.X. Comella, and D. Sanchis. 2006. Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 281:22943-52.
- Bhaskar, P.T., V. Nogueira, K.C. Patra, S.M. Jeon, Y. Park, R.B. Robey, and N. Hay. 2009. mTORC1 hyperactivity inhibits serum deprivation-induced apoptosis via increased hexokinase II and GLUT1 expression, sustained Mcl-1 expression, and glycogen synthase kinase 3beta inhibition. *Mol Cell Biol.* 29:5136-47.
- Broughton, B.R., D.C. Reutens, and C.G. Sobey. 2009. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke.* 40:e331-9.
- Bump, N.J., M. Hackett, M. Hugunin, S. Seshagiri, K. Brady, P. Chen, C. Ferenz, S. Franklin, T. Ghayur, P. Li, and et al. 1995. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science.* 269:1885-8.
- Buzzai, M., R.G. Jones, R.K. Amaravadi, J.J. Lum, R.J. DeBerardinis, F. Zhao, B. Viollet, and C.B. Thompson. 2007. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res.* 67:6745-52.
- Cain, K., S.B. Bratton, and G.M. Cohen. 2002. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie.* 84:203-14.
- Caro LH, Plomp PJ, Wolvetang EJ, Kerkhof C, Meijer AJ (1988). 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. *European Journal of Biochemistry* **175**(2): 325-329
- Caro-Maldonado, A., S.W.G. Tait, S. Ramirez-Peinado, J.E. Ricci, I. Fabregat, D.R. Green, and C. Munoz-Pinedo. 2010. Glucose deprivation induces an atypical form of apoptosis mediated by caspase-8 in Bax-, Bak-deficient cells. *Cell Death Differ.* 17:1335.
- Caro-Maldonado A, Munoz-Pinedo C. (2011). Dying for something to eat: how cells respond to starvation. *Open Cell Signal J*;3:42–51
- Cazanave, S.C., N.A. Elmi, Y. Akazawa, S.F. Bronk, J.L. Mott, and G.J. Gores. 2010. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 299:G236-43.
- Coloff, J.L., A.N. Macintyre, A.G. Nichols, T. Liu, C.A. Gallo, D.R. Plas, and J.C. Rathmell. 2011. Akt-Dependent Glucose Metabolism Promotes Mcl-1

- Synthesis to Maintain Cell Survival and Resistance to Bcl-2 Inhibition. *Cancer Research*. 71:5204-5213.
- Cory, S., and J.M. Adams. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2:647.
- Chen, L., S.N. Willis, A. Wei, B.J. Smith, J.I. Fletcher, M.G. Hinds, P.M. Colman, C.L. Day, J.M. Adams, and D.C.S. Huang. 2005. Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. *Molecular Cell*. 17:393.
- Christofferson, D.E., and J. Yuan. 2010. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*. 22:263-8.
- Danial, N.N., C.F. Gramm, L. Scorrano, C.Y. Zhang, S. Krauss, A.M. Ranger, S.R. Datta, M.E. Greenberg, L.J. Licklider, B.B. Lowell, S.P. Gygi, and S.J. Korsmeyer. 2003. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*. 424:952-6.
- Dasgupta, R., and D.A. Rodeberg. 2012. Update on rhabdomyosarcoma. *Semin Pediatr Surg*. 21:68-78.
- Datema, R., and R.T. Schwarz. 1978. Formation of 2-deoxyglucose-containing lipid-linked oligosaccharides. Interference with glycosylation of glycoproteins. *Eur J Biochem*. 90:505-16.
- De Giovanni, C., L. Landuzzi, G. Nicoletti, P.L. Lollini, and P. Nanni. 2009. Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma. *Future Oncol*. 5:1449-75.
- Degenhardt, K., R. Mathew, B. Beaudoin, K. Bray, D. Anderson, G. Chen, C. Mukherjee, Y. Shi, C.I. Gálinas, Y. Fan, D.A. Nelson, S. Jin, and E. White. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 10:51.
- Denecker, G., P. Ovaere, P. Vandenabeele, and W. Declercq. 2008. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol*. 180:451-8.
- DiPaola, R.S., D. Dvorzhinski, A. Thalasila, V. Garikapaty, D. Doram, M. May, K. Bray, R. Mathew, B. Beaudoin, C. Karp, M. Stein, D.J. Foran, and E. White. 2008. Therapeutic starvation and autophagy in prostate cancer: a new paradigm for targeting metabolism in cancer therapy. *Prostate*. 68:1743-52.
- Egger, L., J. Schneider, C. Rheme, M. Tapernoux, J. Hacki, and C. Borner. 2003. Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions. *Cell Death Differ*. 10:1188.
- El Mjiyad, N., A. Caro-Maldonado, S. Ramirez-Peinado, and C. Munoz-Pinedo. 2010. Sugar-free approaches to cancer cell killing. *Oncogene*. 30:253-64.
- Elgendy, M., C. Sheridan, G. Brumatti, and S.J. Martin. 2011a. Oncogenic Ras-Induced Expression of Noxa and Beclin-1 Promotes Autophagic Cell Death and Limits Clonogenic Survival. *Molecular Cell*. 42:23.
- Fernandez, Y., M. Verhaegen, T.P. Miller, J.L. Rush, P. Steiner, A.W. Opipari, Jr., S.W. Lowe, and M.S. Soengas. 2005. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res*. 65:6294-304.
- Ferrari, D., A. Stepczynska, M. Los, S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff. 1998. Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis. *J Exp Med*. 188:979-84.

- Fritsch, R.M., G. Schneider, D. Saur, M. Scheibel, and R.M. Schmid. 2007. Translational repression of Mcl-1 couples stress-induced eIF2 alpha phosphorylation to mitochondrial apoptosis initiation. *J Biol Chem.* 282:22551-62.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, T.M. Dawson, V.L. Dawson, W.S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H.U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer. 2011. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19:107.
- Gambhir, S.S. 2002. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer.* 2:683-93.
- Ganjavi, H., M. Gee, A. Narendran, M.H. Freedman, and D. Malkin. 2005. Adenovirus-mediated p53 gene therapy in pediatric soft-tissue sarcoma cell lines: sensitization to cisplatin and doxorubicin. *Cancer Gene Ther.* 12:397-406.
- Gomez-Bougie, P., S. Wuillme-Toumi, E. MÃ©noret, V.r. Trichet, N. Robillard, M. Philippe, R.g. Bataille, and M. Amiot. 2007. Noxa Up-regulation and Mcl-1 Cleavage Are Associated to Apoptosis Induction by Bortezomib in Multiple Myeloma. *Cancer Research.* 67:5418-5424.
- Green, D.R., and G.I. Evan. 2002. A matter of life and death. *Cancer Cell.* 1:19.
- Hayes-Jordan, A., and R. Andrassy. 2009. Rhabdomyosarcoma in children. *Curr Opin Pediatr.* 21:373-8.
- Hehlgans, T., and K. Pfeffer. 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 115:1-20.
- Heminger, K., V. Jain, M. Kadakia, B. Dwarakanath, and S.J. Berberich. 2006. Altered gene expression induced by ionizing radiation and glycolytic inhibitor 2-deoxy-glucose in a human glioma cell line: implications for radio sensitization. *Cancer Biol Ther.* 5:815-23.
- Hetz, C., P. Bernasconi, J. Fisher, A.H. Lee, M.C. Bassik, B. Antonsson, G.S. Brandt, N.N. Iwakoshi, A. Schinzel, L.H. Glimcher, and S.J. Korsmeyer. 2006. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science.* 312:572-6.
- Hu, J., N. Dang, E. Menu, E. De Bryune, D. Xu, B. Van Camp, E. Van Valckenborgh, and K. Vanderkerken. 2012. Activation of ATF4 mediates unwanted Mcl-1 accumulation by proteasome inhibition. *Blood.* 119:826-37.
- Huang, W.P., and D.J. Klionsky. 2002. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct.* 27:409-20.
- Iglesias-Serret, D., M. Pique, J. Gil, G. Pons, and J.M. Lopez. 2003. Transcriptional and translational control of Mcl-1 during apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 417:141-52.
- Jabbour, A.M., C.P. Daunt, B.D. Green, S. Vogel, L. Gordon, R.S. Lee, N. Silke, R.B. Pearson, C.J. Vandenberg, P.N. Kelly, S.L. Nutt, A. Strasser, C. Borner, and P.G. Ekert. 2010. Myeloid progenitor cells lacking p53 exhibit delayed up-regulation of Puma and prolonged survival after cytokine deprivation. *Blood.* 115:344-52.

- Jiang, C.C., K. Lucas, K.A. Avery-Kiejda, M. Wade, C.E. deBock, R.F. Thorne, J. Allen, P. Hersey, and X.D. Zhang. 2008. Up-regulation of Mcl-1 is critical for survival of human melanoma cells upon endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res.* 68:6708-17.
- Johnson, R.e.F., and N.D. Perkins. 2012. Nuclear factor-kB, p53, and mitochondria: regulation of cellular metabolism and the Warburg effect. *Trends in Biochemical Sciences.*
- Jones, R.G., D.R. Plas, S. Kubek, M. Buzzai, J. Mu, Y. Xu, M.J. Birnbaum, and C.B. Thompson. 2005. AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell.* 18:283.
- Jung, C.H., C.B. Jun, S.H. Ro, Y.M. Kim, N.M. Otto, J. Cao, M. Kundu, and D.H. Kim. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell.* 20:1992-2003.
- Kadandale, P., and A.A. Kiger. 2010. Role of selective autophagy in cellular remodeling: "self-eating" into shape. *Autophagy.* 6:1194-5.
- Kang, H.T., and E.S. Hwang. 2006. 2-Deoxyglucose: An anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. *Life Sciences.* 78:1392.
- Kaushik, S., R. Singh, and A.M. Cuervo. 2010. Autophagic pathways and metabolic stress. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 12:4.
- Kawauchi, K., K. Araki, K. Tobiume, and N. Tanaka. 2008. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol.* 10:611-8.
- Kikuchi, K., K. Tsuchiya, O. Otabe, T. Gotoh, S. Tamura, Y. Katsumi, S. Yagy, S. Tsubai-Shimizu, M. Miyachi, T. Iehara, and H. Hosoi. 2008. Effects of PAX3-FKHR on malignant phenotypes in alveolar rhabdomyosarcoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 365:568.
- Kim, J., M. Kundu, B. Viollet, and K.L. Guan. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 13:132-41.
- Koren, I., E. Reem, and A. Kimchi. 2010. DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Curr Biol.* 20:1093-8.
- Kurtoglu, M., N. Gao, J. Shang, J.C. Maher, M.A. Lehrman, M. Wangpaichitr, N. Savaraj, A.N. Lane, and T.J. Lampidis. 2007. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol Cancer Ther.* 6:3049-58.
- Lae, M., E.H. Ahn, G.E. Mercado, S. Chuai, M. Edgar, B.R. Pawel, A. Olshen, F.G. Barr, and M. Ladanyi. 2007. Global gene expression profiling of PAX-FKHR fusion-positive alveolar and PAX-FKHR fusion-negative embryonal rhabdomyosarcomas. *J Pathol.* 212:143-51.
- Lee, J.H., A.V. Budanov, E.J. Park, R. Birse, T.E. Kim, G.A. Perkins, K. Ocorr, M.H. Ellisman, R. Bodmer, E. Bier, and M. Karin. 2010. Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies. *Science.* 327:1223-8.
- Lee, Y.J., S.S. Galoforo, C.M. Berns, W.P. Tong, H.R. Kim, and P.M. Corry. 1997. Glucose deprivation-induced cytotoxicity in drug resistant human breast carcinoma MCF-7/ADR cells: role of c-myc and bcl-2 in apoptotic cell death. *J Cell Sci.* 110 (Pt 5):681-6.

- Leist, M., B. Single, A.F. Castoldi, S. Kuhnle, and P. Nicotera. 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 185:1481-6.
- Li, J., B. Lee, and A.S. Lee. 2006. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem.* 281:7260-70.
- Lowman, X.H., M.A. McDonnell, A. Kosloske, O.A. Odumade, C. Jenness, C.B. Karim, R. Jemerson, and A. Kelekar. 2010. The proapoptotic function of Noxa in human leukemia cells is regulated by the kinase Cdk5 and by glucose. *Mol Cell.* 40:823-33.
- Lum, J.J., D.E. Bauer, M. Kong, M.H. Harris, C. Li, T. Lindsten, and C.B. Thompson. 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell.* 120:237-48.
- Lunt, S.Y., and M.G. Vander Heiden. 2011. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:441-64.
- Mackay, F., and S.L. Kalled. 2002. TNF ligands and receptors in autoimmunity: an update. *Curr Opin Immunol.* 14:783-90.
- Maher, J.C., M. Wangpaichitr, N. Savaraj, M. Kurtoglu, and T.J. Lampidis. 2007. Hypoxia-inducible factor-1 confers resistance to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-d-glucose. *Molecular Cancer Therapeutics.* 6:732-741.
- Mathew, R., and E. White. 2012. Autophagy, Stress, and Cancer Metabolism: What Doesn't Kill You Makes You Stronger. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.*
- Mauro, C., S.C. Leow, E. Anso, S. Rocha, A.K. Thotakura, L. Tornatore, M. Moretti, E. De Smaele, A.A. Beg, V. Tergaonkar, N.S. Chandel, and G. Franzoso. 2011. NF- κ B controls energy homeostasis and metabolic adaptation by upregulating mitochondrial respiration. *Nat Cell Biol.* 13:1272.
- Mills, J.R., Y. Hippo, F. Robert, S.M. Chen, A. Malina, C.J. Lin, U. Trojahn, H.G. Wendel, A. Charest, R.T. Bronson, S.C. Kogan, R. Nadon, D.E. Housman, S.W. Lowe, and J. Pelletier. 2008. mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:10853-8.
- Mitchener, J.S., J.D. Shelburne, W.D. Bradford, and H.K. Hawkins. 1976. Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. *Am J Pathol.* 83:485-92.
- Mizushima, N., and M. Komatsu. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 147:728-41.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi. 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell.* 15:1101-11.
- Morishima, N., K. Nakanishi, and A. Nakano. 2011. Activating Transcription Factor-6 (ATF6) Mediates Apoptosis with Reduction of Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 (Mcl-1) Protein via Induction of WW Domain Binding Protein 1. *Journal of Biological Chemistry.* 286:35227-35235.
- Mortimore, G.E., and C.E. Mondon. 1970. Inhibition by insulin of valine turnover in liver. Evidence for a general control of proteolysis. *J Biol Chem.* 245:2375-83.

- Munoz-Pinedo, C., C. Ruiz-Ruiz, C. Ruiz de Almodovar, C. Palacios, and A. Lopez-Rivas. 2003. Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing. *J Biol Chem.* 278:12759-68.
- Munoz-Pinedo, C (2009). "Signaling pathways that regulate life and cell death Evolution of Apoptosis in the Context of self-Defense". Self and Non-Self Book, Chapter 6.
- O'Brien, D., A.G. Jacob, S.J. Qualman, and D.S. Chandler. 2012. Advances in pediatric rhabdomyosarcoma characterization and disease model development. *Histol Histopathol.* 27:13-22.
- Oakes, S.A., L. Scorrano, J.T. Opferman, M.C. Bassik, M. Nishino, T. Pozzan, and S.J. Korsmeyer. 2005. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:105-10.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi, and N. Tanaka. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 288:1053-8.
- Opferman, J.T., A. Letai, C. Beard, M.D. Sorcinelli, C.C. Ong, and S.J. Korsmeyer. 2003. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature.* 426:671-6.
- Pattingre, S., L. Espert, M. Biard-Piechaczyk, and P. Codogno. 2008. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie.* 90:313.
- Peter, M.E., and P.H. Krammer. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10:26-35.
- Piret, J.-P., D. Mottet, M. Raes, and C. Michiels. 2002. Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochemical Pharmacology.* 64:889.
- Pollak, M. 2008. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 8:915-28.
- Pradelli, L.A., M. Beneteau, C. Chauvin, M.A. Jacquin, S. Marchetti, C. Munoz-Pinedo, P. Auberger, M. Pende, and J.E. Ricci. 2009. Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation. *Oncogene.* 29:1641.
- Pradelli, L.A., M. Beneteau, C. Chauvin, M.A. Jacquin, S. Marchetti, C. Munoz-Pinedo, P. Auberger, M. Pende, and J.E. Ricci. 2010. Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation. *Oncogene.* 29:1641-52.
- Puthalakath, H., L.A. O'Reilly, P. Gunn, L. Lee, P.N. Kelly, N.D. Huntington, P.D. Hughes, E.M. Michalak, J. McKimm-Breschkin, N. Motoyama, T. Gotoh, S. Akira, P. Bouillet, and A. Strasser. 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell.* 129:1337-49.
- Qin, J.Z., L. Stennett, P. Bacon, B. Bodner, M.J. Hendrix, R.E. Seftor, E.A. Seftor, N.V. Margaryan, P.M. Pollock, A. Curtis, J.M. Trent, F. Bennett, L. Miele, and B.J. Nickoloff. 2004. p53-independent NOXA induction overcomes apoptotic resistance of malignant melanomas. *Mol Cancer Ther.* 3:895-902.

- Qin, J.Z., H. Xin, and B.J. Nickoloff. 2010. 2-Deoxyglucose sensitizes melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis which is reduced by mannose. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 401:293.
- Ralsler, M., M.M. Wamelinck, E.A. Struys, C. Joppich, S. Krobitsch, C. Jakobs, and H. Lehrach. 2008. A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:17807-11.
- Reimertz, C., D. Kogel, A. Rami, T. Chittenden, and J.H. Prehn. 2003. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Cell Biol*. 162:587-97.
- Rodriguez, D., D. Rojas-Rivera, and C. Hetz. 2010. Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: The BCL-2 protein family rheostat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1813:564.
- Rodriguez, D.A., S. Zamorano, F. Lisbona, D. Rojas-Rivera, H. Urra, J.R. Cubillos-Ruiz, R. Armisen, D.R. Henriquez, E. H Cheng, M. Letek, T. Vaisar, T. Irrazabal, C. Gonzalez-Billault, A. Letai, F.X. Pimentel-Muinos, G. Kroemer, and C. Hetz. 2012. BH3-only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signalling of the unfolded protein response sensor IRE1[alpha]. *EMBO J*. advance online publication.
- Rong, Y.P., G. Bultynck, A.S. Aromolaran, F. Zhong, J.B. Parys, H. De Smedt, G.A. Mignery, H.L. Roderick, M.D. Bootman, and C.W. Distelhorst. 2009. The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:14397-402.
- Sainz-Jaspeado, M., J. Martin-Liberal, L. Lagares-Tena, S. Mateo-Lozano, X. Garcia del Muro, and O.M. Tirado. 2011. Caveolin-1 in sarcomas: friend or foe? *Oncotarget*. 2:305-12.
- Sakamaki, K., and Y. Satou. 2009. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J Fish Biol*. 74:727-53.
- Scorrano, L., S.A. Oakes, J.T. Opferman, E.H. Cheng, M.D. Sorcinelli, T. Pozzan, and S.J. Korsmeyer. 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*. 300:135-9.
- Schindler, A.J., and R. Schekman. 2009. In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:17775-80.
- Schmitz, J., A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T.K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D.M. Gorman, J.F. Bazan, and R.A. Kastelein. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 23:479-90.
- Seglen, P.O., and P. Bohley. 1992. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia*. 48:158-72.
- Semenza, G.L. 2010. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 20:51-6.
- Singh, R., and A.M. Cuervo. 2011. Autophagy in the Cellular Energetic Balance. *Cell Metabolism*. 13:495.
- Steckley, D., M. Karajikar, L.B. Dale, B. Fuerth, P. Swan, C. Drummond-Main, M.O. Poulter, S.S. Ferguson, A. Strasser, and S.P. Cregan. 2007. Puma is a

- dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 27:12989-99.
- Stevens, M.C.G. 2005. Treatment for childhood rhabdomyosarcoma: the cost of cure. *The Lancet Oncology.* 6:77.
- Surmacz, C.A., A.R. Poso, and G.E. Mortimore. 1987. Regulation of lysosomal fusion during deprivation-induced autophagy in perfused rat liver. *Biochem J.* 242:453-8.
- Suzuki, A., G.-i. Kusakai, A. Kishimoto, J. Lu, T. Ogura, and H. Esumi. 2003. ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene.* 22:6177.
- Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:231.
- Thornberry, N.A. 1997. The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull.* 53:478-90.
- Tinel, A., and J. Tschopp. 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science.* 304:843-6.
- Tsaytler, P., H.P. Harding, D. Ron, and A. Bertolotti. 2011. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science.* 332:91-4.
- Ullman, E., Y. Fan, M. Stawowczyk, H.M. Chen, Z. Yue, and W.X. Zong. 2008. Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress. *Cell Death Differ.* 15:422-5.
- Unruh, A., A. Ressel, H.G. Mohamed, R.S. Johnson, R. Nadrowitz, E. Richter, D.M. Katschinski, and R.H. Wenger. 2003. The hypoxia-inducible factor-1[alpha] is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene.* 22:3213.
- Vander Heiden, M.G. 2011. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov.* 10:671.
- Vander Heiden, M.G., D.R. Plas, J.C. Rathmell, C.J. Fox, M.H. Harris, and C.B. Thompson. 2001. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol.* 21:5899-912.
- Vassalli, P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 10:411-52.
- Vega, F.M., A. Sevilla, and P.A. Lazo. 2004. p53 Stabilization and accumulation induced by human vaccinia-related kinase 1. *Mol Cell Biol.* 24:10366-80.
- Vembar, S.S., and J.L. Brodsky. 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:944-57.
- Vousden, K.H., and K.M. Ryan. 2009. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer.* 9:691-700.
- Walter, P., and D. Ron. 2011. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science.* 334:1081-1086.
- Wang, Q., H. Mora-Jensen, M.A. Weniger, P. Perez-Galan, C. Wolford, T. Hai, D. Ron, W. Chen, W. Trenkle, A. Wiestner, and Y. Ye. 2009. ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:2200-5.
- Wang, Y., R. Singh, A.C. Massey, S.S. Kane, S. Kaushik, T. Grant, Y. Xiang, A.M. Cuervo, and M.J. Czaja. 2008. Loss of macroautophagy promotes or prevents

- fibroblast apoptosis depending on the death stimulus. *J Biol Chem.* 283:4766-77.
- Wei, M.C., W.X. Zong, E.H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A.J. Ross, K.A. Roth, G.R. MacGregor, C.B. Thompson, and S.J. Korsmeyer. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 292:727-30.
- Wensveen, F.M., N.L. Alves, I.A. Derks, K.A. Reedquist, and E. Eldering. 2011. Apoptosis induced by overall metabolic stress converges on the Bcl-2 family proteins Noxa and Mcl-1. *Apoptosis.* 16:708-21.
- Willis, S.N., L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J.I. Fletcher, J.M. Adams, and D.C. Huang. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 19:1294-305.
- Wu, Y.-T., H.-L. Tan, G. Shui, C. Bauvy, Q. Huang, M.R. Wenk, C.-N. Ong, P. Codogno, and H.-M. Shen. 2010a. Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry.* 285:10850-10861.
- Wu, Y.T., H.L. Tan, G. Shui, C. Bauvy, Q. Huang, M.R. Wenk, C.N. Ong, P. Codogno, and H.M. Shen. 2010b. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 285:10850-61.
- Xi, H., M. Kurtoglu, H. Liu, M. Wangpaichitr, M. You, X. Liu, N. Savaraj, and T.J. Lampidis. 2010. 2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother Pharmacol.* 67:899-910.
- Yuneva, M., N. Zamboni, P. Oefner, R. Sachidanandam, and Y. Lazebnik. 2007. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *The Journal of Cell Biology.* 178:93-105.
- Zabos, P., D. Kyner, N. Mendelsohn, C. Schreiber, S. Waxman, J. Christman, and G. Acs. 1978. Catabolism of 2-deoxyglucose by phagocytic leukocytes in the presence of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:5422-6.
- Zagorodna, O., S.M. Martin, D.T. Rutkowski, T. Kuwana, D.R. Spitz, and C.M. Knudson. 2012. 2-Deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines. *Oncogene.* 31:2738.
- Zhang, L., H. Lopez, N.M. George, X. Liu, X. Pang, and X. Luo. 2011. Selective involvement of BH3-only proteins and differential targets of Noxa in diverse apoptotic pathways. *Cell Death Differ.* 18:864-73.
- Zhang, X.D., E. Deslandes, M. Villedieu, L. Poulain, M. Duval, P. Gauduchon, L. Schwartz, and P. Icard. 2006. Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Various Malignant Cell Lines In Vitro. *Anticancer Research.* 26:3561-3566.
- Zhao, Y., B.J. Altman, J.L. Coloff, C.E. Herman, S.R. Jacobs, H.L. Wieman, J.A. Wofford, L.N. Dimascio, O. Ilkayeva, A. Kelekar, T. Reya, and J.C. Rathmell. 2007. Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. *Mol Cell Biol.* 27:4328-39.

- Zhao, Y., J.L. Coloff, E.C. Ferguson, S.R. Jacobs, K. Cui, and J.C. Rathmell. 2008. Glucose metabolism attenuates p53 and Puma-dependent cell death upon growth factor deprivation. *J Biol Chem.* 283:36344-53.

VIII. Anexo

2-Deoxyglucose Induces Noxa-Dependent Apoptosis in Alveolar Rhabdomyosarcoma

Silvia Ramírez-Peinado, Fermín Alcázar-Limones, Laura Lagares-Tena, Nadia El Mijad, Alfredo Caro-Maldonado, Oscar M. Tirado, and Cristina Muñoz-Pinedo

Abstract

Alveolar and embryonal rhabdomyosarcomas are childhood tumors that do not respond well to current chemotherapies. Here, we report that the glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose (2-DG) can efficiently promote cell death in alveolar, but not embryonal, rhabdomyosarcoma cell lines. Notably, 2-DG also induced cell differentiation accompanied by downregulation of PAX3/FOXO1a, the chromosome translocation–encoded fusion protein that is a central oncogenic driver in this disease. Cell death triggered by 2-DG was associated with its ability to activate Bax and Bak. Overexpression of the antiapoptotic Bcl-2 homologues Bcl-x₁ and Mcl-1 prevented apoptosis, indicating that cell death proceeds through the mitochondrial pathway. Mechanistic investigations indicated that Mcl-1 downregulation and Noxa upregulation were critical for 2-DG–induced apoptosis. In addition, 2-DG promoted eIF2 α phosphorylation and inactivation of the mTOR pathway. Mcl-1 loss and cell death were prevented by downregulation of the endoplasmic reticulum (ER) stress–induced protein ATF3 and by incubating cells in the presence of mannose, which reverted 2-DG–induced ER stress but not ATP depletion. Thus, energetic stresses created by 2-DG were not the primary cause of cell death. Together, our findings suggest that glycolysis inhibitors such as 2-DG may be highly effective in treating alveolar rhabdomyosarcoma and that Noxa could offer a prognostic marker to monitor the efficacy of such agents. *Cancer Res* 71(21):6796–806. ©2011 AACR.

Introduction

Rhabdomyosarcoma is the most common soft tissue tumor in children and adolescence, accounting for 4% to 5% of pediatric tumors. The 2 common histiotypes are a favorable group comprising embryonal rhabdomyosarcoma and an unfavorable group comprising alveolar rhabdomyosarcoma (1). Standard therapeutic regimens are a combination of vincristine, actinomycin-D, and cyclophosphamide, with other drugs being tested in clinical trials (2). Although the introduction of chemotherapy has greatly improved survival, overall survival rate is 70%, which indicates that new chemotherapeutic approaches need to be developed (3).

Tumor metabolism is receiving an ever-increasing attention as an antitumor target. Several metabolic pathways function differently in tumor and nontransformed cells (4). In particular, glycolysis is frequently upregulated in tumor cells and respiration is inhibited. This makes tumor cells particularly sensi-

tive to glycolytic inhibitors such as 2-deoxyglucose (2-DG) or 3-bromopyruvate (5, 6). Some pieces of evidence suggest that targeting glycolysis could be a good strategy against rhabdomyosarcoma. These cells display mitochondrial respiratory defects (7) and an energy-producing metabolic phenotype compared with a more catabolic metabolism of primary myocytes (8). This could be due to hyperactivation of the PI3K/Akt/mTOR pathway, which is frequently observed in rhabdomyosarcoma (9). Second, p53 is frequently inactivated in rhabdomyosarcoma (10). p53 sustains the production of ATP through respiration, and its loss promotes glycolysis. Therefore, loss of p53 has been shown to promote susceptibility of tumor cells to glucose deprivation (11). In addition, rhabdomyosarcoma can be detected in patients by the positron emission tomographic technique, which is based on uptake of a glucose analogue (12).

Sensitivity to antiglycolitics is known to be regulated by a number of proteins involved in response to metabolic stress. However, little is known about the cell death proteins that respond to these drugs (13). Cell death in animals occurs mainly through apoptosis or necrosis; these forms of cell death promote different responses in the tissue, with necrosis being a proinflammatory form of cell death, as opposed to apoptosis (14). About apoptosis, 2 major pathways have been described: the extrinsic, death ligand–mediated pathway, and the intrinsic or mitochondrial pathway (15). The first pathway is initiated by death ligands such as TNF, Fas ligand, or TRAIL, and is mediated by the protease caspase-8. The mitochondrial pathway is initiated by "Bcl-2-only" proteins such as Bim, Noxa, or Puma, which act as stress sensors and promote activation of

Authors' Affiliation: Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet, Barcelona, Spain

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org>).

Corresponding Author: Cristina Muñoz-Pinedo, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL)–Hospital Duran i Reynals 3 planta, Gran Via de L'Hospitalet 199, L'Hospitalet, Barcelona 08908, Spain. Phone: 34-93-260-7339; Fax: 34-93-260-7426; E-mail: cmunoz@idibell.cat

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0759

©2011 American Association for Cancer Research.

Bax and Bak on the mitochondrial membrane. This allows the release of cytochrome *c*, which promotes formation of the apoptosome and caspase activation.

We aimed to determine whether rhabdomyosarcoma cells are sensitive to the glycolytic inhibitor 2-DG. We describe that alveolar rhabdomyosarcoma cells are sensitive to this drug. Moreover, we provide evidence that the BHK protein Noxa mediates apoptosis.

Materials and Methods

Cell culture and treatments

Alveolar rhabdomyosarcoma cell lines [Rh4, Rh30 (obtained from the original repository, Peter Houghton's laboratory in 2008), and Rh41 purchased from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen 2008] and embryonal rhabdomyosarcoma cells (RD from European HPACC 2009 and A-204 from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen 2008) were expanded and frozen within 2 weeks of purchase and used for a maximum of 2 months after resuscitation of frozen aliquots. They were authenticated by the provider on the basis of viability, recovery, growth, morphology, as well as by cytogenetic analysis, antigen expression, DNA profile, and isoenzymology. Cells were maintained in high-glucose (25 mmol/L), pyruvate-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 2 mmol/L L-glutamine, 200 mg/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin sulfate, and 10% FBS (Invitrogen).

For treatments, cells were plated at a concentration of 200,000/ml and treated in fresh medium 24 hours later at 70% confluence (600,000/ml). Q-YD-OPH (SM Biochemicals LLC) was used at 20 μ mol/L and added simultaneously with 2-DG. An equal amount of DMSO was added to the controls.

Western blotting

Cells were trypsinized, washed with PBS, lysed by resuspending them in lysis buffer [5 mmol/L Tris-HCl/2% SDS, Complete Antiprotease Cocktail (Roche)], and frozen. For analysis of phosphoproteins and hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α), cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer plus orthovanadate and 2-glycerol-phosphate. After sonication, protein concentration was measured with BCA Protein Assay Reagent (bicinchoninic acid; Pierce). Equal amounts of protein were mixed with Laemmli loading buffer. After electrophoresis, protein was transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). Membrane was blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline-Tween (0.1%). Antibodies are detailed in Supplementary Methods.

Immunocytochemistry

Attached and detached cells were collected by trypsinization, fixed in suspension with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 minutes at room temperature, washed, and blocked with 0.1% bovine serum albumin + 0.1% Triton X-100 in PBS for 1 hour. They were then incubated overnight with anti-active Bax (6A7, catalog no. 556467; BD Pharmingen; 1:100) or anti-active Bak (Ab-1/TC100; Calbiochem/Merck) diluted in blocking buffer. See more details in Supplementary Methods.

Immunoprecipitations

Attached cells were collected by trypsinization and washed in PBS together with detached cells. They were lysed in 500 μ L of CHAPS immunoprecipitation buffer [2% CHAPS, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 137 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 10% glycerol] plus Complete Protein Inhibitor Cocktail Tablets (Roche) for 30 minutes. Thirty microliters of Protein G Magnetic Beads (Millipore) was washed 3 \times in immunoprecipitation buffer without CHAPS and then incubated in 1 mL CHAPS buffer with 2 μ g of antibody for 4 hours at 4°C under rotation. Five hundred micrograms of total cell extract was incubated overnight in 1 mL of beads coupled with 2 μ g of antibody. The next day, beads were washed 3 times with immunoprecipitation buffer and incubated with 45 μ L of immunoprecipitation buffer containing 2% SDS and 15 μ L of SDS loading buffer (containing 5% β -mercaptoethanol) for 10 minutes at 95°C. Eluted proteins were subjected to SDS-PAGE.

Measurement of cell death

For sub-G₁ analysis, detached and attached cells were trypsinized, washed in PBS, fixed in 70% cold ethanol while vortexing, and incubated for 1 to 10 days at 20°C. For experiments of transient transfection, fixation was done in 4% paraformaldehyde dissolved in PBS at room temperature for 15 minutes before washing. Cells were further washed, resuspended in PBS with 40 μ g/ml PI and 100 μ g/ml RNase A, and incubated for 30 minutes at 37°C before fluorescence-activated cell-sorting analysis.

DNA and RNA transfections, plasmids, and generation of cell lines

For DNA transfection, cells were incubated in 10-cm dishes in antibiotic-free DMEM and incubated for 6 hours with 25 μ L Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and 10 μ g of DNA. For generation of Rh4 cells stably expressing Bel-x₁, they were transfected as described earlier and selected with 0.5 μ g/ml puromycin. pBABE-Bel-x₁ was provided by Dr. J. Goldstein, and the pcDNA plasmids encoding Mcl-1 and Bel-x₄ were provided by Dr. J.-E. Ricci (INSERM, Nice) and Prof. Seamus Martin (TCU, Ireland), respectively. For transfections of siRNA, cells were incubated in antibiotic-free DMEM for 8 hours (6 hours for Mcl-1) with siRNA 100 nmol/L premixed with Dharmafect 1 (Dharmacon). Sequences are detailed in Supplementary Methods.

Reverse transcription PCR

Total RNA (3 μ g), extracted with the Nucleospin RNA II Kit (MACHEREY-NAGEL), was used for cDNA synthesis with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Amplifications were carried out with specific primers (Noxa: forward 5'-CTCGACAAAAGCGTGGTCTC, reverse 5'-CAACTGGAGCACCTCGGAC; Mcl-1: forward 5'-GAGGAGGACGACTGTACCGG, reverse 5'-CAGACCTGCCCATTTGGCTT; β -actin: forward 5'-CGGGACCTGACTGACTACCTC, reverse 5'-CTTCATTGTGCTGGGTGC). For each set of primers, the number of cycles was adjusted so that the reaction endpoints fell within the exponential phase of product amplification, thus providing a semiquantitative estimate of relative mRNA abundance.

Results

Alveolar rhabdomyosarcoma cell lines are sensitive to 2-DG

2-DG induces different effects in different tumor cell lines; it reduces proliferation, induces cell-cycle arrest, or promotes apoptosis (16). We analyzed the effects of 2-DG in a panel of alveolar rhabdomyosarcoma cell lines. 2-DG inhibited the growth of Rh4 alveolar rhabdomyosarcoma cells incubated with doses of 2 mmol/L or higher, even though glucose is present at 25 mmol/L in the culture medium (Supplementary Fig. S1). We observed cell death at doses over 5 mmol/L (Fig. 1A). Cell death was likely due to apoptosis because DNA was degraded and cells displayed sub-G₁ DNA content. Furthermore, DNA cleavage was prevented by incubating cells in the presence of the caspase inhibitor Q-VD. The same results were observed in Rh30 or Rh41 alveolar rhabdomyosarcoma cell lines (Fig. 1B and C).

Embryonal rhabdomyosarcoma generally have a better prognosis than alveolar rhabdomyosarcoma. We observed that RD and A-204 embryonal rhabdomyosarcoma cells were much more resistant than alveolar rhabdomyosarcoma to 2-DG. Only Rh cells showed cell death at high doses, almost equimolar with glucose concentration in the medium (Fig. 1D). A-204 cells were completely resistant at all doses tested (Fig. 1E). We did, however, observe inhibition of cell growth at higher doses (Fig. 1F). To determine whether this cell growth arrest was irreversible, after 72 hours, cells were washed and were left to grow in the absence of 2-DG. Cell growth arrest was reversible because cells started to grow back immediately after removal of the drug (Fig. 1F). Because HIF-1 α frequently regulates tumor glycolytic phenotype, one possibility was that HIF-1 α was differentially expressed in embryonal versus alveolar rhabdomyosarcoma and it could be regulating uptake and toxicity of 2-DG in rhabdomyosarcomas. Thus, we analyzed the levels of this protein in the 5 cell lines. HIF-1 α was virtually

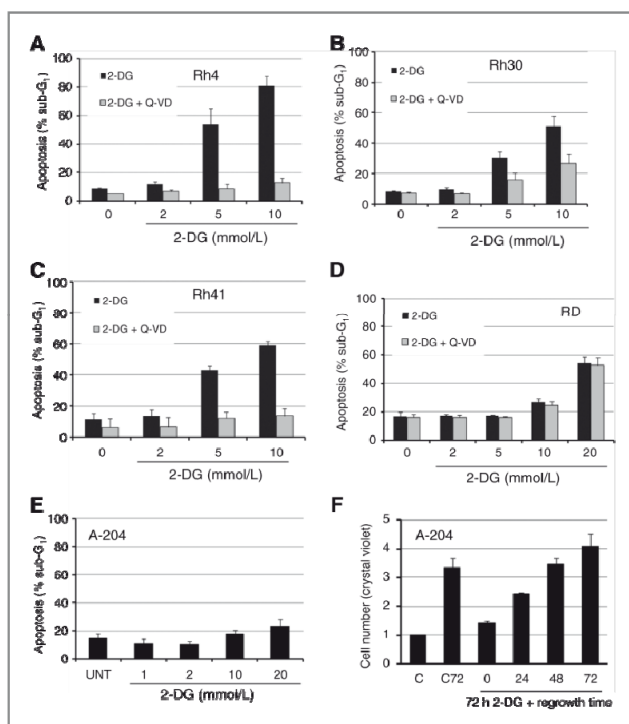


Figure 1. Alveolar rhabdomyosarcoma, but not embryonal rhabdomyosarcoma, cell lines are sensitive to 2-DG. Rh4 (A), Rh30 (B), Rh41 (C), RD (D), or A-204 (E) cells were treated with 2-DG at indicated concentrations in the presence of Q-VD or dimethyl sulfoxide as indicated, collected after 72 hours, and subjected to sub-G₁ analysis. For control samples, cells were plated at half concentration to avoid death due to overgrowth. Mean \pm SEM of at least 3 experiments is shown. F, 24 hours after plating A-204 cells, one well was stained with crystal violet (C, control), and the rest were grown in the absence (C72) or the presence of 20 mmol/L 2-DG for 72 hours. Cells were washed and further incubated with fresh medium for indicated times. Adhered cells were stained with crystal violet 0.2% in 2% ethanol for 20 minutes and solubilized in 10% SDS. Absorbance was measured at 695 nm.

undetectable in all untreated cells. Upon treatment, the levels of this protein did not increase, and its downregulation using siRNA did not provide protection from 2-DG. Rather, a slight sensitization was observed (Supplementary Fig. S2).

Although alveolar rhabdomyosarcoma cells express markers of muscular differentiation, they lack the possibility of terminal differentiation, what is believed to be caused by PAX/FOXO1a chimeras (17, 18). Because differentiated cells stop proliferating, one of the aims of the therapy is to promote differentiation of the tumor cells. We observed fusion of alveolar rhabdomyosarcoma cells characteristic of myotube formation and terminal differentiation after treatment with 2-DG (Fig. 2A and Supplementary Fig. S1). This was likely due to the fact that 2-DG induced the downregulation of the fusion protein PAX3/FOXO1a (Fig. 2B), which promotes differentiation of these cells (17). This effect was more pronounced when cells were cultured in differentiation medium (without serum) and was not inhibited by the caspase inhibitor Q-VD, indicating that differentiation was not a consequence of caspase activity.

2-DG induces apoptotic cell death

Inhibition of glucose metabolism induces cell death by necrosis or by apoptosis, probably depending on the cell type (13). Results shown in Fig. 1 suggest apoptosis as the form of cell death, because death is inhibited by the caspase inhibitor Q-VD. However, we were unable to detect cleavage of caspase-3 by Western blotting (not shown). To verify that cell death is due to apoptosis, we analyzed cleavage of the caspase substrate PARP. Treatment with 2-DG promoted PARP cleavage, which was inhibited by Q-VD (Fig. 3A). Moreover, 2-DG induced

caspase activity as measured by cleavage of a peptidic caspase substrate (Fig. 3B). In addition, we analyzed the nuclear morphology of Rh1 cells after treatment with 2-DG and observed classical apoptotic chromatin condensation (Fig. 3C).

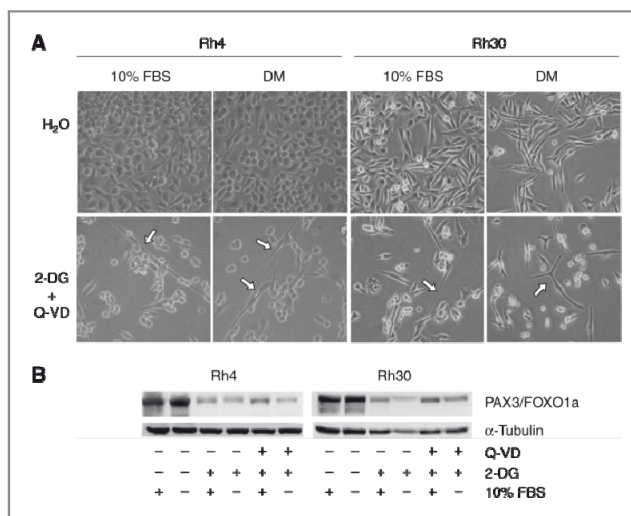
Apoptosis induced by 2-DG proceeds through the mitochondrial pathway

In hematopoietic cells, apoptosis induced by glucose deprivation proceeds through the mitochondrial pathway (13). However, we have described that in other cell types, apoptosis induced by lack of glucose is mediated by caspase-8 and it does not require a functional mitochondrial apoptotic pathway (19). We observed that the most sensitive cell lines did not express detectable caspase-8 (Supplementary Fig. S3). We thus analyzed the mitochondrial pathway by immunostaining with antibodies that detect the active forms of Bax and Bak, the proteins that mediate mitochondrial permeabilization during apoptosis. As shown in Fig. 3C, 2-DG promoted Bax and Bak activation even when cells were treated in the presence of Q-VD, indicating that these events are not a consequence of caspase activity.

To further show the involvement of the mitochondrial pathway in death by 2-DG, we overexpressed the antiapoptotic Bcl-2 homologues Bcl-x_i and Mcl-1 in Rh4 cells (Fig. 4A and B and Supplementary Figs. S4 and S5). Both proteins prevented death induced by 2-DG. Conversely, downregulation of these proteins sensitized cells to 2-DG (Fig. 4C and D and Supplementary Fig. S5).

Inhibition of glucose metabolism by limitation of glucose (20) or by 2-DG (21) promotes downregulation of the

Figure 2. 2-DG promotes differentiation of alveolar rhabdomyosarcoma cells. A, a total of 4×10^5 Rh4 or 1.8×10^5 Rh30 cells were plated in 6-well plates and treated with 10 mmol/L 2-DG in the presence of Q-VD in complete media (FPMI - 10% FBS) or differentiation media (DM; serum-free FPMI) for 48 hours. See microscope settings in Supplementary Methods. Arrows indicate fused cells with myotube morphology. Larger images are shown in Supplementary Fig. S1. B, immunoblots showing reduced PAX3/FOXO1a levels in Rh4 and Rh30 cells in the presence of 2-DG. Lysates of cells treated as indicated were collected at 55 hours (Rh30) or 72 hours (Rh4) and blotted with anti-FOXO1 antibody.



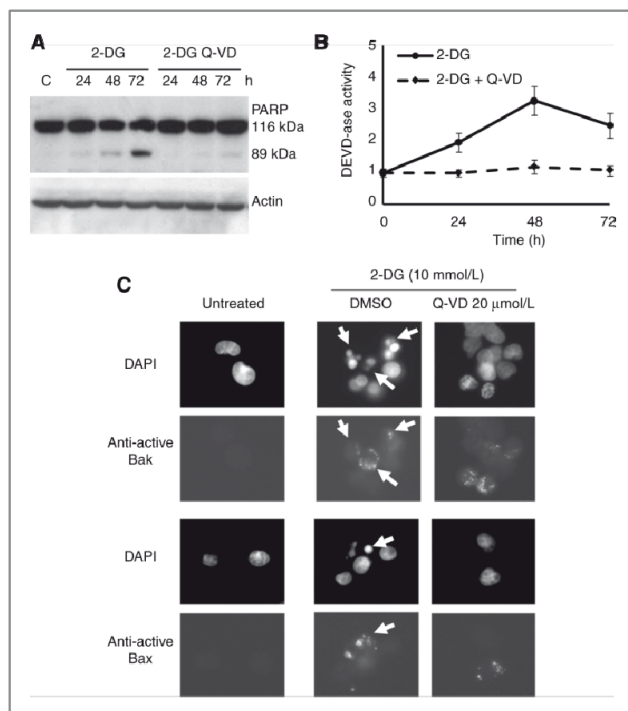


Figure 3. 2-DG promotes apoptosis in RH4 cells. **A** and **B**, 2-DG induces cleavage of PARP and caspase activity that are inhibited by Q-VD. RH4 cells were cultured for the indicated times with 2-DG (10 mmol/L) in the presence or absence of Q-VD. **A**, cell lysates were prepared as described in Materials and Methods, and proteins were resolved by immunoblotting. **B**, lysates were incubated with AC-DEVD-*amc* (Pharmingen) following the manufacturer's instructions. Results show mean \pm SEM of 3 experiments. Fluorescence values (arbitrary units) are divided by the value of fluorescence of untreated cells. **C**, detection of active Bak and Bax and chromatin condensation. Cells were left untreated or treated with 2-DG in the presence or absence of Q-VD for 48 hours. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMSO, dimethyl sulfoxide.

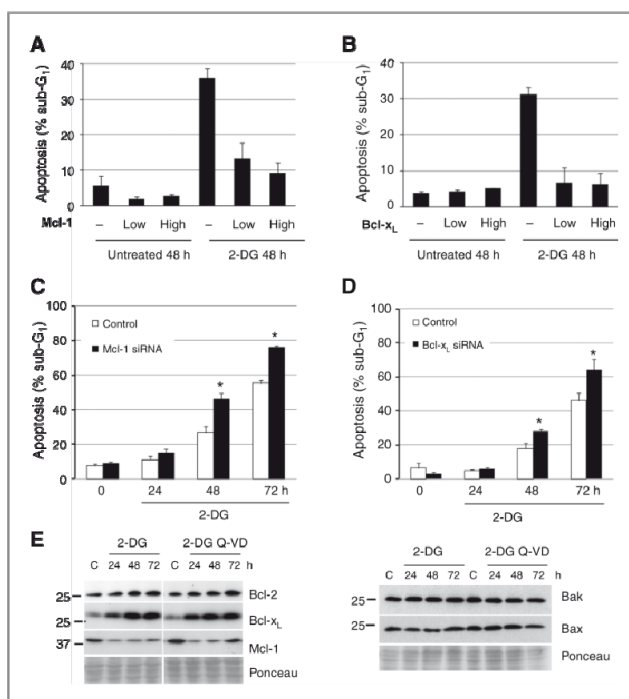
antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. In RH4 cells, we observed downregulation of Mcl-1, which could not be prevented by inhibition of caspases (Fig. 4E). Levels of other antiapoptotic Bcl-2 family members (Bcl-2 and Bcl-x₁) increased during treatment, whereas Bax and Bak did not change significantly. We analyzed the levels of putative BH3-only proteins that could be responsible for cell death induced by 2-DG (Fig. 5A). We observed that Puma was not induced by the treatment. However, Bim and Noxa showed moderate increases, which prompted us to analyze their role by employing siRNA (Fig. 5B and Supplementary Fig. S3). As shown in Fig. 5C, siRNA-mediated ablation of Noxa, but not Bim, conferred significant resistance to 2-DG. The combined ablation of the 2 proteins did not confer further resistance to cell death, indicating that Noxa is the major cell death mediator.

Noxa is constitutively bound to Mcl-1 in many cell lines, and it has also been described to be bound to Bcl-x₁ (22). These antiapoptotic proteins can also sequester Bak and Bax. Proapoptotic proteins such as Noxa can free Bak/Bax, allowing

them to promote cytochrome *c* release. We studied interactions between these proteins and observed that Mcl-1 is constitutively bound to Bim and Noxa (Fig. 5D and E). In addition, we could detect very weak interactions between Bak and Bcl-x₁ or Mcl-1 (Fig. 5F and Supplementary Fig. S6). Bcl-2 and Bax could not be coimmunoprecipitated with Bak or Bcl-x₁/Mcl-1, respectively (data not shown). We could not observe changes in the binding pattern of these proteins when treated with 2-DG.

The Noxa/Mcl-1 axis has been described to be involved in cell death induced by inhibition of cell metabolism, and its levels and activity have been shown to be regulated by multiple transcriptional and posttranscriptional mechanisms (21, 23–25). We checked for transcriptional regulation and observed that mRNA levels of these proteins barely changed (Fig. 6A). By blocking protein synthesis with cycloheximide, we observed that stability of the short-lived Mcl-1 and Noxa was dramatically enhanced when cells were treated with 2-DG (Fig. 6B). Because Mcl-1 is very sensitive to inhibition of translation, we analyzed the status of 2 pathways that lead to translation

Figure 4. Apoptosis induced by 2-DG proceeds through the mitochondrial pathway. A and B. RH4 cells were transfected with 2.5 μ g of membrane-targeted GFP vector and none (-), 2.5 μ g (low), or 7.5 μ g (high) of vector encoding Mcl-1 (A; Supplementary Fig. S5) or Bcl-x_L (B). Empty vector was added up to 10 μ g of total DNA. Cells were rinsed and, 2 hours later, they were trypsinized and replated. Fifteen hours later, medium was replaced, and cells were either left untreated or treated with 10 mmol/L 2-DG for 48 hours. Sub-G₁ analysis of GFP (+) cells (~10%–15%) is shown. C and D, cells were transfected with siRNA against Bcl-x_L or Mcl-1 and subjected to further treatment with 2-DG for the indicated times and sub-G₁ analysis. *, significant differences versus the controls ($P < 0.05$). Western blots are shown in Supplementary Fig. S5. E, RH4 cells were cultured for the indicated times with 10 mmol/L 2-DG in the presence or absence of Q-VD. Indicated proteins were resolved by immunoblotting.



inhibition and Mcl-1 downregulation: Ser³¹ phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2- α (eIF2 α) and mTOR inactivation (21, 26). We observed both phosphorylation of eIF2 α and inactivation (dephosphorylation) of the marker of mTOR status S6 (Fig. 6C). In addition, we observed that Noxa contributed modestly to downregulation of Mcl-1 (Fig. 6D).

Endoplasmic reticulum stress, but not ATP loss, correlates with apoptosis and regulation of Noxa and Mcl-1

Glucose deprivation and 2-DG impair generation of ATP, synthesis of macromolecules, and protein modifications such as acetylation and glycosylation. Although 2-DG is frequently used as a caloric restriction mimic, it has been shown to kill some tumor cell lines by interference with protein N glycosylation rather than by causing energetic stress (27). We aimed to identify the major cause of death induced by 2-DG by incubating cells in the presence of the sugar mannose, which rescues some cell lines from the toxicity of 2-DG by restoring glycosylation. We observed that coinubation with mannose completely prevented cell death induced by 2-DG (Fig. 7A).

This suggested that death was due to impairment of glycosylation in the endoplasmic reticulum (ER) and the subsequent ER stress. We indeed observed induction of several ER stress markers such as ATF4/CREB2 and GRP58 and the ER chaperones GRP94/endoplasmic and GRP78/BiP (Fig. 7B). Mannose fully prevented the induction of these proteins. Moreover, mannose prevented accumulation of Noxa and loss of Mcl-1, and it reduced the induction of Bim (Fig. 7B). To verify that mannose was not interfering with all effects of 2-DG, for instance, by reducing its uptake or providing metabolites for mitochondrial oxidation, we measured the effects of mannose on ATP depletion. As shown in Fig. 7C, 2-DG promoted a reduction of ATP levels that was not prevented by the addition of mannose. These results suggest that the Noxa/Mcl-1 axis is involved in ER stress-induced apoptosis. To further analyze this, we treated the cells with the ER stressor tunicamycin at a dose that promoted cell death with the same kinetics as 2-DG (Fig. 7D). We observed that tunicamycin also promoted a late increase in Noxa levels and a rapid decrease in Mcl-1. Moreover, we downregulated the transcription factor ATF4, which is induced by the PKR-like endoplasmic reticulum kinase

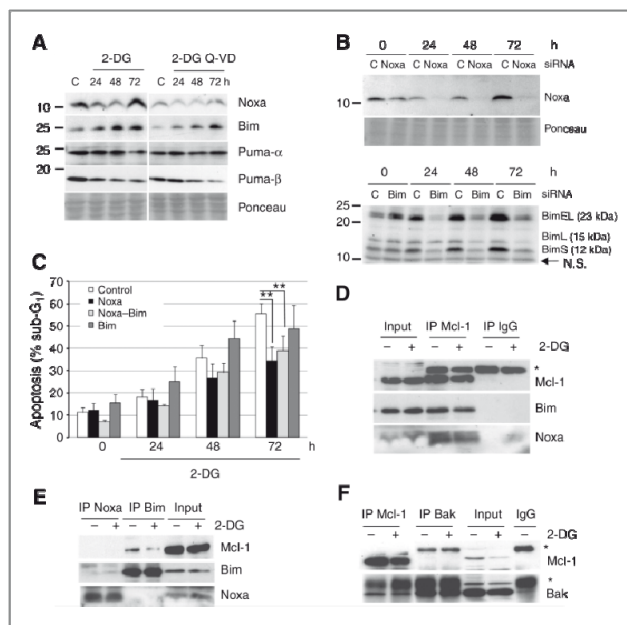


Figure 5. 2-DG regulates BH3-only proteins and induces Noxa-dependent apoptosis. A, Rh4 cells were cultured for the indicated times with 2-DG in the presence or absence of Q-VD. Indicated proteins were resolved by immunoblotting. Bands immunoreactive with anti-Puma antibody of approximately 23 and 16 kDa, and of 23 kDa with anti-Bim, are shown. Untreated control cells (labeled as "C") were incubated in regular culture medium for 24 hours. B, cells were transiently transfected with control oligonucleotide (labeled as "C") or siRNA against Noxa or Bim and subjected to further treatment with 2-DG for indicated times. Western blot against the indicated proteins is shown. N.S., a nonspecific band detected by Bim antibody is shown as a loading control. C, cells were treated as in B with siRNA against Noxa, Bim, or both combined, and subjected to sub-G₁ analysis. See also Supplementary Fig. S5 for a second siRNA against Noxa. *, $P < 0.01$ ($n = 4$). D-F, cells were treated with 10 mmol/L 2-DG for 48 hours. Immunoprecipitation (IP) and Western blotting with indicated antibodies were conducted as indicated under Materials and Methods. -, unspecific bands. Input was 5% of immunoprecipitated protein. IgG, immunoglobulin G.

(PI3K)-dependent ER stress pathway. ATF4 downregulation did not prevent Noxa increase (not shown), but it partially prevented cell death and loss of Mcl-1 (Fig. 7E and F).

Discussion

Rhabdomyosarcomas are aggressive tumors for which more effective chemotherapy needs to be found. We provide evidence here that an inhibitor of the glycolytic metabolism is effective against alveolar rhabdomyosarcoma. This subgroup of rhabdomyosarcoma is characterized by a chromosomal translocation involving *PAX3* or *PAX7* and the *FKHR* (*Foxo1*) genes. *PAX-FKHR* fusion gene has been shown to alter the expression of some metabolic enzymes (28), which may account for the different sensitivity of these tumor cell lines when compared with the embryonal subtype. Other possible determinants of the sensitivity to 2-DG are p53 and HIF-1, which regulate the glycolytic phenotype. p53 is not functional in any of the 3 sensitive alveolar rhabdomyosarcoma cell lines tested (29, 30), which would agree with data that indicate that p53 protects cells from metabolic stress. However, RD cells are also deficient in p53 but still insensitive. According to our results, HIF-1 α does not seem to be mediating the differential response to 2-DG either (Supplementary Fig. S2). We did however observe a small but reproducible sensitization to

2-DG when HIF-1 α was downregulated, in accordance with the studies of Maher and colleagues, which indicate that HIF-1 protects cells under hypoxia from 2-DG (31).

In this work, we have used the most commonly used glycolytic inhibitor 2-DG that has been tested in clinical trials and has been proven to be well tolerated by patients (32). Other drugs that target glycolysis are being tested in preclinical models and may prove more effective in the future (4). Furthermore, it is possible that this drug would be more effective in combination regimens, because 2-DG synergizes with chemo- and radiotherapy *in vitro* and *in vivo*.

Cell death by glucose deprivation has been studied in several models, and the findings indicate that different cell lines die in different manners when subjected to low glucose availability. In general, glucose deprivation kills hematopoietic cells by mitochondrial apoptosis, whereas mesenchymal or epithelial cells die by necrosis or by caspase-8-dependent apoptosis (19, 33). We observed that Rh4 and Rh30 cells died by necrosis when incubated in the absence of glucose (not shown) but by apoptosis when cultured with 2-DG, indicating that 2-DG and acute glucose deprivation do not promote death in the same manner. 2-DG is widely used to mimic glucose starvation. However, recent studies indicate that toxicity of 2-DG may be due to effects that are different from those in the absence of glucose. 2-DG inhibits glycolysis and usage of glucose to

Noxa-Dependent Rhabdomyosarcoma Cell Death by 2-Deoxyglucose

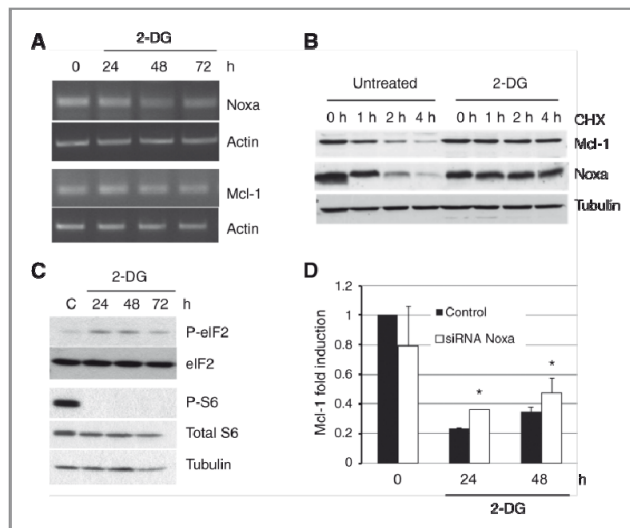


Figure 6. Noxa and Mcl-1 levels are regulated posttranscriptionally. **A**, cells were treated with 10 mmol/L 2-DG for indicated times and collected for RT-PCR analysis. Results are representative of 3 independent experiments. **B**, RH4 cells were incubated for 24 hours in regular medium (control) or treated for 72 hours with 10 mmol/L 2-DG in the presence of CHX to prevent caspase-mediated protein degradation. Cells were further treated with 100 μ g/mL cycloheximide (CHX) for indicated times and collected for Western blot analysis. Results are representative of 2 experiments, plus an experiment in which cells were treated for 48 hours, and identical results were obtained. **C**, cells were treated for indicated times with 10 mmol/L 2-DG and collected for the analysis of phosphorylation of eIF2 α (P-eIF2) and S6 (P-S6) by Western blotting. **D**, cells were transfected with siRNA against Noxa, treated as in Fig. 5C, and subjected to Western blotting. Levels of Mcl-1 versus tubulin were analyzed by densitometry. Values shown are relative to levels of Mcl-1 in untreated cells after transfection of control siRNA.

produce ATP or fatty acids. However, 2-DG can be metabolized through the pentose phosphate pathway in some conditions (34), and a catalytic block does not sufficiently explain the toxicity of 2-DG (35). Moreover, 2-DG alters protein glycosylation in a manner that is different from that of glucose deprivation: While it inhibits N-glycosylation, it enhances O-GlcNAcylation. 2-DG has been shown to kill some cells in normoxia by inhibition of N-glycosylation, and the subsequent ER stress, rather than by inhibition of glycolysis (27). Our experiments indicate that ER stress mediates rhabdomyosarcoma cell death, because a sugar that reverts the effects of 2-DG on N-glycosylation, mannose (36), completely protected from cell death, and inhibition of the ATF4 ER stress pathway partially prevented apoptosis. Inhibition of glycolysis does not seem to be critical for the toxicity of 2-DG over rhabdomyosarcoma. The fact that mannose did not prevent ATP loss induced by 2-DG rules out the possibility that mannose prevents death because it is being metabolized and used as a glycolytic intermediate. Indeed, Kurtoglu and colleagues showed that mannose cannot revert 2-DG toxicity in anaerobic conditions, in which cells are more dependent on glucose, and toxicity of 2-DG would be primarily due to inhibition of anaerobic glycolysis (27).

The apoptotic mechanism by which 2-DG induces cell death has remained underexplored, even though this compound has been used in clinical trials. Apoptosis induced by glucose deprivation in hematopoietic cells is inhibited by overexpression of Bcl-2 or Bcl-x_L, and it has been shown to be mediated by Noxa, Puma, or Bim (20, 25). We could not detect induction of Puma, possibly because this protein is usually induced in a p53-dependent manner, but the alveolar rhabdomyosarcoma cells used in this study are deficient in p53 (29, 30). Consistent with data that suggest that death induced by 2-DG is due to ER stress, we observed induction of Bim, which mediates death induced by ER stress in some systems (37). However, when Bim accumulation was prevented by RNA interference, no effect on cell death induced by 2-DG was observed (Fig. 6). Moreover, Bim induction was only partially prevented by mannose, although this sugar completely prevented cell death.

We observed that Noxa was critical for cell death. Noxa is a well-studied Bcl-2-only protein that has recently been described to play a role in glucose metabolism by promoting glucose uptake but directing glucose flux away from the glycolytic pathway by a yet uncharacterized mechanism (23). Noxa/PMAIP1 mRNA had been observed to be induced in response to 2-DG (38), but its role in cell death had not been tested. In

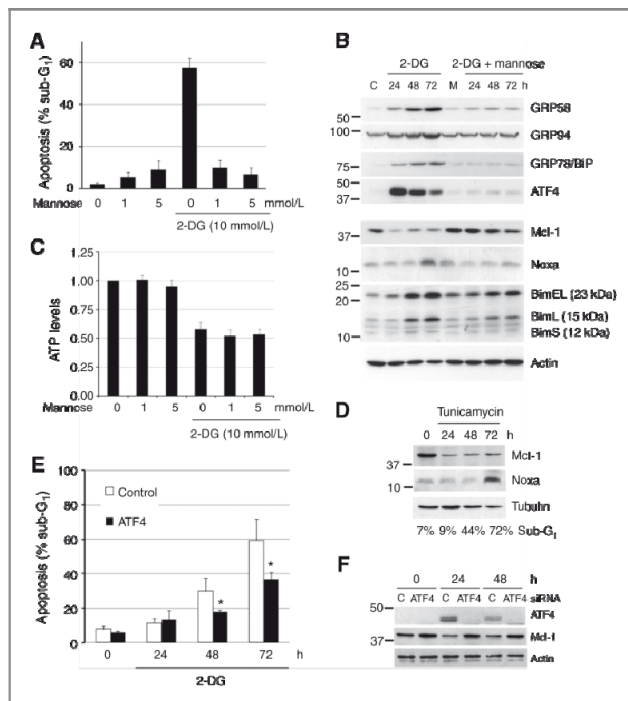


Figure 7. ER stress response mediates apoptosis induced by 2-DG. A, RH4 cells were cultured for 72 hours with or without 10 mmol/L 2-DG in the presence or absence of mannose at indicated doses and collected for sub-G1 analysis. Graph shows mean \pm SEM of 4 experiments. B, RH4 cells were incubated with 10 mmol/L 2-DG with or without 5 mmol/L mannose for indicated times. Control cells were either left untreated for 24 hours (C) or treated with mannose for 24 hours (M). C, a total of 2×10^7 RH4 cells were cultured in 96-well plates for 20 hours as indicated. ATP levels were measured with an ATPase 1 step kit (Perkin-Elmer) and normalized to cell number in each well to prevent effects of decrease in cell numbers by treatment with 2-DG. Values shown are relative to untreated controls. Graph shows mean \pm SEM of 4 experiments. D, RH4 cells were treated with 20 ng/ml tunicamycin and subjected to Western blotting and sub-G1 analysis. Average number of apoptotic cells is shown ($n = 3$). E and F, cells were transfected with ATF4 or control siRNA and collected for sub-G1 (E) or Western blot analysis (F). *, significant effects ($P < 0.05$). Note that siRNA against ATF4 also reproducibly upregulated basal Mcl-1 levels after transfection.

addition, Noxa has been shown to mediate death by ER stressors (22). In our studies, both Noxa induction and loss of Mcl-1 seem to be a consequence of ER stress rather than of energetic stress because the addition of mannose prevented both events (Fig. 7B). Regulation of both proteins was post-transcriptional. In the case of Noxa, its induction is observed only at long time points (3 days), whereas we can detect 40% death at 48 hours. This suggests that Noxa induction and stabilization are not as critical as its activation, which could possibly occur via phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5 (CDK5; ref. 23). Mcl-1 is likely to be downregulated because of inhibition of translation. eIF2 α phosphorylation had been shown to regulate Mcl-1 levels (26). In this line, we show that the ER stressor tunicamycin, which, like 2-DG, induces ER stress by inhibiting N-glycosylation, also promoted loss of Mcl-1 and induction of Noxa. Downregulation of ATF4 partially prevented Mcl-1 downregulation in response to 2-DG, but more experiments are required to determine how ATF4 contributes to maintain its levels. Besides ER stress, a contribution of the mTOR pathway to downregulation of Mcl-1 is also likely. It has been described that glucose deprivation activates

AMP-activated protein kinase and inactivates mTOR, which leads to a decrease in Mcl-1 levels. In response to 2-DG, Mcl-1 decrease was also associated with inactivation of translation (21, 39).

To our knowledge, this article shows the first evidence of the implication of a Bcl3-only protein in death induced by 2-DG. Another glycolytic inhibitor, 3-bromopyruvate, promotes dephosphorylation of the Bcl3-only protein Bad (6), which has also been involved in cell death induced by glucose deprivation in hepatocytes (40). Our results indicate that Noxa is critical for sensitivity to cell death induced by 2-DG. A likely scenario would be that downregulation of Mcl-1 and its inactivation by Noxa would release Bak, which could then be activated. Our immunoprecipitation experiments suggest that Mcl-1 blocks apoptosis, in part, by sequestering Noxa and Bak. In addition, Bcl-x_L prevented cell death when overexpressed, and we could detect (weakly) interaction of Bak with Bcl-x_L. However, we were unable to detect release of Bak from Mcl-1 or Bcl-x_L upon treatment with 2-DG. It is possible that only a very minor fraction is released, and the use of other antibodies would perhaps improve detection of interactions. In addition, other

BJ3-only proteins may also participate in the induction of apoptosis. Altogether, our results suggest that expression of Noxa could predict sensitivity to antiglycolytic drugs, that inhibition of glycolysis could be an effective novel strategy to treat alveolar rhabdomyosarcoma, and that antiglycolytic drugs should be further tested in clinical trials against this type of tumors.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors thank Joan Gil and Isabel Fabregat for support; J.E. Blec, G. Gil, F. Llamó, S.J. Martín, A. Sierra, P. Sancho, F. Virsik, and I. Marzo for discussions

or reagents; Míria Guinera and Clara Lucía León Anicibiaico for technical assistance; and Peter J. Houghton for Rb1 and Rb31 cell lines.

Grant Support

This work was supported by grants PI071027, PI100104, and RTCC RD06/0920 (to C. Muñoz-Pinedo, S. Ramírez-Peñado, F. Aguirre-Limones, and A. Caro-Maldonado) and grant PI090259 (to L. Lagares-Tena and D.M. Tirado) from the Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII, Spain, and ACRC grant 08-062). L. Lagares-Tena is funded by the Conicelmat per a Universitats i Recerca (CUR) from Departament d'Innovació, Universitats i Enginyeria (DUIE) de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

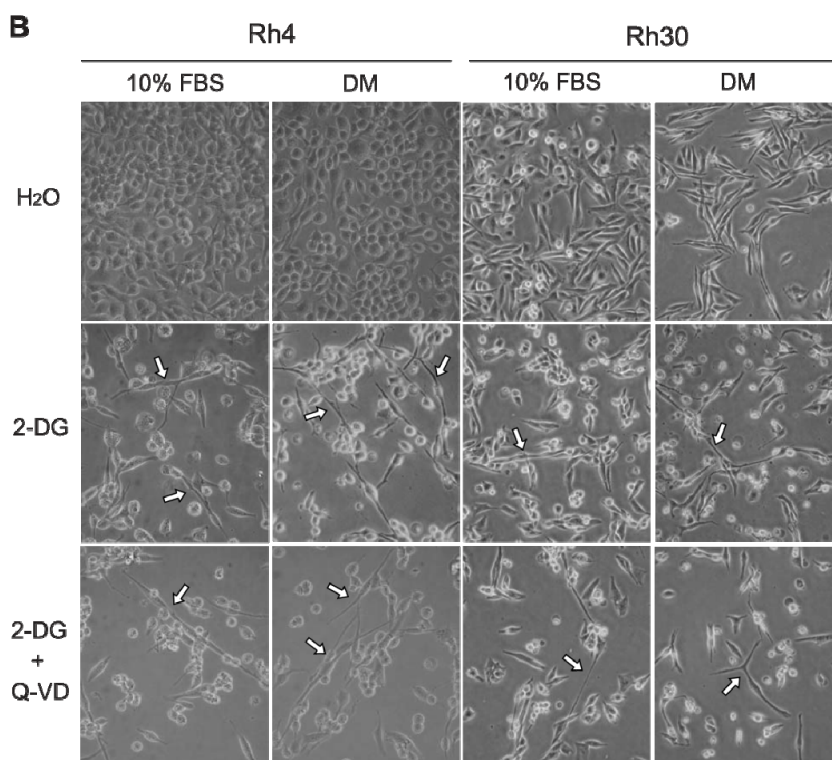
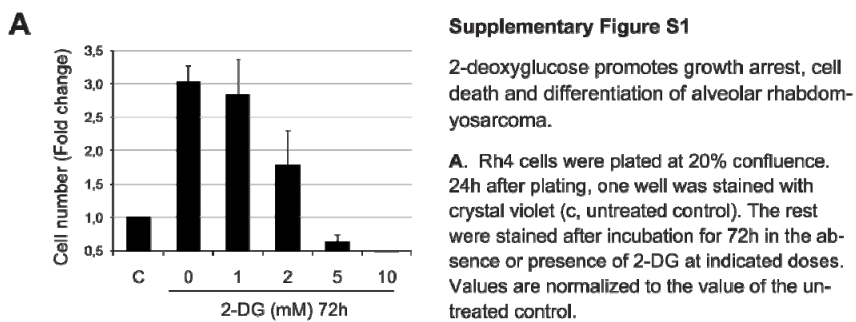
Received March 3, 2011; revised August 22, 2011; accepted September 3, 2011; published OnlineFirst September 12, 2011.

References

- Braitfield PP, Meyer WH. Rhabdomyosarcoma: new windows of opportunity. *Oncologist* 2005;10:518-27.
- Leophart C, Rodeberg D. Pediatric surgical oncology: management of rhabdomyosarcoma. *Surg Oncol* 2007;16:173-85.
- Hayes-Jordan A, Andrassy R. Rhabdomyosarcoma in children. *Curr Opin Pediatr* 2009;21:373-8.
- El Mjayed N, Caro-Maldonado A, Ramirez-Painado S, Muñoz-Pinedo C. Sugar-free approaches to cancer cell killing. *Oncogene* 2011;30:253-64.
- Liu H, Hu YP, Savaraj N, Priebe W, Lampidis TJ. Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors. *Biochemistry* 2011;50:5442-7.
- Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carow JS, Fang L, Bhatta KN, et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 2005;65:6113-21.
- Jahinbe VE, Sabido O, Delour AI, Castells J, Lefal E, Roussel D, et al. Evidence for mitochondrial respiratory deficiency in rat rhabdomyosarcoma cells. *PLoS One* 2010;5:e8837.
- Fan TW, Kudla M, Jankowski K, Higashi RM, Ratajczak J, Ratajczak MZ, et al. Rhabdomyosarcoma cells show an energy producing anabolic metabolic phenotype compared with primary myocytes. *Mol Cancer* 2008;7:79.
- Fulda S. Targeting apoptosis resistance in rhabdomyosarcoma. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8:539-44.
- Mulligan LM, Malickshewski GJ, Scoble HJ, Cavenee WK. Mechanisms of p53 loss in human sarcomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:5869-7.
- Jones RS, Ples DR, Kubek S, Buzzai M, Mi J, Xu Y, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2006;18:283.
- Völkel T, Denecke T, Stoffen L, Misch D, Schönberger S, Pötken M, et al. Positron emission tomography for staging of pediatric sarcoma patients: results of a prospective multicenter trial. *J Clin Oncol* 2007; 25:5435-41.
- Caro-Maldonado A, Muñoz-Pinedo C. Dying for something to eat: how cells respond to starvation. *Open Cell Signal J* 2011;3:42-51.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:231.
- Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2008;36:1-9.
- Zhang XD, Daslandes E, Villaciu M, Poulain L, Duval M, Gauduchon P, et al. Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines *in vitro*. *Anticancer Res* 2008;28:3561-6.
- Kiuchi K, Tsuchiya K, Otake O, Gotch T, Tamura S, Katsumi Y, et al. Effects of PAX3-FKHR on malignant phenotypes in alveolar rhabdomyosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;365:568.
- Finkenstädt FG, Devicioni E, Osborn KG, Cavenee WK, Arden KC, Anderson MJ. Transgenic mice expressing PAX3-FKHR have multiple defects in muscle development, including ectopic skeletal myogenesis in the developing neural tube. *Transgenic Res* 2006; 15:595-614.
- Caro-Maldonado A, Tall SWG, Ramirez-Painado S, Flood JE, Fabregat I, Gran DR, et al. Glucose deprivation induces an atypical form of apoptosis mediated by caspase-9 in Bax-, Bak-deficient cells. *Cell Death Differ* 2010;17:1335-44.
- Alves NL, Derks IA, Bark E, Spijker R, van LierFA, Eldering E. The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity* 2006;24:703-16.
- Pradell LA, Banetau M, Chauvin C, Jacquin MA, Marchetti S, Muñoz-Pinedo C, et al. Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation. *Oncogene* 2010;29:1641.
- Zhang L, Lopez H, George NM, Liu X, Pang X, Luo X. Selective involvement of Bcl-3-only proteins and differential targets of Noxa in diverse apoptotic pathways. *Cell Death Differ* 2011;18:264-73.
- Lowman XH, McDonnell MA, Kosloske A, Odomade OA, Jenness C, Karim C, et al. The proapoptotic function of Noxa in human leukemia cells is regulated by the kinase Cdk5 and by glucose. *Mol Cell* 2010;40:320-30.
- Wensveen F, Alves N, Derks I, Reedquist K, Eldering E. Apoptosis induced by overall metabolic stress converges on the Bcl-2 family proteins Noxa and Mcl-1. *Apoptosis* 2011;16:708-21.
- Zhao Y, Coloff JL, Ferguson EC, Jacobs SR, Cui K, Rahmell JC. Glucose metabolism attenuates p53 and puma-dependent cell death upon growth factor deprivation. *J Biol Chem* 2008;283:26344-53.
- Fritsch RM, Schneider G, Saur D, Scheibel M, Schmid FM. Translational repression of MCL-1 couples stress-induced eIF2 α phosphorylation to mitochondrial apoptosis initiation. *J Biol Chem* 2007;282: 22551-62.
- Kurtoglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehrman MA, Wangpachit M, et al. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol Cancer Ther* 2007;6: 3049-58.
- Lae M, Ahn EH, Mercado GE, Chuai S, Edgar M, Pawel BR, et al. Global gene expression profiling of PAX-FKHR fusion-positive alveolar and PAX-FKHR fusion-negative embryonal rhabdomyosarcomas. *J Pathol* 2007;212:143-61.
- Ganjavi H, Gee M, Narendran A, Freedman MH, Mallin D. Adenovirus-mediated p53 gene therapy in pediatric soft-tissue sarcoma cell lines: sensitization to cisplatin and doxorubicin. *Cancer Gene Ther* 2005; 12:397-406.

Ramírez-Painado et al.

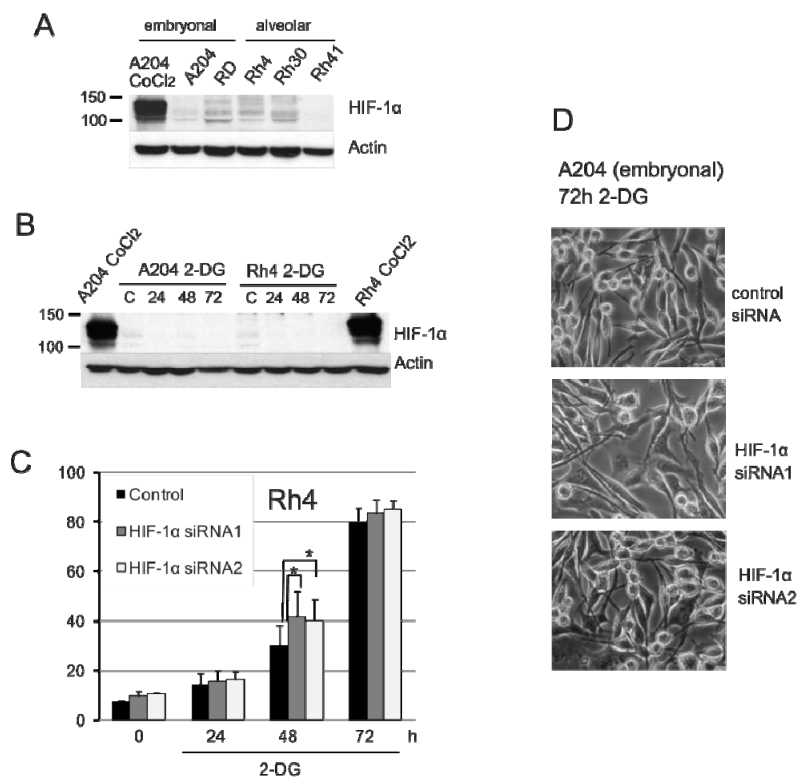
30. Canner JA, Sobo M, Ball S, Hutzen B, DeAngelis S, Willis W, et al. MI-63: a novel small-molecule inhibitor targets MDN2 and induces apoptosis in embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma cells with wild-type p53. *Br J Cancer* 2009;101:774.
31. Mahor JC, Wangsachir M, Sivaraj N, Kurtoglu M, Lampidis TJ. Hypoxia-inducible factor-1 confers resistance to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose. *Mol Cancer Ther* 2007;6:732-41.
32. Stein M, Lin H, Jayaraman C, Dwarzhinski D, Gounder M, Bray K, et al. Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies. *Prostate* 2010;70:1388-94.
33. Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 2007;178:93-105.
34. Zabos P, Kyner D, Mendelsohn N, Schreiber G, Waxman S, Christman J, et al. Catabolism of 2-deoxyglucose by phagocytic leukocytes in the presence of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:5422-6.
35. Ralser M, Wameirák MM, Struys EA, Joppich C, Krobitsch S, Jakobs C, et al. A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;105:17807-11.
36. Detema R, Schwarz RT. Interference with glycosylation of glycoproteins. Inhibition of formation of lipid-linked oligosaccharides *in vivo*. *Biochem J* 1979;164:113-23.
37. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 2007;122:1337-49.
38. Heminger K, Jahn V, Kadakia M, Dwarakanath S, Berbarich SJ. Altered gene expression induced by ionizing radiation and glycolytic inhibitor 2-deoxy-glucose in a human glioma cell line: implications for radio sensitization. *Cancer Biol Ther* 2008;5:815-23.
39. Coloff JL, MacIntyre AN, Nichols AG, Liu T, Gallo CA, Plas DR, et al. Akt-dependent glucose metabolism promotes Mcl-1 synthesis to maintain cell survival and resistance to Bcl-2 inhibition. *Cancer Res* 2011;71:5204-13.
40. Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang C-Y, Krauss S, Ranger AM, et al. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 2003;424:952-6.



B. RH4 or RH30 cells were treated with 10mM 2-DG in the presence of 20 μ M Q-VD in complete media (RPMI + 10%FBS) or differentiation media (DM, serum-free RPMI) for 48h. Phase-contrast microscope pictures are shown. Arrows indicate fused cells with myotube morphology.

Supplementary Figure S2

HIF-1 α expression does not explain differential sensitivity of alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma cells to 2-deoxyglucose.



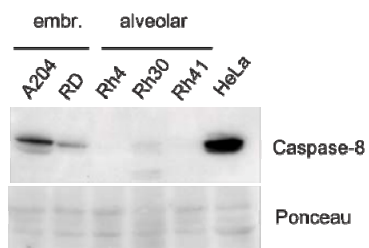
A. Indicated cell lines were analyzed for expression of HIF-1 α . Positive control were A204 cells treated with CoCl₂ 200 μ M for 4hours

B. A204 and Rh4 were treated with CoCl₂ 200 μ M for 4hours or with 2-DG 10mM for indicated times and collected for analysis of HIF-1 α expression by western blot.

C. Rh4 cells were transfected with control or HIF-1 α siRNA. After 72h they were treated with 2-DG

10mM for indicated times and collected for subG1 analysis. Paired t-student test indicates that siRNA against HIF-1 α produces a small although significant sensitization to 2-DG at 48h (p=0.049, n=4 experiments).

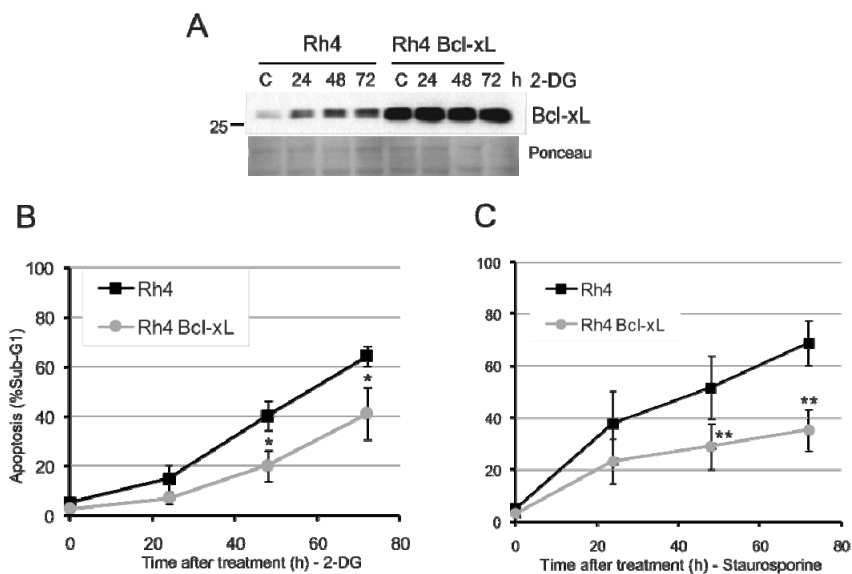
D. A204 cells are not sensitized to 2DG by pretreatment with siRNAs against HIF-1 α . Same results were obtained by analysis of subG1 DNA content of cells pretreated with siRNAs for 48h or 72h (not shown).

Suppl. Fig. S3

Rhabdomyosarcoma cell lines express low levels of caspase-8. Total cell extracts of embryonal (embr.) or alveolar rhabdomyosarcoma cell lines were analyzed for caspase-8 expression by western blot. HeLa cell lysate was used as a positive control for caspase-8 expression.

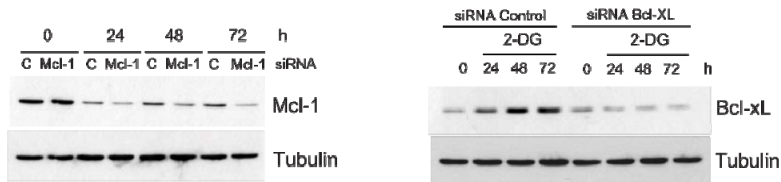
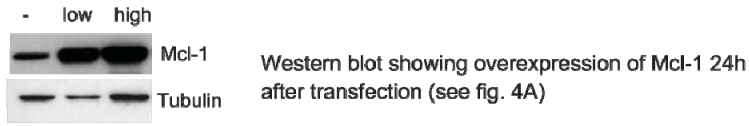
Suppl. Figure S4

Cells overexpressing Bcl-xL are protected from 2-deoxyglucose.

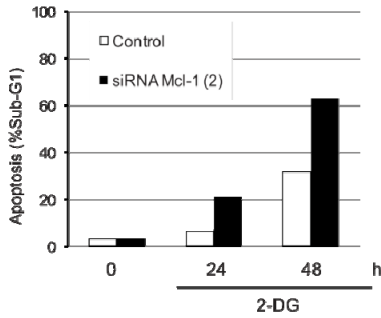


Cells from the parent cell line and Rh4 cells stably over-expressing Bcl-xL were subjected to western blot analysis (A) or cultured for the indicated times with 2-DG 10mM (B) or staurosporine 300nM (C) and collected for analysis of sub-G1 DNA content. Degree of protection from 2-DG is similar to protection from staurosporine. Results show average and SEM of 5 experiments.

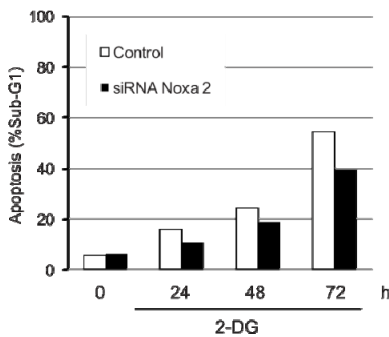
Suppl. Figure S5



Western blot from samples analyzed in Figure 4C and 4D showing downregulation of Mcl-1 or Bcl-xL. "c", control siRNA.



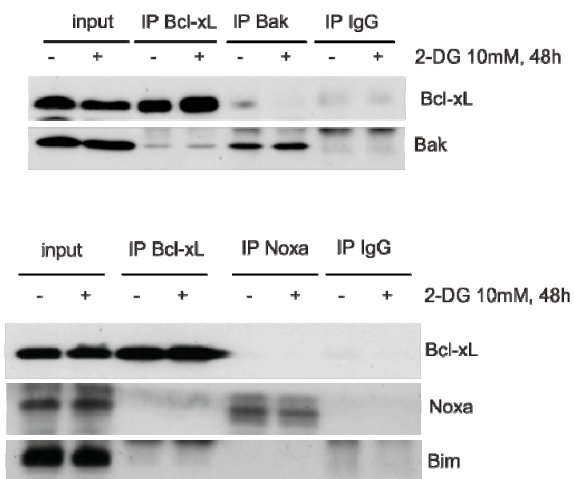
Cells were treated like in Figure 4C but a different sequence to target Mcl-1 was used (5'-UCAAAAGAAACGCGGUAUU).



Cells were treated like in Figure 5C but a different sequence to target Noxa was used (5'-GCTACTCAACTCAGGAGATTT)

Suppl. Figure S6

Interactions between Bcl-2 family members.



Supplemental Methods

Antibodies

Antibodies used for western blot or immunoprecipitation were:

Actin (ICN clone C4), ATF4/CREB2 (Santa Cruz, sc-200), Bax (Santa Cruz, SC-493), Bak (Upstate, clone NT), Bcl-2 (Becton, 550847), Bcl-xL (Cell Signaling, 2764), Bim (BD, Pharmingen, 559685), Caspase-8 (MBL, 5F7), eIF2-alpha (Santa Cruz, sc-11386), phospho-eIF2-alpha (Cell signaling, 3597), FOXO1a (Cell Signaling, 2880), GRP58 (Acris antibodies SP5391), GRP78 (Santa Cruz, sc-1050), GRP 94 (Santa Cruz, sc-1794), HIF-1 α (RD, aF1935), Mcl-1 (Santa Cruz, sc-819), Noxa (Calbiochem, OP180), Puma (Abcam, ab9643), phospho-S6 (Cell Signalling, 2211), S6 (Upstate, 05-781R), alpha-tubulin (Abcam, ab28439), PARP (Cell Signaling, 9542).

HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma) were detected with ECL reagent (Pierce).

siRNA

Previously published sense sequences of siRNA duplexes were:

- Bim: 5'-GCACCAUGAGUUGUGACA-3', Noxa: 5'-GGUGCACGUUUCAUCAUU-3' (Sheridan, C., Brumatti, G., Elgandy, M., Brunet, M., and Martin, S. J. An ERK-dependent pathway to Noxa expression regulates apoptosis by platinum-based chemotherapeutic drugs. *Oncogene*, 2010.).
- Mcl-1: 5'-AAUACACCAGUACGGACGGG (Lopez-Royuela, N., Perez-Galan, P., Galan-Malo, P., Yuste, V. J., Anel, A., Susin, S. A., Naval, J., and Marzo, I. Different contribution of BH3-only proteins and caspases to doxorubicin-induced apoptosis in p53-deficient leukemia cells. *Biochem Pharmacol*, 79: 1746-1758, 2010)
- Bcl-xL: 5'-ACAAGGAGAUGCAGGUUUUU (Zhang, H., Guttikonda, S., Roberts, L., Uziel, T., Semizarov, D., Elmore, S. W., Levenson, J. D., and Lam, L. T. Mcl-1 is critical for survival in a subgroup of non-small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene*, 30: 1963-1968, 2011)
- HIF-1 α : 5'-GCCACTTCGAAGTAGTGCT-3' and 5'-CCTATATCCCAATGGATGATG-3' (Fitsialos, G., Bourget, I., Augier, S., Ginouvès, A., Rezzonico, R., Odorisio, T., Cianfarani, F., Virolle, T., Pouysségur, J., Meneguzzi, G., Berra, E., Ponzio, G., and Buscà, R. HIF1 transcription factor regulates laminin-332 expression and keratinocyte migration. *Journal of Cell Science*, 121: 2992-3001, 2008)

ATF4 sequence was: 5'-GCCUAGGUCUCUJAGAUGA. As a control, an irrelevant siRNA oligonucleotide (pBlue, sense strain: 5-GUAAGACACGACUUAUCGC-3) was used. The same sequence coupled to a fluorochrome (pBlue-FITC) was used to measure transfection efficiency, which was around 80% in all cases.

Microscopy

For immunofluorescence, mouse IgG-FITC from Sigma was used as a secondary antibody. Cells were visualized in an Olympus BX-60 microscope.

Phase-contrast microscope pictures were taken with an Olympus (Center Valley, PA, USA) IX70 inverted microscope with a 20x objective and an Olympus C-5060 camera. One tenth of the whole field is shown.

Statistical analysis

Paired, two-tailed T-student test was used. One asterisk denotes $p < 0.05$ when compared to the control condition; two asterisks, $p < 0.01$.



Glucose deprivation induces an atypical form of apoptosis mediated by caspase-8 in Bax-, Bak-deficient cells

A Caro-Maldonado¹, SWG Tait², S Ramirez-Pelnao¹, J-E Ricci², I Fabregat¹, DR Green^{2,4} and C Muñoz-Pinedo^{1,4}

Apoptosis induced by most stimuli proceeds through the mitochondrial pathway. One such stimulus is nutrient deprivation. In this study we studied death induced by glucose deprivation in cells deficient in Bax and Bak. These cells cannot undergo mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) during apoptosis, but they undergo necrosis when treated with MOMP-dependent apoptotic stimuli. We find in these cells that glucose deprivation, rather than inducing necrosis, triggered apoptosis. Cell death required caspase activation as inhibition of caspases with peptidic inhibitors prevented death. Glucose deprivation-induced death displayed many hallmarks of apoptosis, such as caspase cleavage and activity, phosphatidyl-serine exposure and cleavage of caspase substrates. Neither overexpression of Bcl-xL nor knockdown of caspase-9 prevented death. However, transient or stable knockdown of caspase-8 or overexpression of CrmA inhibited apoptosis. Cell death was not inhibited by preventing death receptor-ligand interactions, by overexpression of c-FLIP or by knockdown of RIPK1. Glucose deprivation induced apoptosis in the human tumor cell line HeLa, which was prevented by knockdown of caspase-8. Thus, we have found that glucose deprivation can induce a death receptor-independent, caspase-8-driven apoptosis, which is engaged to kill cells that cannot undergo MOMP.

Cell Death and Differentiation advance online publication, 5 March 2010; doi:10.1038/cdd.2010.21

Apoptosis is a form of cell death required for homeostasis of human tissues. Apoptotic cells display several morphological and biochemical changes, which are a consequence of the activity of caspase proteases.¹ Caspases are normally inactive in the cytosol, but they become activated by dimerization and/or proteolysis by other caspases. ‘Executioner’ caspases such as caspase-3 are activated through cleavage by ‘initiator’ or ‘apical’ caspases, of which the best characterized are caspases-8 and -9. Caspase-8 is activated by its recruitment to the multimeric DISC (death-inducing signaling complex) in response to extracellular ligands such as Fas/CD95-ligand, TRAIL or TNF;² this is the death receptor, or extrinsic pathway of apoptosis. Caspase-9 is activated by dimerization after recruitment to the apoptosome, a complex of APAF1 proteins formed in response to the release of the mitochondrial protein cytochrome *c* into the cytosol.³ This caspase activation cascade is called the mitochondrial or intrinsic pathway of apoptosis.

The mitochondrial pathway of apoptosis is regulated by proteins of the Bcl-2 family, which regulate the integrity of the mitochondrial outer membrane, thereby controlling

cytochrome *c* and subsequent caspase activation.⁴ Impairment of the mitochondrial pathway is common in human tumors. Cancer cells frequently overexpress the antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1, or they lack functional proapoptotic Bcl-2 family members, including Bax, Bak or both.⁵ The overexpression of antiapoptotic Bcl-2 proteins not only blocks the morphological features of apoptosis, but also enables clonogenic cell survival.⁶ For these reasons, cells from Bax, Bak double-knockout (DKO) mice are a suitable model to identify non-mitochondrial pathways of cell death, which may be targeted for therapy.

Bax/Bak-deficient murine embryonic fibroblasts (MEFs) are resistant to apoptosis induced by stimuli that normally kill cells through the mitochondrial pathway.^{7,8} However, some drugs such as staurosporine, etoposide, thapsigargin and tunicamycin, which kill wild-type (WT) cells in a mitochondria-dependent manner, can kill Bax-, Bak-deficient cells by a slower, non-apoptotic mechanism.^{9,10} We analyzed cell death induced by glucose deprivation in these cells, as this stimulus has been shown to kill some cell lines through necrosis.^{11,12} We report here that glucose deprivation can induce death of

¹Laboratori d'Oncologia Molecular, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Gran Via de L'Hospitalet 189, L'Hospitalet, Barcelona 08907, Spain;

²Department of Immunology, St. Jude Children's Research Hospital, IRC-E7050, MS 351, 262 Danny Thomas Place, Memphis, TN 38105, USA and ³Inserm U895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), équipe 3 Avenir, Nice, France

⁴Corresponding author: C Muñoz-Pinedo, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Duran i Reynals 3^a planta, Gran Via s/n km 2.7, L'Hospitalet, Barcelona 08907, Spain. Tel.: +34 93 260 7339; Fax: +34 93 260 7426; E-mail: cmunoz@idibell.cat

⁵These authors share senior authorship.

Keywords: apoptosis; caspase-8; glucose metabolism; Bax–Bak independent

Abbreviations: CHX, cycloheximide; GFP, green fluorescent protein; DISC, death-inducing signaling complex; DKO, SV40-transformed Bax-, Bak-deficient MEFs; MEF, murine embryonic fibroblast; MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization; PI, propidium iodide; Q-VD, quinalone-Val-Asp-Ch2-difluorophenoyl (Q-VD-OPH); Z-VAD, Z-Val-Ala-Asp(Ome)-CH2F (Z-VAD-FMK)

Received 06.7.09; revised 29.1.10; accepted 29.1.10; Edited by RA Knight



Bax-, Bak-deficient MEFs. Surprisingly, in these cells glucose deprivation induces apoptosis that proceeds through an unconventional pathway requiring caspase-8. Our results uncover a pathway for activation of caspase-8 different than death receptor ligation, and provide new insight into the mechanism of cell death induced by nutrient deprivation.

Results

Glucose deprivation kills Bax-, Bak-deficient cells by apoptosis. Glucose deprivation has been shown to kill cells either by necrosis^{11,12} or through the mitochondrial or 'intrinsic' pathway of apoptosis.^{13–17} We reasoned that cells deficient in Bax and Bak, which cannot die through the intrinsic pathway,⁸ would undergo a rapid necrotic death when deprived of glucose, as glucose deprivation kills most cells in 24–48 h. Alternatively, it was possible that these cells could remain atrophic but alive for weeks, as it was described that Bax-, Bak-deficient hematopoietic cells, when deprived of growth factors, downregulate glucose transporter 1 but do not die for several weeks.¹⁸ We tested whether glucose deprivation provoked cytostatic or cytotoxic effects in SV40-transformed, Bax-, Bak DKO MEFs.⁸ As assessed by morphology and propidium iodide (PI) incorporation, about 10% of cells appeared dead by 24 h, with approximately 75% dead cells within 72 h (Figure 1a and b). Their WT counterparts died more rapidly, and were all dead by 48 h (Figure 1b), suggesting that these cells die through the mitochondrial pathway.

Bax, Bak DKO MEFs can die by a non-apoptotic form of cell death in response to staurosporine, etoposide,^{9,19} alkylating DNA agents²⁰ and ER stressors.¹⁹ We determined whether the form of cell death induced by glucose deprivation was apoptosis or necrosis. The morphology of dead DKO cells was different from the classical necrotic death induced by thapsigargin in these cells,¹⁰ and was more similar to the morphology of cells dying by apoptosis induced by the combination of TNF and cycloheximide (CHX) (Figure 1a): cells rounded up and detached from the culture plate, and they showed a reduction of volume (shrinkage). Moreover, when we incubated glucose-deprived cells in the presence of the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPH (Q-VD), we observed a reduction in the number of dead cells as measured by morphology and PI incorporation, thus indicating that death is caspase-dependent (Figure 1a and b). In addition, we observed that cells displayed sub-G1 DNA fragmentation, a marker of apoptosis, with similar kinetics to that of plasma membrane disruption (PI uptake) (Figure 1b). Z-VAD-FMK (Z-VAD), an alternative pan-caspase inhibitor, inhibited both subG1 DNA fragmentation and PI incorporation. Other markers of apoptosis such as caspase-3 and PARP cleavage were observed in Bax-, Bak-deficient cells, albeit with slower kinetics than in WT cells (Figure 1c). We stained cells with annexin V, which detects phosphatidyl-serine exposure on the surface of apoptotic cells. Glucose-deprived cells displayed annexin V binding before they became PI-positive, another indication of apoptosis (Figure 1d). Moreover, phosphatidyl-serine exposure was inhibited by Q-VD.

We observed chromatin condensation after glucose deprivation (Figure 1e and f). Nuclei had a different appearance to the classical apoptotic morphology observed after treatment with TNF, or to the relaxed appearance of necrotic cells treated with thapsigargin. After glucose deprivation, DNA was condensed around the periphery of the nuclei. However, this condensation may not be directly related to caspase activation as it occurred in glucose-deprived cells treated with Q-VD. Thus, apoptosis induced by glucose deprivation in Bax-, Bak-deficient cells displayed all of the hallmarks of apoptosis analyzed, with the exception of the characteristic chromatin condensation.

Glucose deprivation-induced death is caspase-dependent and does not proceed through the mitochondrial pathway. We had observed that Q-VD and Z-VAD inhibited features of cell death induced by glucose deprivation. To confirm that caspases were active in glucose-deprived DKO cells, we analyzed the cleavage of a synthetic DEVD peptide in cell extracts. Glucose deprivation induced DEVD-ase activity, which was inhibited by Q-VD (Figure 2a). In addition, we analyzed cleavage of the effector caspase-3, which is a marker of its activation. We observed cleavage of caspase-3 in DKO cells after glucose withdrawal that was inhibited by ZVAD (Figure 2b). Moreover, we verified that caspases were active by analyzing the cleavage of substrates of effector caspases: co-chaperone p23 and PARP. These proteins were cleaved in a Z-VAD-inhibitable manner (Figure 2b).

To exclude a possible effect of Z-VAD-fmk or Q-VD-OPH on proteases other than caspases, we studied the inhibition of death by other peptidic inhibitors. We observed that a panel of caspase inhibitors prevented both subG1 DNA fragmentation (Figure 2c) and PI incorporation (Figure 2d). These inhibitors were more efficient in inhibiting DNA cleavage than PI uptake, suggesting that the intracellular concentrations of these compounds can inhibit some apoptotic features better than others, or that inhibition of caspases switches the form of death to necrosis in a small percent of the cells. Consistent with data reported in Jurkat cells,²¹ VDAD-fmk and LEHD-fmk were less efficient than IETD-fmk, Z-VAD-fmk and Q-VD-OPH in preventing death.

Bax and Bak are required for mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) during apoptosis, and cells lacking these proteins cannot release cytochrome *c* or undergo apoptosis in response to many stimuli, including microinjection of tBid.⁸ However, it was possible that glucose deprivation activates the mitochondrial pathway through an unidentified, alternative mechanism. Therefore, we treated cells with shRNA for caspase-9 (Figure 3a). This treatment did not affect any of the parameters of cell death tested (Figure 3b). Furthermore, we generated DKO cells stably overexpressing Bcl-xL. Bcl-xL inhibits MOMP during apoptosis.²² Bulk-transduced cells (pool) and four clones were analyzed. As shown in Figure 3c, Bax, Bak DKO MEFs overexpressing Bcl-xL (Figure 3d) were not protected from death when compared with the parental line.

Intriguingly, although caspase inhibitors effectively blocked glucose deprivation-induced cell death in Bax, Bak DKO MEF,

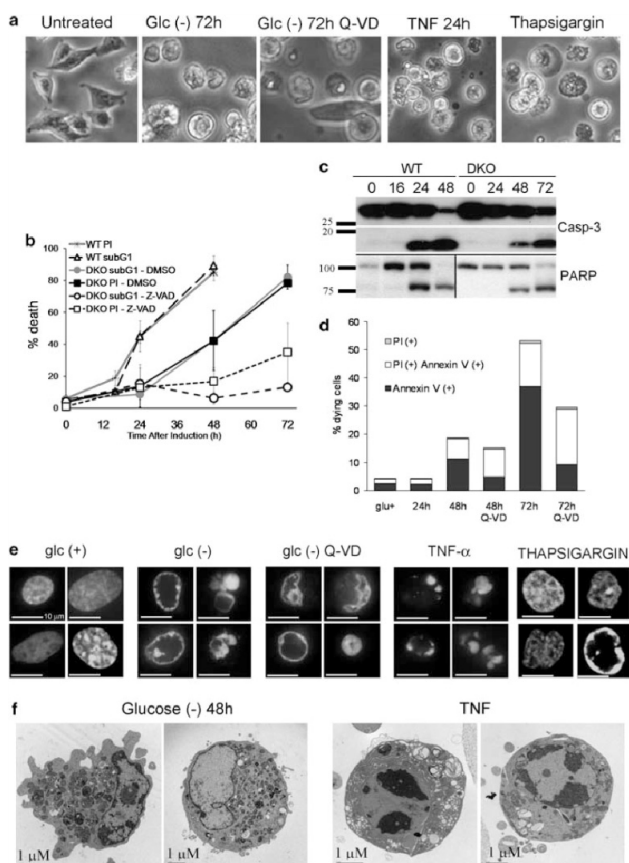


Figure 1 Glucose removal triggers cell death in Bax, Bak DKO cells with mixed features of apoptosis and necrosis. (a) Bax, Bak DKO MEF were subjected to glucose deprivation in the absence or presence of 20 μ M Q-VD for 72 h, or treated with thapsigargin 10 μ M or TNF for 24 h. (b) Glucose deprivation induces DNA degradation. WT and Bax, Bak DKO MEFs were treated as described in Materials and Methods section and collected for subG1 analysis or propidium iodide (PI) incorporation at times shown. Data show average and S.D. of at least three (PI) or four (subG1) experiments. (c) WT and DKO cells display cleavage of caspase-3 and PARP upon glucose deprivation. Cells were subjected to western blot (WB) analysis at times shown (h). Note the different kinetics among cell lines. (d) Glucose deprivation induces phosphatidylserine (PS) externalization measured by Annexin V incorporation in DKO cells. Q-VD inhibits both events. A representative experiment is shown. (e, f) DKO cells undergo atypical nuclear condensation after glucose deprivation. Bax, Bak DKO MEFs were transfected transiently with GFP-Histone 2A plasmid in chamber slides. Cells were treated for 72 h without glucose (in the presence or absence of Q-VD) or with TNF or thapsigargin. Nuclei were visualized by confocal microscopy (e) or electron microscopy (f). Representative images are shown. In (f), only dead (floating) cells were collected after being deprived of glucose for 48 h without Q-VD. Note the absence of massive cytosolic vacuolation which characterizes necrotic/autophagic cell death in Bax-, Bak-deficient MEFs^{4,19}.

we did not observe this effect in WT MEF transduced with Bcl-xL (data not shown). It is possible that Bcl-xL promotes necrosis in MEF in response to glucose deprivation, similar to what has been observed in response to etoposide.⁹

Alternatively, it is possible that the adaptation to the Bax, Bak double-deficient condition primes cells for a novel caspase activation mechanism. We therefore sought to identify the caspase involved in initiating cell death in this setting.



4

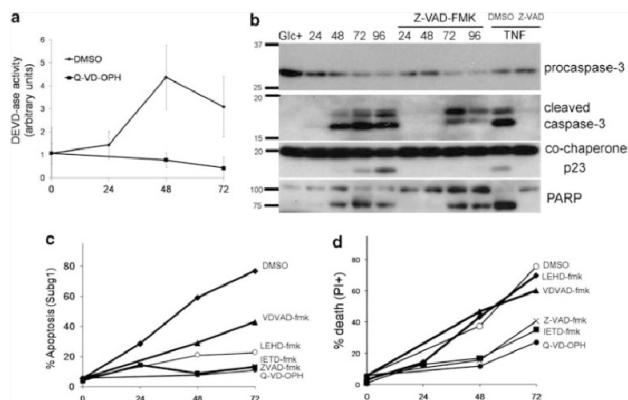


Figure 2 Glucose deprivation induces caspase activation in Bax, Bak DKO cells. (a) Glucose deprivation induces caspase activity. Bax, Bak DKO MEFs were cultured for the indicated times without glucose. In the presence or absence of Q-VD. Cell lysates were incubated with AG-DEVD-arnc as described in Materials and Methods section. Results show average and S.E.M. of three experiments. (b) Glucose deprivation induces cleavage of procaspase-3 and the caspase substrates co-chaperone p23 and PARP, which are inhibited by Z-VAD. Cell lysates were prepared as in (a) and proteins were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted. (c, d) Caspase inhibitors block apoptotic features in glucose-deprived Bax, Bak DKO cells. Bax, Bak DKO MEFs were grown in glucose-free medium in the presence of caspase inhibitors or DMSO as vehicle control. Inhibitors and DMSO were replenished every 24 h. Cells were collected and subjected to subG1 (c) or PI uptake (d) analysis. Data represent average of two experiments

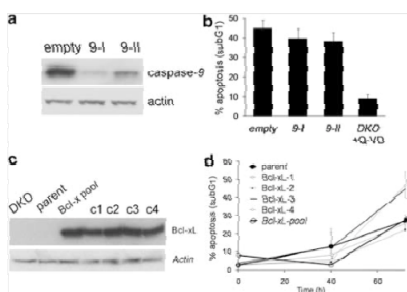


Figure 3 Glucose deprivation-induced apoptosis in Bax, Bak DKO MEF is not dependent on the classical mitochondrial pathway of apoptosis. (a) DKO cells were infected with retroviruses encoding two different shRNA against caspase-9, or the empty vector. Expression of caspase-9 is shown. (b) The same pools were collected after 72 h of glucose withdrawal and analyzed for subG1 DNA content. DKO cells treated with Q-VD-OPH are shown as a control for caspase inhibition. Results show average and S.E.M. of five experiments. (c) DKO cells (shown as 'parent') were stably transfected with Bcl-xL. Several clones were generated by serial dilution and blotted for expression of Bcl-xL or actin. (d) The clones, bulk population and cells from the parent cell line described in (c) were deprived of glucose and collected at 40 and 72 h for analysis of subG1 DNA content. Results show average and S.E.M. of three experiments

Caspase-8 is engaged in death induced by glucose deprivation in Bax, Bak DKO MEFs and HeLa cells. In the absence of a mitochondrial pathway of apoptosis, a likely candidate for initiating the caspase cascade is caspase-8,

required for death receptor-induced²³ and other forms of apoptosis.^{11,24,25} We therefore asked whether caspase-8 was the apical caspase in glucose starvation-induced apoptosis in these cells. We generated a stable cell line expressing short hairpin RNA (shRNA) targeting caspase-8, and selected individual clones expressing low levels of caspase-8 (Figure 4a). As expected, these clones and the parental pool displayed decreased sensitivity to TNF when compared with cells transfected with the empty vector (Figure 4b). When incubated in the absence of glucose, we observed that these clones and the parental pool were less sensitive than their mock-transfected counterparts to glucose deprivation (Figure 4c). To exclude the possibility of an off-target effect of this construct, or a compensation effect of the stable downregulation of caspase-8, we transiently transfected two different siRNA oligonucleotides against caspase-8. We were able to achieve a moderate reduction in caspase-8 levels (Figure 4d). This reduction conferred a mild but reproducible protection from death ligands (data not shown) and glucose deprivation (Figure 4e). Knockdown of caspase-8 reduced glucose deprivation-induced cleavage of caspase-3 (Figure 4f).

We had observed that the peptidic caspase inhibitor IETD-fmk inhibited glucose deprivation-induced death (Figure 2c and d), suggesting that the enzymatic activity of caspase-8 is required for death. However, although IETD-fmk is widely used to block caspase-8 activity, it can also inhibit effector caspases.²¹ In order to test whether the enzymatic activity of mature caspase-8 is required for apoptosis in this system, we transfected DKO cells with the viral caspase inhibitor CrmA, which preferentially inhibits caspase-8, although it can also inhibit the inflammatory caspase-1.^{2,26} Cells transfected with



CrmA were protected from death receptor-induced apoptosis (Figure 4g). CrmA effectively inhibited death induced by glucose deprivation in Bax, Bak DKO MEF (Figure 4h).

To test whether caspase-8 dependency was exclusive of Bax, Bak DKO MEF, we used siRNA to knockdown caspase-8 in established tumor lines. Although we observed no effect on glucose deprivation-induced death in the MCF7 breast cancer line (not shown), we observed an effect in HeLa cells. Knockdown of caspase-8 in HeLa cells reduced caspase-8 levels (Figure 5a), and prevented death induced by TNF (Figure 5b). Strikingly, this decrease in caspase-8 reduced glucose deprivation-induced cell death to the same extent than with incubation with Q-VD (Figure 5b).

The extrinsic pathway is not involved in glucose starvation-induced apoptosis in Bax, Bak DKO cells. Caspase-8 is activated in response to death receptor ligation. It has been shown that some drugs can induce caspase-8-mediated apoptosis through the induction of death ligands such as FasL, TNF or TRAIL.²⁷⁻²⁹ Thus, one possibility is that glucose deprivation is activating the extrinsic pathway by inducing the synthesis and/or secretion of death ligands, which might kill the cells in an autocrine manner. To explore this possibility, we analyzed by RT-PCR the mRNA levels of death ligands and used blocking antibodies against death ligands and receptors. We could not detect the expression of Fas ligand mRNA in these cells (not shown). Furthermore, we starved cells from glucose in the presence of neutralizing antibodies for Fas-ligand or Fas-Fc (Figure 6a), which did not prevent death. TRAIL expression did not change after glucose withdrawal (Supplementary Figure S1A). Moreover, we could not detect toxicity of TRAIL in these cells, even in the presence of CHX or upon glucose deprivation, which has been shown to sensitize human tumor cells to TRAIL³⁰ (Supplementary Figure S1B). In addition, we incubated cells in the presence of anti-TRAIL or TRAIL-R-Fc (Supplementary Figure S1C and D), which did not have any effect on cell death induced by glucose deprivation.

A slight increase in TNF mRNA levels was detected (Figure 6b). Although TNF did not kill these cells unless they were co-incubated with CHX (Figure 6c), the possibility remained that glucose deprivation sensitizes cells to TNF.³⁰ To explore this possibility, we preincubated cells without glucose and then added TNF. We observed that glucose deprivation did not sensitize these cells to TNF, as the combination of glucose deprivation and TNF caused the same amount of death than glucose deprivation alone. The combination of glucose deprivation plus CHX and TNF caused additive effects on cell death numbers (Figure 6c). In addition, we incubated glucose-deprived cells in the presence of neutralizing antibodies against TNF and TNF-R1, which did not prevent death (Figure 6d).

In another approach to examining the possible role of the death receptor pathway in glucose deprivation-induced apoptosis in Bax, Bak DKO cells, we examined the effects of c-FLIP. Overexpression of c-FLIP inhibits caspase-8 activation at the DISC.³¹ We generated Bax, Bak DKO MEF that stably overexpress c-FLIP, and as expected, these cells were protected from TNF or anti-Fas-induced apoptosis (Figure 7a). However, they were not protected from glucose

deprivation-induced apoptosis, suggesting that caspase-8 is activated independently of a conventional death receptor-induced DISC (Figure 7b).

Recently, a novel form of caspase-8- and FADD-mediated apoptosis has been described.³² When TNF is combined with Smac mimetics, TNF induces the formation of a caspase-8 activation complex formed by RIPK1, FADD and caspase-8, which leads to apoptosis. Cell death mediated by this complex is poorly inhibited by FLIP. In order to test a role for RIPK1 in our system, we incubated DKO cells in the presence of Necrostatin-1 (Nec-1). Nec-1 is an allosteric inhibitor of RIPK1 kinase activity, and it inhibits RIPK1-mediated necroptosis (death receptor-mediated necrosis). As RIPK1 kinase activity is required for apoptosis induced by combination of TNF and Smac mimetics, we deprived cells of glucose in the presence of Nec-1. Incubation with Nec-1 did not prevent glucose deprivation-induced cell death (Figure 7c). To exclude a function of RIPK1, which could not be inhibited by Nec-1, we used siRNA to knockdown RIPK1 (Figure 7d). The resultant decrease in RIPK1 was sufficient to inhibit death induced by TNF in the presence of the Smac mimetic Compound A (Figure 7f), but did not influence glucose deprivation-induced cell death (Figure 7e and f). Thus, neither the classical DISC nor the second, RIPK1-dependent caspase-8 activating complex appear to be involved in glucose deprivation-induced apoptosis.

Discussion

Bax and Bak are essential mediators of apoptosis induced by most stimuli.⁶ Because the mitochondrial pathway is frequently inactivated in tumor cells, it may be clinically relevant to find means to induce necrosis or mitochondria-independent apoptosis. Glucose deprivation has been shown to induce necrosis in some cancer cell lines. We show here that SV-40-transformed MEFs with an impairment of the mitochondrial pathway can die by apoptosis upon glucose deprivation, and that this form of apoptosis is mediated by caspase-8.

Inhibition of cell metabolism by nutrient deprivation has been extensively studied as a means to preferentially kill tumor cells, because these cells display numerous alterations in metabolic pathways, including abnormal glucose and glutamine uptake.³³ Indeed, a non-metabolizable glucose analog, 2-deoxyglucose, is currently in clinical trials as an antitumor agent. Moreover, growth factors upregulate glucose uptake and metabolism to induce pro-survival and antiapoptotic effects.¹³ Glucose metabolism interferes with apoptosis at different steps, regulating both the extrinsic and the intrinsic pathways in tumor cells.^{17,30,34} Therefore, deciphering the death pathways engaged by glucose deprivation will be helpful for rational design of clinical trials with antimetabolites and molecules which inhibit growth factor signaling. Our results suggest that tumors deficient in caspase-8 may be resistant to glucose deprivation or non-metabolizable glucose analogs, opening the possibility that this protease may be a prognostic marker of success of anti-glycolytic treatments. Caspase-8 expression is frequently impaired in tumors, especially those of the brain and childhood tumors.^{35,36} An intriguing possibility raised by our findings is that perhaps

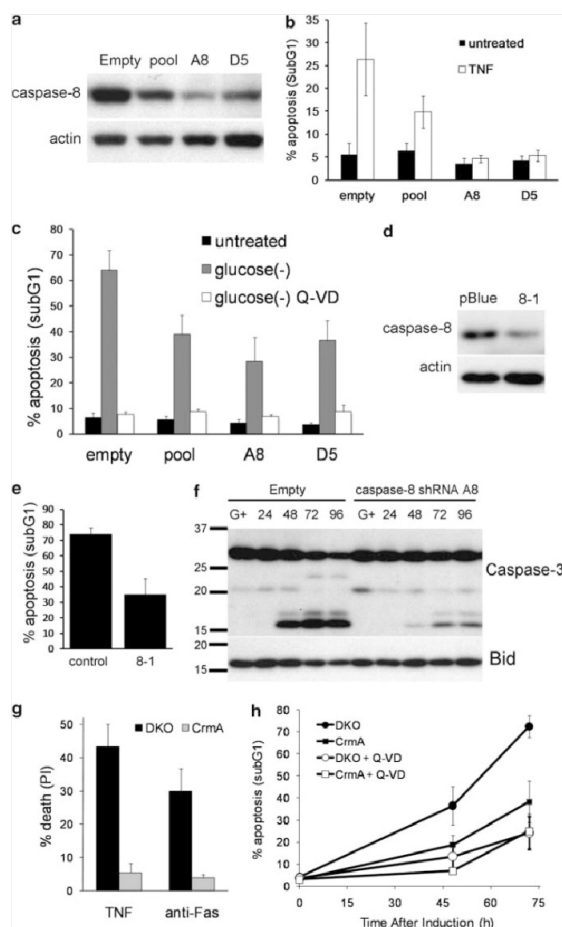


Figure 4 Caspase-8 is required for death induced by glucose deprivation in Bax, Bak DKO MEF. (a) DKO cells were infected with retroviruses encoding shRNA against caspase-8 (shown as "pool"), or the empty vector. Expression of caspase-8 by immunoblot is shown for the pool population, empty vector-transfected cells and two clones that were selected for low caspase-8 expression (A8 and D5). (b) Cells described in (a) were treated with TNF for 24 h and collected for subG1 analysis. Results show average and S.E.M. of four experiments. (c) Same cells as in (a) were cultured without glucose for 72 h. Apoptosis was measured by subG1 analysis. Average and S.E.M. of five experiments are shown. (d) Downregulation of caspase-8 protein with small interfering RNA. Cells were transiently transfected with siRNA against caspase-8 (8-1) or a control oligonucleotide (pBlue). Protein was collected 24 h after transfection. (e) Cells were transfected with a control oligonucleotide or siRNA against caspase-8. Forty-eight hours after transfection, they were deprived of glucose for 72 h and collected for subG1 analysis. The average of three experiments is shown. (f) Clone A8 described in (a) and cells transfected with the empty vector were starved of glucose and collected for western blot of Bid and caspase-3 at times shown. A mixture of antibodies against the procaspase and the cleaved forms was used. (g) DKO MEFs or cells transfected with a CrmA-encoding vector were treated with TNF or anti-Fas antibody. Cell death was measured by PI exclusion. Results show average and range of two experiments. (h) DKO or CrmA-transfected MEFs were starved of glucose in the presence of DMSO or Q-VD, and collected at 24 or 48 h for subG1 analysis. Results show average and S.E.M. of five experiments

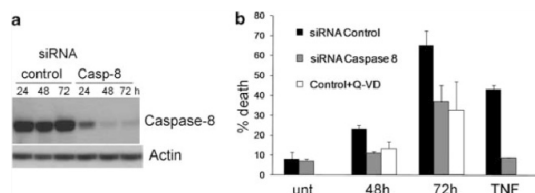


Figure 5 Downregulation of caspase-8 prevents apoptosis in HeLa cells. (a) Caspase-8 knockdown in HeLa cells using siRNA. Seventy-two hours after transfection, cells were subjected to glucose deprivation in the presence or absence of Q-VD as indicated, and collected at times shown for FACS analysis (b). As a positive control, cells were treated with TNF. Results show average and range of three experiments

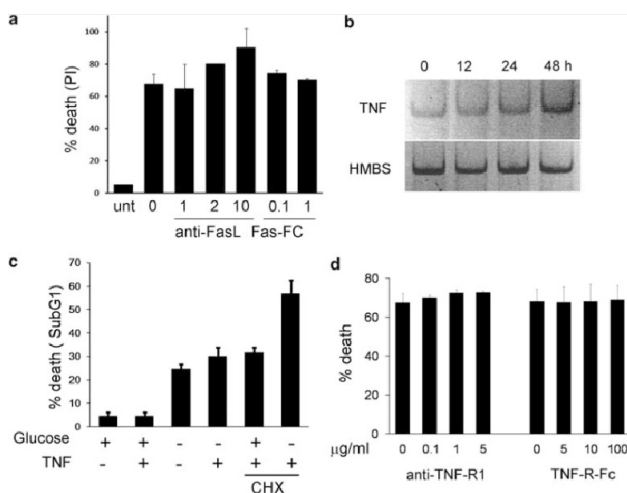


Figure 6 Glucose deprivation-induced death in Bax, Bak DKO cells is not dependent on death receptor-ligand interactions. (a) Blocking Fas/FasL interaction does not inhibit glucose deprivation-induced cell death. Cells were subjected to glucose deprivation for 72 h in the presence of anti-FasL or Fas-FC at concentrations shown (in $\mu\text{g/ml}$). (b) TNF mRNA is slightly induced upon glucose removal. DKO cells were deprived of glucose and collected at indicated times. RT-PCR of TNF and a loading control (HMBS) are shown. (c) TNF was added 24 h after treatment with glucose deprivation. CHX (12 μM) was added 30 min before TNF. Cells were collected after 48 h of glucose withdrawal for subG1 analysis. Data represents average and S.E.M. of three experiments. (d) Blockage of TNF/TNF-R interactions does not prevent death by glucose starvation. Cells were incubated without glucose for 24 h and then anti-TNF-R1 was added at the indicated concentrations (left panel), expressed in $\mu\text{g/ml}$. Antibody was added 24 h later. Cells were collected 72 h after glucose removal to measure PI exclusion. Right panel: cells were incubated for 72 h without glucose in the presence of TNF-R-Fc and they were collected for subG1 analysis. Bars show average and range of two experiments. Positive controls for blocking reagents are shown in Supplementary Figure S1

tumor cells with diminished caspase-8 expression are selected for their ability to resist conditions of low blood flow and glucose supply, which are commonly found in the tumor microenvironment.

In this work, we show that glucose deprivation induces an atypical form of caspase-8 activation in Bax-, Bak-deficient MEFs. Caspase-8 is usually activated in a DISC complex formed upon ligation of death receptors. It is worth noting that caspase-8-dependent death has been described in response to stimuli other than death receptors,^{11,24,25} which suggests

that caspase-8 can be activated in 'alternative' platforms. It is unlikely that the classical death ligand-induced DISC is formed upon glucose deprivation, as blocking interactions between death receptors and their ligands did not block death. Moreover, FLIP overexpression, which inhibits death receptor-induced apoptosis, did not inhibit apoptosis induced by glucose removal.

Caspase-8 has been described to be activated in an FADD-dependent manner with some stimuli, in the absence of death receptor-ligand interactions.^{27,28} We have not been able to



8

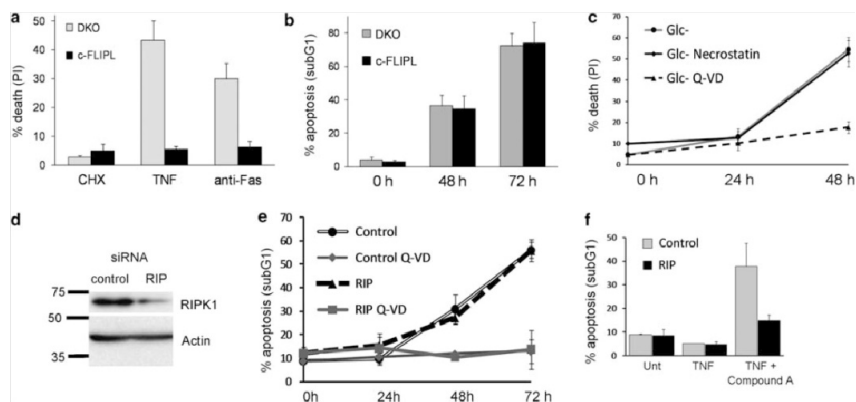


Figure 7 dFLIP1 overexpression or RIPK1 downregulation do not protect from death induced by glucose deprivation in Bax, Bak DKO MEF. (a) DKO cells stably overexpressing cFLIP1 were treated with anti-Fas or TNF- α for 24 h and collected for analysis of PI incorporation. (b) Same cells were deprived of glucose for indicated times and collected for subG1 DNA analysis. Graphs show average and S.E.M. of three (a) or four (b) experiments. (c) Cells were deprived of glucose for 48 h in the presence of necrostatin-1 50 μ M or Q-VD. PI uptake was measured. (d-f) Cells were transfected with control siRNA or siRNA against RIPK1 (labeled as 'RIP') for 48 h and subjected to western blot (d), glucose deprivation for indicated times (e) or treatment with TNF 10 ng/ml and the IAP antagonist Compound A (500 nM) for 24 h (f)

obtain conclusive results regarding the involvement of FADD as the adapter protein for caspase-8 activation after glucose deprivation. We cannot exclude that, upon glucose removal, endogenous FADD may be aggregated intracellularly, interacting with caspase-8 and promoting its activation. However, as FLIP overexpression did not prevent apoptosis in our system, we studied the possible role of RIPK1. This protein contains a death domain and forms a complex with FADD and caspase-8 upon treatment with TNF and Smac mimetics.³² Although knockdown of RIPK1 prevented the latter form of cell death, it did not prevent apoptosis in our system, suggesting that a novel caspase-8 activating complex is formed upon glucose deprivation. One stimulus that has been shown to promote activation of caspase-8 in the cytosol is the accumulation of polyglutamine repeats. Expression of ataxin-3 with an expanded polyglutamine tract is toxic to neurons. Sánchez *et al.*³⁹ observed that cell death is caspase-8-dependent in this system. Caspase-8 and FADD were shown to be recruited to polyglutamine inclusions, which could serve as an aggregation platform for caspase-8. As glucose is required for protein glycosylation, and impairment of glycosylation leads to accumulation of misfolded proteins, it can be speculated that glucose deprivation could promote the generation of protein inclusions, which could recruit and activate caspase-8.

The results presented here, together with other reports, indicate that glucose deprivation can kill cells in three different ways: necrosis, mitochondrial apoptosis or caspase-8-dependent apoptosis. Why some cells undergo 'uncontrolled' necrotic death while other cells undergo apoptosis is still not clear. In our system, caspase inhibitors did not support clonogenicity of glucose-deprived cells (Supplementary

Figure 2), indicating that this stimulus can induce caspase-independent cell death in the same cells. We show here that HeLa cells, which are able to undergo apoptosis through the mitochondrial pathway, die in a caspase-8-dependent manner upon glucose deprivation. This suggests that the caspase-8-dependent pathway of apoptosis described here could be engaged in cells with an intact mitochondrial pathway as well as in Bcl-2 or Bcl-xL-overexpressing tumor cells. This pathway may be relevant for pathologies that involve conditions of low glucose, such as ischemia and cancer.

Materials and Methods

Cell culture and treatments. Bax, Bak DKO MEFs immortalized with V-40⁹ were maintained in high-glucose pyruvate-free DMEM (Invitrogen, Prat de Llobregat, Spain) supplemented with 2 mM L-glutamine, 200 mg/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin sulfate and 10% FBS (Invitrogen).

For treatments, cells were plated at a concentration of 150 000/ml, and treated 24 h later, when they reached the concentration of 500 000/ml. Glucose deprivation was performed by rinsing the cells twice with glucose-free medium (Gibco/Invitrogen) and incubating them in glucose-free medium with freshly added 2 mM glutamine and antibiotics, plus 10% FBS dialyzed against PBS. Unless specified, caspase inhibitors were added at the time of addition of glucose-free medium. Q-VD-OPH (SM Biochemicals LLC, Anaheim, CA, USA) was used at 20 μ M. Other caspase inhibitors (ICMMP) were used at 50 μ M. An equal amount of DMSO (solvent) was added to the controls. Unspecified reagents were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

For treatment with death ligands TRAIL (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), Fas ligand (Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland), TNF and death receptor agonistic antibodies, cells were preincubated with 5 μ M CHX (Sigma-Aldrich) for 30 min. HeLa cells were treated with 10 ng/ml human TNF (Peprotech), and DKO MEF with 1 ng/ml TNF (Peprotech) or 0.1 μ g/ml anti-murine Fas agonist antibody Jo2 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA, cat. no. 55425A) for 20 h unless specified otherwise in figure legends. The following blocking reagents were used: anti-TNF receptor type I p55 (clone 5S1-170), anti-Fas ligand clone MFL3, and Fas-Fc cat.



no. 556578 (all from BD Pharmingen), anti-TRAIL N2B2 (gift by Edith Janssen), TRAIL-R-FC (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and TNF-R-FC (Enbrel/ etanercept from Wyeth, Immunex Corporation, Thousand Oaks, CA, USA).

Measurement of cell death. For analysis of viability, detached and attached cells were collected by trypsinization and subjected to FACS analysis to detect incorporation of PI 1 µg/ml (10 min incubation in PBS). For subG1 analysis, cells were washed in PBS, fixed in 70% cold ethanol while vortexing and incubated for 1–10 days at 4 °C. They were further washed, resuspended in PBS with 40 µg/ml PI and 100 µg/ml RNase A (Sigma) and incubated for 30 min at 37 °C before FACS analysis. Percent of dead HeLa cells was defined as the population with low FSC/SSC compared with untreated cells. Staining with Annexin V-FITC (Immunocyst, Salamanca, Spain) was performed according to the manufacturer's instructions in the presence of 0.5 µg/ml PI.

Caspase activity was measured as DEVDase activity. Cells treated in six-well plates were lysed in lysis buffer (5 mM Tris-HCl pH: 8, 20 mM EDTA, 0.5% Triton-X 100). Twenty µg of protein were incubated with 20 µM AC-DEVD-amc (BD Pharmingen) in a reaction buffer (HEPES 1 M pH: 7.5, glycerol 67%, DTT 1 M) for 2 h. Fluorescence values (arbitrary units) are divided by the value of fluorescence of untreated cells (used as value '1').

Western blots. Cells were treated as indicated in 10 cm plates. They were trypsinized, rinsed and lysed by resuspending them in Laemmli buffer (5 ml Tris-Glycine SDS) without bromophenol blue (Figures 2 and 4) or freezing (rest of figures) in the presence of Complete antiprotease cocktail (Roche, Barcelona, Spain). After sonication, protein concentration was measured with BCA (Pierce/ Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein were mixed with Laemmli loading buffer. After electrophoresis, protein was transferred to a PVDF membrane (Millipore, Madrid, Spain). Membrane was blocked with 5% nonfat dry milk in TBS-Tween (0.1%). Secondary antibodies (1/5000) were HRP conjugated (Zymax, Escondido, CA, USA) and detected with ECL reagent (Pierce). Antibodies used for western blot were as follows: actin (ICN clone C4), Bid (R&D Systems a860), murine caspase-8 (Alexis/Enzo Lifesciences, clone 3B10), human Caspase-8 (MBL M032-3), Caspase-3 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA, cat. 9661 and 9602); co-chaperone p23 (Affinity Bioreagents-MAC-414, Lafayette, CO, USA), Bcl-xL (BD Pharmingen, cat. no. 556636), Fadd: Immunotech (MBL, Marseille, France), RIP-1 (BD Bioscience, 610458), PARP (Cell Signaling, 9542).

Plasmids and RT-PCR. pBABE-Bcl-xL was made by insertion of the sequence of Bcl-xL into pBABE-puro. The plasmid encoding histone 2B-green fluorescent protein (GFP) was a kind gift of Dr. R Agami (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands).

LMP vectors (Open Biosystems, Huntsville, AL, USA) encoding shRNA against murine caspases were generated by following the manufacturer's instructions. Sense sequences against caspase-9 were (5' to 3'): I - CGCCAGAGGTTCTCAG ACCAGA, II - CGGCCACTGCTCATCATCAAC, and against caspase-8: AACGACTGCAGTGCMAATGAAA.

For RT-PCR, 1.5×10^6 cells were collected, and their RNA was extracted with RNeasy kit from Qiagen (Madrid, Spain). RNA from 50 000 cells (~500 ng) was reverse-transcribed to cDNA with the high capacity cDNA reverse transcription kit from Applied Biosystems (Madrid, Spain). 15% of the resulting cDNA was used as a template in a PCR (25 cycles). The following primers were used: FasL, 5'-G CAAATAGCCGACCCAGTACAG-3' and 5'-GCCACCTTCTTATAGTCTGACTCC AG-3'; TRAIL, 5'-CCTCTCGGAAAGGGCATTG-3' and 5'-TCTGTCTGATGAC CAGCT-3'; TNF, 5'-ATCCGCGAGCTGGAACTG-3' and 5'-ACCGCCTGGAG TTCTGGAA-3'; HMBS (loading control), 5'-TTGCAGATCTGAAACTCT-3' and 5'-TCTTGGAAATGATCCGGGCACT-3'.

Transfections and generation of cell lines. Stable cell lines were generated by retroviral infection with viruses produced in Phoenix-Eco cells. Cells infected with pMX-IRES-GFP with CrmA cDNA (kindly provided by JP Medema), with LZRS-MS-IRES-eGFP encoding e-FLIP⁴³ or with shRNA against caspases were selected by sorting for GFP expression. For transient transfections, cells were rinsed with DMEM without FBS or antibiotics and incubated for 6 h with a mix of 2 µM lipofectamine 2000 (Invitrogen) and plasmidic Histone-GFP DNA (1 µg) or shRNA at 100 nM except when indicated. RIPK1 and human caspase-9 were downregulated using Dharmacon (Lafayette, CO, USA) On-Target smart pool (cat. no. L-040150 and cat. no. L-003466, respectively) with Dharmaslect1. Dharmacon On-Target plus non-targeting pool was used as a control. Sense sequence of shRNA duplexes against murine caspase-8 was

Caspase-8 dependent apoptosis by lack of glucose A Caro-Maldonado et al

5'-CAGACAAGUUUACCAAAU[GT]dT (Sigma). As a control, an irrelevant siRNA oligonucleotide (pBlue, sense strand: 5'-GUAAGACACGACUUAUCCG-3') was used. The same sequence coupled to a fluorochrome was used to measure transfection efficiency (pBlue-FITC), which was around 80% in all cases.

Microscopy. For analysis of nuclear morphology by visualization of Histone H2A-GFP, cells were plated and treated in four-well chamber slides (Mattek, Ashland, MA, USA), which had been previously coated with fibronectin (1 µg/ml in PBS). Confocal microscopy was performed in non-fixed cells in culture medium at room temperature using a spinning disk confocal microscope (Marianas SDC imaging system, Intelligent Imaging Innovations/3i, Denver, CO, USA) with a 473 nm laser. Images were acquired using a Neofluar × 63 1.4 NA DIC objective on a Cascade II 512 EMCCD (Photometrics, Tucson, AZ, USA) using SlideBook 4.2 software (3i). For analysis of cell morphology, cells were treated in six-well plates and visualized in an Olympus (Center Valley, PA, USA) IX70 inverted microscope with a × 20 objective. Brightfield pictures were taken with an Olympus C-5060 camera. One tenth of the whole field is shown.

For electron microscopy, cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M pH 7.4 buffer at 4 °C. After fixation, samples were placed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M pH 7.4 buffer, dehydrated in a graded series of ethyl alcohol and embedded in Spurr resin.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank Josh Goldstein for the pBABE-Bcl-xL plasmid, Seamus Martin for antibodies, John Silke and Joan Gil for discussions and Pat Fitzgerald, Marina Noriega, Ana Yris and Marcela Saenz for technical assistance. We also thank TetraLogic Pharmaceuticals for supplying Compound A for studies carried out in John Silke's laboratory in La Trobe University. This work was supported by grants from the U.S. National Institutes of Health (to DRG), by Association pour la Recherche sur le Cancer and l'Agence Nationale de la Recherche (ref ANR-09-JCJC-0003-01) (to JER), and by the Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII (Grants CP05/0036, PI071027 and RTICC RD06/0020 to CM-P).

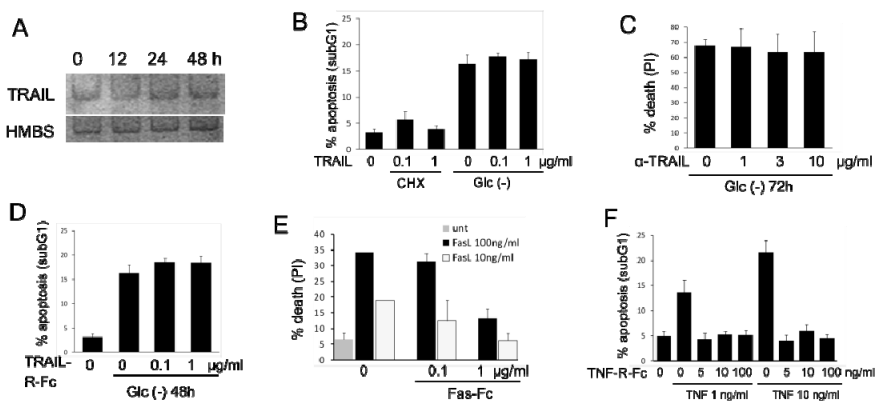
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 231–241.
- Motiani JP, Scullini C, Kischkel FC, Shrivastava A, Mann M, Krummer PH et al. FUCE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997; 16: 2794–2804.
- Li P, Nijhman D, Budiharjo I, Srinivasan SM, Ahmed M, Alnemri ES et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 475.
- Kluck FM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132–1136.
- Deng J, Carlson N, Talevaeva K, Dai Cn P, Shijo M, Lebel A. Bcl-2 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* 2007; 12: 171–185.
- Eskot PG, Reed SH, Silke J, Marsden VS, Kaufmann H, Hawkins CJ et al. Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-depleted or drug-treated cells die. *J Cell Biol* 2004; 166: 805–842.
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zeng W-X, Rathmell JC, Shiels HA et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bax and Bak are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 2000; 6: 1369.
- Woo MC, Zeng W-X, Cheng EHY, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292: 727–730.
- Shimizu S, Kawasumi T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson GB et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 1221–1228.
- Ullmen E, Fan Y, Stawczyk M, Chen HM, Yue Z, Zeng WX. Autophagy promotes necrosis in apoptosis-deficient cells in response to ER stress. *Cell Death Differ* 2007; 15: 422.
- Suzuki A, Kawanishi G, Kohimoto A, Lu J, Ogura T, Ezumi H. APK3 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase-8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene* 2003; 22: 6177–6182.



12. Yuzawa M, Zarbani N, Oelner P, Sathirasandam R, Lazebnik Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 2007; 178: 93-105.
13. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson GB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 5999-5912.
14. Gonie-Graud S, Mathieu AL, Cicou S, Tomkowiak M, Delorme G, Marvel J. Decreased glycolytic metabolism contributes to but is not the inducer of apoptosis following IL-3 starvation. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1147-1157.
15. Lee YJ, Galante SS, Beams CM, Tong WP, Kim HR, Cory PM. Glucose deprivation-induced cytotoxicity in drug resistant human breast carcinoma MCF-7/ADR cells: role of c-myc and bcl-2 in apoptotic cell death. *J Cell Sci* 1997; 110: 681-696.
16. Alves ML, Desle IA, Bek E, Schäfer R, van Lier RA, Eldering E. The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity* 2005; 24: 703-715.
17. Zhao Y, Coloff JL, Ferguson EC, Jacobs SR, Cai K, Rathmell JC. Glucose metabolism attenuates p53 and puma-dependent cell death upon growth factor deprivation. *J Biol Chem* 2006; 281: 35344-35353: M803580200.
18. Lue JJ, Bauer DE, Kong M, Hanis MH, Li C, Lindsten T *et al*. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005; 120: 237.
19. Tu HC, Pao D, Wang GX, Chen CH, Westergaard TD, Kim H *et al*. The p53-caspase axis cooperates with ROS to activate programmed necrotic death upon DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 1083-1088.
20. Zeng WQ, Olszewski D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev* 2004; 18: 1272-1282.
21. McKay GP, Salvesen GS, Green DR. Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ* 2007; 15: 322-331.
22. Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomasek KJ, Thompson CB, Armstrong PC. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-2L and cytochrome c. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 508-515.
23. Rohlin MP, Goncharenko TM, Goltsev YV, Weitch D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803.
24. Stropack DG, Pucelle XS, Boutsaboulay S, Stimpard CM, Cheresch DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 2001; 155: 459-470.
25. Wrasidlo W, Midge A, Torres VA, Barcero S, Stoletov K, Suyama TL *et al*. The marine lipopeptide serratycystinamide A triggers apoptosis via caspase-8. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 2313-2318.
26. Zhou Q, Sripas S, Orth K, Mizuo M, Dietl VM, Salvesen GS. Target protease specificity of the viral serpin CrmA: ANALYSIS OF FIVE CASPASES. *J Biol Chem* 1997; 272: 7787-7800.
27. Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Maibuchi A, Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and AP-1. *Mol Cell Biol* 1998; 1: 543.
28. Gong B, Almsaan A. Apo2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand and death receptor 5 mediate the apoptotic signaling induced by ionizing radiation in leukemic cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5754-5760.
29. Vince JE, Wong WW-L, Khan N, Fellham R, Chau D, Ahmed AU *et al*. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF- α -dependent apoptosis. *Cell* 2007; 131: 682.
30. Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodovar C, Palacios C, Lopez-Ferns A. Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing. *J Biol Chem* 2003; 278: 12759-12768.
31. Imker M, Thore M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Stoiser V *et al*. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388: 190.
32. Wang L, Du F, Wang X. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 2008; 133: 693-703.
33. DeBerardinis RJ, Sayed N, Dhawan D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 54.
34. Munoz-Pinedo C, Robledo G, Lopez-Ferns A. Thymidine synthesis inhibition triggers glucose-dependent apoptosis in p53-negative leukemic cells. *FEBS Lett* 2004; 576: 205-210.
35. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Varin EF, Green J, Valantine VA *et al*. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2006; 6: 529-535.
36. Harada K, Toyooka S, Shrivastava N, Malra A, Reddy JL, Maita H *et al*. Downregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res* 2002; 62: 5897-5901.
37. Gröner S, Adkins I, Schulz S, Richter K, Borgmann S, Wesselsberg S *et al*. Caspase-8 actively active Fas ligand cleaves FADD and caspase-8 at the level of the DISC independently of death receptors in dendritic cells. *Apoptosis* 2007; 12: 1813.
38. Robe C, Cathelin S, Lavanay S, Fiberoletto R, Prevot L, L'Orliac C *et al*. Caspase-8 prevents sustained activation of NF- κ B in monocytes undergoing macrophage differentiation. *Blood* 2007; 109: 1442-1450.
39. Sanchez I, Xu CJ, Joo P, Kishikawa A, Barro J, Yuan J. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 1999; 22: 623-633.
40. Werner AB, de Vries E, Tall SWC, Bonjér I, Best J. TRAIL receptor and CD95 signal to mitochondria via FADD, caspase-8/10, Bcl, and Bax but differentially regulate events downstream from truncated Bid. *J Biol Chem* 2002; 277: 40769-40776.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

Caro-Maldonado *et al.*, Supplementary Figure S1. The extrinsic pathway is not involved in apoptosis induced by glucose deprivation.

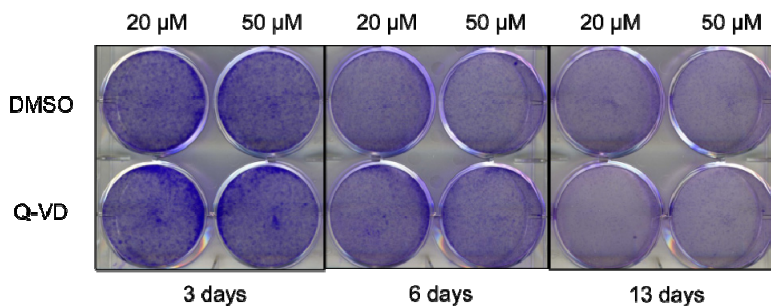


(A) TRAIL mRNA is not induced upon glucose deprivation. DKO cells were deprived of glucose and collected at indicated times. RT-PCR of TRAIL and HMBS (loading control) was performed as described under Methods. **(B)** TRAIL does not kill Bax, Bak DKO MEFs. Cells were incubated with cycloheximide (CHX) for 30 min or without glucose for 24h before adding TRAIL at indicated concentrations. They were collected 24 h later. **(C, D)** Anti-TRAIL or TRAIL-R-Fc do not prevent glucose deprivation-induced apoptosis. Cells were subjected to glucose deprivation for 24h and treated with anti-TRAIL antibody at the indicated concentra-

tions. Antibody was re-added 24 h later. Cells were collected at 72h of glucose deprivation. **(D)** Cells were incubated 48h without glucose in the presence of TRAIL-R-Fc at indicated concentrations. **(E)** Control showing that Fas-Fc blocks apoptosis induced by exogenous Fas ligand in the presence of CHX. **(F)** Control showing that TNF-R-Fc is able to block apoptosis induced by exogenous TNF. Cells were preincubated with CHX and treated for 18 h with TNF-R-Fc plus TNF. Data in all panels represents average and SEM of 3 experiments.

Caro-Maldonado *et al*, Suppl. Fig S2.

Caspase inhibitors do not promote clonogenic recovery of glucose-deprived cells.



Cells were grown for 3, 6 or 13 days in glucose-free medium in the presence of Q-VD or DMSO (solvent) at indicated concentrations. Q-VD or DMSO were readded every 3 days. After treatment, cells were trypsinized and plated in six

well plates (1/3 dilution) in complete medium, and were grown for three days before staining with crystal violet (0.2% in 2% ethanol, 15 min). A representative experiment out of three is shown.



REVIEW

Sugar-free approaches to cancer cell killing

N El Mjiyad¹, A Caro-Maldonado¹, S Ramirez-Pcinado and C Muñoz-Pinedo

Cell Death Regulation Group, IDIBELL + Bellvitge Biomedical Research Institute, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Tumors show an increased rate of glucose uptake and utilization. For this reason, glucose analogs are used to visualize tumors by the positron emission tomography technique, and inhibitors of glycolytic metabolism are being tested in clinical trials. Upregulation of glycolysis confers several advantages to tumor cells: it promotes tumor growth and has also been shown to interfere with cell death at multiple levels. Enforcement of glycolysis inhibits apoptosis induced by cytokine deprivation. Conversely, antiglycolytic agents enhance cell death induced by radio- and chemotherapy. Synergistic effects are likely due to regulation of the apoptotic machinery, as glucose regulates activation and levels of proapoptotic BH3-only proteins such as Bim, Bad, Puma and Noxa, as well as the antiapoptotic Bcl-2 family of proteins. Moreover, inhibition of glucose metabolism sensitizes cells to death ligands. Glucose deprivation and antiglycolytic drugs induce tumor cell death, which can proceed through necrosis or through mitochondrial or caspase-8-mediated apoptosis. We will discuss how oncogenic pathways involved in metabolic stress signaling, such as p53, AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) and Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin), influence sensitivity to inhibition of glucose metabolism. Finally, we will analyze the rationale for the use of antiglycolytic inhibitors in the clinic, either as single agents or as a part of combination therapies.

Oncogene advance online publication, 25 October 2010; doi:10.1038/onc.2010.466

Keywords: cancer; apoptosis; glucose; tumor metabolism; Bcl-2 proteins

Metabolic transformation: cancer's friend and foe

Tumors have a special metabolism. Among the many differences with non-transformed tissues, perhaps the most relevant is that they rely on glucose as a source of energy and carbon. Tumors seek glucose so avidly that they can be visualized by the positron emission tomography technique using a glucose analog as a tracer. It has been known for decades that cancer cells show an increased uptake of glucose and utilization of

glycolysis instead of respiration, even in the presence of oxygen ('the Warburg Effect'). It was thought that the glycolytic switch was caused by defects in mitochondrial respiration due to mutations in mitochondrial DNA. Currently, however, the prevailing view is that tumor cells are dependent on glucose because they use glucose to produce metabolites required to grow; in particular, nucleic acids and fatty acids (DeBerardinis *et al.*, 2008; Vander Heiden *et al.*, 2009). A high rate of glucose utilization is not exclusive of tumor cells, and other highly proliferative cells such as T lymphocytes also switch to aerobic glycolysis when stimulated to proliferate (Michalek and Rathmell, 2010). Alterations in metabolism allow cells to grow faster than if they used most of the glucose to produce adenosine monophosphate (ATP) through respiration.

The switch to glycolysis is promoted by signaling pathways that stimulate proliferation, which are frequently dysregulated in tumors. 'Metabolic transformation' is thus linked to oncogenic transformation, as it is driven by oncogenes. A few examples are cited as follows: oncogenic Ras or activation of the PI3K/Akt pathway promotes glycolysis. Akt stimulates membrane localization of glucose transporters and enhances transcription or activity of glycolytic enzymes such as hexokinase and phosphofructokinase (Gottlob *et al.*, 2001; Rathmell *et al.*, 2003). K-Ras promotes transcription of several glycolytic enzymes (Chiaraadonna *et al.*, 2006). Conversely, tumor suppressors such as PTEN (inhibitor of the PI3K/Akt pathway) or p53 downregulate glycolysis. Activation of p53 alters the balance between glycolysis and oxidative phosphorylation through several mechanisms. p53 slows down glycolysis by downregulating the expression of glucose transporters and upregulating fructose-2,6-bisphosphatase TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator), and it promotes oxidative phosphorylation by upregulating SCO2, a protein required for the function of the respiratory chain (Vousden and Ryan, 2009). Therefore, inactivation of p53 could be partially responsible for the increased aerobic glycolysis in transformed cells.

'Metabolic transformation' involves the regulation of many metabolic pathways. Indeed, glucose is not the only molecule that tumor cells require to grow. For instance, oncogenic *myc* promotes the use of the amino acid glutamine, which cells can use to produce not only proteins but also ATP and nucleic acids (DeBerardinis *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2009). Growing cells require to synthesize new lipids, nucleic acids and proteins, which means that inhibition of many metabolic pathways, such

Correspondence: Dr C Muñoz-Pinedo, Molecular Oncology, IDIBELL, Hospital Duran i Reynals 3^a planta, Gran Via de l'Hospitalet 199, L'Hospitalet, Barcelona 08907, Spain.

E-mails: emunoz@idibell.cat or munozpinedo@gmail.com

¹These authors contributed equally to this work.

Received 11 July 2010; revised and accepted 3 September 2010



as fatty acid synthesis or nucleotide synthesis, could promote tumor cell death. Indeed, drugs that interfere with nucleic acid metabolism, such as methotrexate or 5-FU, have been used for decades to treat tumors. We could thus interfere with tumor metabolism at multiple levels: either depleting tumor cells of their preferred nutrients or inhibiting intracellular catabolic or biosynthetic pathways altered in tumors (Pelicano *et al.*, 2006; Kroemer and Pouyssegur, 2008; Pathania *et al.*, 2009; Tennant *et al.*, 2010). In the present review, we will focus on glucose metabolism as a target for tumor therapy. A number of studies suggest that interference with glucose metabolism is a suitable strategy against cancer: glycolytic inhibitors such as 2-deoxyglucose (2-DG) or 3-bromopyruvate have been shown to promote tumor cell death and tumor regression in animals. Moreover, lonidamine, a glycolytic inhibitor, has been approved for use as an antitumor drug. Perhaps, however, antglycolytic drugs may show more promising results in combination with other therapies. As we will discuss later, inhibition of glycolysis sensitizes cells to death ligands, such as TRAIL, and promotes an imbalance of Bcl-2 proteins, which sensitizes cells to chemotherapy.

Sensing glucose deprivation

Growth and survival factors promote glucose utilization. When stimulated to grow by growth factors, cells take glucose avidly and use it to produce fatty acids,

nucleic acids and proteins, which are the main building blocks of the cell (DeBerardinis *et al.*, 2008). Non-transformed cells are thus programmed to stop growing when growth factors are not present, and also when they lack nutrients.

At the organism level, a lack of nutrients is sensed by specific tissues, which produce hormones, provoking a feeling of hunger and prompting animals to search for food. In mammalian cells, nutrient levels are mostly sensed indirectly, by changes in the levels of metabolites from these nutrients. An important factor in sensing and reacting to lack of glucose is the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK). AMPK is activated by a decrease in the ATP:adenosine monophosphate ratio, which is a good indicator of energetic stress. This kinase phosphorylates a number of substrates that switch metabolism of the cell toward catabolic instead of biosynthetic pathways. When cells lack glucose, AMPK promotes downregulation of biosynthetic genes and utilization of stored fatty acids as a source of energy (Hardie, 2007). Moreover, AMPK activates p53 and stabilizes the cell cycle inhibitor p27 to cause cell cycle arrest (Figure 1) (Liang *et al.*, 2007; Jones and Thompson, 2009).

One of the targets of AMPK is the master orchestrator of cell growth and proliferation, the mammalian target of rapamycin (mTOR) (Wang and Proud, 2009). mTOR is a kinase that is constitutively active in proliferating cells owing to its activation by the PI3-kinase/Akt pathway. When mTOR is inactive, cells stop growing, mostly because of its effect on protein

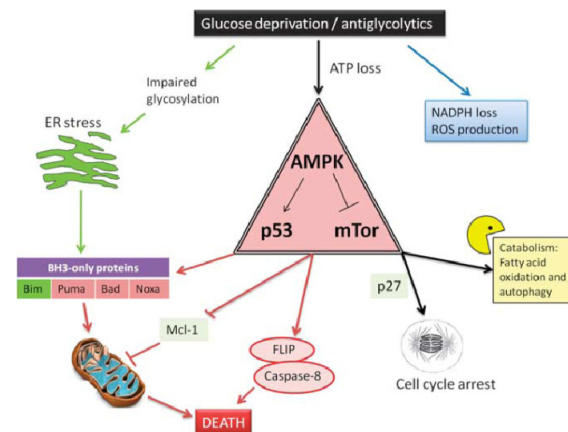


Figure 1 Inhibition of glucose metabolism promotes catabolism, cell cycle arrest or cell death. Glucose deprivation or treatment with antglycolytics leads to loss of ATP, impaired protein glycosylation and oxidative stress. ATP depletion inactivates mTOR and activates AMPK; this kinase induces cell cycle arrest through p27. AMPK also inhibits mTOR and activates p53. Inhibition of mTOR leads to autophagy, and AMPK and p53 promote induction of Bcl-2 only proteins and cell death. Impaired glycosylation results in ER stress and subsequent induction of some proapoptotic Bcl-2 only proteins. Inhibition of glucose metabolism can induce cell death through the mitochondrial pathway or through caspase-8, and it can promote downregulation of FLIP, thus sensitizing cells to death receptors.



synthesis. If cells lack glucose, the resulting energetic stress leads to mTOR inactivation and cells cease to synthesize proteins (Jones and Thompson, 2009). The mechanism that leads to mTOR inactivation on glucose withdrawal is still incompletely characterized. It was first demonstrated to be AMPK dependent, but recently it has been reported that agents that reduce ATP levels can inactivate mTOR in the absence of AMPK (Gwinn *et al.*, 2008; Kalender *et al.*, 2010).

Besides ATP levels, other good indicators of low glucose availability and energy stress are a decrease in the NADH/NAD⁺ ratio and a general decrease in protein acetylation. NAD⁺, the levels of which increase on inhibition of glycolysis, activates the sirtuin SIRT1. This protein promotes chromatin compaction and repression of gene expression. Repression of ribosomal RNA transcription by SIRT1 helps shut down ribosomal synthesis and protein translation (Murayama *et al.*, 2008). On the other hand, acetylation, which is a post-transcriptional modification of many proteins, is influenced by glucose levels, as acetyl groups are derived from glucose metabolism. Histones, which regulate gene expression, and several metabolic enzymes are regulated by acetylation and are thus responsive to the presence of glucose (Wellen *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010).

Lack of glucose is additionally detected by the carbohydrate response element-binding protein (ChREBP), which is a transcription factor of the basic helix-loop-helix leucine zipper family (Lyeda and Repa, 2006). In the presence of glucose, ChREBP activates genes with carbohydrate-responsive elements and promotes glycolysis. Downregulation of ChREBP switches cell metabolism from aerobic glycolysis to respiration and inhibits proliferation of tumor cells (Tong *et al.*, 2009).

Cells react to lack of glucose by switching to alternative energy sources

As discussed above, when subjected to glucose deprivation or energetic stress, cells cease proliferation and protein synthesis through activation of AMPK and p53, and through inactivation of mTOR. These same pathways stimulate alternative means of obtaining energy and building blocks. The aim is not only to minimize the use of resources required for proliferation but also to use energy reserves to maintain homeostatic functions. One of such energy reserves is fatty acids. In response to glucose deprivation, AMPK not only impairs fatty acid synthesis but also promotes fatty acid oxidation. Fatty acid oxidation has been shown to help glioblastoma cells survive deprivation of glucose (Buzzai *et al.*, 2005).

In the presence of antiglycolytics, tumor cells can frequently use amino acids as a source of energy and carbon. The amino acid glutamine can be incorporated into the mitochondrial Krebs cycle and can be used to generate fatty acids, nucleotides and energy. When deprived of glucose, glioblastoma cells have been shown to turn to glutamine utilization, and if glutamine metabolism is impaired, cells cannot survive in the

absence of glucose (Yang *et al.*, 2009). Thus, when glucose is not available, cells turn to amino acids and fatty acids to try to maintain energy levels and homeostatic functions.

A conserved response to nutrient and oxygen starvation is autophagy. Autophagy is required for cells to survive nutrient deprivation (Boya *et al.*, 2005). Most reports about the role of autophagy in response to nutrient deprivation have focused on cells subjected to complete starvation: depletion of amino acids, serum, glucose and vitamins. However, autophagy is thought to be activated in response to lack of glucose, and it has been shown to be induced and required for survival of prostate cells after treatment with the antiglycolytic 2-DG (DiPaola *et al.*, 2008). Moreover, when apoptosis-deficient cells are subjected to glucose deprivation under hypoxia, autophagy becomes essential to maintain cell survival (Degenhardt *et al.*, 2006).

Lack of glucose can also promote the unfolded protein response, which is a responsive mechanism to endoplasmic reticulum (ER) stress (Figure 1). The reason is that glucose is required for glycosylation. When proteins cannot be glycosylated, misfolded proteins accumulate, and the unfolded protein response is engaged. Indeed, ER stress, rather than energetic stress, may be the leading cause of cell death on treatment of some tumor cells with antiglycolytics such as 2-DG (Kurtoglu *et al.*, 2007).

Oncogenes promote sensitivity to glucose deprivation

Proliferating cells react to glucose unavailability by shutting down biosynthetic pathways and actively promoting cell cycle arrest. However, tumor cells frequently present hyperactivation of proliferation-associated pathways and mutations in cell cycle inhibitors. This makes cells hypersensitive to glucose deprivation, as the cell is stimulated to proliferate but it lacks the building blocks needed for this purpose. For instance, hyperactivation of the oncogenic Akt/mTOR pathway promotes sensitivity to glucose withdrawal (Flstrom *et al.*, 2004). Downstream of Akt, hyperactivation of mTOR, for instance, owing to the lack of tumor suppressor TSC1/2, promotes sensitivity to starvation. In this context, cells become unable to stop anabolism, and this leads to energy stress and cell death (Choo *et al.*, 2010).

Survival of cells undergoing energetic stress requires AMPK to stop anabolism and promote catabolism and cell cycle arrest. Many tumor cells lack LKB1, which is the main kinase involved in activation of AMPK. As cells without LKB1 cannot respond adequately to energetic stress, they are hypersensitive to energy-depleting agents (Shaw *et al.*, 2004). Downstream of AMPK, glucose deprivation promotes activation of p53 and p27. Both p53 and p27 promote cell cycle arrest and induce autophagy, which contributes to their prosurvival effects in the absence of glucose (Jones *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2007; Tasdemir *et al.*, 2008). For this reason, the tumor suppressor p53, which is mutated in a variety



of tumors, has been shown to confer resistance rather than sensitivity to metabolic inhibitors. This is the reverse of that observed with most chemotherapeutic agents, which require p53 to kill cells. Thus, p53-deficient tumors are likely to be more sensitive than p53-positive tumors or non-transformed cells to antiglycolytics. However, more studies are required to clarify the role of p53 in cell death induced by glucose deprivation, as proapoptotic effects of this protein have also been reported (Zhao *et al.*, 2008).

Glucose deprivation and antiglycolytics induce cell cycle arrest or cell death

The most widely used inhibitor of glycolysis is 2-deoxy-D-glucose (2-DG, DOG). This molecule is a non-metabolizable glucose analog, which is phosphorylated by hexokinase in the first step of glycolysis, but it cannot be further metabolized. Cell responses to 2-DG or to glucose deprivation are not identical (Kang and Hwang, 2006), but, in general, 2-DG produces the same effects as glucose deprivation in terms of AMPK activation, mTOR inactivation, cell cycle arrest and cell death. It has been known for decades that 2-DG, similar to glucose starvation, promotes cell cycle arrest and tumor cell death (Table 1). The effects of glucose deprivation and 2-DG are stronger under hypoxia than in normoxia, indicating that in the absence of oxygen, cells rely on anaerobic glycolysis and thus become more dependent on glucose (Liu *et al.*, 2002; Maher *et al.*, 2004). As tumors are frequently subjected to hypoxia, drugs that kill better under hypoxia are particularly interesting for tumor treatment. Indeed, 2-DG has been tested in animal models and in clinical trials (Tables 1 and 2), in which it offered moderate success and was proven to be well tolerated and relatively non-toxic to normal tissues (Racz *et al.*, 2005).

Glucose deprivation has been described to kill cells either by apoptosis or by necrosis. Apoptosis is a form of cell death orchestrated by caspases, which are proteases that degrade hundreds of substrates involved in cell homeostasis or in structural functions. When cells die by apoptosis, they are phagocytosed rapidly with no spillage of cytoplasmic content (Taylor *et al.*, 2008). In contrast, necrosis occurs with rupture of the plasma membrane, which promotes inflammation. Necrosis cannot be prevented by the use of caspase inhibitors, and can only be inhibited, in certain cases, by inhibitors of RIPK1 (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) or antioxidants. Although 2-DG usually kills cells by apoptosis, glucose deprivation has been shown to kill some cells by necrosis. For instance, when subjected to glucose deprivation under hypoxia, immortalized baby mouse kidney cells transfected with constitutively active Akt die by apoptosis. In contrast, their Bax-, Bak-deficient counterparts die by necrosis (Degenhardt *et al.*, 2006). Bax and Bak are molecules required for one of the two main pathways of apoptosis: the intrinsic or mitochondrial pathway. These experiments suggested that cells usually die through the

mitochondrial apoptotic pathway, but when this pathway is impaired, cells die by necrosis. However, glucose deprivation promotes apoptotic cell death in SV40-transformed, Bax-, Bak-deficient mouse embryonic fibroblasts. This form of cell death was dependent on caspase-8, which is a caspase involved in the non-mitochondrial, extrinsic apoptotic pathway (Caro-Maldonado *et al.*, 2010). Caspase-8 was also shown to participate in the death of HeLa cells by glucose starvation. Thus, glucose deprivation can induce mitochondrial apoptosis, caspase-8-dependent apoptosis or necrosis (Table 1).

Antiapoptotic Bcl-2 proteins regulate cell death by lack of glucose

Members of the Bcl-2 family of proteins are regulators of apoptosis with a well-documented implication in cancer (Frenzel *et al.*, 2009). This family is divided into three subfamilies of proteins, depending on the types and number of BH (BCL-2 homology) domains they contain. BH1-3 proteins such as Bak and Bax are the main inducers of apoptosis through the direct permeabilization of the mitochondrial membrane. The second group contains BH1-4 domains and are antiapoptotic proteins. Finally, the third subgroup of Bcl-2 proteins contains only the BH3 domain and are proapoptotic (Youle and Strasser, 2008).

A number of reports indicate that cell death induced by glucose deprivation in tumor or untransformed cells is inhibited by antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family, indicating that glucose deprivation promotes mitochondrial apoptosis (Table 1). For instance, a study in the multidrug-resistant breast carcinoma MCF-7 line showed that, on glucose deprivation, these cells undergo apoptosis, which could be inhibited by Bcl-2 overexpression (Lee *et al.*, 1997). In addition, in Ba/F3 hematopoietic cells, the stable expression of the antiapoptotic Bcl-2 homolog Bcl-xL was shown to protect cells from apoptosis caused by IL-3 starvation under low-glucose conditions (Gonin-Giraud *et al.*, 2002).

Mcl-1, another member of the antiapoptotic Bcl-2 family, has also been shown to have a role in apoptosis induced by glucose deprivation, as reduction of Mcl-1 levels sensitized the acute T-cell leukemia cell line Jurkat to glucose withdrawal (Alves *et al.*, 2006). Moreover, this short-lived protein was shown to be metabolically regulated. Rathmell and colleagues demonstrated that enforcement of glycolysis in hematopoietic cells leads to stabilization of Mcl-1 by inhibiting its degradation (Zhao *et al.*, 2007). On the contrary, as discussed above, glucose deprivation or treatment with 2-DG results in AMPK-dependent mTor inactivation; this was shown to inhibit translation of Mcl-1 (Pradelli *et al.*, 2010). Thus, Mcl-1 is controlled at translational and post-translational levels by the glycolytic metabolism. As we will discuss later, glucose restriction sensitizes cells to a number of proapoptotic stimuli, and it is possible that downregulation of Mcl-1 has a key role in this sensitization.

Table 1 Cell death induced by inhibition of glucose metabolism

Stimulus	Response	Molecules implicated	Cell tumor type	References
Glucose deprivation	Apoptosis	Bel-xL (protective)	IL-3 dependent FLS.12 and Ba F3 cells	Gonin-Giraud <i>et al.</i> (2002); Vander Heiden <i>et al.</i> (2001)
		Bel-2 (protective)	Breast carcinoma MCF-7 ADR (multidrug resistant); rat-myc-transformed fibroblasts	Lee <i>et al.</i> (1997)
		Mel-1 (protective), Notch	human T cells and leukemia	Alves <i>et al.</i> (2006)
		Caspase-8	MEFs; Bax Bak	Caro-Maldonado <i>et al.</i> (2010)
		Bcl	Mouse liver	Daniel <i>et al.</i> (2003)
Cell death Cell death with necrotic phenotype	Cell death with necrotic phenotype	Bim, PU·MA, p53 (pro-apoptotic)	IL-3 dependent FLS.12. Primary T lymphocytes	Zhao <i>et al.</i> (2008)
		p53 (protective)	Primary mouse fibroblasts	Jones <i>et al.</i> (2005)
		ARK5	Human fibroblasts Hepatoma HepG2	Yuncea <i>et al.</i> (2007) Suzuki <i>et al.</i> (2003)
Glucose deprivation + hypoxia	Necrosis, apoptosis	AKT, Bax, Bak	iBMK; immortalized kidney epithelial cells	Degenhardt <i>et al.</i> (2006)
2-deoxyglucose	Apoptosis		Breast cancer cell lines (MCF-7), ovarian carcinoma (IGROV1, IGROV1-R10, U251), mesothelioma (MSTO-211H), Head and neck squamous cancer (SQ2OB, SCC61)	Afi <i>et al.</i> (2002); Zhang <i>et al.</i> (2006); Kaplan <i>et al.</i> (1990)
		Beclin (protective)	Prostate cancer cells	DiPaola <i>et al.</i> (2008)
		Bcl-2 (protective)	Rat1a-Myc transformed fibroblasts, nontransformed CB33 lymphoblastoid cells, Burkitt lymphoma cell lines	Shim <i>et al.</i> (1998)
	Cell cycle blockade without apoptosis		Ovarian carcinoma (SKOV3), mesothelioma (NCI-H28), Glioblastoma (GL15), Head and neck squamous cancer (SCC12B2)	Zhang <i>et al.</i> (2006)
2-deoxyglucose	Tumor regression		Fibrosarcoma, animal model	Kern and Norton (1987)
2-deoxyglucose			Clinical trial: Prostate Cancer, Intracranial metastases	NCT00633087; 2008-2010, Phase I/II study; Safety of 2-deoxyglucose in the treatment of advanced solid tumors and hormone refractory prostate cancer. Status: suspended NCT00247403; 2005-2009, Phase I Study; safety study of 2-DG with stereotactic radiosurgery for treatment of intracranial metastases. Status: pharmaceutical company no longer manufactures drug.
3-BrPA	Tumor eradication		Hepatocarcinoma (animal model)	Geschwind <i>et al.</i> (2002); Ko <i>et al.</i> (2004)
Lonidamine	Cytotoxicity		Breast-carcinoma MCF7 cells	Rosbe <i>et al.</i> (1989)
Lonidamine			Clinical trials: Benign Prostatic hyperplasia	NCT00435448, NCT00237536, 2005-2009, Phase II/III studies; efficacy and safety of lonidamine for the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. Status: terminated

Abbreviation: DG, deoxyglucose.

Glucose regulates BH3-only proteins

The so-called 'BH3-only' proteins regulate apoptosis by sensing signals emanating from various cellular processes and inducing the activation of Bax/Bak, either directly or indirectly by inhibiting antiapoptotic Bcl-2 proteins. In both cases, these proteins trigger Bax and Bak to cause cytochrome *c* release and subsequent

activation of the caspase cascade. BH3-only proteins have key roles in tumorigenesis and in sensitivity to chemotherapy. A few of these proteins have been shown to have a role in glucose deprivation-induced apoptosis in different models (Figure 2).

Bim has been implicated in cell death induction in various cell types and tissues in response to different stimuli, notably growth factors or cytokine withdrawal.


Table 2 Combination of inhibition of glycolysis and therapeutic agents

<i>Anti-glycolytic stimulus</i>	<i>Therapeutic stimulus</i>	<i>Cell type</i>	<i>Effect</i>	<i>Reference</i>
3-BTPA	Doxorubicin, vincristine, ara-C	Leukemia cells and hepatocarcinoma	Sensitization to cell death (apoptosis, necrosis)	Xu <i>et al.</i> (2005)
2-deoxyglucose	Histone deacetylase inhibitors (trichostatin A, sodium butyrate)	Brain, breast, and cervix cancer cells	Sensitization to apoptosis	Egler <i>et al.</i> (2008)
	Metformin	Prostate cancer	Sensitization to cell death <i>in vitro</i>	Ben Sahra <i>et al.</i> (2010)
	Cisplatin carboplatin	Ovarian cancer cell lines, human epidermoid carcinoma A431, and colon carcinoma HT-29	Sensitization to cell death apoptosis	Yamada <i>et al.</i> (1999); Hernlund <i>et al.</i> (2009)
2-deoxyglucose	Prednisolone dexamethasone	Leukemia cells (Jurkat, Molt-4)	Sensitization to cell death	Hulleman <i>et al.</i> (2009)
	Adriamycin, Paclitaxel	Osteosarcoma 143b, Lung cancer (MV522, NSCLC) xenograft	Inhibition of tumor growth (<i>in vivo</i>)	Mashek <i>et al.</i> (2004)
2-deoxyglucose	Docetaxel	Clinical trial (phase I): Advanced solid tumors (lung, breast, pancreatic, head and neck, gastric cancer)	Low toxicity; some anti-tumor effects.	NCT00096707: 2004-2009 Study: dose escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone and in combination with docetaxel in subjects with advanced solid malignancies Raay <i>et al.</i> (2007)
2-deoxyglucose, glucose deprivation	TRAIL, TNF, Fas cross-linking	MCF7, U937, HeLa, SKW6.4, Jurkat	Sensitization to apoptosis	Munoz-Pinedo <i>et al.</i> (2003); Nam <i>et al.</i> (2002); Pradelli <i>et al.</i> (2010)
2-deoxyglucose	γ irradiation	Malignant glioma cells, melanoma, HeLa Murine tumor (Ehrlich ascites)	Sensitization to cell death Inhibition of tumor growth (<i>in vivo</i>); enhanced animal survival	Dwarkanath <i>et al.</i> (2001); Jain <i>et al.</i> (1985) Dwarkanath <i>et al.</i> (1999); Latz <i>et al.</i> (1993)
Glucose deprivation	Thymidylate synthase inhibitor 5-FCdR	Histiocytic lymphoma U937	Inhibition of apoptosis	Munoz-Pinedo <i>et al.</i> (2004).
		Leukemia (U937)	Inhibition of apoptosis	Haga <i>et al.</i> (1998)
2-deoxyglucose	Antitumor drugs (etoposide, camptothecin and mitomycin C)	Normal epithelium	Inhibition of apoptosis <i>in vitro</i>	Thakkar and Potten (1993)
	Doxorubicin	Normal epithelium	Inhibition of apoptosis <i>in vitro</i>	Thakkar and Potten (1993)
Lonidamine	Cisplatin	Breast cancer <i>in vitro</i> and mammary carcinoma <i>in vivo</i>	Sensitization to cell death	Teicher <i>et al.</i> (1991)
	Epirubicin and cyclophosphamide	Breast cancer (Phase I II)	Active and well tolerated.	Papaldo <i>et al.</i> (2003)
	Diazepam	Glioblastoma (Phase II study)	No complete or partial response. 50% stabilizations	Oudard <i>et al.</i> (2003)
2-deoxyglucose	Cisplatin carboplatin paclitaxel	Ovarian cancer (Phase II study)	Active and well tolerated	De Lena <i>et al.</i> (2001); Di Cosimo (2003)

Abbreviation: TNF, tumor necrosis factor.

Bim is also the main BH3-only protein associated with ER-stress-induced cell death. It was demonstrated in various cell lines that, on induction of ER stress Bim was upregulated, both transcriptionally by the transcription factor CHOP and post-translationally through its dephosphorylation by PP2a and subsequent stabilization (Puthalakath *et al.*, 2007). One of the consequences of glucose deprivation is the activation of the unfolded protein response in the ER; the reason behind it is not clear yet, but it is thought that it could be caused

both by the drop in ATP levels and by the impairment of protein glycosylation (reviewed in (Kaufman *et al.*, 2002)). Consistent with this, Bim was shown to be induced along with Puma in hematopoietic cells exposed to glucose deprivation (Zhao *et al.*, 2008). This suggests that the induction of Bim under glucose deprivation could be due to the induction of ER stress. Conversely, in hematopoietic cells, enforcement of glycolysis caused Mcl-1 upregulation and inhibition of Bim-induced apoptosis (Zhao *et al.*, 2007).

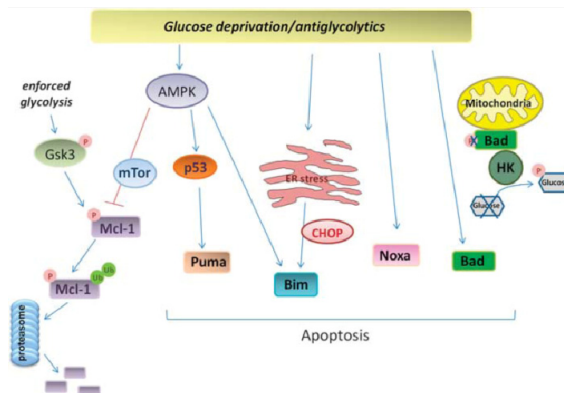


Figure 2 Regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by inhibition of glycolysis. Glucose deprivation or treatment with 2-DG leads to AMPK-dependent mTor inactivation with the subsequent inhibition of Mcl-1 translation. Conversely, enforcement of glycolysis leads to GSK3 inactivation, and this impairs Mcl-1 degradation by the proteasome. The activation of AMPK results in p53 activation and upregulation of the BH3-only protein Puma. Bim is induced not only by AMPK activation but also by the ER stress response through the action of the transcription factor CHOP. In addition, Noxa participates in apoptosis on glucose withdrawal in activated T cells and in leukemic cell lines, possibly by inhibiting Mcl-1. Finally, Bad is regulated post-translationally on glucose deprivation through inhibition of its phosphorylation. Unphosphorylated Bad is then able to interact with Bcl-2 family members and induce apoptosis. On the contrary, Bad also interacts with a glucose hexokinase (HK), and Bad phosphorylation is crucial for the kinase activity of the hexokinase.

In addition, this BH3-only protein has been recently implicated in apoptosis induced by excitotoxic stress in primary neurons (Concannon *et al.*, 2010). This stimulus promotes a drop in ATP cellular levels and subsequent activation of AMPK, which were shown to induce transcription of Bim (Concannon *et al.*, 2010). In summary, Bim was shown to be induced both by ER stress and by AMPK activation, two consequences of glucose deprivation.

PUMA is upregulated in a p53-dependent manner after DNA damage and growth factor withdrawal (Nakano and Vousden, 2001). A study in murine hematopoietic cells demonstrated that PUMA was metabolically regulated and was induced on glucose deprivation through the activation of p53 (Zhao *et al.*, 2008). In this model, p53 was activated, but its expression was not upregulated. Downregulation of PUMA with small interfering RNA was sufficient to reduce death induced by glucose deprivation, indicating that PUMA mediates glucose withdrawal-induced cell death. Consequently, high glucose metabolism seemed to protect from interleukin-3 deprivation by suppressing upregulation of Bim and PUMA, and, as we will discuss later, by stabilizing Mcl-1.

Noxa is another BH3-only protein under the control of p53. Noxa has been shown to participate in cell death induced by glucose deprivation, both in primary and tumor cells (Alves *et al.*, 2006). In this study, Alves *et al.* looked at the response of rapidly dividing hematopoietic cells to glucose limitation. In their model, Noxa was

shown to be involved in apoptosis after glucose withdrawal, as downregulation of Noxa conferred a competitive survival advantage to primary T cells, as well as to leukemic cell lines, under low glucose conditions. The authors hypothesized that the role of Noxa in this setting is related to its ability to neutralize the antiapoptotic Bcl-2 homolog, Mcl-1. Indeed, the downregulation of Mcl-1 rendered these cells more sensitive to glucose deprivation, as described earlier. Moreover, Noxa has been shown to redistribute to mitochondria on glucose deprivation. Translocation is linked to its dephosphorylation, which triggers its release from a large cytosolic complex, which also contains a glycolytic transferase (A Kelekar, personal communication). These intriguing results suggest that Noxa, similar to Bad, may have a role both in death induced by glucose deprivation and in glucose metabolism.

Bad is the BH3-only protein that has been most directly linked to glucose metabolism (Danial, 2008). Bad-deficient murine hepatocytes deprived of glucose are strikingly protected from cell death compared with their normal counterparts (Danial *et al.*, 2003). These results suggest that Bad functions as a proapoptotic BH3-only protein in response to glucose deprivation. However, it is possible that Bad promotes cell death in this context indirectly, by regulating glucose metabolism. In liver and pancreatic β -cell mitochondria, Bad associates with a protein complex that contains hexokinase IV, responsible for the first step of glycolysis. Furthermore, studies on Bad^{-/-} mice showed that Bad was necessary for



blood glucose sensing. These mice display glucose intolerance and a defect in insulin production by pancreatic islets (Danial *et al.*, 2008). Intriguingly, Bad BH3 motive, which regulates cell death induced by some stimuli, was shown to be required for the activity of the hexokinase.

Bad had previously been shown to be regulated post-translationally by phosphorylation. Its phosphorylation by growth factor-activated kinases triggers its binding to 14-3-3 proteins, thus inhibiting its interaction with Bcl-2 antiapoptotic proteins and impeding its proapoptotic functions (Zha *et al.*, 1996). It was shown by Danial *et al.* (2003) that phosphorylation of the BH3 domain of Bad promotes hexokinase IV activity. On the other hand, glucose deprivation promotes dephosphorylation of the BH3 motive, correlating with apoptosis induction. Furthermore, treatment of human leukemic cells with a glycolytic inhibitor (3-BrPA) led to Bad dephosphorylation and Bax oligomerization on mitochondria (Danial *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005). Thus, the phosphorylation status of Bad seems to have opposite effects on its two main functions: phosphorylation promotes glycolysis while inhibiting apoptosis. In this context, it is unclear whether Bad participates directly in apoptosis induced by inhibition of glucose metabolism, functioning as a classical BH3-only protein. Instead, it is possible that it is the role of Bad in the maintenance of glucose metabolism that accounts for the protection of Bad-deficient hepatocytes from glucose withdrawal.

Glycolysis protects from deprivation of growth factors

Growth/survival factors promote glucose metabolism. Conversely, a high glycolytic rate has been shown to protect cells from cell death induced by survival factor withdrawal. One of the first studies that suggested the protective role of high glucose metabolism from growth factor deprivation is that by Thompson and colleagues (Vander Heiden *et al.*, 2001). They demonstrated that by increasing glucose uptake through Glut1 overexpression in hematopoietic cells, they could efficiently delay apoptosis induced by interleukin-3 withdrawal. In addition, it was shown that glucose uptake and phosphorylation are required by constitutively active Akt to protect from interleukin-3 withdrawal (Rathmell *et al.*, 2003). The process of deciphering the mechanism behind it has begun. Under normal glucose conditions, withdrawal of interleukin-3 leads to Mcl-1 phosphorylation by kinase GSK3, which promotes degradation of Mcl-1 by the proteasome and leads to cell death (Maurer *et al.*, 2006). However, enforcement of glucose metabolism maintains GSK3 α and β phosphorylated and thus inactive, and this promotes stability of Mcl-1 (Zhao *et al.*, 2007; Figure 2). Moreover, although PUMA is induced by growth factor withdrawal, enforcement of glucose uptake and metabolism were shown to attenuate PUMA induction (Zhao *et al.*, 2008). It was thus suggested that the high glycolytic metabolism observed in tumor cells and described as the Warburg effect was in fact a protective strategy to cope with growth factor limitation.

2-DG sensitizes to radio- and chemotherapy

Glycolytic inhibitors 2-DG, lonidamine and 3-bromopyruvate have shown encouraging results as antitumor agents in animal models. 2-DG has been studied in several clinical trials that indicate its safety in humans (Tables 1 and 2). Although some reports indicate some antitumor effects, currently, to our knowledge, there are no ongoing clinical trials using 2-DG as a single agent. However, its low toxicity, together with a good number of *in vitro* experiments, suggests that this compound may be useful in combination with chemotherapeutic drugs, as it sensitizes tumor cells to common chemotherapeutic drugs (Table 2). A number of hypotheses have been proposed to explain this effect. It is possible that glycolytic inhibitors reduce the ability of cells to repair damage caused by other drugs. Alternatively, reduction of ATP levels could impair the function of the ATP-dependent multidrug resistance-associated pumps. Moreover, as discussed earlier, inhibitors of glycolysis regulate apoptotic proteins, thus lowering the threshold for a cell to undergo apoptosis. As discussed above, glucose deprivation or treatment with 2-DG regulates levels or activity of p53, Mcl-1, PUMA, Noxa and Bad proteins, which have been associated with sensitivity to chemotherapy (Frenzel *et al.*, 2009).

Several studies have shown that the glucose analog 2-DG improves responses to radiotherapy (Table 2). For example, high concentrations of 2-DG sensitize malignant glioma cells or HeLa to radiation. Interestingly, the use of 2-DG did not promote radiotoxicity of normal peripheral blood leukocytes, splenocytes or thymocytes (Kalia *et al.*, 1982; Jain *et al.*, 1985; Dwarkanath *et al.*, 2001; Swamy *et al.*, 2005). Moreover, the same results were obtained in animal experiments. In implanted murine Ehrlich ascites or sarcoma, the administration of 2-DG (≥ 1 g/kg) before or immediately after irradiation increases tumor cell death and improves animal survival (Dwarkanath *et al.*, 1999). However, in normal bone marrow and spleen, a similar dose of 2-DG confers radioprotection (Singh *et al.*, 1990). These studies promoted the development of a clinical trial that confirmed that the combination of 2-DG with radiation was well tolerated in patients (Singh *et al.*, 2005).

Chemoprotection of normal tissues by 2-DG or fasting

As seen earlier, 2-DG sensitizes to chemo- and radiotherapy. One possible negative effect of using antiglycolytic agents in combination with other therapies would be the possibility that untransformed cells would also be sensitized. As discussed above, 2-DG sensitizes tumor cells, but not non-transformed cells, to radiotherapy. Moreover, a number of studies have reported encouraging results, which indicate that 2-DG protects normal tissues from chemotherapy. In this sense, an *in vivo* study showed that the treatment with 2-DG concomitantly with doxorubicin led to inhibition of apoptosis induced by this DNA-damaging drug in intestinal cells (Thakkar and Potten, 1993). Moreover,

a differential effect of the influence of low glucose on chemotherapy resistance between normal and tumor cells has been observed (Raffaghello *et al.*, 2008). Low glucose protected only primary glial cells, but not glioblastoma cancer cell lines, from cyclophosphamide.

Raffaghello *et al.* subjected mice to starvation to study its effect on chemotherapy-induced toxicity. Strikingly, 2 days of starvation protected mice from high doses of etoposide, which are usually very toxic. Treatment with etoposide after starvation promoted survival of mice injected with human neuroblastoma, suggesting that a short period of starvation would allow patients to receive higher, more effective doses of chemotherapy.

However, it should be noted that antagonistic effects of antiglycolytic agents with other drugs have also been reported in tumor cell lines. It was observed that glucose deprivation could inhibit apoptosis induced by DNA-damaging agents such as VP-16 (etoposide), adriamycin or camptothecin (Yun *et al.*, 1995; Tomida *et al.*, 1996). Furthermore, studies in U937 cells show that pretreatment with 2-DG also confers resistance to cell death induced by DNA-damaging agents (Haga *et al.*, 1998; Munoz-Pinedo *et al.*, 2004). Nevertheless, no common mechanisms of resistance have been described in these different studies. Yun and colleagues linked the resistance to a decrease in topoisomerase II cellular levels, although other studies show steady state levels of topoisomerase-DNA complexes and postulate that the inhibition occurs downstream of the DNA damage, but upstream of cytochrome *c* release from mitochondria.

It is possible that, as most of these drugs need the cells to be in a highly proliferative state in order to kill them, the cell cycle arrest caused by glucose deprivation impairs their effects. In the same line, another effect of glucose metabolism inhibitors that could explain the inhibition of death is the inhibition of *de novo* protein synthesis, which is required by most of these drugs to induce apoptosis. Nevertheless, more studies, especially *in vivo* studies, are needed in order to determine whether the targeting of glucose metabolism in combination with certain DNA-damaging drugs could cause antagonist effects.

Sensitization to death receptors

Death ligands such as Fas:CD95 ligand, TNF and TRAIL kill cells through the extrinsic pathway of apoptosis. This pathway is engaged when these proteins bind to their receptors on the surface of the cell and promote their oligomerization. Oligomerization then triggers the recruitment of several molecules to the Death Inducing Signaling Complex to which caspase-8 binds. Caspase-8 is activated through oligomerization, and can directly cleave and activate caspase-3, thus killing the cell. TRAIL is a promising death ligand that is being studied in clinical trials because of its ability to kill tumors but not normal cells (Johnstone *et al.*, 2008). However, proteins of the apoptotic extrinsic pathway are very frequently upregulated or downregulated in

tumors, and some tumor cells are resistant to low doses of TRAIL. *In vitro* studies have shown that glucose withdrawal or treatment with 2-DG can overcome resistance to TRAIL, TNF- α and Fas ligation in several cell lines (Nam *et al.*, 2002; Munoz-Pinedo *et al.*, 2003; Pradelli *et al.*, 2010) (Table 2). At the molecular level, these results could be explained, at least in some cell lines, by the effects of glucose levels on the inhibitors of apoptosis FLIP and Mel-1. These two proteins have a short half-life, and glucose deprivation promotes inhibition of their synthesis.

Synergistic effects with TRAIL suggest that glycolytic inhibitors could be combined with TRAIL agonists to improve its therapeutic effects. One important question, however, is whether inhibition of glucose metabolism sensitizes normal human cells to death receptors, which will likely cause unwanted side effects. A study suggests that this may not be the case. Schimmer and colleagues identified a compound that sensitizes tumor cells to death ligands (Wood *et al.*, 2008). This compound, fasentin, inhibits glucose uptake, possibly by direct inhibition of glucose transporters. Importantly, fasentin did not sensitize normal resting or phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood mononuclear cells to cross-linking of Fas receptors (Wood *et al.*, 2008). However, to our knowledge, it has not been studied whether glycolytic inhibitors would sensitize non-transformed cells to TRAIL.

Conclusions and future perspectives

Nutrients are required for life, and nutrient availability regulates cell death. Control of cell death by metabolism is likely to occur at multiple levels, from regulation of stability and activation of BH3-only proteins to regulation of caspase activation at the Death Inducing Signaling Complex. This is probably a well-conserved phenomenon across evolution. Yuan and colleagues performed a genome-wide RNAi screen to identify genes that regulate caspase activation in *Drosophila* (Yi *et al.*, 2007), and they found that many of the genes that regulated apoptosis were genes involved in metabolism: from carbohydrate metabolism to fatty acid synthesis.

Glucose dependency of tumor cells is exploited for diagnostic purposes. The fact that tumor cells require more glucose than their normal counterparts, and that they frequently undergo cell death when treated with antiglycolytics, has promoted clinical trial development. It should be noted, however, that antiglycolytic drugs—similar to most chemotherapeutic drugs—may have a number of undesired side effects, as there are many tissues that use glucose as fuel; among these, the brain and highly proliferating cells, such as those of the immune system (particularly activated lymphocytes), may be the most sensitive to inhibition of glycolysis. Some results discussed earlier are encouraging because they suggest that inhibition of glucose metabolism is less toxic to normal cells than to tumor cells when combined with radio- or chemotherapy. However, we should improve our understanding of how tumor metabolism



differs from metabolism of normal cells. In this sense, a matter of relevance is whether specific oncogenes confer more sensitivity than others to inhibition of specific metabolic pathways. For instance, tumors with deregulated myc expression may be less sensitive to inhibition of glycolysis than tumors with overactivation of the Akt pathway. Instead, myc-overexpressing tumors could be more susceptible to inhibition of mitochondrial/ glutamine metabolism (Yuneva *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2010).

Surprisingly little is known about the apoptotic pathways involved in tumor cell death in response to starvation. Several reports described above have studied the apoptotic role of caspase-8 or specific BH3-only proteins in a few tumor cell lines or in non-transformed cells. Aside from these few reports, we do not know the specific pathways by which glucose deprivation or antiglycolytics kill tumor cells. Many tumor cells have been shown to die by necrosis when deprived of glucose. Some forms of necrosis are specifically regulated by molecules such as RIPK1; the knowledge of possible molecules involved in necrosis of tumor cells would open the possibility to control it by drugs. Moreover, it

would be of interest to identify the key molecules involved in sensitization of tumor cells to radio- and chemotherapy in order to design better combinations with antiglycolytics. All these studies also open the possibility that temporary starvation will synergize with chemotherapy. It is known that caloric restriction prolongs life. However, to determine whether this would hold true for cancer patients would require many more experiments and clinical trials.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Ameeta Kelekar for sharing unpublished data and Oscar M. Tirado for critical reading of this manuscript. Research in our group is supported by AICR grant 08-0621 and by grants PI071027 and RTICC RD06.0020 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII.

References

- Alt RL, Zhang FW, Gins D. (2002). Evaluation of 2-deoxy- α -glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br J Cancer* 87: 805-812.
- Alves NL, Derks IA, Berk E, Spijker R, van Lier RA, Eklering E. (2006). The Noxa-Med1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity* 24: 703-716.
- Ben Sahra I, Laurent K, Giuliano S, Larbret F, Ponzio G, Gounon P *et al.* (2010). Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res* 70: 2465-2475.
- Boya P, Gorzalvez-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N *et al.* (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 25: 1025-1040.
- Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, DeBerardinis RJ, Hatzivassiliou G, Elstrom RL *et al.* (2005). The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid β -oxidation. *Oncogene* 24: 4165-4173.
- Caro-Maldonado A, Tait SWG, Ramirez-Perinazo S, Ricci JE, Fabregat I, Green DR *et al.* (2010). Glucose deprivation induces an atypical form of apoptosis mediated by caspase-8 in Bax-, Bak-deficient cells. *Cell Death Differ* 17: 1335-1344.
- Chiaramonda F, Sacco E, Manzoni R, Giorgio M, Vanoni M, Alberghina L. (2006). Ras-dependent carbon metabolism and transformation in mouse fibroblasts. *Oncogene* 25: 5391-5404.
- Choo AY, Kim SG, Vander Heiden MG, Mahoney SJ, Vu H, Yoon S-O *et al.* (2010). Glucose addiction of TSC null cells is caused by failed mTORC1-dependent balancing of metabolic demand with supply. *Mol Cell* 38: 487-499.
- Concannon CG, Tully LP, Wcislova P, Bouczer HP, Davila D, Bouczer C *et al.* (2010). AMP kinase-mediated activation of the BH3-only protein Bim couples energy depletion to stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 189: 83-94.
- Daniel NN, Gramm CJ, Scorrano L, Zhang C-Y, Knauts S, Rangan AM *et al.* (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424: 952-956.
- Daniel NN, Walensky LD, Zhang C-Y, Choi CS, Fisher JK, Molina AJA *et al.* (2008). Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med* 14: 144-153.
- De Lena M, Lorusso V, Latorre A, Fanizza G, Gargano G, Caporaso L *et al.* (2001). Paclitaxel, cisplatin and lornidamine in advanced ovarian cancer: A phase II study. *Eur J Cancer* 37: 364-368.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7: 11-20.
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Diukhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S *et al.* (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci* 104: 19345-19350.
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G *et al.* (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10: 51-64.
- Di Cosimo S. (2003). Lornidamine: efficacy and safety in clinical trials for the treatment of solid tumors. *Drugs Today (Barc)* 39: 157-174.
- DiPaola RS, Dvorzhinski D, Thalasila A, Garikapaty Y, Doran D, May M *et al.* (2008). Therapeutic starvation and autophagy in prostate cancer: a new paradigm for targeting metabolism in cancer therapy. *Prostate* 68: 1743-1752.
- Dwarakanath BS, Singh S, Jain V. (1999). Optimization of tumour radiotherapy: part V radiosensitization by 2-deoxy- α -glucose and DNA ligand Hoechst-33342 in a murine tumour. *Indian J Exp Biol* 37: 865-870.
- Dwarkamath BS, Zolzer F, Chandani S, Bauch T, Adhikari JS, Muller WC *et al.* (2001). Heterogeneity in 2-deoxy- α -glucose-induced modifications in energetics and radiation responses of human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50: 1051-1061.
- Egler V, Kocur S, Faully M, Boulay JL, Imber R, Liao MM *et al.* (2008). Histone deacetylase inhibition and blockade of the glycolytic pathway synergistically induce glioblastoma cell death. *Clin Cancer Res* 14: 3132-3140.
- Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR *et al.* (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64: 3892-3899.



- Fan Y, Dickman KG, Zong W-X. (2010). Akt and c-Myc differentially activate cellular metabolic programs and prime cells to bioenergetic inhibition. *J Biol Chem* 285: 7334-7333.
- Frenzel A, Crespi F, Chmielewski W, Villunger A. (2009). Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis* 14: 584-596.
- Gao P, Tchernyshyov I, Chang T-C, Lee Y-S, Kita K, Ochi T et al. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutamine expression and glutamine metabolism. *Nature* 458: 762-765.
- Geschwind J-Fil, Ka YH, Torbetson MS, Muggs C, Pedersen PL. (2002). Novel therapy for liver cancer: direct intratumoral injection of a potent inhibitor of ATP production. *Cancer Res* 62: 3909-3913.
- Gomin-Giraud S, Muthléer AL, Dicosu S, Tomkowiak M, Delorac G, Marval J. (2002). Decreased glycolytic metabolism contributes to but is not the inducer of apoptosis following IL-3-starvation. *Cell Death Differ* 9: 1147-1157.
- Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* 15: 1406-1418.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS et al. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30: 214-226.
- Ihaga N, Naito M, Setuno H, Toriida A, Dong J, Tsuruo T. (1998). 2-Deoxyglucose inhibits chemotherapeutic drug-induced apoptosis in human monocytic leukemia U937 cells with inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1 stress-activated protein kinase activation. *Int J Cancer* 76: 86-90.
- Iurdie DG. (2007). AMP-activated SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 774-785.
- Hertlund E, Hjerpe E, Avall-Lundqvist E, Shoshan M. (2009). Ovarian carcinoma cells with low levels of beta-F1-ATPase are sensitive to combined platinum and 2-deoxy-D-glucose treatment. *Mol Cancer Ther* 8: 1916-1923.
- Hulleman E, Kazanietz KM, Hollman A, VanderWeele DJ, Rudin CM, Brockhuis MJC et al. (2009). Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 113: 2014-2021.
- Jain VK, Kalia VK, Sharma R, Maharajan V, Menon M. (1985). Effects of 2-deoxy-D-glucose on glycolysis, proliferation kinetics and radiation response of human cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11: 943-950.
- Johnstone RW, Frey AJ, Smyth MJ. (2008). The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 782-798.
- Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzai M, Mu J, Xu Y et al. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18: 283-293.
- Jones RG, Thompson CB. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23: 537-548.
- Kukender A, Sivaraj A, Kim SY, Gulati P, Bruck S, Viollet B et al. (2010). Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* 11: 390-401.
- Kalia VK, Jain VK, Otto EF. (1982). Optimization of cancer therapy: part IV effects of 2-deoxy-D-glucose on radiation induced chromosomal damage in PHA-stimulated peripheral human leukocytes. *Indian J Exp Biol* 20: 884-888.
- Kang HT, Hwang ES. (2006). 2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. *Life Sci* 78: 1392-1399.
- Kaplan O, Navon G, Lyon RC, Faustino PJ, Straka EJ, Cohen JS. (1990). Effects of 2-deoxyglucose on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: toxicity and magnetic resonance spectroscopy studies of metabolism. *Cancer Res* 50: 544-551.
- Kaufman RJ, Scheuner D, Schroeder M, Shen X, Lee K, Liu CY et al. (2002). The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 411-421.
- Kern KA, Norton JA. (1987). Inhibition of established rat fibrosarcoma growth by the glucose antagonist 2-deoxy-D-glucose. *Surgery* 102: 380-385.
- Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomeroy MG, Rini DA, Torbetson MS et al. (2004). Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 269-275.
- Kroemer G, Pouyssegur J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's achilles' heel. *Cancer Cell* 13: 472-482.
- Kurioglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehman MA, Wangschirer M et al. (2007). Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol Cancer Ther* 6: 3049-3058.
- Lanz D, Thonke A, Juling-Pohlil I, Pohlil W. (1993). Tumor response to ionizing radiation and combined 2-deoxy-D-glucose application in EATC tumor bearing mice: monitoring of tumor size and microscopic observations. *Strahlenther Onkol* 169: 405-411.
- Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM, Tong WP, Kim HR, Cory PM. (1997). Glucose deprivation-induced cytotoxicity in drug resistant human breast carcinoma MCF-7 ADR cells: role of c-myc and cdk-2 in apoptotic cell death. *J Cell Sci* 110: 681-686.
- Liang J, Shao SH, Xu Z-X, Hennessy B, Xing Z, Larren M et al. (2007). The energy sensing 1,3B-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 9: 218-224.
- Liu H, Savařaj N, Priebe W, Lampidis TJ. (2002). Hypoxia increases tumor cell sensitivity to glycolytic inhibitors: a strategy for solid tumor therapy (model C). *Biochem Pharmacol* 64: 1745-1751.
- Maher J, Krishan A, Lampidis T. (2004). Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol* 53: 116-122.
- Muschek G, Savařaj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF et al. (2004). 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers *in vitro*. *Cancer Res* 64: 31-34.
- Maurer U, Charvet C, Wagnan AS, Dejardin E, Green DR. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 21: 749-760.
- Michalek RD, Rathmell JC. (2010). The metabolic life and times of a T-cell. *Immunity* 32: 190-202.
- Munoz-Pinedo C, Robledo G, Lopez-Rivas A. (2004). Thymidylate synthase inhibition triggers glucose-dependent apoptosis in p53-negative leukemic cells. *FEBS Lett* 570: 265-270.
- Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodovar C, Palacios C, Lopez-Rivas A. (2003). Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical caspase-8 processing. *J Biol Chem* 278: 12759-12768.
- Murayama A, Ohtori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T et al. (2008). Epigenetic control of cDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* 133: 627-639.
- Nakano K, Vousden KH. (2001). PLUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7: 683-694.
- Nam SY, Amescato AA, Lee YJ. (2002). Low glucose-enhanced TRAIL cytotoxicity is mediated through the ceramide-Akt-FLIP pathway. *Oncogene* 21: 337-346.
- Oudard S, Carpentier A, Barni E, Fauchon F, Cokier D, Poupon MF et al. (2003). Phase II study of lomidamine and diazepam in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 63: 81-86.
- Papaldo P, Lopez M, Cortesi E, Cammilluzzi E, Antimi M, Terzoli E et al. (2003). Addition of either lomidamine or granulocyte colony-stimulating factor does not improve survival in early breast cancer patients treated with high-dose epirubicin and cyclophosphamide. *J Clin Oncol* 21: 3462-3468.
- Pathania D, Millard M, Neamati N. (2009). Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondrial and cancer cell metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 1250-1275.
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25: 4633-4646.



- Pradelli LA, Benetou M, Chauvin C, Jacquin MA, Marchetti S, Munoz-Pinedo C et al. (2010). Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptor-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to McI-1 block in translation. *Oncogene* 29: 1641-1652.
- Puthalakath H, O'Reilly JA, Gunn P, Lee J, Kelly PN, Huntington ND et al. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129: 1337-1349.
- Racz LE, Langmuir V, Toibu K, Rocha-Lima CM, Papadopoulos K, Kroll S et al. (2007). Responses to the combination of the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose (2DG) and docetaxel (DC) in patients with lung and head and neck (H N) carcinomas. *J Clin Oncol* 25: 14035.
- Racz LE, Rosenblatt J, Schlesselman J, Langmuir V, Tidmarsh G, Rocha-Lima C et al. (2005). Combining glycolytic inhibitors with chemotherapy: Phase I trial of 2-deoxyglucose and docetaxel in patients with solid tumors. *J Clin Oncol. 2005 ASCO Annu Meet Proc* 23: 3190.
- Raffaghello L, Lee C, Saffle FM, Wei M, Madia F, Bianchi G et al. (2008). Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci* 105: 8215-8220.
- Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cincilli RM, Thompson CB. (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol* 23: 7315-7328.
- Roshe KW, Braun TW, Hocken SA, Tisdler BA, Frei III E. (1989). Effect of lisdexamfetamine on the cytotoxicity of four alkylating agents *in vitro*. *Cancer Chemother Pharmacol* 25: 32-36.
- Shaw RJ, Kosmanika M, Bardossy N, Hurley RL, Winters LA, DePinho RA et al. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3329-3335.
- Shim H, Chun YS, Lewis BC, Dang CV. (1998). A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1511-1516.
- Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, Tripathi RP, Gupta JP, Mathew TL et al. (2005). Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlentherapie und Onkologie* 181: 507-514.
- Singh SP, Singh S, Jain V. (1990). Effects of 5-bromo-2-deoxyuridine and 2-deoxy-D-glucose on radiation-induced micronuclei in mouse bone marrow. *Int J Radiat Biol* 58: 791-797.
- Suzuki A, Kusaka G, Kishimoto A, Lu J, Ogura T, Esuiri H. (2003). ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation. *Oncogene* 22: 6177-6182.
- Susany RK, Manickam J, Adhikari JS, Dwarakanath BS. (2005). Glycolytic inhibitor, 2-deoxy-D-glucose, does not enhance radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes and splenocytes *in vitro*. *Indian J Exp Biol* 43: 686-692.
- Tasakmit E, Mairuri NC, Gallozzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amadio M et al. (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* 10: 676-687.
- Taylor RC, Cutler SP, Martin SJ. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 231-241.
- Teicher BA, Herman TS, Hocken SA, Epelbaum R, Liu SD, Frei III E. (1991). Lisdexamfetamine as a modulator of alkylating agent activity *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 51: 780-784.
- Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E. (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 10: 267-277.
- Thakkar NS, Potten CS. (1993). Inhibition of doxorubicin-induced apoptosis *in vitro* by 2-deoxy-D-glucose. *Cancer Res* 53: 2057-2060.
- Tomida A, Yun J, Tsuruo T. (1996). Glucose-regulated stresses induce resistance to camptothecin in human cancer cells. *Int J Cancer* 68: 391-396.
- Tong X, Zhao F, Mancuso A, Gruber JJ, Thompson CB. (2009). The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 106: 21660-21665.
- Uysal K, Reza JJ. (2006). Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 4: 107-110.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029-1033.
- Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. (2001). Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 21: 5899-5912.
- Vousden KH, Ryan KM. (2009). p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* 9: 691-700.
- Wang X, Proud CG. (2009). Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. *Trends in Cell Biol* 19: 260-267.
- Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 324: 1076-1080.
- Wood TE, Dullini S, Simpson CD, Hurren R, Mao X, Suiz FS et al. (2008). A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death. *Mol Cancer Ther* 7: 3546-3555.
- Xu R-h, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN et al. (2005). Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 65: 613-621.
- Yamada M, Tomida A, Yun J, Cai B, Yoshikawa H, Taketani Y et al. (1999). Cellular sensitization to cisplatin and carboplatin with decreased removal of platinum-DNA adduct by glucose-regulated stress. *Cancer Chemother Pharmacol* 44: 59-64.
- Yang C, Sulderth J, Dang T, Buchoo RG, McDonald JG, DeBerardinis RJ. (2009). Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res* 69: 7986-7993.
- Yi CH, Sogah DK, Boyce M, Degterev A, Christofferson DE, Yuan J. (2007). A genome-wide RNAi screen reveals multiple regulators of caspase activation. *J Cell Biol* 179: 619-626.
- Youle RJ, Strasser A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47-59.
- Yun J, Tomida A, Nagata K, Tsuruo T. (1995). Glucose-regulated stresses confer resistance to VP-16 in human cancer cells through a decreased expression of DNA topoisomerase II. *Oncol Res* 7: 583-590.
- Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y. (2007). Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 178: 93-105.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-2/XL1. *Cell* 87: 619-628.
- Zhang XD, Deslandes E, Villedieu M, Poulain L, Duval M, Gauduchon P et al. (2006). Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines *in vitro*. *Anticancer Res* 26: 3561-3566.
- Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T et al. (2010). Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327: 1000-1004.
- Zhao Y, Altman BJ, Colloff JJ, Herman CE, Jacobs SR, Wikman HJ et al. (2007). Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize McI-1. *Mol Cell Biol* 27: 4328-4339.
- Zhao Y, Colloff JJ, Ferguson EC, Jacobs SR, Cui K, Rathmell JC. (2008). Glucose metabolism attenuates p53 and Puma-dependent cell death upon growth factor deprivation. *J Biol Chem* 283: 36344-36353. M80.3580200.