

Universitat de Lleida

Senyalització per β -catenina i FAK en el glioblastoma: possibles dianes terapèutiques

Mireia Nàger Grifo

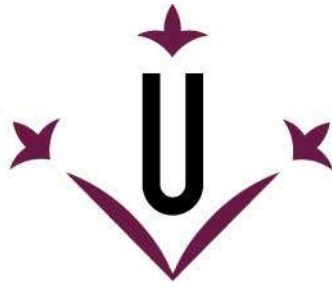
<http://hdl.handle.net/10803/457623>



Senyalització per β -catenina i FAK en el glioblastoma: possibles dianes terapèutiques està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

Les publicacions incloses en la tesi no estan subjectes a aquesta llicència i es mantenen sota les condicions originals.

(c) 2017, Mireia Nàger Grifo



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

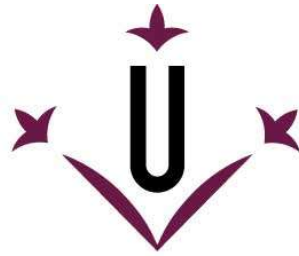
**Senyalització per β -catenina i FAK en el
glioblastoma: possibles dianes terapèutiques**

Mireia Nàger Grifo

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida
Programa de Doctorat en Salut

Director/a
Judit Herreros Danés

2017



Universitat de Lleida

Judit Herreros Danés, Doctora en Ciències Biològiques, investigadora i professora agregada del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida, com a directora de la present tesi,

Faig constar que,

La llicenciada en Biotecnologia per la Universitat de Lleida **Mireia Nàger Grifo**, ha realitzat sota la meva direcció i supervisió dins del grup de Senyalització per calci i diferenciació neuronal del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, el treball experimental titulat “**Senyalització per β -catenina i FAK en Glioblastoma: possibles dianes terapèutiques**”.

El treball reuneix les condicions adients per tal de poder ser defensat davant del Tribunal de Tesi corresponent i, si s'escau, obtenir el grau de **Doctor** per la Universitat de Lleida.

I perquè així consti i als efectes oportuns signo el present document a

Lleida, 26 de abril de 2017

Dra. Judit Herreros Danés

Índex

Contingut

| | |
|--|-----------|
| Resums | 12 |
| Abreviatures | 13 |
| Introducció | 19 |
| 1. Tumors astrocítics | 21 |
| 1.1. <i>Classificació dels tumors astrocítics.....</i> | 23 |
| 1.2. <i>Epidemiologia.....</i> | 27 |
| 1.3. <i>Origen dels gliomes</i> | 28 |
| 1.4. <i>Capacitat invasiva dels gliomes.....</i> | 29 |
| 2. β-catenina | 31 |
| 2.1. <i>Estructura</i> | 31 |
| 2.2. <i>Via Wnt canònica.....</i> | 33 |
| 2.3. <i>β-catenina en el complex d'adhesió</i> | 37 |
| 2.4. <i>La via Wnt/β-catenina en Glioma.....</i> | 39 |
| 2.5. <i>La via Wnt/β-catenina com a diana contra el càncer.....</i> | 41 |
| 3. HGF i c-Met..... | 43 |
| 3.1. <i>Estructura del lligand HGF i del seu receptor.....</i> | 43 |
| 3.2. <i>Via de senyalització</i> | 45 |
| 3.3. <i>La senyalització HGF/c-Met en migració/invasió</i> | 47 |
| Desenvolupament embrionari | 47 |
| Regeneració d'òrgans..... | 48 |
| Transició epiteli-mesènquima (EMT) | 48 |
| 3.4. <i>Implicació d'HGF/c-Met en càncer i en gliomas</i> | 50 |
| 4. La Cinasa d'Adhesió Focal | 51 |
| 4.1. <i>Estructura de FAK</i> | 52 |
| 4.2. <i>Regulació de l'activació de FAK.</i> | 54 |

Índex

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.3. | <i>Funcions de FAK en càncer</i> | 55 |
| 4.4. | <i>La inhibició de FAK com a diana terapèutica</i> | 59 |
| 5. | Autofàgia | 61 |
| 5.1. | <i>Mecanisme autofàgic</i> | 63 |
| 5.2. | <i>Autofàgia selectiva</i> | 66 |
| 5.3. | <i>Regulació de l'autofàgia</i> | 68 |
| | Regulacions post-traduccionals | 68 |
| | Regulació transcripcional | 70 |
| 5.4. | <i>El paper de l'autofàgia en càncer</i> | 72 |
| | El paper dual de l'autofàgia en Càncer | 72 |
| | L'autofàgia com a mecanisme de mort cel·lular | 76 |
| | L'autofàgia en Glioma | 78 |
| 5.5. | <i>Modulació de l'autofàgia en assaigs clínics</i> | 79 |
| | Objectius | 81 |
| | Materials i mètodes | 87 |
| 1. | Tècniques de biologia cel·lular | 89 |
| 1.1. | <i>Línies de glioma</i> | 89 |
| 1.2. | <i>Cultius primaris</i> | 90 |
| 1.3. | <i>Cultiu de la línia cel·lular HEK 293T</i> | 91 |
| 1.4. | <i>Descongelació, manteniment i congelació</i> | 91 |
| 1.5. | <i>Recomptes cel·lulars</i> | 92 |
| 1.6. | <i>Viabilitat cel·lular</i> | 95 |
| 1.7. | <i>Assaigs de migració</i> | 96 |
| 1.8. | <i>Tractaments i drogues utilitzades en aquest treball</i> | 97 |
| 1.9. | <i>Producció de lentivirus i infecció</i> | 98 |
| 1.10. | <i>Transfeccions amb Lipofectamina</i> | 100 |
| 2. | Tècniques de bioquímica i biologia molecular | 102 |
| 2.1. | <i>Construccions plasmídiques per al silenciament gènic</i> | 102 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 2.2. | <i>Amplificació en cadena de la polimerasa</i> | 103 |
| 2.3. | <i>Immunodetecció de proteïnes</i> | 105 |
| 3. | Citometria de Flux | 114 |
| 3.1. | <i>Assaig d'AnnexinaV</i> | 114 |
| 4. | Animals d'experimentació | 114 |
| 4.1. | <i>Consideracions prèvies</i> | 114 |
| 4.2. | <i>Animals i tractaments</i> | 115 |
| 5. | Eines bioinformàtiques | 116 |
| | Resultats | 117 |
| | Capítol 1: β-Catenina nuclear fosforilada en Y142 s'acumula en astrocitomes i glioblastomes i promou invasió cel·lular | 119 |
| 1.1. | <i>Cultius primaris establerts a partir de biòpsies de pacients mostren positivitat pel marcador astrocític GFAP</i> | 121 |
| 1.2. | <i>Diferents formes de β-catenina es localitzen en el nucli en línies cel·lulars de GBMs i en cultius primaris d'astrocitomes i GBMs</i> | 122 |
| 1.3. | <i>Estudi de les diferents formes de β-catenina en homogenats de biòpsies d'astrocitomes i de GBMs</i> | 126 |
| 1.4. | <i>PY142 β-catenina nuclear, Snail/Slug i c-Met es troben presents en biòpsies d'astrocitomes i GBMs</i> | 127 |
| 1.5. | <i>Els factors de transcripció TCF s'acumulen en astrocitomes i GBMs i correlacionen amb PY142-β-catenina, que senyalitza transcripcionalment</i> | 133 |
| 1.6. | <i>HGF regula els nivells de PY142 β-catenina i Snail/Slug en cèl·lules de GBM</i> | 134 |
| 1.7. | <i>Efecte de la inhibició de c-Met sobre la migració i proliferació en cèl·lules de GBM</i> | 137 |
| 1.8. | <i>PY142 β-catenina disminueix l'adhesió cel·lular i promou la migració i invasió de cèl·lules de GBM</i> | 139 |
| | Capítol 2. La inhibició de la via Wnt/β-Catenina sobreregula p62 i sensibilitza les cèl·lules de glioblastoma a la mort cel·lular induïda per bloquejants de l'autofàgia | 143 |
| 2.1. | <i>Els nivells de p62 incrementen en GBM i correlacionen inversament amb β-catenina</i> | 145 |

Índex

| | | |
|---|--|------------|
| 2.2. | <i>La via Wnt/β-catenina, a través de TCF/β-catenina, regula transcripcionalment l'expressió de p62</i> | 147 |
| 2.3. | <i>La inhibició de la senyalització Wnt/β-catenina incrementa el flux autofàgic en GBM</i> | 151 |
| 2.4. | <i>La inhibició de TCF disminueix la senyalització per mTOR i produeix la translocació nuclear de TFEB</i> | 157 |
| 2.5. | <i>La inhibició de TCF disminueix la migració de cèl·lules de GBM</i> | 160 |
| 2.6. | <i>La inhibició de TCF disminueix la proliferació de cèl·lules de GBM</i> | 161 |
| 2.7. | <i>La doble inhibició de TCF i de l'autofàgia promou apoptosi en cèl·lules de GBM mitjançant un mecanisme dependent de caspasa-8 i de p62</i> | 164 |
| 2.8. | <i>El silenciament de TCF4 i l'administració de CQ redueixen el creixement tumoral in vivo</i> | 170 |
| Capítol 3: La inhibició farmacològica de FAK indueix autofàgia i senescència en glioblastoma | | 173 |
| 3.1. | <i>Expressió dels nivells de FAK i de PY397 FAK en línies cel·lulars de GBM i cultius primaris de glioma</i> | 175 |
| 3.2. | <i>La inhibició farmacològica de FAK promou l'autofàgia</i> | 176 |
| 3.3. | <i>La inhibició de FAK promou l'autofàgia a través de la inhibició de mTOR</i> | 180 |
| 3.4. | <i>La inhibició de FAK promou un descens en la viabilitat i la proliferació cel·lulars</i> | 181 |
| 3.5. | <i>La inhibició de FAK redueix la migració cel·lular</i> | 184 |
| 3.6. | <i>La inhibició de FAK produeix un fenotip senescent</i> | 185 |
| Discussió | | 189 |
| 1. | β -Catenina nuclear fosforilada en Y142 s'acumula en astrocitomes i glioblastomes i promou invasió cel·lular | 191 |
| 2. | La inhibició de la via Wnt/ β -catenina sobrerregula p62 i sensibilitza les cèl·lules de glioblastoma a la mort cel·lular induïda per bloquejants de l'autofàgia | 194 |
| 3. | La inhibició farmacològica de FAK indueix autofàgia i senescència en glioblastoma | 201 |
| Conclusions | | 207 |
| Bibliografia | | 211 |
| Annex | | 243 |

Resums

RESUM

L'objecte d'estudi d'aquesta tesi han estat dos elements centrals de vies de senyalització implicades en adhesió cel·lular: β -catenina i la Cinasa d'Adhesió Focal (FAK). La primera és un component de les adhesions adherents, des d'on regula el binomi adhesió/migració cel·lulars. A la vegada, β -catenina és un efector de la via Wnt canònica, que junt amb factors de transcripció LEF/TCF, regula la transcripció de gens diana de Wnt implicats en multitud de processos, des de l'adquisició de destí cel·lular en el desenvolupament embrional, la sinaptogènesi, la proliferació cel·lular, la biologia de les cèl·lules mare i la migració cel·lular, tant en situacions fisiològiques com en la malaltia - molt especialment en càncer. Per la seva banda, FAK situada en les adhesions focals integra els senyals de la matriu extracel·lular amb la regulació del citoesquelet, que controlen la migració, proliferació i supervivència cel·lulars.

El glioblastoma (GBM, grau IV de malignitat segons la OMS) és un tipus de tumor cerebral astrocitari de mal pronòstic, caracteritzat per un creixement ràpid, una elevada migració i invasivitat cel·lular, necrosi i angiogènesi, que infiltra el teixit cerebral, podent reaparèixer en diferents regions. La desregulació de la senyalització per β -catenina (dependent i independent de Wnts) i FAK és coneguda en càncer. En GBM, mentre que la senyalització per β -catenina ha estat estudiada en diferents aspectes, menys treballs han analitzat les implicacions de les vies regulades per FAK en aquest tumor. No obstant, ambdues són vies pro-oncogèniques, quina inhibició ha estat explotada en assaigs clínics en diferents càncers.

L'autofàgia (macroautofàgia) és un procés cel·lular pel qual les cèl·lules degraden orgànuls i proteïnes malmeses, amb el fi d'obtenir nutrients i energia, en condicions d'absència dels mateixos i d'oxigen. Aquestes circumstàncies són freqüents en l'entorn de les cèl·lules tumorals, igual que en l'estrès induït pels quimioteràpics. En aquest sentit, s'ha intentat inhibir l'autofàgia per tal de promoure la mort de les cèl·lules tumorals, amb o sense sinèrgia amb agents terapèutics convencionals.

Resums

En la primera i segona part d'aquesta tesi doctoral hem estudiat la senyalització per β -catenina en el GBM. En la primera, hem investigat les funcions d'una forma fosforilada de β -catenina (PY142 β -catenina), que prèviament havíem demostrat que és fosforilada per c-Met, en la invasivitat del GBM. Utilitzat línies cel·lulars de GBMs, cultius primaris derivats de pacients i biòpsies, hem trobat que la forma PY142 β -catenina s'acumula en el nucli de cèl·lules d'astrocitomas de baix grau i de GBMs, a diferència de β -catenina activa per la via Wnt. A més, hem observat que els nivells de PY142 β -catenina augmenten amb el tractament amb el lligand de c-Met, el Factor de Creixement Hepàtic (HGF). Hem associat PY142 β -catenina amb marcadors pro-migratoris i demostrat que el mutant Y142F de β -catenina altera la capacitat de migració/invasió de cèl·lules de GBM.

En la segona part, partint de la repressió transcripcional de β -catenina/TCF del gen *p62*, un receptor dels autofagosomes, hem utilitzat la inhibició farmacològica i gènica de β -catenina i TCF per investigar les conseqüències d'aquesta inhibició en el procés de l'autofàgia, i en última instància, en la viabilitat cel·lular del GBM. Hem trobat que la inhibició farmacològica i gènica de β -catenina/TCF sobrerregula *p62* i promou el flux autofàgic. D'altra banda, prou la translocació nuclear de TFEB actiu, un regulador de l'autofàgia i la biogènesi lisosomal, a través de la inhibició de mTOR. Mentre que la inhibició de TCF atura la proliferació cel·lular *in vitro* i *in vivo* sense promoure mort i disminueix la migració cel·lular, la inhibició combinada de TCF i de l'autofàgia compromet la viabilitat cel·lular del GBM i condueix a mort cel·lular per un procés que implica la proteòlisi de caspasa-8, de forma dependent de *p62*.

Per últim, en el tercer capítol, hem estudiat la inhibició farmacològica de FAK en GBM. Hem observat que la inhibició de FAK incrementa el flux autofàgic, a través de la inhibició de mTOR i d'AKT, atura la migració i la proliferació cel·lulars i condueix les cèl·lules de GBM a un fenotip senescent.

En resum, els resultats obtinguts demostren que la inhibició de β -catenina seria rellevant per la implicació de PY142 β -catenina en processos de migració/invasió, a la vegada que β -catenina activa per la via Wnt s'ha vist associada amb marcadors proliferatius. D'altra banda, la inhibició de β -catenina/TCF induïx el flux autofàgic i inhibeix la proliferació. És

important que la inhibició dual de β -catenina/TCF i de l'autofàgia promou la mort de les cèl·lules de GBM. Per tant, aquesta doble inhibició podria constituir una nova estratègia terapèutica en el GBM segons estudis de xenotransplants. Per últim, la inhibició de FAK presenta també aspectes terapèutics, donat que atura la proliferació i la migració, i porta les cèl·lules del GBM a senescència. En conjunt, hem demostrat que la inhibició de β -catenina o de FAK atura la proliferació i la migració del GBM, i la inhibició dual explicitada en el capítol segon indueix la mort de cèl·lules de GBM. Teòricament, per tant, la inhibició de les vies aquí estudiades hauria d'afectar el creixement del GBM i dificultar la seva extensió pel teixit cerebral, reduint-ne la recurrència.

Resumen

El objeto de estudio de esta tesis han sido dos elementos centrales de vías de señalización implicadas en adhesión celular: β -catenina y la quinasa de adhesión Focal (FAK). La primera es un componente de las adhesiones adherentes, desde donde regula el binomio adhesión/migración celulares. A la vez, β -catenina es un efector de la vía Wnt canónica, que junto con factores de transcripción LEF/TCF, regula la transcripción de genes diana de Wnt en multitud de procesos, desde la adquisición de destino celular en el desarrollo embrional, la sinaptogénesis, la proliferación celular, la biología de las células madre y la migración celular, tanto en situaciones fisiológicas como en la enfermedad - muy especialmente en cáncer. Por su parte, FAK situada en las adhesiones focales integra las señales de la matriz extracelular con la regulación del citoesqueleto, que controlan la migración, proliferación y supervivencia celulares.

El glioblastoma (GBM, grado IV de malignidad según la OMS) es un tipo de tumor cerebral astrocitario de mal pronóstico, caracterizado por un crecimiento rápido, una elevada migración y invasividad celular, necrosis y angiogénesis, que infiltra el tejido cerebral, pudiendo reaparecer en diferentes regiones. La desregulación de la señalización para β -catenina (dependiente e independiente de Wnts) y FAK es conocida en cáncer. En GBM, mientras que la señalización para β -catenina ha sido estudiada en diferentes aspectos, menos trabajos han analizado las implicaciones de las vías reguladas por FAK en este tumor. No obstante, ambas son vías pro-oncogénicas, qué inhibición ha sido explotada en ensayos clínicos en diferentes cánceres.

La autofagia (macroautofagia) es un proceso celular por el cual las células degradan orgánulos y proteínas dañadas, con el fin de obtener nutrientes y energía, en condiciones de ausencia de los mismos y de oxígeno. Estas circunstancias son frecuentes en el entorno de las células tumorales, al igual que en el estrés inducido por los quimioterapéuticos. En este sentido, se ha intentado inhibir la autofagia para promover la muerte de las células tumorales, con o sin sinergia con agentes terapéuticos convencionales.

En la primera y segunda parte de esta tesis doctoral hemos estudiado la señalización para β -catenina en el GBM. En la primera, hemos investigado las funciones de una forma fosforilada de β -catenina (PY142 β -catenina), que previamente habíamos demostrado

que es fosforilada por c-Met, en la invasividad del GBM. Utilizado líneas celulares de GBMs, cultivos primarios derivados de pacientes y biopsias, hemos encontrado que la forma PY142 β -catenina se acumula en el núcleo de células de astrocitomas de bajo grado y de GBMs, a diferencia de β -catenina activa por la vía Wnt. Además, hemos observado que los niveles de PY142 β -catenina aumentan con el tratamiento con el ligando de c-Met, el factor de crecimiento hepático (HGF). Hemos asociado PY142 β -catenina con marcadores pro-migratorios y demostrado que el mutante Y142F de β -catenina altera la capacidad de migración / invasión de células de GBM.

En la segunda parte, partiendo de la represión transcripcional de β -catenina/TCF del gen *p62*, un receptor de los autofagosomas, hemos utilizado la inhibición farmacológica y génica de β -catenina y TCF para investigar las consecuencias de esta inhibición en el proceso de la autofagia, y en última instancia, en la viabilidad celular del GBM. Hemos encontrado que la inhibición farmacológica y génica de β -catenina/TCF sobrerregula *p62* y promueve el flujo autofágico. Por otra parte, basta la translocación nuclear de TFEB activo, un regulador de la autofagia y la biogénesis lisosomal, a través de la inhibición de mTOR. Mientras que la inhibición de TCF para la proliferación celular in vitro e in vivo sin promover muerte y disminuye la migración celular, la inhibición combinada de TCF y de la autofagia compromete la viabilidad celular del GBM y conduce a muerte celular por un proceso que implica la proteólisis de caspasa-8, de forma dependiente de *p62*.

Por último, en el tercer capítulo, hemos estudiado la inhibición farmacológica de FAK en GBM. Hemos observado que la inhibición de FAK incrementa el flujo autofágico, a través de la inhibición de mTOR y de AKT, para la migración y la proliferación celulares y conduce las células de GBM en un fenotipo senescente.

En resumen, los resultados obtenidos demuestran que la inhibición de β -catenina sería relevante para la implicación de PY142 β -catenina en procesos de migración/invasión, a la vez que β -catenina activa por la vía Wnt se ha visto asociada con marcadores proliferativos. Por otra parte, la inhibición de β -catenina/TCF induce el flujo autofágico e inhibe la proliferación. Es importante resaltar que la inhibición dual de β -catenina/TCF y de la autofagia promueve la muerte de las células de GBM. Por lo tanto, esta doble inhibición podría constituir una nueva estrategia terapéutica en el GBM según estudios

Resums

de xenotransplantes. Por último, la inhibición de FAK presenta también aspectos terapéuticos, dado que detiene la proliferación y la migración, y lleva las células del GBM en senescencia. En conjunto, hemos demostrado que la inhibición de β -catenina o FAK detiene la proliferación y la migración del GBM, y la inhibición dual explicitada en el capítulo segundo induce la muerte de células de GBM. Teóricamente, por tanto, la inhibición de las vías aquí estudiadas debería afectar el crecimiento del GBM y dificultar su extensión por el tejido cerebral, reduciendo la recurrencia.

Summary

The focus of this doctoral thesis has been two central components of cell signaling pathways regulating cell adhesion: β -catenin and Focal Adhesions Kinase (FAK). β -catenin is a component of cell-cell adherent adhesions, from which it regulates cell adhesion/migration. In addition, β -catenin is an effector of canonical Wnt signaling in which β -catenin, together with transcription factors LEF/TCF, regulates the expression of Wnt targets. Thus, Wnt signaling is involved in several cellular processes, from the acquisition cell fate in embryonic development, synaptogenesis, cell proliferation, stem cell biology and cell migration, both in physiological and disease contexts -and especially, in cancer. On the other hand, FAK located in the focal adhesions links the signals from the extracellular matrix with cytoskeleton regulation, therefor controlling cell migration, survival and proliferation.

Glioblastoma (GBM, grade IV malignancy according to WHO) is an astrocytic brain tumor of poor prognosis, characterized by fast growth, high migration and invasion abilities, necrosis and angiogenesis, which easily extends to different cerebral areas, unfortunately leading to recurrence. Deregulation of β -catenin signaling (both dependent and independent of Wnt ligands) and FAK is well known in cancer. In GBM, whilst β -catenin signaling has been extensively studied, the implications of FAK signaling have been less studied. Different clinical trials in distinct tumors have exploited the inhibition of these pro-oncogenic pathways.

Autophagy (macroautophagy) is a cellular process in which cells degrade damaged proteins and organelles, to obtain energy and nutrients in conditions of absence of these and of oxygen deprivation. These conditions are frequent in the tumor environment, and also during cell stress induced by chemotherapy. Thus, autophagy inhibition has been attempted to induce tumor cell death, with or without synergy with conventional therapeutic agents.

On the first and second parts of this thesis we studied β -catenin signaling in GBM. On the first chapter, we investigated the functions of a phosphorylated form of β -catenin (PY142

Resums

β -catenin), which we had previously shown to be phosphorylated by c-Met, in the invasiveness of GBM cells. Using GBM cell lines, primary cultures derived from biopsies and patients samples, we found that PY142 β -catenin accumulates in the nucleus from low grade astrocytomas to GBMs, unlike Wnt-active β -catenin. In addition, we found that the levels of PY142 β -catenin increase upon treatment with the ligand of c-Met, Hepatocyte Growth Factor (HGF). We associated PY142 β -catenin with pro-migratory markers and showed that the mutant Y142F of β -catenin alters the ability of migration/invasion of GBM cells. In the second part, based on the transcriptional repression of β -catenin/TCF of *p62* (a receptor of autophagosomes), we tested the pharmacological inhibition and gene silencing of β -catenin and TCF to investigate its consequences in autophagy and, ultimately, in the viability of GBM cells. We found that this inhibition (pharmacological or genic) induces p62 and increases autophagic flow. Moreover, Wnt signaling inhibition leads to the nuclear translocation of active TFEB, a master regulator of autophagy and lysosomal biogenesis, through mTOR inhibition. Inhibiting TCF/ β -catenin alone reduced GBM cell proliferation *in vitro* and *in vivo* without promoting cell death and also diminished GBM cell migration. In addition, importantly, the combined inhibition of TCF and autophagy affected GBM cell viability, leading to death cell by a process involving the proteolysis of caspase-8 in a p62-dependent manner.

Finally, on the third chapter, we studied the pharmacological inhibition of FAK in GBM cells. We found that FAK inhibition increases the autophagic flux through the inhibition of AKT and mTOR. Furthermore, it blocked GBM cell migration and proliferation and led to a senescent phenotype.

In summary, our results demonstrate that a possible inhibition of β -catenin in GBM could be relevant considering both the involvement of PY142 β -catenin in cell migration/invasion and the association of Wnt-active β -catenin with markers proliferative. Moreover, the inhibition of β -catenin/TCF elevates the autophagic flux and inhibits cell proliferation. It is important that the dual inhibition of β -catenin/TCF and of autophagy promotes GBM cell death. Therefore, this dual inhibition could provide a new therapeutic strategy in GBM, as suggested by xenotransplant studies. Finally, the inhibition of FAK also shows possible therapeutic aspects, as it inhibits the proliferation

and migration of GBM cells and results in cell senescence. Together, we have shown that the inhibition of β -catenin or FAK blocks the proliferation and migration of GBM cells and we have identified a dual inhibition in the second chapter that induces the death of GBM cells. Hence, theoretically, inhibiting these pathways should affect the growth of GBM and impede its spread into the brain tissue, reducing GBM recurrence.

Abreviatures

Abreviatures

| | |
|----------------|---|
| μM | Micromolar |
| ATG | Autophagy related genes |
| Baf | Bafilomicina |
| Caspasa | Cysteine- containing aspartate specific proteases |
| cDNA | Àcid deoxiribonucleic complementari |
| CNS | Sistema nerviós central |
| CQ | Cloroquina |
| CSCs | Cèl·lules mare canceroses |
| DKK | Dickkopf-1 |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle medium |
| DMSO | Dimetil sulfoxide |
| DNA | Acid deoxiribonucleic |
| dNTP | Deoxiribonucleotid |
| DVL | Dishevelled |
| ECM | Matriu extracel·lular |
| EGF | Epidermal growth factor |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| EMEM | Eagle's minimum essential medium |
| EMT | Transició epiteli-mesènquima |
| FAK | Cinasa d'adhesions focals |
| FBS | Sèrum fetal boví |

Abreviatures

| | |
|--------------------------------|---|
| Fz | Frizzled |
| GADPH | Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenases |
| GBM | Glioblastoma |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein |
| GFP | Proteïna fluorescent verda |
| GICs | Cèl·lules mare de glioma |
| GSK-3β | Glycogen synthase Kinase 3 β |
| HGF | Factor de creixement hepàtic |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| HS | Sèrum de cavall |
| ICH | Immunocitoquímica |
| ICQ | Immunocitoquímica |
| IP3 | Inositol triphosphate |
| kDA | Kilo Dalton |
| LC3 | Light chain 3 |
| LFT | Lipofectamina |
| LPR5/6 | Low density lipoprotein-related protein-5/6 |
| MAPK | Mitogen activated protein kinase |
| mRNA | Àcid ribonucleic missatger |
| mTOR | mammalian Target of Rapamycin |
| NEAA | Aminoàcids no essencials |
| Nm | Nanomolar |
| PBS | Buffer fosfat sali |

| | |
|--------------------|--|
| PCP | Planar cell polarity |
| PDGFR | Platelet-derived growth factor receptor |
| PDL | Poli-D lisina |
| PEI | Polyethilenimine |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PI | Iodur de propidi |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate |
| Pygo | Pygopus |
| qRT-PCR | Quantitative real time polymerase chain reaction |
| Rb | Retinoblastoma |
| RNA | Àcid ribonucleic |
| RT | Temperatura ambient |
| RTK | Receptor tirosina cinasa |
| RT-PCR | Reverse Transcriptase polymerase chain reaction |
| SDS | Sodium dodecyl sulphate |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis |
| SH2 | Src homology 2 |
| ShRNA | Short hairpin RNA |
| siRNA | Small interference RNA |
| SQSMT1 | Sequestosome 1 |
| TBST-buffer | Tampo tris sali amb Tween 20 |
| TCF/LEF | T cell factor/Lymphoid Enhancing factor |

Abreviatures

| | |
|--------------------------------|--|
| TFEB | Factor de transcripci3 EB |
| Tween 20 | Polyoxyethylene sorbitan monolaurate |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| WB | Western blot |
| WIF | Wnt inhibitoroty Factor |
| WT | Wild type |
| β-TrCP | β -trasducin repeat-containing protein |

Introducció

1. Tumors astrocítics

El *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* defineix el càncer com una malaltia on les cèl·lules normals del nostre organisme es tornen malignes, començant a dividir-se d'una forma descontrolada, envaint el teixit que les envolta i migrant mitjançant el sistema sanguini o limfàtic fins a altres parts del organisme.

Hanahan and Weinberg van descriure l'any 2006 les característiques bàsiques que presenta un tumor: senyalització sostinguda per proliferar, la capacitat d'ignorar les senyals dels supressors tumorals, resistència a la inducció de la mort cel·lular, immortalitat replicativa, capacitat angiogènica i capacitat per envair i/o metastatitzar (D Hanahan and Weinberg 2000). A aquestes sis característiques, l'any 2011 se'ls hi van afegir quatre més: reprogramació del metabolisme energètic, competència per enganyar el sistema immune, inestabilitat genòmica i capacitat del tumor per induir inflamació (Fig. 1) (Douglas Hanahan and Weinberg 2011).

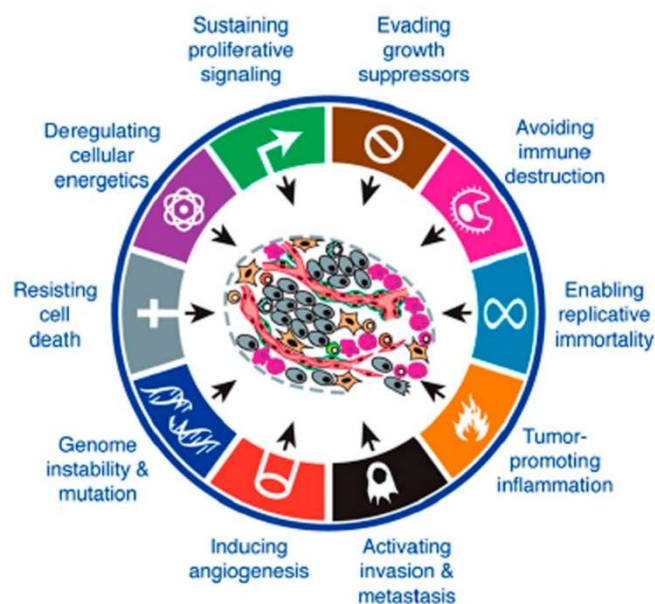


Figura 1: Les 10 característiques típiques que presenta un tumor. Adaptat de Douglas Hanahan and Weinberg 2011.

Introducció

Els tumors que es desenvolupen a partir del sistema nerviós són considerats tumors cerebrals i es poden classificar en primaris quan s'originen en el propi sistema nerviós, o bé, ser metàstasis d'altres tipus que envaeixen algun dels òrgans del sistema nerviós (tumors secundaris). Els tumors cerebrals poden produir danys directament perquè el seu creixement pressiona zones del cervell fent que aquestes no funcionin correctament, o bé, per la destrucció de cèl·lules cerebrals normals.

En els vertebrats, el tub neural embrional o neuroectoderma dóna lloc a la major part dels tipus cel·lulars del sistema nerviós central (CNS), incloent neurones, astròcits i oligodendròcits. Durant el desenvolupament embrionari, la cresta neural, derivada del llavi dorsal del tub neural, i les seves cèl·lules migren donant lloc a diversos teixits, incloent el sistema nerviós perifèric (PNS) (Zhu and Parada 2002).

Els tumors de la neuroectoderma o tumors neurològics inclouen totes aquelles neoplàsies derivades de cèl·lules del CNS i PNS. La classificació clàssica dels tumors neurològics es fa en base al tipus cel·lular que predomina en ells. Un cop finalitzat el desenvolupament, les neurones es tornen post-mitòtiques mentre que les cèl·lules de la glia retenen la capacitat de proliferar. És per aquesta raó, que la major part de tumors neurològics es consideren d'origen glial. Aquest tumors s'anomenen gliomes, i són classificats depenent del tipus cel·lular al que es semblen: astròcits (astrocitomes), oligodendròcits (oligodendrogliomes) i ependimòcits (ependimomes).

Els Gliomes són tumors que causen una alta mortalitat i morbiditat com a conseqüència de la seva localització, sent molt agressius i resistents a la radioteràpia i quimioteràpia (Zhu and Parada 2002; Weller et al. 2015). Presenten una gran capacitat de infiltrar-se als teixit que els envolta, inclús els gliomes de baix grau, fent difícil la seva resecció quirúrgica completa. Altrament, els gliomes no metastatitzen fora del cervell. Els gliomes representen un 30% de tots els tumors cerebrals, i un 80% de les neoplàsies cerebrals malignes. Malgrat tots els avenços, la supervivència dels pacients als 5 anys de detectar-se el tumor és de tan sols un 5% (J. Chen, McKay, and Parada 2012) i la de la majoria no supera els 14 mesos.

1.1. Classificació dels tumors astrocítics.

Històricament la Organització Mundial de la Salut (OMS) ha classificat els astrocitomes en base a la presència d'aspectes anaplàstics en diferents graus de malignitat (grau I-IV) determinat per criteris histopatològics (Fig. 2) (Kleihues et al. 2002; Louis et al. 2007).

Els **astrocitomes pilocítics** (Grau I) són tumors que afecten principalment a nens i joves, són tumors benignes amb un creixement lent i circumscribit i que poden ser eliminats amb una simple resecció quirúrgica. Solen aparèixer en el neuroeix, nervi òptic, hipotàlem, tàlem i hemisferis cerebrals. Representen un 10 % dels tumors astrocítics i un 85 % dels tumors cerebel·losos.

Els **astrocitomes difusos (grau II)** són tumors amb una malignitat baixa i amb una progressió clínica llarga. Presenten una taxa de proliferació baixa però amb una capacitat infiltrant en el teixit que els envolta, per la qual cosa la seva resecció quirúrgica completa resulta complexa. Els astrocitomes de grau II estan caracteritzats per atípia nuclear ocasional i activitat mitòtica no visible. Representen un 35% dels tumors astrocítics, afectant principalment a adults joves i amb una tendència a evolucionar cap a tumors d'alt grau. Solen localitzar en qualsevol zona del CNS amb una supervivència mitjana dels pacients de 5 a 15 anys.

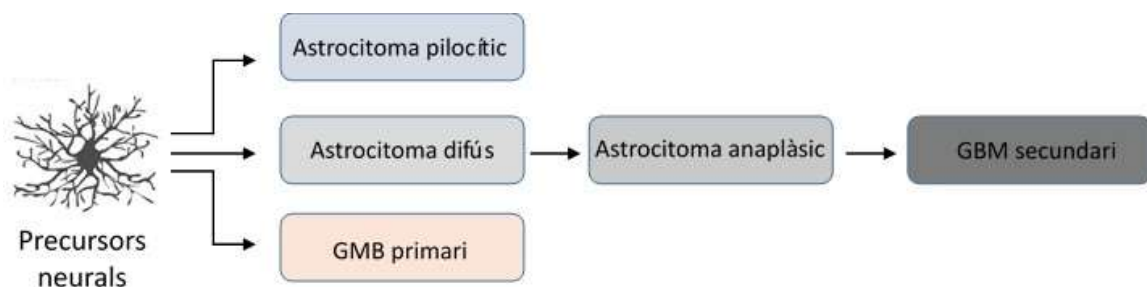


Figura 2: Classificació histopatològica clàssica dels gliomes.

Els **astrocitomes anaplàsics (grau III)** són considerats tumors malignes amb una taxa de proliferació alta. Presenten característiques anaplàsiques, en concret taxa de cel·lularitat alta, pleomorfisme cel·lular, atípia nuclear incrementada i una activitat mitòtica ràpida. Aquests tumors solen presentar-se als dos hemisferis i la supervivència dels pacients és molt baixa (inferior als tres anys).

Introducció

Finalment el **glioblastoma multiforme (GBM; grau IV)** és el tumor cerebral amb pitjor pronòstic i el més maligne. Comparteix amb els astrocitomes anaplàsics altes taxes de proliferació i capacitat d'invasió alta, però, a més a més, aquests presenten processos angiogènics i necròtics. Les zones necròtiques sovint es troben envoltades de cèl·lules tumorals en conformació pseudoempalissada. Solen ser molt resistents a la quimioteràpia i radioteràpia i supervivència del pacient no sol superar l'any. Dintre dels GBM podem trobar els primaris que apareixen "de novo" sense cap tipus de lesió prèvia i els GBM secundaris, que evolucionen des de tumors de baix grau. Els primaris representen un 90% dels GBM i afecten a gent adulta (> 45 anys), mentre els secundaris solen afectar a pacients més joves, inclòs adolescents i nens. Aproximadament un 70% dels astrocitomes de baix grau evolucionaran cap a GBM secundaris. Encara que a nivell histopatològic són indistingibles, presenten un perfil genètic i molecular molt diferent (Louis et al. 2007) (corresponen al tipus IDH, Fig. 3).

En els últims anys s'han produït molts progressos per tal d'entendre la patogènesis molecular dels gliomes. Aquest avanços han provocat millores en el diagnòstic dels pacients i en una nova classificació basada en els perfils genètics d'aquests, la qual complementa la classificació histopatològica tradicional (Sturm et al. 2016). La importància d'una nova classificació radica en el fet de poder realitzar un tractament personalitzat per a cada perfil genètic més efectiu i que repercutirà en la supervivència dels pacients (Verhaak et al. 2010). A més a més, tots aquests avanços han permès la identificació de noves dianes, que poden conduir a noves estratègies terapèutiques individualitzades, les quals han de permetre una millora en el tractament als pacients (Fig. 3) (Weller et al. 2015). Una primera classificació (Verhaak, H et al. 2010) va identificar quatre grans classes de GBM: proneural, neural, clàssic i mesènquimal, basat en les mutacions i en nombre de còpies de EFGR, NF1 i PDGFRA/IDH, que permetria dividir-lo en clàssic, mesènquimal i proneural respectivament. El tipus neural va ser definit en base a la presència dels marcadors neurals *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* i *SLC12A5*. La nova i provisional classificació basada en el perfil genètic dels pacients es pot dividir en (Sturm et al. 2012):

H3F3 K27 (proneural). Es troba mutat el gen que codifica per la histona H3F3, concretament una substitució en l'aminoàcid K27. Es tracta d'un GBM pediàtric que sol aparèixer en forma de tumors talàmics i pontins, amb un pronòstic molt baix.

H3F3 G34 (mesclat). Tanmateix com en el grup anterior es troba mutat el gen que codifica per la histona H3F3, però aquest cop en l'aminoàcid G34. Són també GBM pediàtrics que afecten principalment als hemisferis cerebrals. La seva principal característica és que presenten un patró de hipometilació de molts gens.

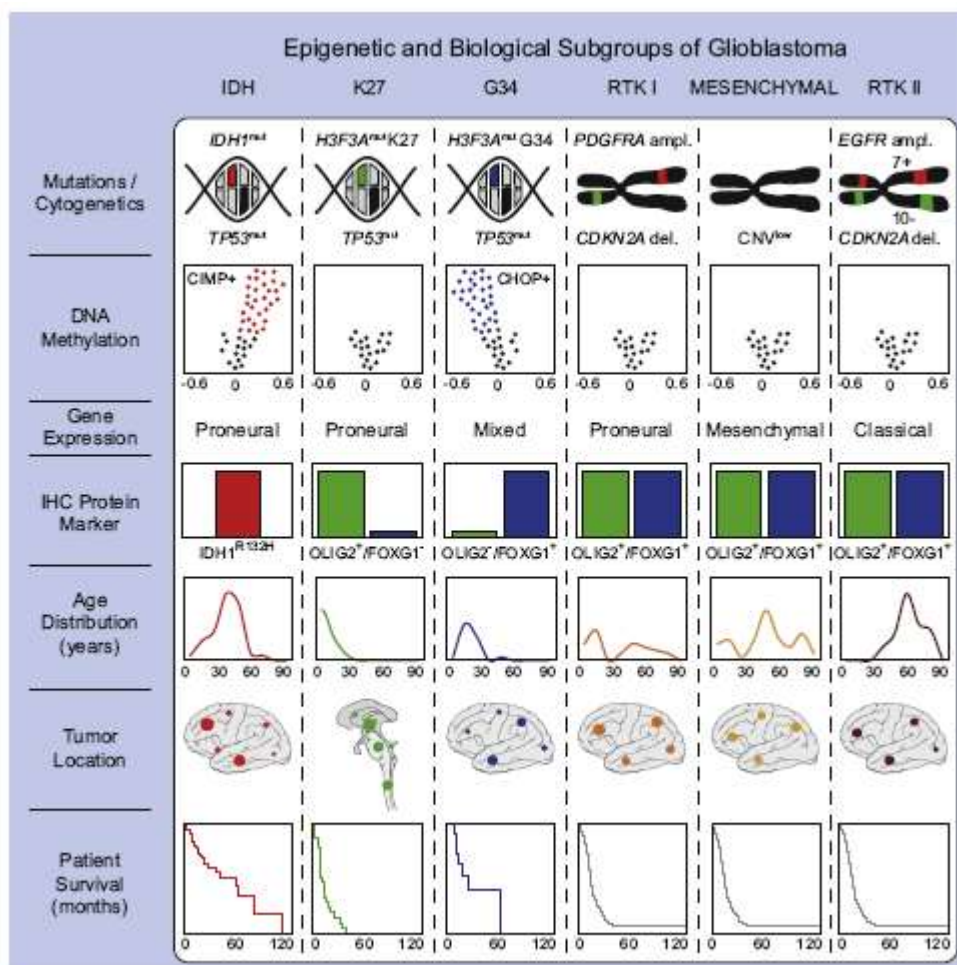


Figura 3: Classificació dels astrocitomes basada en els perfils genètic i epigenètics. Resum gràfic de les característiques moleculars i biològiques claus dels sis subgrups de GBM (Sturm et al. 2016).

Introducció

IDH mutant (proneural). En aquest tipus de tumors trobem mutada la proteïna IDH1 (*Isocitrate Deshidrogenasa 1*). Aquesta mutació comporta la producció de menys α -cetoglutarat i NADPH que resulta en estrès oxidatiu i un patró de hipermetilacions generalitzat. D'altra banda, les mutacions i la pèrdua d'un al·lel de p53 són també molt freqüents en aquest subtipus (Verhaak et al. 2010). Els astrocitomes de baix grau (astrocitoma difús i anaplàstic) i els GBM secundaris que evolucionen a partir d'ells pertanyen tots a aquest grup.

RTK I (Proneural). Presenten amplificacions de la regió que codifica per PDGFRA (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha*) en el cromosoma 4 i freqüentment mutacions puntuals. L'amplificació del cromosoma 7 i la deleció del 10 (amb regions que codifiquen per EGFR -*Epidermal Growth Factor*- i PTEN -*Phosphatase and Tensin Homolog*) respectivament també són típiques d'aquest grup. D'aquest grup formen part els GBM secundaris (J. Chen, McKay, and Parada 2012).

Mesenquimal. Presenten deleció en homozigosis de la regió del cromosoma 17 que codifica per NF1 (Neurofibromatosis tipus I); per tant, presenten una baixa expressió de NF1. A més a més, solen presentar expressió dels gens mesenquimals c-Met i CHI3L1 (Verhaak et al. 2010).

RTK II (clàssic). Caracteritzats per una amplificació en el cromosoma 7 (que codifica per EGFR) i una deleció en el 10 (codificant per PTEN). Tant mateix, és freqüent trobar mutat el receptor EGFR, i associat a aquest una manca de p53. Finalment sol haver-hi deleció en homozigosis d'una regió del cromosoma 9 que codifica per CDKN2A (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*) (Verhaak et al. 2010).

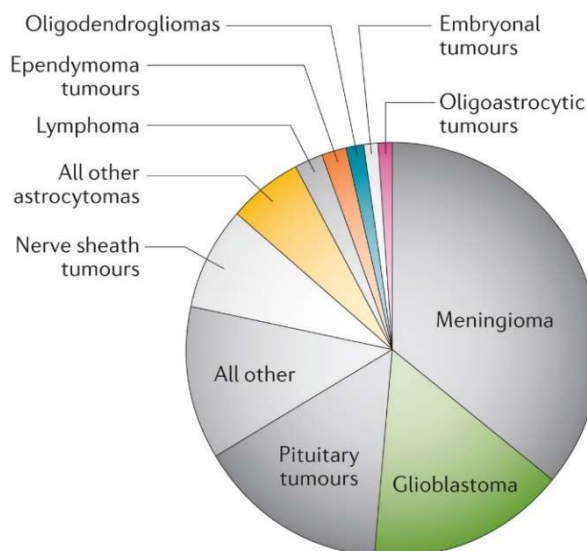
El tractament estàndard que reben els pacients amb GBM consisteix en la resecció quirúrgica completa (encara que resulta pràcticament impossible per l'alta capacitat infiltrant), seguit de radioteràpia i quimioteràpia. La quimioteràpia que se'ls administra és l'agent alquilant TMZ que produeix dany al DNA. El tractament amb quimioteràpia i radioteràpia en tots els grups augmenta la seva supervivència (almenys en uns mesos), l'únic on el tractament no suposa cap tipus d'avantatge, ni augment en la supervivència és en el tipus proneural (Verhaak et al. 2010). Altres aspectes importants a considerar són

la presència de recurrències en tots els grups, possiblement degut a la alta capacitat infiltrant del tumor, però és important tenir en compte que la recurrència i el primari sempre pertanyen al mateix grup, malgrat canvis moleculars importants (Verhaak et al. 2010).

Finalment, també cal tenir present en relació al tractament dels pacients la metilació del promotor de O-6-methylguanine-DNA methyltransferasa (MGMT), que pot presentar-se en tots els tipus de tumors. Es tracta d'un enzim capaç de reparar el dany al DNA que produeixen els agent alquilants, com pot ser la temozolomida (TMZ; quimioteràpic que reben els pacients de GBM). D'aquesta manera els tumors que tinguin aquest gen silenciats seran sensibles a TMZ, ja que no podran reparar el dany al DNA que produeix la TMZ i per tant, aquests pacients presenten una millor resposta al tractament, i consegüentment un millor pronòstic (Hegi et al. 2005; Weller et al. 2015).

1.2. Epidemiologia

La incidència anual dels tumors cerebrals en Estats Units entre 2007 i 2011 va ser de 21,4 per cada 100.000 persones, dels quals 6,6 van ser gliomes, i la meitat d'aquests GBM. La



incidència (per cada 100.000) de la resta de gliomes es relativament baixa 0,34 per l'astrocitoma pilocític, 0,55 per al astrocitoma difús i 0,37 per al astrocitoma anaplàsic (Fig. 4). La incidència augmenta amb l'edat, sent per al GBM 0,15 en xiquets, 0,41 en joves, 13,1 entre 65 i 75 anys i 15 en persones entre 75 i 85 anys (Ostrom et al. 2015; Weller et al. 2015).

Figura 4: Freqüència relativa dels tumors cerebrals i del Sistema Nerviós (Modificat de Ostrom et al. 2015)

A Espanya, segons dades de la Associació Espanyola Contra el Càncer (AECC) la

Introducció

incidència dels tumors cerebrals és de 8,73 per cada 100.000 individus en homes i 5,41 en dones.

No hi ha dades concloents que facin sospitar que pugui haver augmentat la incidència dels tumors cerebrals en les últimes dècades. S'han estudiat diversos factors de risc ambientals que poden fer augmentar la incidència, però sols la radiació ionitzant utilitzada per tractar tumors cerebrals en infants ha sigut reconeguda com a factor de risc. Alguns gliomes s'associen a síndromes familiars rars com la Neurofibromatosis, Síndrome de Li-Fraumeni o de Turcot (Ohgaki, Kim, and Steinbach 2010; Weller et al. 2015)

1.3. Origen dels gliomes

Abans del descobriment de les cèl·lules mare adultes, es creia que els astròcits eren el tipus cel·lular responsable de donar lloc als gliomes (astrocitomes). S'entenia que aquestes cèl·lules sofrien un procés de transformació maligna, donant lloc a cèl·lules poc diferenciades amb capacitat per mimetitzar les propietats de les cèl·lules progenitores i donar lloc a cèl·lules gials immadures. Aquesta teoria es reforçava amb el fet de que és possible reprogramar *in vitro* una cèl·lula diferenciada perquè després doni lloc a diferents tipus neurals (J. Chen, McKay, and Parada 2012).

El descobriment de les cèl·lules mare neurals (NSC) en cervell postnatal va obrir la porta a una nova teoria sobre l'origen dels gliomes. La capacitat d'autorenovació de les NSC faria que aquestes fossin més susceptibles a acumular mutacions i a desenvolupar tumors.

L'associació americana d'investigació en càncer, defineix les cèl·lules mare canceroses (CSCs) com una subpoblació de cèl·lules del tumor amb capacitat d'autorenovació, que pot donar lloc una població heterogènia de cèl·lules canceroses que conformen el tumor (J. Chen, McKay, and Parada 2012). En el cas dels gliomes, aquestes cèl·lules presenten capacitat d'autorenovació persistent que tenen el potencial de poder donar lloc a cèl·lules diferenciades de diferents llinatges (glial i neuronal) i amb la capacitat de formar un nou tumor quan es transplanten en models animals (Morokoff et al. 2015). De fet en uns dels primer articles publicats sobre GSC (cèl·lules mare de glioma), Singh et al. (2004) va

descriure la capacitat de 100 cèl·lules GSCs per produir un nou tumor en ratolins, mentre que 1.000.000 de no GSCs no eren capaces de reproduir el tumor (Singh et al. 2004).

La relació entre les GSCs i els diferents subtipus moleculars descrits (Sturm et al. 2012; Verhaak et al. 2010) no ha estat ben caracteritzada, però en base a les seves característiques moleculars es poden dividir en dos tipus: tipus I (Proneural) són les que més s'assemblen a les NSC fetals, sent positives pels marcadors CD133 i CD15 i amb capacitat per formar neuroesferes en flotació. Per contra, el tipus II (mesenquimal) són més semblants a les NSC adultes, expressen CD44 però són negatives per CD133, presentant un comportament més invasiu i amb un creixement de les neuroesferes en adhesió (Morokoff et al. 2015).

Degut a que aquestes cèl·lules són les encarregades de la propagació i manteniment del tumor, sembla lògic pensar que serien una bona diana terapèutica per al tractament dels gliomes. A més a més, s'ha descrit que les GSC, i en general les CSC, tenen alta capacitat de invasió i serien les cèl·lules que donarien lloc a la dispersió en un altra zona del cervell i per tant, les responsables de les recurrències. Per últim, Bleau et al. 2009 descriu que les GSC expressen nivells elevats de transportadors amb capacitat per exportar quimioteràpics com la TMZ fora d'elles com a mecanisme de resistència (J. Chen, McKay, and Parada 2012; Stiles and Rowitch 2008).

1.4. Capacitat invasiva dels gliomes

Els gliomes tenen una alta capacitat de infiltrar el teixit que els envolta, aquest fet dificulta la completa resecció quirúrgica del tumor, apareixent les recurrències al voltant de la zona reseccionada o a pocs centímetres (Louis et al. 2007; Paw et al. 2015) però també en regions distants o a l'altre hemisferi. Aquesta capacitat es present ja en tumors de baix grau, sent per tant una característica adquirida en les primers etapes de la transformació oncogènica (Louis et al. 2007).

La major part dels tumors presenten capacitat de metastatitzar mitjançant el sistema circulatori o dels vasos limfàtics, però en el cas del gliomes no metastatitzen fora del

Introducció

cervell i utilitzen en canvi els espais extracel·lulars per envair altres regions del cervell. Concretament, utilitzen l'espai perivascular que hi ha al voltant dels vasos sanguinis o bé, mitjançant els espais que hi ha entre les neurones i les cèl·lules glials que componen la parènquima i la matèria blanca, havent-se descrit que puguin migrar utilitzant com a guia axons o tractes nerviosos (Demuth and Berens 2004). Per tal d'envair aquestes zones, es produeixen canvis en les cèl·lules del glioma: augment de la mobilitat, habilitat de degradar la matriu extracel·lular (ECM) i un fenotip de cèl·lules mare.

Diversos estudis demostren que els tumors són capaços de influenciar les cèl·lules de la estroma que tenen al voltant, produint un canvi en l'organització i la composició de la ECM, afavorint així el creixement tumoral i la invasivitat (Furnari et al. 2007).

A més de la capacitat de migrar, les cèl·lules de glioma han de ser capaces de traspasar la barrera física que representa la ECM. Per fer-ho, han de degradar les proteïnes de la ECM i crear una via de invasió. Per tant, molts estudis recalquen la importància de les metaloproteinases de matriu (MMPs) en la degradació de l'ECM. En molts càncers, incloent els gliomes, és freqüent trobar una sobreexpressió de les MMPs, i no és sorprenent que moltes de les vies que regulin invasió regulin també la expressió de MMPs. Una de les vies implicades en aquesta regulació és la via Wnt/ β -catenina (Paw et al. 2015).

2. β -catenina

2.1. Estructura

β -catenina és una proteïna citoplasmàtica i conservada evolutivament que controla multitud de processos. Principalment participa en dues funcions, d'una banda intervé en la via Wnt canònica, important en el desenvolupament i d'altra banda forma part del complex de les unions adherents, interaccionant amb cadherines (Valenta, Hausmann, and Basler 2012). Una desregulació de β -catenina o de components de la via Wnt canònica pot conduir a diverses patologies, entre les que trobem el càncer o malalties metabòliques (Clevers and Nusse 2012).

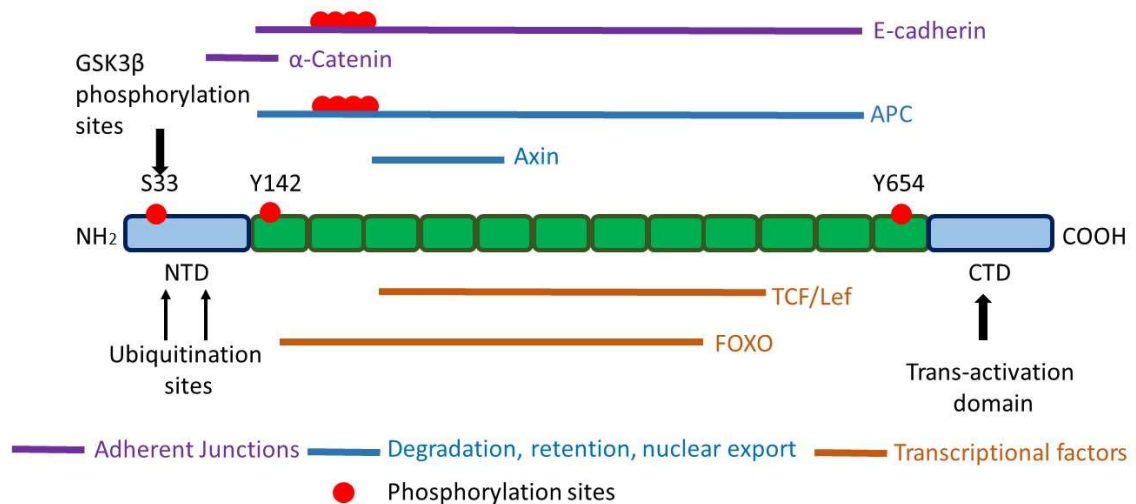


Figura 5. β -catenina funciona com a plataforma d'interacció amb moltes proteïnes presents en les unions adherents, en el citoplasma i en el nucli. β -catenina està composta per una regió central amb 12 repeticions armadillo (caixes verdes), rodejada d'una regió N-terminal (NTD) i d'una C-terminal (CTD). Les barres indiquen el llocs d'unió entre β -catenina i altres proteïnes. Lila, unions adherents; blau, degradació, retenció i export nuclear; marró, factors de transcripció. Cercles roigs, llocs de fosforilació. (Adaptat de Valenta, Hausmann, and Basler 2012).

El fet de que una mateixa proteïna pugui controlar tantes funcions radica en la seva estructura i en el fet de que diferents proteïnes es pugin unir a ella en diferents temps i llocs per tal de regular diferents cascades de senyalització d'una manera específica.

Introducció

β -catenina és una proteïna de 92 kDa formada per una regió central (residus 141-664) que conté 12 repeticions d'un domini "armadillo". Rodejant aquesta part trobem un domini N-terminal (NTD) i un altre de C-terminal (CTD). Les regions NTD i CTD són relativament flexibles, mentre el domini armadillo és bastant rígid. Aquest domini és el que servirà com a plataforma d'interacció per altres proteïnes (Fig. 5). Moltes d'aquestes proteïnes comparteixen llocs d'unió amb β -catenina, pel què no es poden unir totes alhora, i en relació a com β -catenina desenvolupa funcions tan diverses. Principalment, mitjançant l'exclusió en la interacció de tres proteïnes que desenvolupen funcions diferents: E-cadherina, Adenomatous Polyposis Coli C (APC) i els factors de transcripció TCF/LEF (T-cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor) (Huber and Weis 2001). Un altre punt important de regulació de β -catenina són les regions terminals; al ser més flexibles poden canviar la seva conformació afectant la capacitat d'unió de proteïnes al domini armadillo. Curiosament, la CTD és essencial per a la senyalització de la via Wnt, mentre que sembla prescindible per la funció en adhesió, mostrant per tant una separació de funcions (Valenta, Hausmann, and Basler 2012).

Tal i com hem dit amb anterioritat, una de les funcions principals de β -catenina és com a component i efector de la via Wnt canònica, on juga un paper central. Els factors Wnt són una família conservada de molècules secretades. Des del seu descobriment com a via oncogènica en models murins de càncer de pit l'any 1982 (Nusse and Varmus 1982), la via Wnt s'ha descobert com una via crítica de regulació per a les interaccions cèl·lula-cèl·lula, decisions de destí cel·lular durant el desenvolupament i migració cel·lular, entre d'altres processos. En el sistema nerviós està implicada en la formació de sinapsis i de circuits neuronals i desregulada en malalties neurodegeneratives i psiquiàtriques (Moon et al. 2004). Conseqüentment, mutacions en components de la via Wnt produeixen defectes en el desenvolupament, mentre que sovint la seva sobreexpressió dona lloc a càncer. En aquest sentit, cal remarcar que també és una via clau en el manteniment de la pluripotencialitat de cèl·lules mare i en regulació de proliferació i diferenciació (Valenta, Hausmann, and Basler 2012).

La via Wnt pot senyalitzar a través de tres branques: la via canònica, la via de polaritat plana (PCP) i la via Wnt/calci (Ciani and Salinas 2005). Diverses evidències senyalen que

les tres vies s'activen diferencialment depenent del lligand Wnt que les activi (Ciani and Salinas 2005). En el nostre treball ens centrarem en la via Wnt canònica, ja que és aquesta en la que la β -catenina exerceix la seva funció.

2.2. Via Wnt canònica

Els factors Wnt són una família altament conservada al llarg de l'evolució de molècules de senyalització secretades. Són proteïnes d'uns 350-500 aminoàcids, amb un gran nombre de residus cisteïna i que contenen una senyal de secreció en l'extrem N-terminal. Els factors Wnt sofreixen modificacions lipídiques necessàries per una eficient senyalització i per a ser secretades (MacDonald, Tamai, and He 2009) com ara la palmitolació (Cadigan 2008). Els Wnts que intervenen en la via canònica són clàssicament Wnt1, Wnt3a, Wnt3, Wnt8 i Wnt 10.

Quan la via es troba activa les proteïnes Wnt s'uneixen a un receptor heterodímer format per un receptor Frizzled (Fz) i un LRP5/6 (LDL receptor-Related Proteins 5/6). Els receptors Fz són una família de receptors amb 7 regions transmembrana i amb un domini N-terminal extracel·lular enriquit en residus cisteïna, mentre que els LRP5/6 són molècules d'un únic pas transmembrana (Clevers and Nusse 2012). La unió del factor Wnt al heterodímer FZ-LRP5/6 produeix l'inici d'un conjunt de successos que conduiran a la inhibició del complex de degradació de β -catenina.

Introducció

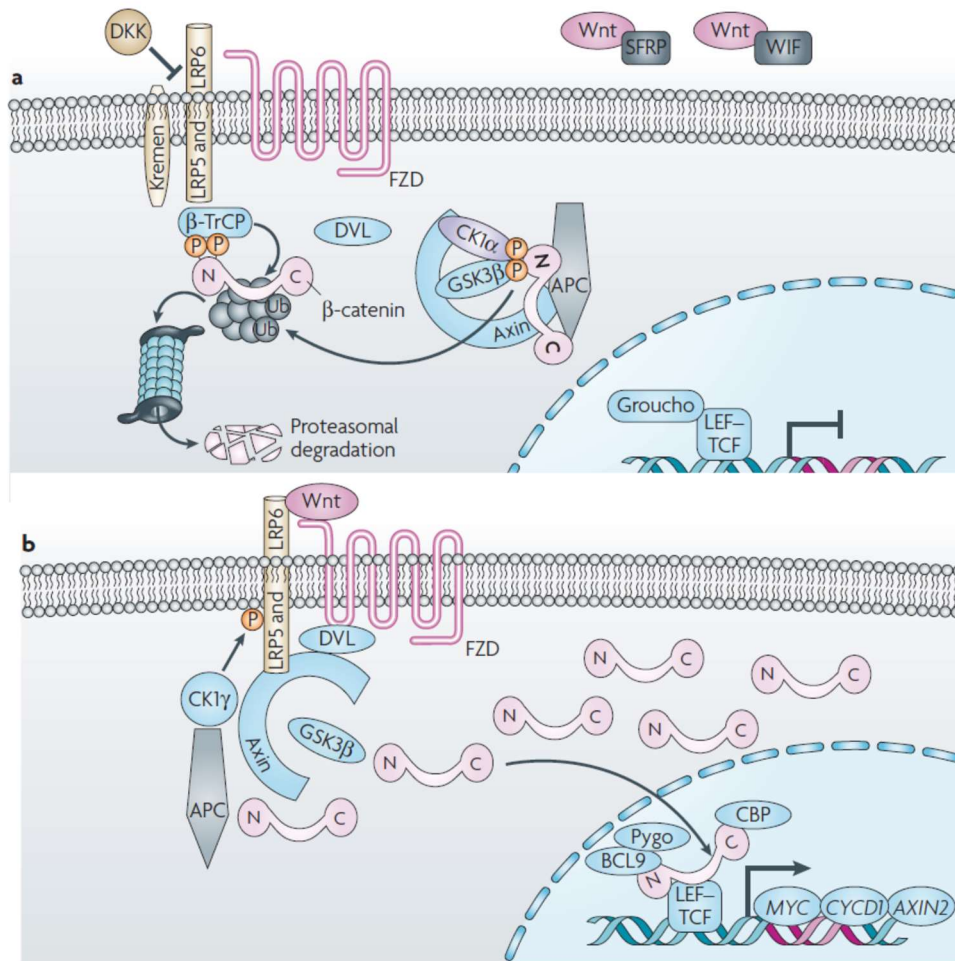


Figura 6. La via Wnt canònica. (A) En absència de factors Wnt, β -catenina és fosforilada per CK1 α i GSK3 β en el complex de destrucció (on també s'hi troba APC i axina) i marcada per degradació pel proteosoma provocant la inactivació de la via. DKK, SFRP i WIF són antagonistes fisiològics de Wnt, que actuen directament sobre el receptor LRP5/6 (DKK) o segresten factors Wnt (SFRP i WIF) (B) En presència de factors Wnt, el complex de degradació està inactiu i β -catenina s'acumula. L'acumulació de β -catenina en el citoplasma produeix la seva translocació a nucli on actua com a co-factor transcripcional juntament amb factors de transcripció LEF/TCF, regulant l'expressió de gens diana, entre els quals Myc, CycD1 i Axin2 (Klaus and Birchmeier 2008).

L'activació de Fz i de LPR5/6 produeix el reclutament de la proteïna citoplasmàtica *Dishevelled* (Dvl), formant un gran complex anomenat "*Wnt signalosoma*". Aquest gran complex interacciona amb el complex de degradació de β -catenina (format per Axina, *Glycogen Kinase Synthase*-GSK3, *Casein Kinase 1*-CK1 i la proteïna citoplasmàtica APC) produint el seu segrest i, conseqüentment, la seva inactivació. A la seva vegada, les cinases GSK3 i CK1 fosforilen els receptors LPR5/6, produint un canvi conformacional i fent que sigui més estable la inhibició del complex de degradació. Amb la inhibició del complex de degradació, β -catenina s'acumula a citoplasma i transloca a nucli on regula l'expressió de gens diana. La β -catenina en el nucli actua com a cofactor transcripcional de factors de transcripció TCF/LEF, desplaçant els repressor Groucho i interaccionant amb altres co-activadors com Bcl-9, Pygopus, CBP (*CREB-binding protein*) o Hyrax (Ciani and Salinas 2005). TCF i LEF tenen una capacitat limitada per activar la transcripció, i en absència de factors Wnt i per tant de β -catenina nuclear, actuen com a repressors transcripcionals (Fig. 6B)

En absència de factors Wnt, els nivells de β -catenina estan controlats mitjançant la seva degradació. És el complex de degradació actiu qui s'encarrega de fosforilar β -catenina i marcar-la per degradació. La proteïna Axina utilitza diferents llocs de unió a β -catenina que GSK3 i CK1. La fosforilació coordinada de diferents residus de β -catenina comença primer en Ser45 per CK1 i després en les Ser33/37 per GSK3. La fosforilació en Ser33/37 crea un lloc de unió per la lligasa E3 (β -TRCP), produint la ubiquïtinització i degradació de β -catenina en el proteosoma. D'aquesta manera la via Wnt canònica roman inactiva (Fig. 6A).

La via Wnt/ β -catenina canònica està altament regulada a diversos nivells, mitjançant fosforilacions de diferents components de la via (per exemple de GSK3 β), però també mitjançant antagonistes secretats dels lligands Wnt. Entre aquests últims trobem les proteïnes secretades relacionades amb els Fz (sFRPs, que interaccionen amb Wnts a través d'un domini ric en Cys) i proteïnes inhibidores de Wnt (WIF). Ambdós antagonistes poden unir-se als factors Wnt, inhibint d'aquesta manera la interacció entre Wnt i els seus receptors. Altres inhibidors de la via Wnt canònica, inclouen les proteïnes Dickkopf (DKK)

Introducció

i de la família WISE/SOST, els quals antagonitzen mitjançant la seva unió als receptors LPR5/6, impedit la formació del complex Fz/LPR induïda pels factors Wnt (Fig. 6a) (Clevers and Nusse 2012).

TCF

La família de factors de transcripció TCF és la millor caracteritzada com a reguladors de l'expressió dels gens diana de la via Wnt/ β -catenina. Els factors TCFs pertanyen a un grup de factors d'unió al DNA d'alta motilitat (HMG) i que s'uneixen a una seqüència consens del DNA CCTTTGWW (W es refereix a T o A) anomenada "*Wnt responsible element*" (Wre) (Fig. 7) (Cadigan 2012; MacDonald, Tamai, and He 2009). El repressor Groucho (TLE1 en humans) unit a TCF reprimeix l'expressió de gens diana, promovent la desacetilació de les histones i per tant, la compactació de la cromatina. L'estabilització de β -catenina i la seva translocació a nucli, permet la formació del complex β -catenina/TCF, desplaçant el repressor Groucho/TLE i reclutant altres co-activadors per tal d'induir l'expressió de gens diana de la via (Clevers and Nusse 2012). En humans trobem 4 factors TCF: TCF1 (TCF7), LEF1, TCF3 (TCF7L1) i TCF4 (TCF7L2).

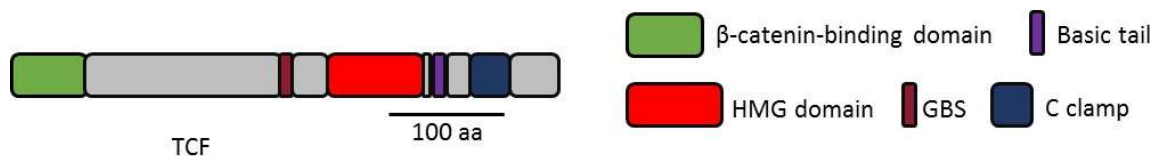


Figura 7. Estructura de TCF. Esquema dels dominis dels factors de la família de TCF, on es mostra la localització dels 5 dominis conservats. Regió N-terminal d'unió a β -catenina, seqüència d'unió a Groucho (GRS), grup d'alta mobilitat (HMG) seguit de la senyal de localització nuclear (basic tail), i el domini C Clamp. Adaptat de Cadigan and Waterman 2012

Cadascun d'aquests TCFs té funcions diferents i s'expressen diferencialment dependentment del teixit, però de manera general podem dir que: TCF1 i TCF4 actuen els dos com a repressors i activadors, LEF1 sol actuar com a activador mentre que TCF3 és principalment un repressor (Archbold et al. 2012).

Molts dels co-activadors transcripcionals que s'uneixen a β -catenina tenen funcions que afecten l'estructura de la cromatina, com les histones acetiltransferases (CBP, p300) o l'organització dels nucleosomes. Altres, en canvi, ajuden a l'associació del complex β -catenina/TCF amb la RNA polimerasa II (Pygo i Bcl9) (Valenta, Hausmann, and Basler 2012).

2.3. β -catenina en el complex d'adhesió

La gran majoria de teixits i òrgans s'originen a partir de cèl·lules epitelials que es converteixen en cèl·lules mesenquimals gràcies a un procés anomenat transició epiteli-mesènquima (EMT). Les cèl·lules epitelials estableixen forts contactes entre elles i amb la matriu a través d'unions adherents, desmosomes i unions estretes. Aquesta conversió és important durant el desenvolupament embrionari i implica importants canvis fenotípics com la pèrdua de les adhesions cèl·lula-cèl·lula, de la polaritat i la inducció de la capacitat de migració i invasió (Thiery et al. 2009).

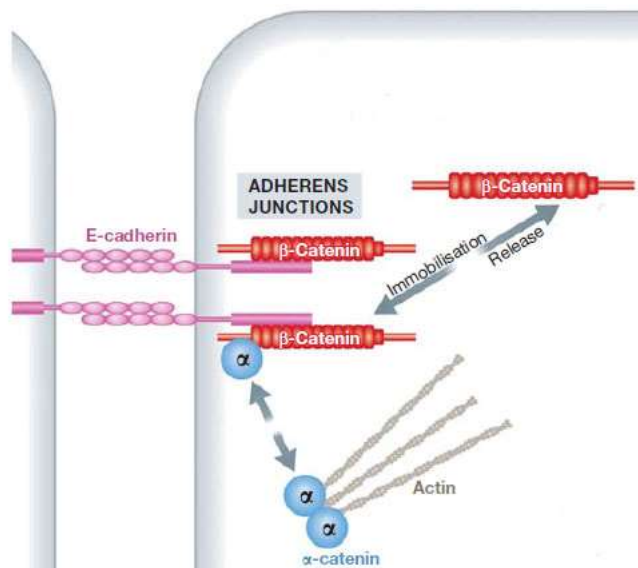


Figura 8. β -catenina intervé en el complex d'adhesió. β -catenina interacciona amb E-cadherina i α -catenina als les unions adherents, on modula indirectament el citoesquelet de actina. β -catenina pot alliberar-se de les unions per l'acció de cinases o per la downregulació de E-cadherina. Adaptat de Valenta, Hausmann, and Basler 2012

Per a la inducció de processos d'infiltració o de metàstasi és necessari que les cèl·lules desencadenin el mecanisme d'EMT, per tal d'abandonar el tumor primari i migrar a altres

Introducció

regions. Molts estudis senyalen que l'activació de la via Wnt/ β -catenina està fortament implicada en la inducció d'EMT en càncer (Anastas and Moon 2013).

Una gran part de la β -catenina es troba en el citoplasma, propera a la membrana, com a component de les unions cèl·lula-cèl·lula i interaccionant amb cadherina. Les cadherines són glicoproteïnes amb un domini transmembrana d'un únic pas, que formen part de les unions adherents per tal de mantindre la integritat del teixit. Així mateix, E-cadherina estableix la β -catenina mitjançant la seva unió i impeding la interacció d'aquesta amb el complex de degradació (Heuberger and Birchmeier 2010). D'altra banda, la β -catenina també s'uneix a α -catenina mitjançant la seva regió N-terminal i la primera repetició del domini armadillo de β -catenina (Fig. 8).

La regulació de la unió cadherina/ β -catenina i per tant també de la seva estabilitat es produeix mitjançant diverses fosforilacions induïdes per diferents cinases. La fosforilació de residus de β -catenina normalment debilita les unions amb cadherina o amb α -catenina, possibilitant que β -catenina s'acumuli a citoplasma i transloqui a nucli on activarà la transcripció de gens dianas. Entre aquestes fosforilacions, cal destacar la que es produeix en Tyr142 (Y142) de β -catenina, induïda per les cinases Fyn, Fer i c-Met (Brembeck et al. 2004; David et al. 2008; Heuberger and Birchmeier 2010; Piedra et al. 2003; Valenta, Hausmann, and Basler 2012). Aquesta fosforilació debilita la unió amb α -catenina, produint la translocació de β -catenina a nucli on induïx la transcripció de gens implicats en EMT en cèl·lules epitelials (Brembeck et al. 2004), així com creixement i arborització axonal induït per la senyalització de c-Met (David et al. 2008). D'altra banda, estudis en cèl·lules endotelials suggereixen que la cinasa Fak (*Focal Adhesion kinase*) induïx la fosforilació en Y142 de β -catenina després de l'estimulació amb VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (X. L. Chen et al. 2012).

Un altra residu ben estudiat és la Tyr654 (Y654) de β -catenina. La fosforilació d'aquest residu per diversos receptors tirosina cinasa (*Epidermal Growth Factor Receptor*- EGFR, c-Met o Trk) o la cinasa Src redueix la unió entre β -catenina i cadherina *in vitro* i *in vivo*. Ratolins mutants homozigots per una forma fosfomimètica de Y654 β -catenina (Y654E β -catenina) produeixen embrions letals mentre que els animals heterozigots pateixen

adenomes intestinals causats per l'estabilització de β -catenina (van Veelen et al. 2011), d'acord amb l'activació de la via Wnt en la iniciació de tumors intestinals.

La via Wnt/ β -catenina afecta de diverses formes la capacitat d'induir EMT en les cèl·lules; una és mitjançant la destrucció de les unions adherents amb cadherina, però també regulant la transcripció de gens implicats en EMT quan transloca a nucli i actúa com a factor co-transcripcional juntament amb TCF (Anastas and Moon 2013). Els més conegut són els gens Twist/Snail1/Slug (Snail2), que produeixen la *downregulació* de l'expressió d'E-cadherina, mentre que indueixen l'expressió de N-cadherina i vimentina i desencadenant fenòmens de migració i invasió (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005). Snail2 està regulat transcripcionalment per la β -catenina, mentre que els nivells de Snail1 incrementen després de l'estimulació amb factors Wnt a través de la inhibició de GSK3 (GSK3 activa marca Snail1 per degradació; Bachelder et al. 2005). Així mateix, Snail1 pot interaccionar directament amb β -catenina promovent la seva transcripció en un *loop* d'activació positiu (Valenta, Hausmann, and Basler 2012).

2.4. La via Wnt/ β -catenina en Glioma

Donada la importància de la via Wnt/ β -catenina en el desenvolupament i la homeòstasi cel·lular no és estrany trobar alterada aquesta via en moltes malalties metabòliques, malalties hereditàries o en càncer (MacDonald, Tamai, and He 2009). En càncer, la via Wnt/ β -catenina promou el creixement tumoral, capacitat d'invasió alta i l'autorenovació de les cèl·lules mare canceroses (Y. Lee et al. 2016). L'associació entre la desregulació de la via Wnt/ β -catenina i el càncer ha estat molt ben estudiada en càncer colorectal, on la deficiència en APC o mutacions activadores de β -catenina fan que aquesta no es degradi, conduïnt a una activació de la via que desencadena una excessiva proliferació i desregula les cèl·lules mare intestinals, predisposant per al inici de la tumorigènesi (Vijayakumar et al. 2011)

En canvi en glioma, no s'han trobat mutacions activadores en β -catenina ni delecions en APC. L'acumulació de β -catenina, i per tant, l'activació de la via es produeix per altres

Introducció

mecanismes que produeixen l'estabilització de la β -catenina. S'han descrit silenciaments epigenètics d'efectors negatius de la via Wnt que porten a l'activació de la via i al comportament maligne de les cèl·lules de glioma. Entre aquests, són freqüents la hipermetilació de gens que codifiquen per els sFRPs (antagonistes de Wnt), que es donen en un 40% del GBM primaris, i de DKK (que inhibeix LRP5/6) que es troba hipermetilat en un 50% del GBM secundaris (Y. Lee et al. 2016; Nager et al. 2012). D'altra banda, β -catenina i TCF es troben sobreexpressats i acumulats en el nucli en gliomes d'alt grau comparat en graus baixos; correlacionant positivament amb la malignitat del tumor (K. Zhang et al. 2012).

Un altre punt important a tindre en compte, és el complex de degradació degut al seu paper clau en la regulació de la via. Dades recents descriuen una *downregulació* de la Axina en un 31% de casos analitzats, correlacionant amb el grau de malignitat (K. Zhang et al. 2012). A més, s'ha descrit un nou mecanisme induït per Wnt3a per a la localització nuclear de β -catenina mitjançant la interacció amb el factor de transcripció FoxM1, que fa que β -catenina sigui importada a nucli, jugant una funció important en GICS i en la formació del glioma (Fig. 9) (N. Zhang et al. 2011).

Desregulacions d'altres vies també condueixen a l'activació de la β -catenina, produint un augment en la capacitat de migració de les cèl·lules de glioma, de forma independent de Wnt. La sobreexpressió i activació de EGFR, que és freqüent en glioma, és capaç de trencar l'associació entre α -catenina i β -catenina promovent l'activació transcripcional depenent de β -catenina. A més a més, c-Met ha demostrat tindre una forta capacitat d'activar la senyalització per β -catenina en gliomes mitjançant la fosforilació de diversos residus de β -catenina que disminueixen la seva interacció amb cadherines i α -catenina (Náger et al. 2015).

Els factors Wnt, alguns dels quals també estan sobreexpressats en glioma, produeixen augment de la capacitat de migració de les cèl·lules de glioma. Estudis mostren que el silenciament de Wnt1 produeix tumors més petits i la supressió de la capacitat invasiva dels gliomes (Paw et al. 2015). En canvi, un dominant negatiu de LRP5 pot regular negativament la via Wnt i suprimir, per tant, la capacitat de migració de les cèl·lules de

glioma. Finalment, l'activació de la via Wnt/ β -catenina també pot portar a l'increment de l'expressió de MMPs (Fig. 9), importants per la capacitat de degradar la matriu extracel·lular i que, per tant, faciliten la invasió cel·lular cap a altres zones del cervell (Anastas and Moon 2013).

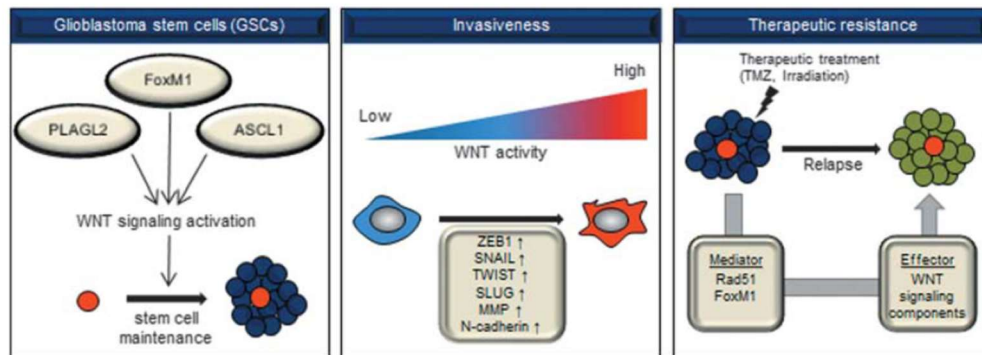


Figura 9. Principals funcions de la via WNT en GBM

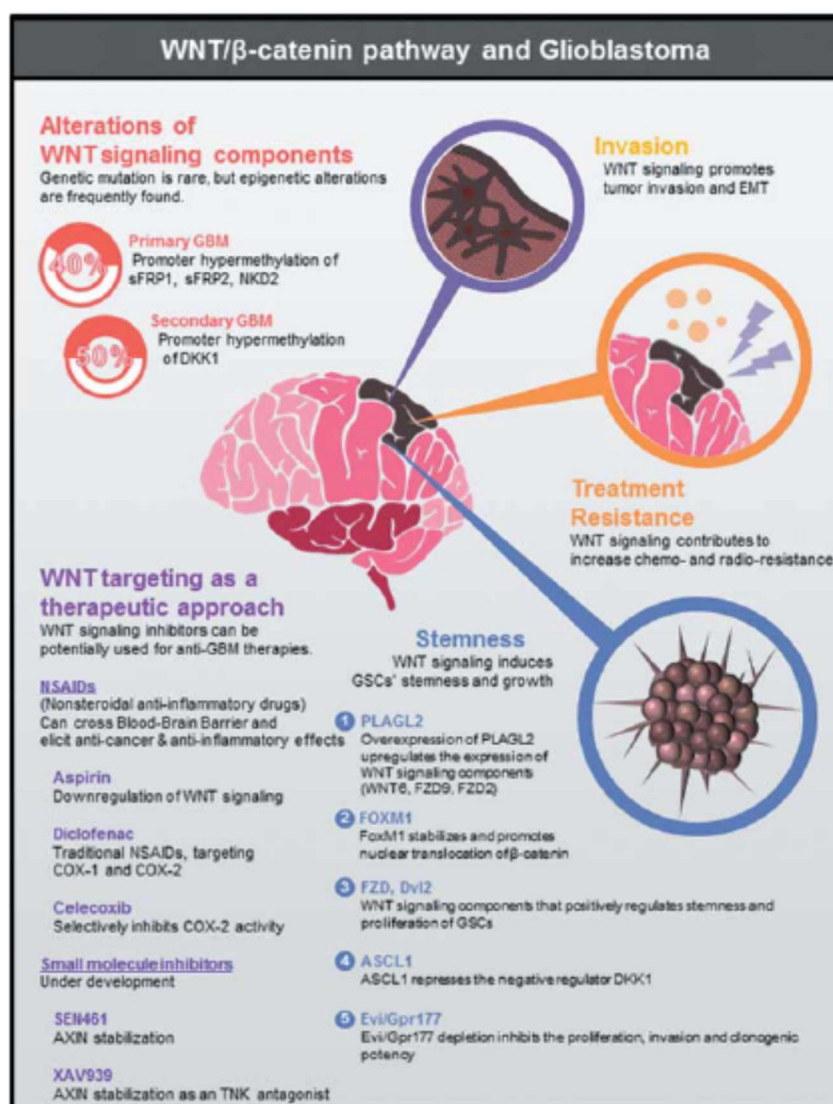
2.5. La via Wnt/ β -catenina com a diana contra el càncer

Degut a la implicació de la via Wnt/ β -catenina en la malignitat dels gliomes, s'han fet molts esforços en la recerca per a desenvolupar compostos contra aquesta via (Clevers and Nusse 2012). Encara que tractaments contra aquesta via s'han aplicat en diversos tipus de càncers (Polakis 2012), la seva eficàcia en glioma està en fase experimental. En l'actualitat, hi han diversos assajos clínics en càncer que la tenen com a diana.

Les aproximacions que s'han seguit per atacar la via Wnt es poden classificar en tres grups: (1) drogues antiinflamatòries no-esteroïdes (NSAIDs), (2) petites molècules inhibidores de la via i, (3) anticossos contra components de la via Wnt. 1) S'ha demostrat que els NSAIDs tenen propietats anticanceroses, a més a més de ser antiinflamatoris i capaços de creuar la barrera hematoencefàlica; entre aquests segurament el més famós és la Aspirina. Diversos estudis suggereixen que la aspirina pot inhibir la via Wnt produint una disminució en proliferació i invasivitat i incrementant la apoptosi. El tractament amb aspirina redueix l'activitat de TCF i l'expressió de gens diana com c-MYC i Ciclina D1 (Lan et al. 2011). Així, estudis en càncer colorectal mostren que tractaments prolongats amb aspirina (superiors a 5 anys) redueixen la incidència d'aquest tipus de càncer. 2) Entre les

Introducció

petites molècules amb capacitat per inhibir la via Wnt destaca SEN461, un fort inhibidor capaç de reduir l'activitat de la via mitjançant l'estabilització d'Axina, prevenint així la seva degradació proteosomal. L'estabilització d'Axina promou la fosforilació de β -catenina en residus que promouen la seva degradació pel proteosoma. També s'han descrit inhibidors com el FH535 i altres que modifiquen la interacció TCF/ β -catenina, disminuint la seva activació transcripcional. 3) Respecte dels anticossos, s'estan fent esforços per a incrementar la capacitat per a que penetrin la barrera hematoencefàlica. Entre aquests es troben anticossos amb capacitat per neutralitzar factors Wnt i Fz (Lan et al. 2011; Y. Lee et al. 2016; MacDonald, Tamai, and He 2009; Polakis 2012).

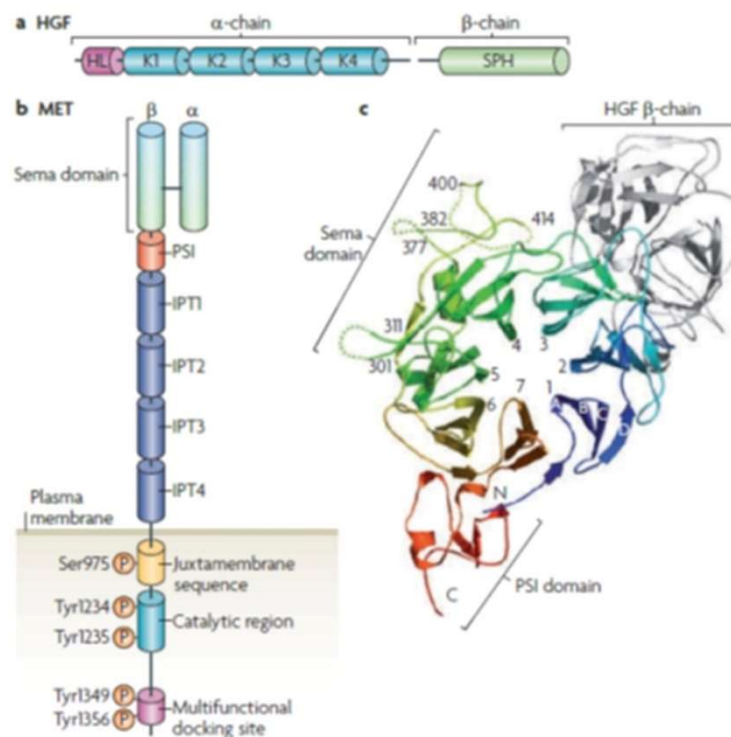


3. HGF i c-Met

El Factor de Creixement Hepàtic (HGF) i el seu receptor tirosina cinasa c-Met activen una cascada de senyalització que promou proliferació cel·lular, invasió i supervivència en cèl·lules no tumorals i canceroses. És freqüent trobar sobreexpressió de c-Met o HGF, mutacions i per tant, *loops* autocrins d'activació de la via HGF/c-Met en càncer, les quals solen conduir a la seva activació constitutiva (Jason A. Capítol llibre).

3.1. Estructura del lligand HGF i del seu receptor

HGF (*scatter factor*) és membre de la família de factors de creixement al que pertany el plasminogen (Trusolino, Bertotti, and Comoglio 2010). Està format per una subunitat α i un altra β unides per un pont disulfur. La subunitat α conté quatre dominis "Kringle", mentre que la subunitat β conté un domini similar a les proteases de Ser al que li falta el domini catalític (Fig. 11A). HGF és sintetitzat en forma de cadena simple i secretat al medi extracel·lular, on serà processat per proteïnases de Ser i matriptases (proteasas de Ser transmembrana) per a formar un heterodímer actiu (Birchmeier et al. 2003; Trusolino, Bertotti, and Comoglio 2010).



Introducció

Figura 11 Estructura de l'HGF (A) i el seu receptor c-Met (C). HGF esta format per dos subunitats α i β units per un punt disulfur (A). El receptor c-Met conte una regió extracel·lular, una transmembrana i una intracel·lular, aquesta ultima conte un domini catalític amb les Y1234/5 important per la seva funció (B). Estructura 3D de la interacció entre HGF i el seu receptor c-Met (C) (Trusolino, Bertotti, and Comoglio 2010).

HGF s'uneix al seu receptor c-Met mitjançant dues regions. D'una banda la subunitat α s'uneix amb alta afinitat al receptor, però no és capaç de produir la seva activació. Per contra, la subunitat β s'uneix amb baixa afinitat però en canvi produeix la seva activació (Sakai, Aoki, and Matsumoto 2015).

c-Met és un receptor tirosina cinasa, que com ocorre amb el seu lligand, és sintetitzat en forma de precursor immadur de 190 kDa de cadena simple i és posteriorment proteolitzat per furina per formar dues subunitats: una subunitat α de 45 kDa, altament glicosilada i completament extracel·lular i una subunitat β de 140 kDa que conté una regió extracel·lular (implicada amb la unió al lligand), una transmembrana i una intracel·lular (que conté el domini cinasa). Les dues subunitats estan unides per un pont disulfur. La regió extracel·lular de c-Met presenta un domini amb homologia a les semaforines (Sema; que inclou tota la subunitat α i una part de la subunitat β , i és la encarregada de la unió amb el lligand), una seqüència relativa a Met (MRS) amb alt contingut en cisteïnes, seguida per una zona amb repeticions rica en residus glicina-prolina i finalment quatre dominis immunoglobulina (Fig. 11B).

La zona intracel·lular de c-Met es pot dividir en tres regions: 1) La regió juxtamembrana que conté dos important residus: una serina (S985), que al ser fosforilada redueix l'activitat cinasa del receptor i la tirosina 1003 (Y1003), on s'uneix la ubiquitina ligasa Cbl responsable de la poliubiquitinació, endocitosis i degradació de c-Met. 2) El domini tirosina cinasa, que després de l'activació i dimerització del receptor provoca la transfosforilació de les tirosines 1234 i 1235 (Y1234/5). 3) Una regió C-terminal amb dues tirosines (Y1349/56) importants per al reclutament de diversos adaptadors que provocaran la transducció del senyal, fosforilades com a conseqüència de l'activació del domini cinasa (Fig. 11B) (Gentile, Trusolino, and Comoglio 2008).

Mentre que HGF s'expressa principalment en cèl·lules amb origen mesenquimal, c-Met s'expressa en cèl·lules d'origen epitelial.

3.2. Via de senyalització

La unió de l'HGF al domini Sema del receptor c-Met produeix la dimerització d'aquest i la transfosforilació dels residus Y1234/5 del domini catalític. L'activació porta a l'autofosforilació de dues tirosines addicionals (Y1349/56) en l'extrem C-terminal, creant un lloc d'unió per a altres proteïnes que produirà la transducció i amplificació de la senyalització (Gherardi et al. 2012). Aquests adaptadors inclouen el factor de creixement unit a receptor-2 (Grb2), la proteïna d'unió 1 associada a Grb2 (Gab1), la fosfolipasa C (PLC), la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K), l'adaptador SHC, Src i el factor de transcripció STAT3 (Fig. 12). Aquestes proteïnes són freqüentment fosforilades en residus tirosina que porta a la seva activació.

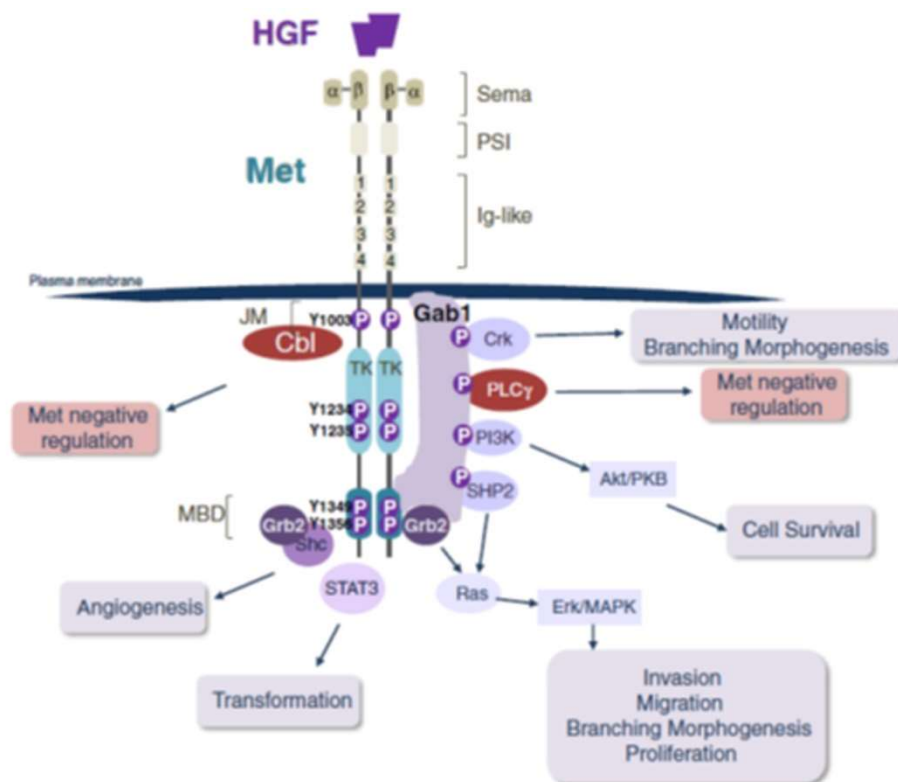


Figura 12 Vies de senyalització de HGF/c-Met i les seves funció biològiques. Un cop es produeix la unió del lligand al seu receptor i la seva posterior dimerització i activació, diverses proteïnes adaptadores s'uneixen a la regió C-terminal directament o indirectament mitjançant Grb2 i Gab1. Aquest fet produeix l'activació de vies de senyalització com ERK/MAPK que implica l'activació de una resposta biològica que inclou fenòmens de morfogènesi, migració i proliferació, d'AKT/PKB induïnt supervivència, i altres (Maroun and Rowlands 2014).

Gab1 es pot unir directament a c-Met o bé mitjançant la proteïna Grb2. Gab1 a la seva vegada conté diverses tirosines que quan són fosforilades per c-Met actuen com a llocs d'unió addicionals d'altres proteïnes. Entre aquestes destaquen la PI3K, el regulador CT10 de cinasa (Crk), PLC, la fosfatasa 2 amb un domini amb homologia a Src (shp2) i p120 Ras-GAP, que portaran a l'activació de diverses cascades de senyalització revisat per Barrow-McGee and Kermorgant 2014; Trusolino, Bertotti, and Comoglio 2010 (Fig. 12).

Entre les vies de senyalització activades per c-Met destaca la via de les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). L'activació d'aquesta implica un augment de la supervivència cel·lular, tubulogènesi i motilitat, i és una via de vital importància per a la regeneració del fetge.

Rac es membre de la família de Rho GTPases i també pot ser activada per c-Met, mitjançant Grb2 o bé per la PI3K. Aquesta via de senyalització és important regulant la reorganització del citoesquelet, migració i angiogènesi.

Finalment, STAT3 és un factor de transcripció que també pot ser activat mitjançant la unió directa amb c-Met, jugant un paper important en el creixement independent de substrat, la migració, la tubulogènesi i la tumorogènesi. (Barrow-McGee and Kermorgant 2014; Gentile, Trusolino, and Comoglio 2008).

Un important punt a entendre sobre la transducció del senyal és com l'activació de tantes vies pot portar a una resposta cel·lular concreta. Una possible resposta és el context cel·lular, la interacció amb altres vies de senyalització i la modulació per duració i intensitat del senyal. A més, hi ha força evidències de la regulació creuada entre c-Met i altres receptors de membrana, que poden actuar com a coreceptor de c-Met. Possiblement aquestes interaccions milloren la integració de les diferents vies, inclús de

forma redundant. Entre els receptors que interaccionen amb c-Met trobem la integrina $\alpha 6 \beta 4$, CD44, plexinB, Fas i altres receptors tirosina cinasa com RON, EGFR i ErbB2. Aquestes interaccions regulen la senyalització per c-Met la “qualitat” i intensitat de la senyal

3.3. La senyalització HGF/c-Met en migració/invasió

Durant la embriogènesi, les cèl·lules són capaces de migrar del llocs on s’originen i moure’s per formar part de nous òrgans. Un procés similar ocorre en la vida adulta en el tancament de ferides i la reparació de teixits, quan les cèl·lules migren fins a la ferida per re-crear les estructures pre-existents danyades. A més a més, les cèl·lules que migren deuen ser capaces de proliferar, per produir les noves estructures que es formen durant l’embriogènesi o bé per substituir aquelles que han estat destruïdes.

Les fases de l’embriogènesi i de la regeneració d’òrgans són molt semblants a les que es desenvolupen en la invasió tumoral. Les cèl·lules trenquen els contactes entre elles, s’infiltraen en el teixit que les envolta, on proliferen, abans de penetrar en els vasos sanguinis i disseminar-se per tot el cos. Aquestes semblances es deuen a que comparteixen els mecanismes moleculars pels quals es produeix aquest procés, definit com creixement invasiu o EMT. Aquest procés està conduït per diversos estímuls extracel·lulars que regulen l’activitat de diversos factors de transcripció, que a la seva vegada modulen la expressió de multitud de proteïnes, entre les que trobem diverses que formen part del citoesquelet, unions cèl·lula-cèl·lula, reguladors de cicle i efectors anti-apoptòtics. Un dels estímuls més importants que regulen tots aquests processos són HGF i la via activada pel seu receptor c-Met, així com la via Wnt.

Desenvolupament embrionari

Durant el desenvolupament, la via HGF/c-Met senyalitza induint el creixement, proliferació i la supervivència dels hepatòcits i dels trofoblasts de la placenta (Trusolino, Bertotti, and Comoglio 2010). La incorrecta funció de l’eix HGF/c-Met també afecta al sistema nerviós, provocant una menor supervivència de les neurones sensorials. A més, el nostre grup va demostrar que la via HGF/c-Met induïx la fosforilació de β -catenina en

Introducció

Y142, regulant el creixement i l'arborització axonal (David et al. 2008). Finalment, c-Met és un important regulador de la transició epiteli-mesènquima (EMT, aquest procés es discutirà més profundament a continuació) de progenitors miogènics (progenitors que donaran lloc al múscul esquelètic) que s'alliberen d'una estructura epitelial transitòria de l'embrió que donarà lloc al múscle esquelètic, dermis i altres tipus cel·lulars, i de molts altres tipus cel·lulars. Aquestes cèl·lules són capaces de migrar llargues distàncies en l'embrió fins ocupar el seu lloc final d'una manera depenent de c-Met i Gab1 (Gherardi et al. 2012)

Regeneració d'òrgans

HGF/c-Met també juga també un paper fonamental en la regeneració d'òrgans i en el tancament de ferides guiat per gradients d'HGF (Maroun and Rowlands 2014). L'increment d'expressió en HGF i c-Met es dona en els teixits quan són danyats, com fetge o ronyons; tant mateix es produeix un augment d'HGF en el plasma després que es produeixi aquest dany. En fetge, la producció d'HGF augmenta ràpidament després del dany, produint l'activació de c-Met en hepatòcits. Aquest fet provoca un fort estímul mitogènic i antiapoptòtic que ajuda a la regeneració del fetge. En la pell, diversos estudis demostren que HGF és necessari també per la reparació de ferides. Durant aquest procés, HGF i c-Met son co-expressats en queratinòcits, activant un *loop* autorcri de hiperproliferació de l'epiteli per tal de produir noves cèl·lules que migraran cap a la ferida per repoblar aquesta àrea (Gentile, Trusolino, and Comoglio 2008).

Transició epiteli-mesènquima (EMT)

Un dels mecanismes mes important dirigits per HGF/c-Met durant la remodelació de teixits i la embriogènesi és la EMT. És un procés en que les cèl·lules epitelials canvien el seu fenotip cap a mesenquimal, implicant l'activació d'un ampli i complex programa genètic. Aquest mecanisme és essencial en situacions fisiològiques com la embriogènesi i la reparació de teixits però també, en situacions patològiques com en càncer o en fibrosis.

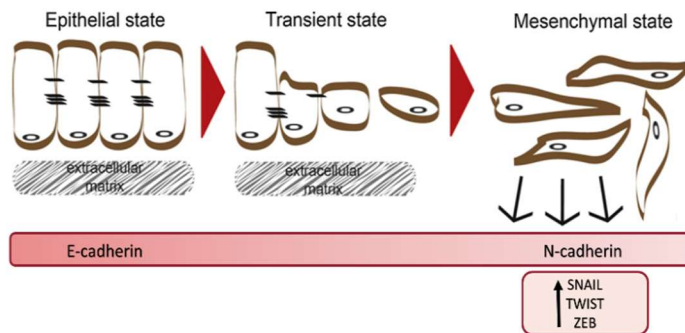


Figura 13. Transició Epiteli-mesènquima. Les cèl·lules epitelials polaritzades, amb contactes cèl·lula-cèl·lula, i amb una monocapa ben organitzada, adquireixen un fenotip mesenquimal caracteritzat per la reorganització del citoesquelet, pèrdua de les unions entre cèl·lules i degradació de la membrana basal, que els permetrà desenganxar-se i poder envair el microambient que les envolta. Adaptat de Kahlert, Nikkha, and Maciaczyk 2013

Les cèl·lules epitelials es caracteritzen per una morfologia poligonal i una configuració en capes. Presenten polarització apical/basal i estan connectades estretament entre elles lateralment per unions adherents fortes. *In vivo*, aquestes unions garanteixen la integritat estructural dels teixits. Els processos claus de l'EMT que portaran aquestes cèl·lules cap a un fenotip mesenquimal comporten la pèrdua de les unions cèl·lula-cèl·lula, la pèrdua de la polaritat apical/basal per adquirir una polaritat a la zona en que migren, reorganització del citoesquelet i establiment de una morfologia més agullada, increment en el nombre de protrusions, canvis tots compatibles amb un augment de la mobilitat. Finalment, en molts casos també adquireixen l'habilitat de degradar proteïnes de la ECM, que permetrà a les cèl·lules envair el teixit que les envolta. A més a més, les cèl·lules que desenvolupen EMT sovint es tornen resistents a la senescència i l'apoptosi.

Durant l'EMT, disminueix l'expressió de proteïnes epitelials i es promouen canvis d'expressió gènica que condueixen a canvis en el citoesquelet i que modifiquen les interaccions entre les cèl·lules i la ECM. Un dels aspectes claus d'aquesta regulació, es el balanç entre cadherines: disminueix l'expressió d'E-cadherina (implicada en les fortes unions entre cèl·lules) i augmenta l'expressió de N-cadherina, que implica unes unions

més dèbils afavorint la migració i invasió. El balanç entre cadherines és controlat pels reguladors de la transcripció SNAIL, TWIST i ZEB. SNAIL és l'encarregat d'iniciar l'EMT, ja que reprimeix directament diverses proteïnes implicades en el fenotip epitelial, entre les que destaca E-caherina (Baulida and García de Herreros 2015).

3.4. Implicació d'HGF/c-Met en càncer i en gliomas

La regulació de HGF/c-Met es troba sovint alterada a diversos nivells en càncer, produint l'activació d'aquesta. Aquestes modificacions ocorren tant a nivell transcripcional com d'una inadequada degradació del receptor, o mitjançant interaccions amb altres vies (revisat per Gherardi et al. 2012). També s'ha descrit una forma de fusió activa en GBM Trp. L'activació de la via c-Met comporta un augment en la malignitat produint un increment en proliferació, resistència a l'apoptosi i migració (Trusolino, Bertotti, and Comoglio 2010).

En gliomes, l'alta expressió d'HGF o de c-Met correlaciona amb el grau de malignitat tumoral en astrocitomes i s'associa a un mal pronòstic, un temps de supervivència més baix i una resposta pobra al tractament. A més a més, la senyalització per HGF/c-Met indueix proliferació i invasió en línies cel·lulars de GBM però no en astròcits humans. Així mateix, l'expressió de c-Met correlaciona amb la de (MMPs indicant una activació del programa d'EMT. L'anàlisi de mostres de recurrències de GBMs comparat amb el seu tumor primari mostra un increment dels nivells de c-Met en les recurrències (W. Liu et al. 2011).

D'altra banda, la senyalització per c-Met es troba activada en GSC, i la seva expressió correlaciona amb els marcadors de cèl·lules mare. En paral·lel, la inhibició de c-Met porta a la diferenciació de les GSC i la reducció de la seva capacitat tumorigènica i invasiva.

L'activació de Met està també reforçada per la regulació creuada amb altres vies, especialment amb altres receptor tirosina cinasa, representant un dels mecanismes més importants per la progressió tumoral i en la resistència al tractament. En glioma, es troba sovint sobreexpressada la forma truncada de EGFR (Δ EGFR). Aquesta forma truncada és

capaç d'induir l'activació de c-Met i l'expressió d'HGF. A la seva vegada HGF/c-Met són capaços de activar Δ EGFR mitjançant la via de les STAT, reforçant un *loop* d'activació (Garnett et al. 2013). Una altra de les vies importants amb les que coopera c-Met és la via Wnt/ β -catenina. En càncer de colon, c-Met és diana directa d'aquesta via. En paral·lel, i també en càncer de colon, HGF és capaç d'induir la translocació de β -catenina a nucli, on actua de cofactor transcripcional de TCF (Gherardi et al. 2012). Estudis en glioma suggereixen que l'increment de la capacitat invasiva induïda per HGF/c-Met hi intervé en part l'activació de la via Wnt/ β -catenina (Kang Ho Kim et al. 2013).

4. La Cinasa d'Adhesió Focal

La Cinasa d'Adhesió Focal (FAK) és un mediador crític intracel·lular dels canvis extracel·lulars, com la remodelació de l'ECM, la disponibilitat de nutrients o la resposta a factors de creixement. FAK és una cinasa no-receptora de tirosina, constituent dels focus d'adhesió focal, que s'activa per interacció amb integrines, receptors de factors de creixement, receptors de proteïna G o receptors de quimiocines (Fig. 14). Realitza una funció clau en la regulació de l'adhesió cel·lular, motilitat, proliferació i supervivència de diferents tipus cel·lulars (Yoon et al. 2015).

La interacció entre les cèl·lules i el seu microambient és una característica essencial per al bon funcionament dels teixits. Les integrines són essencials transmetent bidireccionalment la informació, regulant les unions físiques i la senyalització per tal de comunicar l'interior i l'exterior de la membrana plasmàtica. Un cop es dona la correcta interacció entre les integrines i l'ECM, el "*clúster*" d'integrines a la membrana plasmàtica indueixen el reclutament i activació de diverses molècules que inclouen, no-receptors tirosina cinasa, GTPases petites i proteïnes del citoesquelet per a formar complexos intracel·lulars especialitzats, anomenats adhesions focals, dels quals FAK n'és un constituent essencial (Schlaepfer, Hauck, and Sieg 1999). Mitjançant diverses proteïnes

Introducció

que es troben en les adhesions focals, la senyalització on intervien les integrines pot transmetre informació del medi extern en la regulació de l'adhesió cel·lular, conduint a la reorganització del citoesquelet, o d'altres importants en la progressió tumoral com l'angiogènesis i la metastasi (Tai, Chen, and Shen 2015).

4.1. Estructura de FAK

El gen humà que codifica per FAK s'anomena *PTK2* i està localitzat en el cromosoma 8q24.3, una regió que sovint presenta aberracions en càncer (Weiner et al. 1993). FAK està format per tres regions: un domini cinasa central i rodejant aquest un domini N-terminal FERM (four-point-one, ezrin, radixin, moesin) i un domini C-terminal que conté la regió FAT (*Focal Adhesion Targeting*) (Fig. 14) (Sulzmaier, Jean, and Schlaepfer 2014).

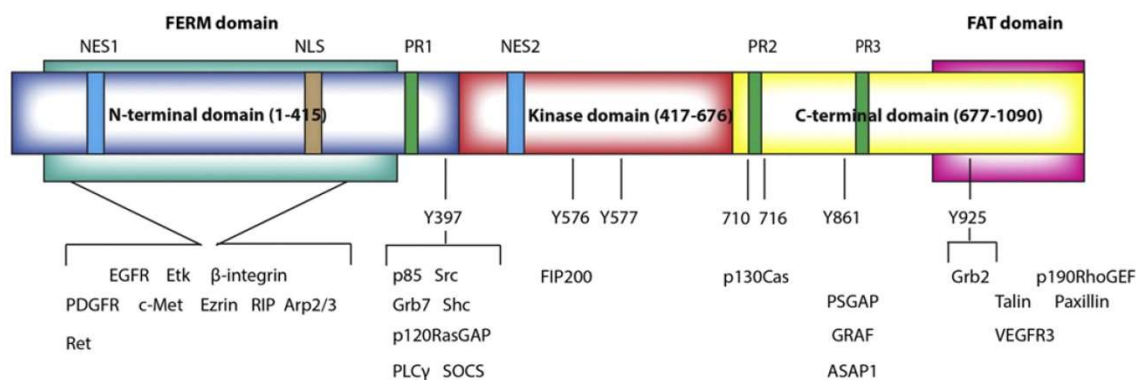


Fig. 14. Representació esquemàtica de FAK. El domini N-terminal conté la regió FERM i les seqüències de sortida nuclear (NES) i d'import nuclear (NLS). A més en aquesta zona interaccionen receptors com EGFR, PDGFR i c-Met. El residu Y397 és capaç d'autofosforillar-se i actuar de lloc d'unió per a Src. El domini central presenta els residus Y576/7 necessaris per la funció catalítica. Finalment, la regió C-terminal conté el domini FAT important per la unió de proteïnes entre les que destaca paxilina i talina (B. Y. Lee et al. 2015).

El **domini FERM** és una regió no catalítica en l'extrem N-terminal conservada en moltes cinasa de tirosina, com les JAK cinases. El domini FERM de FAK desenvolupa diverses funcions. Primer, la unió de FERM al domini catalític produeix la inhibició d'aquest. Segon, pot funcionar com a proteïna adaptadora, produint l'activació de moltes cascades de senyalització. Per exemple, el domini FERM de FAK s'uneix a receptors de factors de

creixement com EGFR i c-Met en la membrana plasmàtica induint migració cel·lular i invasió (S.-Y. Chen and Chen 2006). HGF és capaç d'estimular la unió entre c-Met i FAK mitjançant el domini FERM incrementant unes 15 vegades l'activitat de FAK i promovent la invasió en cèl·lules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*). El domini FERM de FAK també regula la seva localització nuclear, on intervé en senyalització pro-supervivència (Lobo and Zachary 2000). La translocació nuclear de FAK en resposta al tractament amb estaurosporina o bé, el trencament de les adhesions cel·lulars, provoca la seva translocació nuclear, regulant proliferació cel·lular i supervivència en un mecanisme independent de la seva activitat catalítica (Lim, Mikolon, et al. 2008). La sortida nuclear de FAK també està controlat per dues seqüències dins del domini FERM i una altra en el domini catalític (B. Y. Lee et al. 2015). D'altra banda, també conté una seqüència d'unió al domini cinasa (KDBS) que és crítica per la regulació de l'activitat cinasa mitjançant un mecanisme autoinhibitori (Frame et al. 2010). A més, compren el residu Y397, el qual mitjançant autofosforilació inicia l'activació de la cinasa FAK.

El domini cinasa de FAK ocupa la regió central de la proteïna i presenta un *loop* d'activació, amb dues tirosines (Y576/7) que són fosforilades per Src i necessàries per l'activitat cinasa de FAK (Chan et al. 1999). L'estimulació que es dona quan FAK s'uneix a receptors de factors de creixement, receptors de quimiocines i integrines produeix l'autofosforilació ràpida del residu Y397 (localitzat al domini N-terminal), i aquest consegüentment porta a la fosforilació de les altres dues tirosines.

S'ha descrit que el domini FERM interacciona i bloqueja la funció del domini cinasa, produint la seva inhibició. La unió de la regió FERM de FAK a altres receptors produeix un canvi conformacional, que fa que el domini cinasa torni a ser accessible i es pugui activar. D'altra banda, el fosfatidil inositol (PIP2) és capaç d'unir-se al subdomini F2 de FERM, produint també un canvi conformacional en FAK i l'activació del seu domini catalític (Barsukov et al. 2003).

Finalment, **la regió C-terminal (CD)** es caracteritza per la presència de dues seqüències riques en prolines i per la regió FAT (*Focal adhesion targeting*). Aquest domini, i tal i com succeeix amb el domini FERM, participa en la unió amb altres proteïnes. Encara que FAK

Introducció

no s'uneix directament a les integrines, la interacció amb paxilina i talina fan que FAK es localitzi en els focus d'adhesió. Així mateix també s'ha descrit la dimerització de FAK, mitjançant la interacció entre els dominis FERM i FAT, jugant un paper molt important en l'activació i localització nuclear de FAK mitjançant la unió amb paxilina (Brami-Cherrier et al. 2014).

4.2. Regulació de l'activació de FAK.

Hi ha diversos estímuls que poden iniciar l'activació de FAK, però el mecanisme millor caracteritzat és el que implica la unió entre les integrines i la ECM, que produeix el reclutament d'altres proteïnes com talina i paxilina al domini citoplasmàtic de les integrines (Lawson and Schlaepfer 2012). Aquesta a la seva vegada implica la unió de FAK al complex, mitjançant la paxilina i la seva conseqüent activació. Altres estímuls que produeixen l'activació de FAK són l'EGF, HGF, VEGF i PDGF mitjançant la unió de FAK als seus receptors. El primer pas de l'activació de FAK es produeix quan el domini FERM es desplaça del domini cinasa, possiblement per la unió de fosfolípids o de pèptids lligands al domini FERM, el que comporta la ràpida autofosforilació del residu Y397 (Westhoff et al. 2004). És aleshores quan es crea un lloc d'alta afinitat per a Src, que porta a l'exposició del lloc d'activació, impedit que es torni a donar la unió entre el domini FERM i el domini cinasa. Llavors Src fosforila altres dos residus del domini cinasa (Y576/7) produint la seva completa activació (J. Zhao and Guan 2009).

El complex format per FAK/Src fosforila o funciona com a lloc de reclutament d'un abundant nombre de proteïnes que inicien diverses cascades de senyalització i respostes molt variades. Entre aquestes proteïnes trobem p130cas, paxilina, PLC γ , SOCS, GRB7, Shc, P120 RasGAP o la subunitat p85 de PI3K (Fig. 15) (Schlaepfer, Hauck, and Sieg 1999).

A més a més, Abbi et al. (Abbi et al. 2002) han descrit que FIP200 (*Focal Inhibitor Protein 200*) funciona com a inhibidor de FAK mitjançant la unió al seu domini cinasa i produint la seva inactivació *in vitro* i *in vivo*. L'associació entre FIP200 i FAK disminueix l'adhesió cel·lular dependent de integrines, i conseqüentment de FAK. La sobreexpressió de FIP200

inhibeix l'adhesió i la migració cel·lular i la progressió del cicle cel·lular, destacant així les conseqüències funcionals que té la inhibició de FAK.

4.3. Funcions de FAK en càncer

FAK es troba en el centre de moltes vies de senyalització amb capacitat per promoure creixement tumoral i metàstasi. FAK controla funcions dependents del seu domini cinasa com motilitat cel·lular, invasió, supervivència i EMT (Shibue et al. 2012), però també desenvolupa moltes altres funcions independents de la funció cinasa, on FAK funciona com a proteïna adaptadora. Entre aquestes, destacar la supervivència cel·lular i proliferació de cèl·lules mare canceroses en càncer de pit (Lim, Mikolon, et al. 2008; Luo et al. 2013). Entendre el balanç entre les funcions cinasa dependents o independents és bàsic per comprendre els fenotips causats per les vies de senyalització on intervé FAK (Fig. 15).

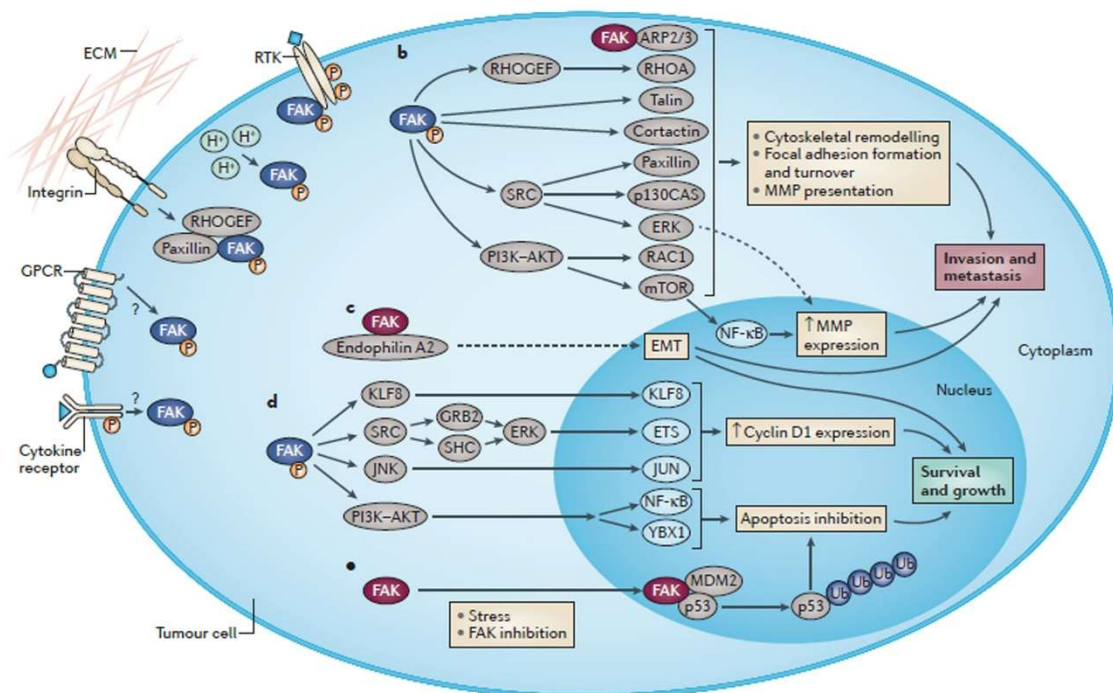


Figura. 15. Senyalització i funcions de FAK en càncer. FAK induïx creixement tumoral i metàstasi, mitjançant funcions dependents del domini cinasa (blau) o independents d'aquest (roig). Entre les vies que activa cal destacar l'eix PI3K-AKT/mTOR (Sulzmaier, Jean, and Schlaepfer 2014).

Introducció

La capacitat de les cèl·lules **d'envair** el teixit que les envolta és un mecanisme clau en la progressió tumoral. La capacitat d'invasió requereix que es produeixi un canvi en el fenotip cel·lular, incloent canvis en les adhesions focals, citoesquelet i una canvi en la expressió i activació de les MMPs per tal de facilitar la invasió en l'ECM. La senyalització per FAK intervé en la formació i reciclatge de les adhesions focals (J. Zhao and Guan 2009). La unió i activació de FAK a les adhesions focals implica la seva unió a RHO *guanine nucleotide exchange factor* (GEF) ARHGEF38, i la senyalització per aquest complex promou la invasió local i l'inici del carcinoma de colon en ratolí (Fig. 15B). La dimerització d'aquest complex produeix l'activació de FAK, incrementant la fosforilació de paxilina i la unió de talina, de forma independent a la unió a integrines i desemboca en la maduració de les adhesions focals (Miller et al. 2012). FAK també desenvolupa un paper essencial en el reciclatge de les adhesions focals. Complexes on participen proteases com la calpaina i la caspasa-8 participen en la proteòlisi de components de les adhesions focals (Barbero et al. 2009).

La senyalització per FAK també regula la transcripció de gens implicats en EMT. La re-expressió de FAK en ratolins deficients implica un mecanisme d'EMT induït per Snail (X.-Y. Li et al. 2011). Per contra, la reducció en l'expressió de FAK (provocat per miR-7) o la seva inhibició resulta en la pèrdua de marcadors mesenquimals i l'increment d'E-cadherina, que es situa en la membrana produint que les unions entre cèl·lules siguin més fortes. D'aquesta manera, FAK juga un paper important tant en la regulació transcripcional com en la localització de la E-cadherina en les cèl·lules (Canel et al. 2013).

La interacció entre HGF i el seu receptor c-Met també regula FAK per promoure invasió. L'estimulació amb HGF produeix la unió del seu receptor al domini FERM de FAK. En càncer de pulmó, la formació del complex c-Met/FAK s'associa amb un fenotip invasiu, i la expressió de la regió N-terminal de FAK suprimeix aquest efecte sobre la invasió cel·lular *in vitro* (S.-Y. Chen and Chen 2006).

FAK també desenvolupa una funció molt important en la **angiogènesi**, mitjançant la senyalització en les cèl·lules endotelials (EC). FAK integra les senyals angiogèniques que provenen dels receptors de VEGF i de les integrines, afectant a la migració i invasió de les

EC per promoure la angiogènesi (Veikkola et al. 2000). Una de les funcions principals de FAK en les EC és regular la permeabilitat vascular, punt crític per la funció pro-angiogènica. VEGF indueix l'activació de FAK i promou la seva ràpida localització en les unions adherents endotelials, unint-la a la cadherina endotelial mitjançant el domini FERM i produint la consegüent fosforilació de β -catenina. A continuació el complex entre cadherina i β -catenina es dissocia i es trenquen les unions entre cèl·lules. Per contra, la inhibició farmacològica o genètica de FAK en les cèl·lules endotelials evita la permeabilitat vascular induïda per VEGF i la fosforilació de β -catenina en el residu Y142 (X. L. Chen et al. 2012).

FAK també regula la **supervivència i el creixement del tumor** mitjançant funcions dependents i independents de l'activitat cinasa. Dins de les vies de senyalització dependents de l'activitat cinasa cal destacar la cascada PI3K-AKT (Fig. 15). En cèl·lules normals, el trencament de les adhesions entre les integrines i l'ECM, i el consegüent desenganxament de la matriu, afecta la supervivència i indueix un tipus de mort, coneguda com anoikis. En cèl·lules canceroses, però, la senyalització per FAK pot fer que les cèl·lules superin l'anoikis i promou la supervivència en absència d'adhesió. Es tracta d'un mecanisme on són necessàries l'autofosforilació del residu Y397 i l'activitat del domini cinasa (Fig. 15D) (Frisch et al. 1996). Aquesta funció de FAK proporciona un mecanisme on FAK promou creixement tumoral en xenografts independentment d'adhesió (Ward et al. 2013). Una de les vies més ben caracteritzades per les que FAK promou supervivència, evitant l'anoikis, és la via de les PI3K/AKT. A més d'aquesta, la regulació entre FAK i altres components com les JNK (Almeida et al. 2000), p53, p130Cas i paxilina també contribueixen a la resistència a l'anoikis (Fig. 15d). En GBM, l'axis entre la FAK i PI3K/AKT atenua la apoptosi induïda per l'estrès oxidatiu, i la inhibició farmacològica de FAK (amb el inhibidor VS-6063) sensibilitza les cèl·lules per a la mort (Y. Kang et al. 2013).

Recentment, Sandilands et al. (Sandilands et al. 2011) han descrit que FAK també regula supervivència mitjançant l'autofàgia. En aquest estudi es descriu que components del procés autofàgic estan associats a les adhesions focals. A més la pèrdua de FAK

Introducció

desemboca en el segrest de Src en els autofagosomes, mantenint Src actiu i essent un mecanisme capaç d'induir supervivència, evitant la pèrdua de viabilitat prevista per la depleció de FAK. Un treball posterior del mateix grup també descriu que el receptor RET es degrada per autofàgia com a conseqüència de la inhibició de la senyalització de FAK.

FAK també s'ha implicat amplament en **proliferació**, i a més la seva activitat catalítica regula específicament diferents estadis del cicle cel·lular. El trencament de les unions entre les integrines i la matriu extracel·lular inhibeix la fosforilació en tirosina de FAK i comporta el retràs en la transició de la fase G1 a la S del cicle cel·lular, mentre que la overexpressió de FAK accelera la transició (J. H. Zhao, Reiske, and Guan 1998). En canvi, un mutant negatiu de FAK disminueix la proliferació, els nivells de CiclinaD1 i augmenta els de l'inhibidor del cicle p21, en un mecanisme que implica reducció de l'activitat de les ERK (Fig. 15D) (J. H. Zhao, Reiske, and Guan 1998). Un mecanisme alternatiu pel qual FAK promou proliferació és mitjançant la seva translocació nuclear i la interacció amb el supressor tumoral p53, a través del seu domini FERM (Lim, Chen, et al. 2008). FAK localitza a nucli mitjançant la seva seqüència de localització nuclear en el domini FERM i indueix la degradació de p53 mitjançant la formació d'un complex entre ella, la *E3 ubiquitin ligase* Mdm2 i p53, que resulta en la degradació de p53 independentment de l'activitat cinasa de FAK (Fig. 15E). La degradació de p53 porta a la inhibició de l'activitat transcripcional d'aquesta, disminuint la expressió de molts gens, entre els que trobem p21 (Sulzmaier, Jean, and Schlaepfer 2014).

D'altra banda, en ratolins heterozigots per APC, FAK funciona *downstream* de la senyalització pels factors Wnt per induir l'activació de AKT/mTOR i la proliferació i tumorogènesi en intestí (Ashton et al. 2010). Ho fa per un mecanisme que implica l'estabilització de β -catenina per la via FAK-PI3K-GSK3, i promou la translocació nuclear de β -catenina i l'activació transcripcional que resulta en hiperproliferació de cèl·lules de pell en ratolí (Samuel et al. 2011).

La relació entre càncer i FAK va ser ja descrita fa més de 20 anys, quan es van trobar nivells de mRNA de FAK elevats en diversos tipus de càncer, com en adenocarcinoma (Weiner et al. 1993). FAK es troba ja present en graus de baixa malignitat, suggerint que la

sobreexpressió de FAK pot ser un esdeveniment que es doni ja en els primer estadis de la malaltia, i per tant jugui un paper clau en la progressió i metàstasi tumoral. En tumors cerebrals, FAK també es troba sobreexpressat en tumors astrocitaris, ja des de grau II, i en recurrències. Per contra, els seus nivells d'expressió eren més baixos en els oligodendrogliomes, tumors amb millor pronòstic (Jones et al. 2001). El mecanisme exacte pel què l'expressió de FAK està augmentada en càncer no es coneix exactament, però un dels mecanismes proposats és mitjançant l'augment del nombre de còpies del gen codificant, trobant-se correlacionat nombre de còpies i nivells de proteïna en alguns càncers (Stone et al. 2014). D'altra banda, no sembla l'únic mecanisme, ja que en altres tipus de càncers no hi ha augment del nombre de còpies, fet que suggereix que la regulació traduccional i post-traduccional també són importants per explicar l'augment en els seu nivells. L'anàlisi de la regió promotora de FAK mostra llocs d'unió per al factor transcripcional NF- κ B i per al supressor tumoral p53, els quals activen i reprimeixen la transcripció de FAK, respectivament (Golubovskaya et al. 2008). Aquestes dades senyalen com l'expressió de FAK pot ser induïda per reguladors transcripcionals que sovint es troben alterats en càncer. També hi ha un paper que descriu la supressió de FAK per Merlin, un supressor tumoral. Nivells elevats de FAK correlacionen amb l'estadi i la metàstasi del càncer i per tant s'associen a malignitat. D'altra banda, la fosforilació de residus clau de FAK (Y397 i Y576) està també lligada a una major capacitat d'invasió i metàstasi (Madan et al. 2006). Aquest estudis indiquen que FAK i la seva activació pot ser un potencial marcador de pronòstic i diana terapèutica.

4.4. La inhibició de FAK com a diana terapèutica

Diverses de les funcions de FAK contribueixen a la tumorogènesi mitjançant l'activació de diferents vies de senyalització. En els últims anys s'han fet molts esforços en la c de molècules petites amb capacitat per inhibir FAK, que podrien ser uns bons agents quimioterapèutics. Així, la inhibició de FAK en models murins disminueix el creixement tumoral, la metàstasi, la permeabilitat vascular i l'angiogènesi (X. L. Chen et al. 2012; Stokes et al. 2011; Walsh et al. 2010; Ward et al. 2013). La utilització conjunta d'inhibidors

Introducció

de FAK amb altres drogues citotòxiques o que actuen contra l'activitat angiogènica dels tumors demostra una efectivitat més alta d'actuar contra el tumor, recolzant la idea de que la inhibició de FAK sensibilitza a la mort cel·lular per altres agents quimioterapèutics (Y. Kang et al. 2013). Malgrat això, la habilitat de PYK2 per fer algunes de les funcions FAK, fa que calgui dissenyar inhibidors amb capacitat per inhibir totes dues proteïnes. Igualment ocorre amb les funcions de FAK independents del domini cinasa, les quals han de ser també tingudes en compte, ja normalment la funció de FAK com a proteïna adaptadora no es bloqueja després de la inhibició del domini catalític (Lim, Chen, et al. 2008). D'aquesta forma podem dividir les molècules contra FAK entre aquelles amb capacitat per inhibir el seu domini catalític i les que interfereixen amb la funció de proteïna adaptadora.

Els **inhibidors del domini catalític** de FAK són petites molècules que s'uneixen al voltant de la zona d'unió a l'ATP, fent que aquest no es pugui unir i realitzar la funció catalítica. Aquests es componen per un grup pirimidina (TAE226, PF-526,271 i PF-573,228 –el darrer utilitzat en aquest estudi) o per piridina (VS4718). En cultius cel·lulars i models animals tots tenen la capacitat de disminuir la autofosforilació del residu Y397 de FAK i reduir el moviment cel·lular, però no poden induir apoptosi in condicions de cultiu adherent (Slack-Davis et al. 2007; Tanjoni et al. 2010).

En l'actualitat s'estan desenvolupant altres tipus de components per a inhibir les funcions de FAK, que s'uneixen al domini catalític però no competeixen amb la unió de l'ATP (Tomita et al. 2013). A més, aquests han mostrat la capacitat de trencar les interaccions entre FAK i altres proteïnes, **inhibint així la funció de proteïna adaptadora**. Entre aquest trobem C4 capaç de bloquejar les interaccions d'altres proteïnes amb el domini C-terminal de FAK, Y15 que bloqueja l'accés al residu Y397 de FAK i R2 que evita la interacció amb p53 (Cance et al. 2013; Heinrich et al. 2013). Malgrat això, sols s'ha testat la seva efectivitat en models en xenografts.

Hi ha diverses farmacèutiques que han iniciat **assajos clínics** en fase I amb inhibidors de FAK. Una de elles Pfizer amb el compost PF526-271, ara nomenat VS-6062; en aquest estudi, alguns dels pacients mostren un estancament de la malaltia en càncers sòlids

(Infante et al. 2012). La farmacèutica Verastem va tancar un assaig en fase II, on testava l'efecte de VS-6063 en base a les mutacions en CDKN2A (codifica per INK4A i ARF) i p53. Aquest estudi mostra que tumors amb pèrdua de INK4A (p16) i ARF (p14ARF) en adenocarcinomes resulta en una la retroalimentació i activació de la senyalització de RhoA-FAK. De manera que inhibir FAK podria sensibilitzar les cèl·lules a altres quimioterapèutics (Konstantinidou et al. 2013). A més VS-6062 millora la sensibilitat a tractament amb taxane en càncer d'ovari en un estudi en fase I/Ib (Y. Kang et al. 2013).

Una de les evidències de que FAK podria ser una bona diana radica en el fet de que la seva inhibició afecta tant al tumor com al microambient (Tancioni et al. 2014). Donada la complexitat de la senyalització i funcions de FAK, sembla lògic pensar que el desenvolupament i aplicació de teràpies dirigides contra FAK necessitaran aproximacions multidisciplinàries que inclouran estudis en biologia cel·lular, models 3D i animals i desenvolupament de nous biomarcadors i fàrmacs. A més degut a aquesta complexitat, els esforços futurs haurien d'anar encaminats a tractaments combinats de FAK i d'altres de les vies que FAK pot modular, així com a la inhibició de la funció catalítica i de proteïna adaptadora de FAK (B. Y. Lee et al. 2015; Sulzmaier, Jean, and Schlaepfer 2014).

5. Autofàgia

El terme autofàgia prové dels termes grecs "*phagy*" que significa menjar i "*auto*" a un mateix (Z. Yang and Klionsky 2010). L'autofàgia es defineix com un conjunt de processos catabòlics evolutivament conservats i altament regulats, on components citoplasmàtics són lliurats als lisosomes per a ser degradats. Existeixen tres tipus de autofàgia: macroautofàgia, microautofàgia i autofàgia mitjançada per xaperones. La macroautofàgia (comunament anomenada autofàgia i de la que ens ocuparem aquí) implica la formació de vesícules amb doble membrana anomenades autofagosomes, que rodegen i engoleixen proteïnes citoplasmàtiques i orgànuls cel·lulars (el cargo). Aquests

Introducció

autofagosomes es fusionen amb els lisosomes per tal de formar autofagolisosomes, on el cargo és degradat per hidrolases contingudes en els propis lisosomes (Y. Chen and Klionsky 2011). En canvi, en la microautofàgia és el propi lisosoma el que produeix invaginacions que directament capturen el material a degradar. Finalment en l'autofàgia mitjançada per xaperones, les proteïnes que contenen un tetrapèptid senyal amb els aminoàcids KFERQ són reconegudes per una xaperona citoplasmàtica HSC70 (*Heat Shock Cognate 70kDa protein*). Aquesta xaperona és l'encarregada de promoure la translocació dels substrats a través de les membranes fins al lumen del lisosoma, mitjançant la interacció amb la proteïna LAMP2A (*Lysosomal Associated Membrane Protein 2A*) (Kaur and Debnath 2015).

Els autofagosomes es formen a partir dels fagòfors, estructures membranoses també nomenades membranes d'aïllament, l'origen de les quals continua encara en debat. La membrana plasmàtica, el reticle endoplasmàtic (ER), l'aparell de Golgi, o bé intermediaris entre aquest dos o inclòs les mitocòndries s'han proposat com a font per als fagòfors (Kruppa, Kendrick-Jones, and Buss 2016; Nascimbeni, Codogno, and Morel 2017). Els fagòfors són els encarregats de mitjançant la seva elongació atrapar el "cargo" per a ser degradat. Després del seu tancament, els autofagosomes es fusionen amb els lisosomes per formar els autofagolisosomes, on el cargo és exposat a l'activitat catalítica de hidrolases i proteases lisosomals. Els productes degradats, que inclouen sucres, nucleòsids/nucleòtids, aminoàcids i àcids grassos poden ser transportats de nou al citoplasma i ser utilitzats en el metabolisme cel·lular (Galluzzi et al. 2015), proporcionant fonts d'energia a la cèl·lula.

La maquinaria encarregada de l'autofàgia està altament conservada evolutivament i inclou l'acció de més de 30 proteïnes relacionades amb l'autofàgia (ATGs) (Hurley and Schulman 2014).

En situacions fisiològiques, els nivells basals d'autofàgia són importants per a mantenir l'homeòstasi cel·lular, que funciona com un sistema de control de qualitat intracel·lular. Aquesta es desenvolupa mitjançant la renovació d'òrgànuls danyats, agregats proteics i

renovació de proteïnes amb una vida mitjana molt llarga, que potencialment poden ser tòxiques per a la cèl·lula (Denton, Xu, and Kumar 2015).

A més a més, l'autofàgia pot ser induïda com a resposta a senyals d'estrès, com la privació de nutrients, la hipòxia, les espècies reactives de l'oxigen, infeccions de patògens o les drogues quimioterapèutiques. Actua així tant com a mecanismes primari de supervivència, reciclant material citoplasmàtic per la producció d'energia o per a l'eliminació de proteïnes que puguin causar algun tipus de dany a la cèl·lula. Així mateix, una inhibició genètica o farmacològica de la autofàgia, limita la capacitat de la cèl·lula per adaptar-se a l'estrès i restablir l'homeòstasi, podent desembocar en mort cel·lular dependent de autofàgia (Galluzzi et al. 2015).

5.1. Mecanisme autofàgic

L'autofàgia pot ser dividida en diferents parts: inducció, nucleació, elongació de l'autofagosoma i finalment la fusió entre l'autofagosoma i el lisosoma, on es degrada el cargo seguit per la translocació dels productes degradats al citosol (He and Klionsky 2009) (Fig. 16).

Inducció- Els nivells basals d'autofàgia en les cèl·lules són baixos en condicions normals, però és molt important que en situacions d'estressos o estímuls extracel·lulars la cèl·lula sigui capaç d'adaptar-se a aquesta situació a través d'una inducció i regulació eficient del flux autofàgic (com ocorre en les cèl·lules canceroses). La cinasa serina/treonina mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) és l'efector principal de l'autofàgia. Quan mTOR està actiu és capaç d'inhibir l'autofàgia mitjançant la interacció amb el complex ULK i la fosforilació directa de la proteïna ULK1. El complex ULK està format per ULK1/2 (els ortòlegs en mamífers de ATG1), ATG13, FIP200 (ATG17; també coneguda com RB1CC1) i ATG101. Per contra, la inhibició de mTOR produeix la seua dissociació del complex d'ULK, produint un canvi en la fosforilació de ULK1 i la seva activació catalítica. Aquesta activació produeix la fosforilació de ATG13 i FIP200 i conseqüentment l'inici de l'autofàgia.

Introducció

Nucleació- El complex format per Beclin1, Vps34 i ATG14L és l'encarregat d'iniciar el procés de nucleació. Quan l'autofàgia està activa, el complex ULK produeix el reclutament del complex Beclin-Vps34 donant lloc a la formació de l'autofagosoma, mitjançant la fosforilació d'Ambra1. A la seva vegada Ambra1 interacciona amb TRAF6 (ubiquitina lligasa E3) reforçant l'estabilització d'ULK mitjançant la seva ubiquitinització. Així, l'activitat del complex ULK reforçada facilitarà l'activitat del complex Vps34-ATG14L fosforilant directament Beclin. Finalment, Vps34 produeix fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) que funciona com a lloc de reclutament d'altres proteïnes efectores (DFCP1, WIPI) essencials per a la iniciació de la nucleació de la doble membrana de la vesícula (Kook Hwan Kim and Lee 2014; Kroemer, Mariño, and Levine 2010).

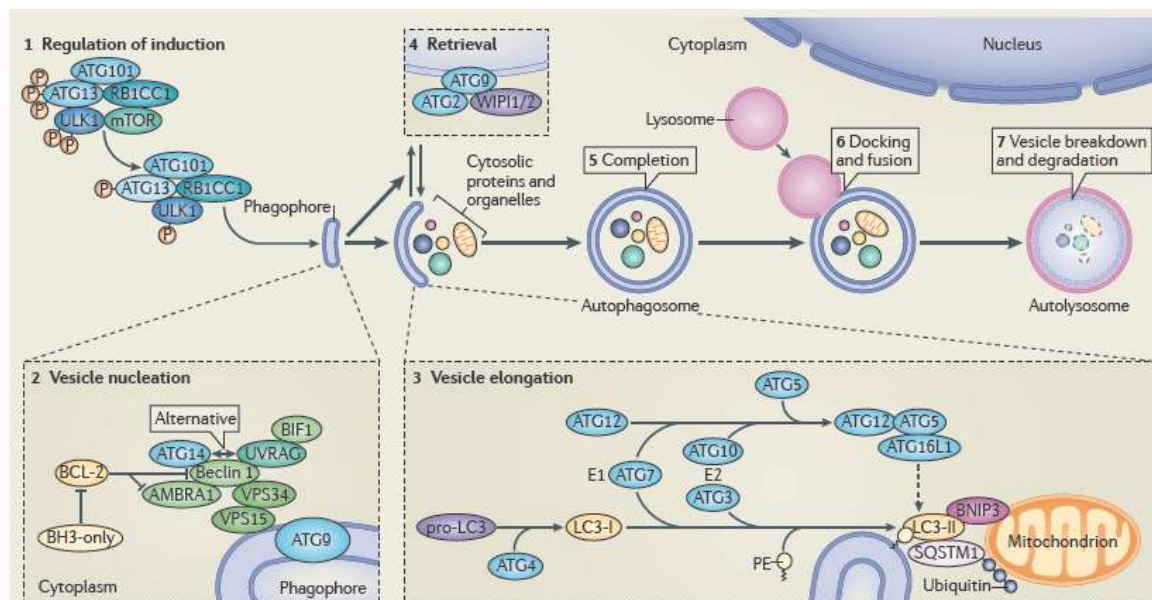


Figura 16: Visió general de la maquinària autofàgica, on es poden observar les diferents fases (Füllgrabe, Klionsky, and Joseph 2014)

Proteïnes amb funció antiapoptòtica com BCL-2, Bcl-X_L i Mcl-1 són importants reguladors negatius de l'autofàgia mitjançant la interacció entre els seus dominis BH3 i els de Beclin, i inhibint conseqüentment la seva funció i l'autofàgia (R. Kang et al. 2011). D'altra banda, l'autofàgia pot ser també induïda independentment de mTOR, mitjançant la fosforilació directa d' AKT i EGFR sobre Beclin (R. C. Wang et al. 2012; Y. Wei et al. 2013).

Elongació de la vesícula- L'expansió i tancament de l'autofagosoma es produeix mitjançant diverses proteïnes ATG, que es poden dividir en dos sistemes de conjugació:

ATG12-ATG5-ATG16L i ATG8(LC3)-fosfatidiletanoalamina(PE). En el primer sistema, ATG12 és covalentment conjugada a ATG5 mitjançant l'acció de ATG7 i ATG10. Aquesta unió s'organitza en un complex mitjançant la unió no covalent amb ATG16L, formant el complex multimèric ATG12-ATG5-ATG16L amb funció de lligasa E3 sobre LC3. Aquest primer complex produirà la conjugació del segon complex.

El segon sistema de conjugació comporta la unió de PE a un residu Glicina de LC3. El procés s'inicia amb les accions seqüencials de diverses proteases, primer ATG4 (que talla pro-LC3 a LC3) i posteriorment d'ATG7 i ATG3. Finalment, el complex format per tots dos sistemes de conjugació serà l'encarregat de produir la unió de PE a LC3 per a formar LC3-PE (o LC3-II). Aquesta forma lipidada de LC3 (LC3-II) s'associa de forma estable a les membranes dels autofagosomes, participant en la formació i elongació dels autofagosomes. La monitorització de LC3 tant per microscòpia com per Western blot és una de les principals eines per estudiar l'autofàgia (Mizushima, Yoshimori, and Levine 2010).

Fusió i degradació- La unió de les proteïnes i orgànuls que són inclosos als autofagosomes per a ser degradats és facilitada per receptors o proteïnes adaptadores, com sequestosoma-1 (SQSMT1 o p62) optineurin, NDP52, NBR1 i Alfy. Aquestes proteïnes adaptadores funcionen com a pont entre la fracció de LC3-II ancorada a la membrana interna de l'autofagosoma i les proteïnes o agregats a ser degradats.

Els autofagosomes madurs es fusionen amb els lisosomes per formar autofagolisosomes (o autolisosomes), on tot el contingut és degradat per l'acció d'enzims lisosomals. El contingut degradat torna al citosol mitjançant permeases, de manera que els productes resultants són reincorporats al metabolisme cel·lular. Les proteïnes SNARE han sigut proposades com a les responsables d'aquesta fusió entre els autofagosomes i els lisosomes (R. Liu, Zhi, and Zhong 2015; Y. Wang et al. 2016). Així mateix, juntament amb el cargo, també són degradades les proteïnes adaptadores i la fracció de LC3-II que es troba localitzada en la membrana interna del autofagosoma. Per contra, la fracció de LC3-II que es troba en la part externa serà reciclada (Klionsky et al. 2016; Knævelsrud, Carlsson, and Simonsen 2013; Zois et al. 2011).

5.2. Autofàgia selectiva

L'autofàgia ha estat considerada durant molt de temps com un procés de degradació no selectiu de components citoplasmàtics en condicions de privació de nutrients. Es calcula que aproximadament entre 1-1,5% de les proteïnes cel·lulars són catabolitzades per hora mitjançant l'autofàgia, inclòs en condicions de disponibilitat de nutrients. Actuant per tant, a nivell basal, com un sistema de control dels components citoplasmàtics, i amb un paper clau en l'homeòstasi de diversos tipus cel·lulars post-mitòtics com neurones i hepatòcits. Encara que aquest sistema de control s'aconsegueix parcialment mitjançant l'autofàgia no-selectiva, cada vegada més estudis suggereixen un paper molt important per a l'autofàgia selectiva (Mizushima and Komatsu 2011).

En els últims anys s'han descrit diversos tipus d'autofàgia selectiva, ja que sota determinades condicions els autofagosomes poden degradar exclusivament: mitocondris, peroxisomes, RE, endosomes, lisosomes, lípids, agregats citoplasmàtics o inclús patògens

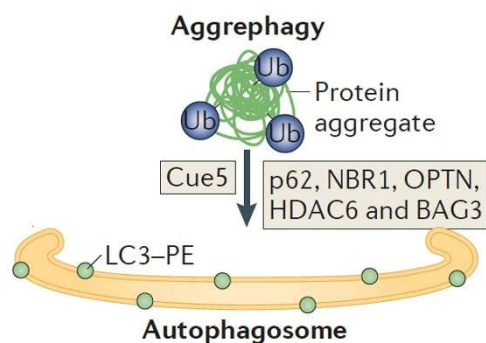


Figura 17: Visió general de la agregofàgia i de les seves proteïnes adaptadores. Adaptat de Kaur and Debnath 2015

(Boya, Reggiori, and Codogno 2013).

L'autofàgia selectiva es desenvolupa gràcies a l'acció d'adaptadors autofàgics que són capaços de reconèixer senyals en el cargo a ser degradat. En mamífers, es troben freqüentment marcats amb ubiquitina. Els adaptadors solen tindre un domini d'unió a ubiquitina (UBD) i un domini d'interacció amb LC3 (LIR), el qual facilita la unió a LC3. Com a resultat, aquests adaptadors actuen com a

punts que incorporen les proteïnes marcades per ubiquitinització a les vies de degradació autofàgica (Kaur and Debnath 2015). Un dels exemples més importants són aquelles proteïnes adaptadores que participen en la degradació d'agregats proteics, un fenomen que es coneix per agregofàgia, i que és dependent dels dominis UBD i LIR (Fig. 17). Entre aquests adaptadors trobem p62, NBR1 (*Next to BRCA1 gene 1 protein*) i HDAC6 (*Histone*

Deacetylase 6). A més de l'agregofàgia, la autofàgia selectiva també és important per a la degradació d'òrgànuls. Per exemple, els mitocondris malmesos són degradats en un procés anomenat mitofàgia. Diversos estudis han suggerit la importància de BNIP3 (*BCL2/adenovirusE1B 19kDa interacting protein 3-Atg32*), NIX (*NIP3-like protein X*) i FUNDC1 (*FUN14 domain-containing protein 1*) en aquest procés, ja que aquestes proteïnes tenen motius LIR que dirigeixen els mitocondris cap als autofagosomes (Chourasia et al. 2015; Wu et al. 2016).

P62



Figura 18: Estructura de la proteïna adaptadora p62.

P62 (SQTSM) és una proteïna de 440 aminoàcids que conte un domini terminal PB1, seguit d'un domini *ZZ-type zinc finger*, una senyal de localització nuclear (NLS), una d'export nuclear (NES), motius LIR i KIR (regió d'interacció amb KEAP1) i un domini UBD (Fig. 18). El domini PB1 és un domini d'interacció proteïna-proteïna que li permet interaccionar amb altres proteïnes, però també de homopolimeritzar. Curiosament, p62 també conté senyals d'import i export nuclear que permetrien a p62 moures entre el nucli i el citoplasma. D'altra banda, el domini UBA facilita la unió a proteïnes mono- i poli-ubiquïtinitzades, encara que sembla que té predilecció per la mono-ubiquïtina (Fig. 18) (Moscat and Diaz-meco 2013). Una de les principals funcions que desenvolupa p62 és en l'autofàgia, on és un adaptador selectiu de proteïnes que són constantment degradades per l'autofàgia, mitjançant la seva interacció directa amb el domini LIR de LC3. Un model simplificat mitjançant el qual p62 desenvolupa la seva funció selectiva en l'autofàgia estaria dividit en: (1) el substrat a ser degradat necessita ser reconegut per xaperones moleculars o altres sistemes per tal de entrar en la via de degradació mitjançant autofàgia; (2) aquest substrat serà ubiquïtinitzat; (3) p62 és reclutada, interaccionant amb la proteïna ubiquïtinitzada, que comportarà la seva acumulació en forma de agregats proteics i (4) finalment mitjançant la interacció amb LC3 present al fagòfor,

l'autofagosoma creixerà al voltat del substrat, on serà degradat (Johansen and Lamark 2011).

5.3. Regulació de l'autofàgia

Regulacions post-traduccionals

Diverses vies de senyalització i proteïnes modulen l'autofàgia en resposta a estímuls cel·lulars i ambientals. El regulador de l'autofàgia millor caracteritzat és el complex mTOR1. És tracta d'una cinasa serina/treonina que regula el creixement cel·lular mitjançant la inducció de processos anabòlics com la traducció de proteïnes quan hi ha abundància de nutrients, mitjançant la inducció de la cinasa S6 (S6K), EIF4e, 4E-BP1 i d'altres. Pel contrari, en escassetat de nutrients, mTOR regula positivament l'autofàgia mitjançant la inhibició de l'activitat del complex de ULK1 per fosforilació. L'activitat de mTOR està activada per diversos estímuls anabòlics, que inclouen l'estat energètic i metabòlic, així com la presència d'aminoàcids i factors de creixement. mTOR és inhibida quan hi ha escassetat de aminoàcids o nutrients, quan la senyalització dels factors de creixement està inhibida o quan la concentració d'ATP cau; aleshores, consegüentment, es produeix la inducció de l'autofàgia (Fig. 19) (Boya, Reggiori, and Codogno 2013).

Una de les vies més importants que activa mTOR s'inicia quan diversos factors de creixement, com el factor de creixement de la insulina (IGF) s'uneix al receptor de la insulina (IGFR). Aquest receptor s'activa i senyalitza mitjançant la seva activitat tirosina cinasa, activant els substrats receptors de la insulina (IRS1 i IRS2), que a la seva vegada activen AKT. A més, també poden activar RAS, activant a la seva vegada una cascada que finalitzarà amb l'activació de les ERK1/2. AKT i ERK1/2 inhibeixen l'activitat del complex TSC1/TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex*), regulador negatiu de mTOR. D'aquesta manera la senyalització per IGF1R activa mTOR, inhibint a la seva vegada l'autofàgia, oposadament al que ocorre quan hi ha manca de nutrients (He and Klionsky 2009; Kroemer, Mariño, and Levine 2010).

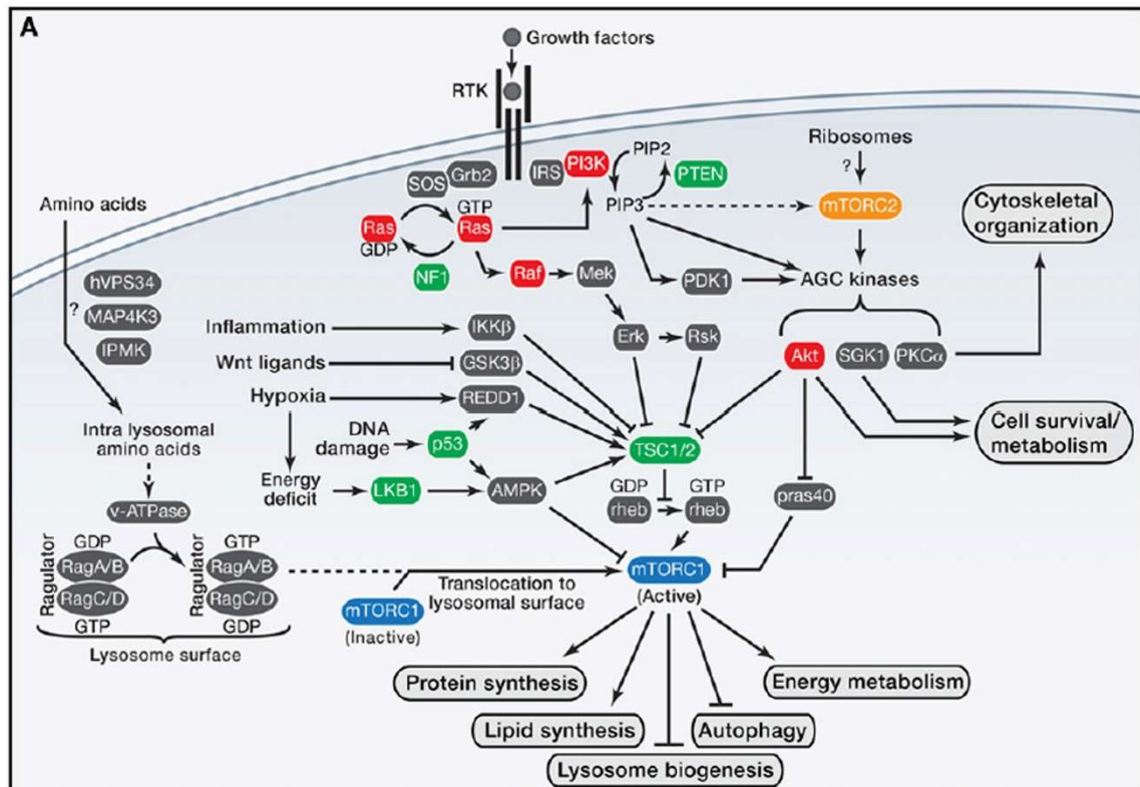


Figura 19: Representació esquemàtica de la via de senyalització mTOR. L'autofàgia és negativament regulada per mTOR, que integra processos anabòlics. mTOR pot ser inhibida per Rapamicina, Torin i PP242 que a la seva volta indueixen autofàgia (Saxton and Sabatini 2017).

L'activitat de mTOR també pot ser regulada mitjançant la família de les Rag GTPases que controlen la localització de mTOR en la superfície lisosomal, juntament amb la proteïna Raptor. En condicions de privació de nutrients, mTOR1 es dissocia dels lisosomes on resideixen els seus activadors directes, quedant inhibida (Rubinsztein, Mariño, and Kroemer 2011). P53, que es troba comunament mutat en càncer, i també en glioma, pot regular tant positivament com negativament l'autofàgia mitjançant la via mTOR i la seva localització cel·lular. Els estressos oncogènics o genotòxics estableixen i activen p53 nuclear, induint l'activació de l'autofàgia mitjançant l'activació d'AMPK o bé per la sobrerregulació de PTEN, regulador negatiu de AKT i TSC1 (Rubinsztein, Mariño, and Kroemer 2011). A més a més, la fracció nuclear de p53 induïx l'autofàgia mitjançant la regulació transcripcional de gens autofàgics. D'altra banda, la inhibició de p53 en la seva

Introducció

localització citoplasmàtica sembla activar l'autofàgia, per mecanismes que no es coneixen; a la seva vegada, l'autofàgia sembla eliminar el pool citoplasmàtic de p53 (Füllgrabe, Klionsky, and Joseph 2014).

Un altra via implicada en la regulació de l'autofàgia és la mitjançada per les interaccions entre Beclin-1 i les proteïnes apoptòtiques Bcl-2 o Bcl-XL. La privació de nutrients activa la cinasa N-terminal de c-Jun (Jnk-1), que fosforila Bcl-2, trencant la interacció entre Beclin i Bcl-2 i induint l'autofàgia. Aquest mecanisme també està implicat en la regulació de l'autofàgia induïda per estrès de reticle (R. Kang et al. 2011; Rubinsztein, Mariño, and Kroemer 2011).

L'autofàgia també pot ser directament activada per AMPK, la qual és activada quan els nutrients són escassos o quan la proporció AMP/ATP augmenta, produint l'activació de ULK1. L'activació d'AMPK també pot induir l'autofàgia mitjançant la inhibició de mTOR, mitjançant la fosforilació de TSC1/TSC2 (Rubinsztein, Mariño, and Kroemer 2011).

Regulació transcripcional

Tradicionalment la regulació de l'autofàgia s'havia enfocat des del punt de vista del citoplasma, mitjançant les modificacions post-traduccionals induïdes pels diversos reguladors i components que participen en l'autofàgia. Aquesta primera línia de regulació és important degut a la rapidesa amb la que pot induir l'autofàgia en resposta a diversos estímuls. En l'actualitat, no obstant, s'ha posat èmfasis en la regulació a nivell nuclear i s'ha ressaltat que quan la resposta a aquest estímuls ha de ser prolongada no n'hi ha prou amb regulacions post-traduccionals i és aleshores quan s'activa una regulació de l'autofàgia a nivell transcripcional. Diversos factors de transcripció regulen l'expressió d'elements essencials per a desenvolupar l'autofàgia com poden ser LC3 o Beclin, així com reguladors d'aquests (BNIP, DRAM). Aquest és un camp que està en les fases inicials del seu desenvolupant, però a continuació es resumiran alguns dels reguladors transcripcionals més importants per a aquest treball.

Foxo. La família dels factors de transcripció *Forkead Box O* (FOXO) és una de les que controlen l'autofàgia. Mitjançant la seva regulació per fosforilació es controla la localització nuclear d'aquesta proteïna, promovent l'autofàgia mitjançant la regulació

transcripcional de diversos gens implicats en la mecanisme de l'autofàgia (ATG5, ATG12, LC3...) (Pietrocola et al. 2013)

L'eix RB1–E2F. La família de factors de transcripció E2F poden ser dividits depenent de la seva funció en activadors o repressors de la transcripció. Un dels membres d'aquesta família E2F1 desenvolupa una funció central en l'autofàgia, ja que entre els seus gens diana es troben gens pro-autofàgics i per tant, la seva activació produeix la inducció de l'autofàgia. Un dels mecanismes pels que ho fa és mitjançant la regulació de BNIP3 (Tracy et al. 2007), un regulador clau de l'autofàgia que trenca la unió entre BCL-2 i Beclin, modulant-la positivament (Füllgrabe, Klionsky, and Joseph 2014).

Ume6, que controla l'expressió d'ATG8. Ume6 és un factor de transcripció que pot activar o reprimir diversos gens durant el creixement i del desenvolupament meiótic. Delecions en *Ume6* incrementen en gran mesura els nivells d'expressió d'Atg8 (LC3 en mamífers). Ume6 sembla unir-se a la regió promotora d'Atg8, per reprimir-lo mitjançant el reclutament d'un complex que inclou el co-repressor Sin3 i de la histona deacetilasa Rpd3. Encara que en mamífers no s'han trobat homòlegs d'Ume6, sí que s'han trobat per SIN3. En mamífers, una delecio de l'homòleg de SIN3 produeix també un increment en els nivells d'expressió de LC3 (Füllgrabe, Klionsky, and Joseph 2014).

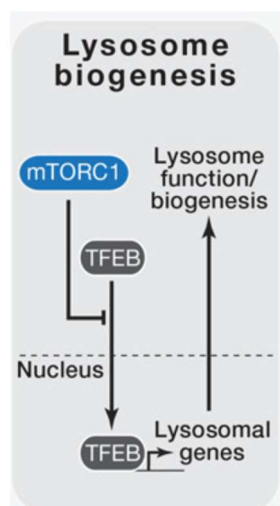


Figura 20. Senyalització per mTOR i TFEB en la biogènesi lisosomal (Laplante and Sabatini 2012).

El màster regulador TFEB . L'autofàgia necessita la cooperació dels autofagosomes i els lisosomes. El Factor de Transcripció EB (TFEB) és un dels reguladors principals de la biogènesi i la funció dels lisosomes. TFEB promou la transcripció de diversos gens lisosomals, a través de la unió directa als seus promotors. A més a més, TFEB també sobreregula l'expressió de proteïnes implicades en les principals fases de l'autofàgia (LC3, p62, ATG9B).

Sota condicions basals TFEB es troba en el citoplasma, més concretament en la superfície dels lisosomes associat a mTOR. Aquí, mTOR el reté

Introducció

mitjançant la seva continua fosforilació. En canvi, en condicions d'inducció d'autofàgia, mTOR s'inhibeix i es desplaça del lisosoma, fent que TFEB no sigui fosforilat, el qual aleshores transloca a nucli, on indueix transcripció de gens diana. Així per exemple, la sobreexpressió de TFEB en el fetge produeix una inducció de l'autofàgia similar a la que es produeix en condicions de privació de nutrients (Settembre et al. 2013).

5.4. El paper de l'autofàgia en càncer

El paper dual de l'autofàgia en Càncer

Donada la importància de l'autofàgia en la regulació de la homeòstasis cel·lular, degradant per una banda proteïnes no funcionals i per l'altra fent front a estressos, no és estranya la implicació que té la seva desregulació en diverses patologies, entre les quals cal destacar el càncer.

L'autofàgia en càncer pot tenir un paper dual. Per una banda, pot actuar com a supressor tumoral en estadis inicials de la malaltia, desenvolupant una funció pro-mort. Evitaria, així, la transformació cancerosa mitjançant la degradació de components cel·lulars perjudicials que poden produir dany al DNA. D'altra banda, també pot afavorir la progressió tumoral en estadis més avançats, funcionant com a mecanisme adaptatiu de supervivència cel·lular. D'aquesta manera, ajuda a les cèl·lules canceroses a sobreviure en manca de nutrients o fent front a estressos induïts pel tractament, com ara la radiació i agents quimioterapèutics. Per tant, la funció de l'autofàgia en càncer és complexa i dependent de l'estadi i de la seva localització; en estadis inicials sol tenir un paper protector i per tant en molts càncers al principi de la progressió tumoral es troba inhibida, però en estadis més avançats actua com a pro-supervivència i per tant es sol trobar activada.

Supressió Tumoral

L'autofàgia és un mecanisme homeostàtic que quan es troba desregulat pot promoure i accelerar la tumorigènesi. L'autofàgia funciona com a supressor tumoral eliminant òrgànuls i proteïnes danyades que contribueixen a la inestabilitat genètica, així com

limitant el creixement cel·lular. En diversos models murins, defectes en la maquinària autofàgica, causada per la pèrdua en heterozigosi o homozigosi de gens essencials per l'autofàgia accelera l'oncogènesi. Per exemple, ratolins amb pèrdua en heterozigosi de Beclin1 (els ratolins amb pèrdua en homozigosi no són viables) produeixen l'aparició de lesions neoplàsiques, incloent limfomes i carcinomes de pulmó i fetge. D'acord amb això, la pèrdua de Beclin1 es troba present en el 75% dels càncers d'ovari i entre el 50-70% dels de pit (Panda et al. 2015).

Diversos mecanismes poden explicar, almenys en part, la funció onco-supressiva de l'autofàgia. Una correcta resposta autofàgica pot suprimir l'**acumulació de defectes genètics i genòmics**, que afavoreix la transformació oncogènica per diferents mecanismes. Les espècies reactives de l'oxigen (ROS) són altament genotòxiques, i la autofàgia preveu la seva sobreproducció eliminant mitocondris defectuosos, així com els agregats redox-actius i les proteïnes ubiquïtinitzades. Aquesta tipus d'autofàgia preveu el dany a DNA (Panda et al. 2015).

Un altre dels mecanismes mitjançant el qual l'autofàgia actua com a supressor tumoral és mitjançant la **senescència** induïda per oncògens. La senescència és un procés que implica l'aturada del cicle cel·lular d'una manera en principi irreversible, limitant així la proliferació de les cèl·lules transformades pels oncogens. D'aquesta manera la inducció de l'autofàgia per estressos oncogènics o dany al DNA pot desencadenar en senescència, com a mecanisme per evitar el càncer. En fibroblasts en què l'autofàgia ha estat activada com a conseqüència d'oncògens (BRAF^{V600E} i HRAS^{G12V}), la deleció de gens essencials en l'autofàgia (ATG5 i ATG7) preveu la senescència causada per aquests oncogens, posant de manifest la necessitat de l'autofàgia per a induir senescència. Per contra, la sobreexpressió d'ULK1 i ULK3 (necessaris en la inducció de l'autofàgia) produeix la inducció d'autofàgia acompanyat de fenòmens senescent. Aquest resultats suggereixen que l'autofàgia basal juga un paper important limitant el creixement cel·lular i la proliferació a través d'autofàgia quan es produeix un estrès oncogènic o dany al DNA, evitant així la transformació tumoral de les cèl·lules (Galluzzi et al. 2015; Panda et al. 2015). L'autofàgia està fortament implicada en el manteniment de la **homeòstasi**

metabòlica. La transformació cancerosa normalment es desenvolupa a la vegada que es produeixen canvis en el metabolisme, que passa de ser principalment catabòlic cap a un altre tipus on: (1) es produeix un augment del consum de la glucosa per poder mantenir el metabolisme anabòlic; (2) la respiració mitocondrial es manté alta per poder satisfer la demanda d'energia, (3) diversos aminoàcids com la serina i la glutamina es tornen essencials com a conseqüència de l'alta demanda metabòlica. L'autofàgia preserva les funcions bioenergètiques mitjançant la renovació de mitocondris disfuncionals, contrarestant aquest canvi metabòlic a nivell de mitocondris que comporta la transformació cancerosa (Galluzzi et al. 2015). A més a més, la degradació autofàgica de p62 participa en un feedback negatiu que regula l'activació de mTOR en resposta a la disponibilitat de nutrients (Linares et al. 2013; Valencia et al. 2014)

En resum, aquestes observacions suggereixen que l'autofàgia preveu la transformació cancerosa preservant la homeòstasi cel·lular en condicions que la posen en risc degut a l'oncogènesi.

L'autofàgia en la progressió tumoral

La resposta autofàgica normalment ajuda al creixement i la progressió dels tumors ja establerts, reduint la seva sensibilitat tant a estímuls intrínsecs de la cèl·lula com als de l'ambient, que en situacions normals o fisiològiques portarien a la mort cel·lular. Així ho recolza el fet que en tumors ja establerts, defectes en l'autofàgia produeixen una disminució en proliferació, disseminació i en la capacitat metastàtica de les cèl·lules malignes (Galavotti et al. 2013; Gong et al. 2014; Kaminsky et al. 2012; Macintosh et al. 2012). Estudis en ratolins mostren que la deleció de gens essencials per l'autofàgia (Atg5 i Atg6) desenvolupen neoplàsies més freqüentment que els ratolins *Wild Type*, però aquestes neoplàsies són menys malignes, amb defectes en la progressió tumoral, desenvolupant tumors amb millor pronòstic.

L'autofàgia sol estar activada en tumors a causa de diversos estressos com: privació de nutrients, inhibició de factors de creixement, hipòxia, estímuls perjudicials o la inhibició del proteosoma. En la gran majoria dels casos la inducció de l'autofàgia promou i permet la supervivència front a aquests estressos. La supervivència autofàgica en resposta a

absència de factors de creixement o en situacions de estressos metabòlics és més important en aquelles situacions en que l'apoptosis està compromesa. En aquestes situacions les cèl·lules entren en un estat d'inactivitat i quiescència, sobrevivint latents durant setmanes i finalment reiniciant el creixement cel·lular quan les condicions deixen de ser adverses (White 2012).

L'**isquèmia** (privació de glucosa i d'oxigen) és un dels estressos fisiològics més típics que es donen en el tumor. En aquestes situacions les cèl·lules canceroses sobregulen l'autofàgia per tal de permetre la seva supervivència. Les cèl·lules tumorals que es troben en zones hipòxiques comunament solen tenir un major nombre d'autofagosomes, suggerint una inducció de l'autofàgia. En aquestes cèl·lules, la deleció de gens essencials per l'autofàgia produeix mort cel·lular. Aquest fet indica la capacitat de les cèl·lules per induir l'autofàgia com a mecanisme de supervivència, promovent així la tumorigènesi.

D'altra banda, les cèl·lules canceroses aïllades de tumors ja establerts i sotmeses a inhibició genètica o farmacològica de l'autofàgia són més sensibles a estímuls externs que les que no han sigut manipulades. Així, estudis previs mostren que tumors deficients per l'autofàgia són més sensibles a agents quimioterapèutics que els no deficients.

Un altre tipus de resposta que poden desenvolupar les cèl·lules canceroses quan són tractades amb terapèutics és la **senescència**. Encara que durant la senescència les cèl·lules no proliferen, poden en canvi, ser les responsables de la recaiguda del pacient en la malaltia mitjançant l'alliberament de citocines pro-inflamatòries i mitogèniques en el microambient (desenvolupament de la senescència associada a un fenotip secretor, SASP). Aquestes cèl·lules degut al seu estat latent són molt dependents de l'autofàgia per sobreviure, i per tant, a tractaments amb inhibidors farmacològics de l'autofàgia. El subministrament d'aquests juntament amb els quimioteràpics tradicionals mostren un efecte sinèrgic en models de limfoma, que són més susceptibles al bloqueig de l'autofàgia en haver adquirit un fenotip SASP en resposta a la quimioteràpia (Galluzzi et al. 2015).

Introducció

Tots aquests punts semblen suggerir que l'autofàgia és un mecanisme de suport a la progressió de les neoplàsies ja establertes i per tant la inhibició farmacològica de l'autofàgia pot ser una bona estratègia per combatre el càncer (Galluzzi et al. 2015).

L'autofàgia com a mecanisme de mort cel·lular

A més, de la funció citoprotectora que desenvolupa l'autofàgia, en els últims anys s'ha descrit una funció de l'autofàgia associada a mort cel·lular, donat que característiques del procés autofàgic s'han trobat en cèl·lules que estan morint. Els estressos perllongats o l'autofàgia sostinguda poden dirigir a mort cel·lular quan el reciclatge de proteïnes o orgànuls supera la capacitat de renovació de la cèl·lula (Z. J. Yang et al. 2011). L'autofàgia pot produir mort cel·lular mitjançant la inducció de la apoptosi o necrosis o bé, desencadenar una mort independentment d'aquestes mitjançant un tipus de mort associat i dependent d'autofàgia (Tsujimoto and Shimizu 2005).

L'apoptosi és un tipus de mort cel·lular programada, caracteritzada per un conjunt de canvis morfològics incloent condensació i fragmentació nuclear, així com la formació de bombolles en la membrana nuclear que conduirà a la formació de cossos apoptòtics. L'apoptosi ve acompanyada per canvis en les característiques bioquímiques de la cèl·lula, incloent la permeabilització de la membrana mitocondrial externa, l'activació de les Caspases efectores (Casp3, Casp6 i Casp7) i l'activació de hidrolases catabòliques que degradaran la major part de les macromolècules cel·lulars, incloent el DNA (revisat per Mariño et al. 2014).

Encara que l'autofàgia i l'apoptosi estan sota l'estrict control de diverses vies de senyalització, aquests dos processos també es regulen creuadament l'un a l'altre, principalment d'una forma inhibítoria, però també hi ha exemples on l'autofàgia es capaç de induir l'apoptosi (revisat per Jain et al. 2013; Marino et al. 2014; Mukhopadhyay et al. 2014; Ojha, Ishaq, and Singh 2015).

Hi ha dos proteïnes principals implicades en la relació entre autofàgia i apoptosi; una és

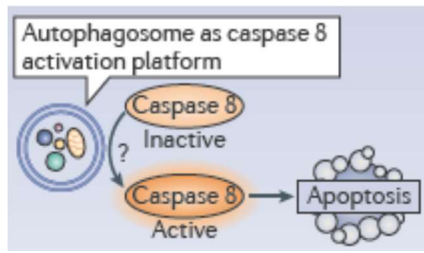


Figura 21. Paper dels autofagosomes en l'activació de la Casp8 (Mariño et al.

p62 i l'altra el supressor tumoral Beclin1. p62 és una proteïna clau en la degradació selectiva de moltes proteïnes (i mitocondris) durant l'autofàgia, interaccionant amb diverses proteïnes implicades en les vies apoptòtiques o de supervivència, que inclou la Casp8, TRAF6 (que modula la via de supervivència per la via NF- κ B) i ERK. La interacció entre p62 i Casp8 és

especialment interessant perquè p62 és important per l'activació de Casp8, mitjançant la formació d'una plataforma en la superfície dels autofagosomes que produeix el processament de Casp8 d'una forma dependent de p62 (Fig. 21) (M. M. Young et al. 2012). D'altra banda, la Casp8 també talla p62 com a resposta a l'activació de receptors de mort. A més a més, recentment s'ha descrit que la Casp8 és un dels substrats que es degrada per autofàgia (presumiblement via p62). Aquest fet crea un paradigma on autofàgia i apoptosi estan involucrades en un complicat balanç, on per una banda, l'autofàgia altera l'extensió i la velocitat de la apoptosi, i per l'altra l'apoptosi altera la degradació autofàgica de p62 i dels seus "cargos" selectius entre els que trobem Casp8.

D'altra banda, Beclin1 interacciona directament amb la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2. Quan Bcl-2 i Beclin1 estan unides, Beclin1 és incapaç d'activar l'autofàgia. L'autofàgia és induïda quan aquesta interacció es desfà per l'efecte de les proteïnes pro-apoptòtiques amb dominis BH3 (R. Kang et al. 2011). Un altre mecanisme que depèn de Beclin1, mitjançant el qual l'apoptosi pot inhibir l'autofàgia és el trencament que produeix la Casp3 sobre Beclin1, produint un fragment truncat de Beclin1 incapaç d'induir autofàgia, i per tant romanent aquesta inhibida. Així, la regulació de Beclin1 per diferents components apoptòtics pot tant promoure com inhibir l'autofàgia, depenent de les activitats de les proteïnes BH3 i de Caspases (Gump and Thorburn 2011).

L'autofàgia en Glioma

L'opinió actual que és té de la funció que desenvolupa l'autofàgia en tumorigènesi és que pot actuar tant com a supressor tumoral com a promotor d'aquesta, depenent de l'estadi de la malaltia, del tipus tumoral i el context.

En el cas dels tumors cerebrals, els nivells citoplasmàtics de proteïna i de mRNA de Beclin1 són més baixos en GBM comparats amb astrocitomes de baix grau o teixit cerebral normal. A més a més, alts nivells citoplasmàtics de Beclin1 són un factor de bon pronòstic, que es correlaciona amb una millor supervivència dels pacients, mentre que nivells baixos de Beclin1 correlacionen amb un increment de la proliferació cel·lular i disminució de l'apoptosi

Sorprenentment, en GBM els nivells alts d'expressió de LC3 estan associats amb una millora de la supervivència en aquells pacients on la resta de paràmetres suggereixen un mal pronòstic. En canvi, en aquells pacients amb un pronòstic dintre de la mitjana, baixos nivells de LC3 augmenten la seva supervivència.

Per tant, i donats els baixos nivells de Beclin i LC3 que troben en els astrocitomes de alt grau, la disminució en el flux autofàgic pot ser un dels mecanismes que condueixen a la progressió tumorigènica dels tumors astrocitaris (Kaza, Kohli, and Roth 2012).

Existeixen també evidències indirectes que recolzen la rellevància de l'autofàgia en glioma. Gens com EGFR, Neurofibromatosis (NF1), PTEN, AKT i TP53 que es troben freqüentment alterats o mutats en tumors cerebrals desenvolupen un paper important en l'autofàgia. El receptor tirosina cinasa EGFR, que normalment es troba amplificat en glioma, és capaç de suprimir l'autofàgia, mitjançant el control dels nivells intracel·lulars de glucosa. Mutacions en PTEN i NF1 són comunes en glioma i produeixen una activació constitutiva de la senyalització per PI3K/AKT/mTOR, la qual suprimeix l'autofàgia. p53 és una altre supressor tumoral que freqüentment es troba alterat en tumors cerebrals i que pot tenir un paper dual sobre l'autofàgia, inhibint-la o promovent-la depenent de la seva localització.

En el context dels tumors cerebrals, les mutacions o alteracions en supressors tumorals acostumen a regular positivament l'autofàgia, suggerint que l'autofàgia té un paper com

a supressor tumoral en tumors cerebrals. Els gens implicats en autofàgia en glioma (a part de Beclin1 i LC3) han estat poc investigats.

Són necessaris més estudis per aclarir el paper de l'autofàgia com a marcador de pronòstic i com a possible eina terapèutica (Kaza, Kohli, and Roth 2012).

5.5. Modulació de l'autofàgia en assaigs clínics

La desregulació de l'autofàgia, causada per vies de senyalització activades en càncer és un procés comú en molts càncers. En la teràpia anti-neoplàsica clàssica, l'autofàgia resulta induïda en les cèl·lules canceroses com a resposta adaptativa per promoure la supervivència cel·lular. D'altra banda, en certes condicions, l'autofàgia és necessària per produir l'efecte citotòxic causat per les drogues anti-tumorals. La modulació de l'autofàgia representa una nova aproximació terapèutica per millorar l'eficàcia dels tractaments contra el càncer, posant èmfasi en la identificació de nous fàrmacs que la puguin tant induir com bloquejar. Diverses drogues aprovades per la FDA (*Food and Drug Administrations*) identificades com a inductores (per exemple rapamicina, fluspirilente, pimozone) o inhibidores (cloroquina, hidroxicloroquina, verteporfin) de l'autofàgia han estat portades a assaigs clínics.

Objectius

Context i objectius

Les unions estretes formades per cadherina-catenina són complexes dinàmics que controlen l'adhesió entre cèl·lules. La pèrdua d'adhesió induïda per diferents mecanismes promou pel contrari la migració cel·lular, gràcies a canvis en el citoesquelet i l'alliberació de β -catenina del complex, que queda lliure per senyalitzar al nucli. β -catenina nuclear també és un efector principal de la via Wnt/ β -catenina, que regula transcripció gènica. A més, la fosforilació de β -catenina en Tyr provoca una pèrdua d'afinitat per proteïnes del complex d'adhesió, facilitant-ne la seva dissociació i senyalització. El nostre grup va demostrar que la forma PY142 β -catenina, que s'indueix en la senyalització HGF/c-Met, transloca a nucli i promou el creixement axonal en neurones.

D'altra banda, la connexió entre estímuls extracel·lulars i el citoesquelet regula la migració cel·lular. La proteïna d'adhesió focal FAK és un transductor dels senyals que emanen de la matriu extracel·lular (ECM) gràcies a la seva interacció amb integrines, que regula processos d'adhesió i migració/invasió cel·lular.

Tant la senyalització Wnt/ β -catenina com la senyalització per FAK estan hiperactives en càncer i el GBM no n'és una excepció. El procés de l'autofàgia com a mecanisme adaptatiu cel·lular ha guanyat molta importància en càncer, donat que també es troba sobreactivat en cèl·lules tumorals i en la resposta al tractament, essent un mecanisme important en la resistència tumoral/recrència. Aquests fets han estat explotats en diferents assaigs clínics dirigits a inhibir la via Wnt, FAK o la pròpia autofàgia en diferents càncers.

En els darrers anys, dos treballs van demostrar que l'autofàgia regula negativament la via Wnt/ β -catenina, a través de la degradació d'alguns dels seus components per aquest procés. A la vegada, es va demostrar la repressió transcripcional del gen pro-autofàgic *p62* per TCF/ β -catenina. Aquests resultats van posar de manifest una complexa relació entre la via Wnt i l'autofàgia que es podia explotar. Per últim, es va trobar que la depleció de FAK porta a la inclusió de Src actiu en autofagosomes, prevenint la pèrdua de viabilitat esperada. Aquest treball indicava per primera vegada una relació entre FAK i autofàgia i suggeria que la inhibició de FAK s'hauria de combinar amb la de l'autofàgia.

Possibles dianes antitumorals en GBM podrien dirigir-se a atacar dos aspectes importants en aquest tumor. Per una banda, l'elevada invasivitat que facilita la dispersió de cèl·lules tumorals en el parènquima cerebral i, per l'altra, l'elevada recurrència, relacionada amb l'anterior i amb l'adquisició de mecanismes de resistència cel·lular

Objectius específics.

En aquesta tesi, treballant en GBM com a model, m'he centrat en tres objectius, amb el propòsit de definir mecanismes moleculars rellevants en GBM que potencialment puguin portar a noves estratègies antitumorals.

1) Estudiar la implicació de la senyalització per PY142 β -catenina en migració/invasió de cèl·lules de GBM

1.1. Anàlisi dels nivells de PY142 β -catenina i de β -catenina activa per la via Wnt, així com de possibles gens diana d'aquestes, en biòpsies de gliomes.

1.2. Investigar la relació entre la senyalització per HGF i PY142 β -catenina i la seva implicació en migració/invasió de cèl·lules de GBM.

2) Estudiar l'efecte de la inhibició/silenciament de la via Wnt/ β -catenina en el procés de l'autofàgia i en el destí cel·lular de les cèl·lules de GBM.

2.1. Determinar l'efecte de la inhibició gènica i farmacològica de TCF i β -catenina sobre l'expressió de p62 i el flux autofàgic.

2.2. Identificar els mecanismes moleculars implicats en la regulació de l'autofàgia induïda per la inhibició de la via Wnt/ β -catenina.

2.3. Avaluar el possible efecte sinèrgic de la doble inhibició de la via Wnt/ β -catenina i de l'autofàgia en la inducció de mort cel·lular en GBM i investigar els mecanismes implicats.

3) Estudiar el resultat de la inhibició farmacològica de FAK en el procés de l'autofàgia i en el destí cel·lular de les cèl·lules de GBM.

3.1. Determinar l'efecte de la inhibició farmacològica de FAK sobre el flux autofàgic i les vies moleculars implicades.

3.2 Avaluar la capacitat proliferativa, adquisició de fenotip senescent i capacitat migratòria de les cèl·lules tractades amb un inhibidor de FAK.

Materials i mètodes

1. Tècniques de biologia cel·lular.

1.1. Línies de glioma

Per tal de realitzar el nostre treball vam treballar amb tres línies cel·lular de GBM, totes elles obtingudes de la *American Type Culture Collection* (ATCC) i mantingudes sota les condicions recomanades per ells.

La línia A172 prové d'un home de 53 anys i presenta mutacions en CDKN2A i PTEN, però sembla que no és tumorigènica en ratolins immunodeprimits. La línia cel·lular U251-MG prové d'un home de 75 anys i presenta mutacions en PTEN i P53 (Pontén and Macintyre 1968). Per últim, vam utilitzar la línia cel·lular U87-MG que prové d'una dona de 45 anys i presenta mutacions en CDKN2A, PTEN i CDKN2C, així com un creixement en agregats/esferes característic. Presenta capacitat per formar tumors en ratolins immunodeprimits (Fig. 22) (Pontén and Macintyre 1968).

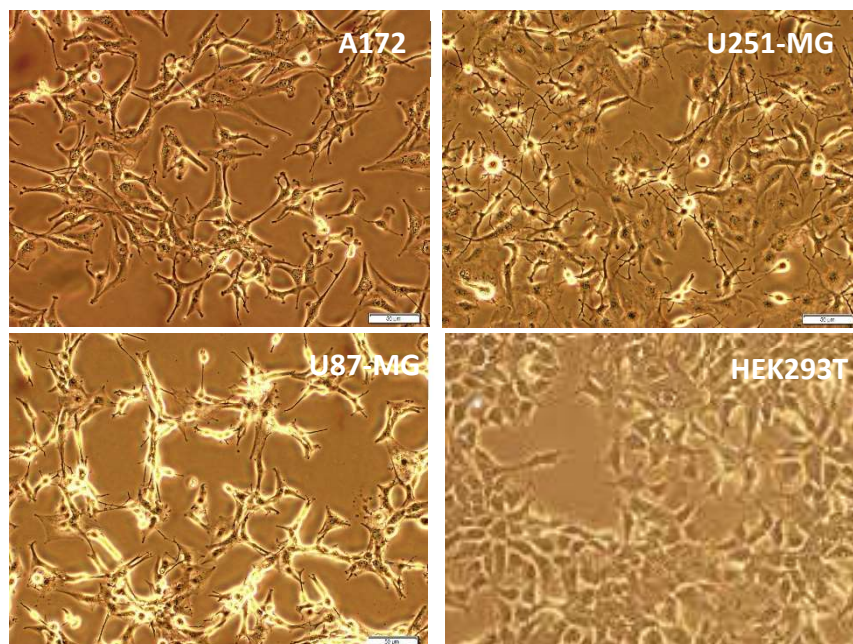


Figura 22. Imatges en contrast de fase de les línies cel·lulars de GBM i de la línia HEK 293T utilitzades en aquest treball. La barra indica 50 μm .

Materials i mètodes

Aquestes línies cel·lulars es mantenen en medi MEM (*Minimal Essential Medium*, Lomza) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS; Invitrogen) prèviament inactivat, 1 mM de sodi piruvat (Invitrogen) aminoàcids no essencials (NEAA; Invitrogen), 2mM de L-glutamina (Invitrogen) i 20 unitats/ml de penicil·lina i 20 µg/ml estreptomina. Aquestes línies creixen en incubadors de CO₂ (Thermo Scientific) a 37°C en atmosfera humida al 5% de CO₂. Les cèl·lules es testen periòdicament per a descartar la presència de micoplasma. Els cultius cel·lulars utilitzats en els experiments *in vivo* d'aquesta tesi eren negatius per la contaminació de micoplasma. Per la detecció d'aquest organisme és va utilitzar el MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Cambrex).

1.2. Cultius primaris

A banda de les línies cel·lulars, el nostre laboratori treballa amb cultius primaris de gliomes establerts a partir de biòpsies de pacients. Les mostres s'obtenen de pacients operats a la Unitat de Neurocirurgia de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova (HUAU), prèvia obtenció d'un consentiment informat de tots els pacients.

Les mostres extretes pels neurocirurgians es guarden amb medi DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*; Invitrogen) a 4°C abans del processament, que típicament es realitza en menys de 2 hores de la seva extracció. Tot el processament i el posterior cultiu de les mostres es realitzen en una campana de bioseguretat Bio2A.

El teixit es renta dos cops amb tampó fosfat salí (PBS) i els coàguls i les zones necròtiques s'eliminen per tal de no interferir amb el cultiu. El teixit es fragmenta en trossos d'uns 5mm² i cada tros es col·loca en un eppendorf amb 1 ml de PBS que conté col·lagenasa al 0,025 % (Worthington) i DNasa (Sigma-Aldrich) a 4800U/ml durant 2 hores a 37°C i en agitació. Un cop passat aquest temps, el cultiu es filtra amb filtres de nilon de 70 µm (BD) per tal d'eliminar el teixit que no s'ha digerit. A continuació, el cultiu es centrifuga i el pellet es renta dues vegades amb PBS (Bruna et al. 2007). Finalment, el pellet es sembra en medi DMEM suplementat amb 10% FBS i 100U/ml penicil·lina i 100 µg/ml estreptomina. Al dia següent es realitza un canvi de medi i es permet que les cèl·lules creixin fins a un 90% de confluència i després es divideixen 1:2.

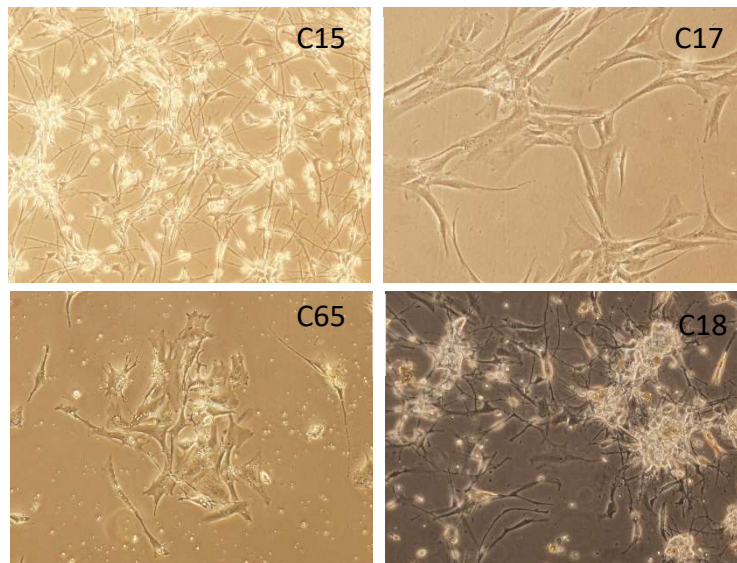


Figura 23. Imatges representatives en contrast de fase de algun dels cultius primaris derivats de biòpsies utilitzats en aquest treball.

1.3. Cultiu de la línia cel·lular HEK 293T

La línia humana HEK 293T de ronyó embrionari és un bon model per la sobreexpressió de proteïnes intracel·lulars, extracel·lulars, secretades o de membrana. És una variant de la línia cel·lular humana de l'epiteli renal 293, transformada amb el gen E1A d'adenovirus, que expressa l'antigen T de SV40. És una línia cel·lular que creix molt ràpid i que es transfecta molt fàcilment, és per aquesta raó que en aquest treball s'utilitzen les HEK 293T per a la producció de virus. Aquestes cèl·lules creixen en medi DMEM suplementades amb 10% FBS, 1mM de sodi piruvat, NEAA i 20 unitats/ml de penicil·lina i 20 µg/ml estreptomina a 37°C i en condicions d'elevada humitat i 5% CO₂.

1.4. Descongelació, manteniment i congelació

Aliquotes tant de les línies cel·lulars com els cultius primaris són emmagatzemades en nitrogen líquid per emmagatzemar-les durant molts anys. Per tal de descongelar les cèl·lules d'una manera adequada, s'extrauen els criotubs del nitrogen líquid i directament es passen a un bany a 37°C, donat que per una descongelació òptima és necessari que aquesta sigui molt ràpida. Una vegada descongelats els tubs, el contingut es transfereix a un tub amb 10 ml amb medi complet i es centrifuga 5 minuts a 1000 rpm, s'elimina el

Materials i mètodes

sobrenedant per eliminar el dimetil sulfòxid (DMSO; Sigma Aldrich) i el pellet es sembra amb medi complert. Al dia següent es canvia el medi per eliminar possibles cèl·lules mortes que puguin interferir en el cultiu.

Una vegada aquestes cèl·lules arriben a la confluència, és necessari “dividir-les”. Breument, les cèl·lules es renten amb PBS, i s’incuben amb tripsina-EDTA (Invitrogen) a 37°C durant 3 minuts. Quan les cèl·lules estan desenganxades es transfereixen a un tub que conté medi complert, de manera que el sèrum inactivarà la tripsina. Es centrifuguen 5 min a 1000 rpm i s’elimina el sobrenedant. El pellet es resuspen en medi i la quantitat corresponent depenent de la dilució es sembra en una nova placa que contengui medi complert. Per regla general, en les línies cel·lulars de GBM (A172, U251-MG i U87-MG) apliquem una dilució 1:3, per les HEK 293T una dilució 1:10, mentre que per als cultius primaris una dilució 1:2. Les línies cel·lulars es passen dos cops per setmana, mentre que els primaris degut a la seva baixa velocitat de creixement es passaran quan arribin a confluència, però en el cas dels primaris es canvia el medi dos cops per setmana.

Finalment, per congelar alíquotes de cèl·lules en nitrogen líquid, aproximadament un milió de cèl·lules són resuspeses en 850 µl de FBS i transferides a un criotub on gota a gota afegirem 150 µl de DMSO. Per a una congelació òptima, les cèl·lules s’han d’anar refredant poc a poc, idealment, a un grau per hora. En el nostre cas, transferim els criotubs a un tanc de congelació a -80°C que conté isopropanol, fent que l’intercanvi de fred sigui lent durant 24 hores. Després d’aquest període les cèl·lules són transferides al nitrogen líquid on poden romandre durant anys.

1.5. Recomptes cel·lulars

1.5.1. Recompte de la proliferació mitjançant exclusió amb Blau de Tripà

Aquest assaig s’utilitza per fer un comptatge directe de la viabilitat cel·lular ja que ens permet diferenciar entre les cèl·lules vives i les mortes. Les cèl·lules vives, amb la membrana cel·lular intacta, expulsen el Blau de Tripà, mantenint-se incolores, mentre que les cèl·lules mortes es tenyeixen de blau. El reactiu de Blau de Tripà (Sigma-Aldrich)

s'utilitza al 0,2 % i de la suspensió de cèl·lules resultant se'n compten 10 µl a la cambra de Neubauer.

Es sembren 15.000 cèl·lules per pou (placa M24) en triplicats. Després de 24 hores es tracten les cèl·lules segons correspongui i es compten les cèl·lules passades 24, 48 i 72 hores després del tractament. Es renten les cèl·lules amb PBS, es tripsinitzen i es centrifuguen. El pellet es resuspen en 100 µl de medi i finalment es fa la tinció amb el Blau de tripà, afegint 10 µl de colorant 0,4% a 10 µl de cèl·lules. D'aquests, 10 µl es comptaran a la cambra de Neubauer, valorant cèl·lules vives i mortes.

1.5.2. Recompte de la proliferació mitjançant l'assaig d'incorporació de BrdU.

La BrdU (Bromodeoxyuridine o 5-bromo-2'-deoxyuridine) (Sigma-Aldrich) és un nucleòtid sintètic anàleg a la timidina. És un compost que s'utilitza de forma molt comuna a l'hora de detectar cèl·lules que proliferen; això es degut a que la BrdU té la capacitat de incorporar-se -substituint a la timidina- en les noves cadenes de DNA, sintetitzades per les cèl·lules que s'estan replicant. El fenomen de replicació és dóna durant la fase S del cicle cel·lular.

Per fer l'assaig d'incorporació de la BrdU és necessari que en el medi de les cèl·lules que es volen analitzar estigui present aquest compost. Per tant, afegim la BrdU a una concentració final de 8 µg/ml durant 3 hores, perquè s'incorpori a les cèl·lules en divisió.

Un cop passat aquest temps, es fixen les cèl·lules amb una solució al 4% de paraformaldehid (PFA) durant 15 minuts a temperatura ambient. Tot seguit es permeabilitzen les cèl·lules amb PBS que conté Tritó X-100 (TX-100) al 0,2% durant 2 min. A continuació, es fan tres rentats amb PBS i s'afegeix HCl 2M durant 30 minuts a 37°C, per a desnaturalitzar i trencar la doble cadena de DNA de les cèl·lules i així facilitar que l'anticòs primari pugui reconèixer la BrdU incorporada al DNA.

Un cop han passat els 30 minuts s'afegeix tetraborat sòdic 0,1M (pH 8,5) durant 2 minuts al pou, per tal de neutralitzar el HCl. Seguidament afegirem la solució de bloqueig, que conté PBS + 5% *Horse Serum* (HS) + 5% FBS + 0,2% glicina, durant 1 hora a temperatura ambient. Després rentem 3 cops amb PBS, i s'incuben les cèl·lules amb l'anticòs primari

Materials i mètodes

durant 18 hores a 4°C. Al dia següent es renten els pous amb PBS i afegim l'anticòs secundari i *Hoechst* 33342 (que s'uneix al DNA i proporciona un marcatge nuclear; Sigma-Aldrich) a una concentració de 0,5 µg/ml en solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient. Després, es renten els pous amb PBS i es compten el nombre de cèl·lules positives per BrdU i les totals (positives per Hoechst) mitjançant un microscopi òptic de fluorescència.

1.5.3. Recompte de la proliferació mitjançant ki67

Un marcador típic de proliferació és ki67, una proteïna nuclear necessària per la proliferació cel·lular i per tant que es troba present en aquelles cèl·lules que estan dividint-se, es troba present en totes les fases del cicle cel·lular, excepte en les que estan en G₀. A més a més, és un dels marcadors tumorals més utilitzats, útil per valorar l'índex proliferatiu de biòpsies. En aquest cas l'anàlisi per aquest marcador es fa mitjançant una immunocitoquímica utilitzant un anticòs específic contra aquesta proteïna, tal i com es detalla en l'apartat 2.3.2. De manera que es calcularà el percentatge de cèl·lules positives i negatives per ki67 respecte al nombre de cèl·lules totals (positives per Hoechst)

1.5.4. Recompte de mort apoptòtica per tinció de Hoechst 33342

El reactiu *Hoechst* 33342 o Bisbenzimidà és un compost fluorescent que s'uneix al DNA i que es visualitza al microscopi òptic de fluorescència. Pot tenyir tant cèl·lules vives com fixades, ja que degut a la seva estructura molecular pot travessar la membrana plasmàtica de les cèl·lules intactes. Pel recompte de la mort apoptòtica es sembren les cèl·lules, es realitza el tractament corresponent i es tenyeixen les cèl·lules amb 0,5 µg/ml de colorant *Hoechst* durant 30 minuts a temperatura ambient afegit directament al medi. Passat aquest temps es prenen fotos al microscopi òptic de fluorescència i es compten els nuclis totals i aquells amb morfologia apoptòtica. Per comptabilitzar la mort apoptòtica, es consideren positives aquelles cèl·lules que presenten nuclis amb condensació de la cromatina o aquells que formen petits orgànuls anomenats nuclis apoptòtics.

1.6. Viabilitat cel·lular

1.6.1. Wst-1

El reactiu Wst-1 (basat en sals de tetrazolium) ens permet analitzar de forma indirecta la viabilitat cel·lular. És un assaig colorimètric, de quantificació espectrofotomètrica que es basa en la reducció de les sals de tetrazolium, Wst-1, a sals de formazan mitjançant l'acció de les succinat deshidrogenases mitocondrials i per tant l'assaig determina l'activitat enzimàtica mitocondrial. Les sals de formazan que es formen són solubles i donen un color púrpura que és quantificable a l'espectrofotòmetre. La quantitat de cèl·lules metabòlicament actives és directament proporcional a l'absorbància obtinguda.

Per aquest tipus d'assaig es treballa en plaques de 96 pous (M96), on en cada pou es sembren 5000 cèl·lules i es deixen créixer durant 24 hores a 37°C. Passat aquest temps les cèl·lules es tracten durant 48 hores segons correspongui. Per acabar, s'aspira el medi amb cura, evitant aspirar cèl·lules i s'afegeix el reactiu Wst-1 diluït 1:15 en medi complet i es deixa incubar a 37°C. Es realitzaran lectures a 30 min, 1 hora, 2 hores i 3 hores en el lector de plaques multipous Biotek utilitzant el filtre de 450 nm i el de 655 nm com a filtre de referència. Cada condició es fa per triplicat i l'experiment es repeteix almenys tres vegades per fer una anàlisi estadística.

1.6.2. Assaig clonogènic

La capacitat clonogènica d'una cèl·lula ve donada, per la capacitat que té aquesta de formar una colònia de cèl·lules a partir d'una cèl·lula individual. El propòsit d'aquest tipus d'assaig és determinar l'efecte dels tractaments sobre la proliferació cel·lular.

Les cèl·lules són sembrades el més individualitzades possible a baixa densitat (500 cèl·lules/pou M6), i al cap de 24 hores es tracten. Cada condició es va sembra per duplicat, i es deixen créixer a l'incubador a 37°C/5% CO₂ durant 12-14 dies. Passat aquest temps es realitza una tinció amb MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) 0,5 mg/ml durant 1 hora a 37°C. A continuació es fixen les cèl·lules amb PFA al 4% durant 15 min i es renten amb PBS. El nombre de colònies es quantifiquen amb el programa de processament d'imatge digital ImageJ.

1.7. Assaigs de migració

1.7.1. Assaig d'adhesió o "*spreading assay*"

Una forma indirecta d'analitzar la capacitat de migració, és mitjançant la mesura de la seva capacitat d'adhesió. Una baixa capacitat d'adhesió de les cèl·lules s'associa amb una capacitat alta de migració (Li et al., 2006). En aquest assaig, les cèl·lules de glioma es pretracten durant 16 hores amb el tractament corresponent o bé es transfecten amb el plasmidi d'interès 48 hores abans de començar l'assaig. Passat aquest temps, les cèl·lules es tripsinitzen i 20.000 cèl·lules es sembren en un pou de M24 prèviament recobert de fibronectina (5µg/ml, 1 hora). Les cèl·lules es deixen adherir durant 30-45 minuts i a continuació es fixen amb PFA 2% i es renten amb PBS. Finalment, es compten les cèl·lules amb una morfologia redona i refringent (poc adherides, amb alta capacitat de migració) i aquelles que mostren una morfologia estesa (molt adherides; baixa capacitat migració). Es compten al voltant de 100 cèl·lules i en el cas de cèl·lules transfectades es compten únicament aquelles amb fluorescència roja (co-transfectada amb el plasmidi DsRed).

1.7.2. Assaig de migració mitjançant tancament de ferida (*wound healing*)

Una forma més directa de mesurar la capacitat de migració de les cèl·lules és mitjançant la capacitat de tancar una ferida feta en un monocapa de cèl·lules, ja que les cèl·lules davant de l'estímul de la ferida són capaces de migrar cap a la ferida i de reomplir l'espai buit. Les cèl·lules de GBM es sembren en pous de M24 a una confluència del 100% i amb una punta groga (200 µl) es fa una ferida. A continuació, s'aspira el medi i s'afegeix medi fresc amb el tractament corresponent. Es prenen tres fotos de la ferida a temps 0 sota el microscopi de contrast de fase. A 24 i 28 hores es tornen a prendre fotos de la mateixa zona per tal, d'avaluar la capacitat de migració de les cèl·lules mitjançant la seva capacitat per tancar la ferida. Els experiments es realitzen per duplicat amb tres repeticions independents. L'amplitud de la ferida, i per tant el seu tancament, es mesura utilitzant el programa ImageJ.

1.7.3. Assaig de migració i invasió en Transwell™

Per tal d'analitzar tant la capacitat de migració de les cèl·lules de glioma com la seva capacitat d'invasió s'han realitzat assaigs de Transwell™ (BD Bioscience). En aquest tipus d'assaig les cèl·lules han de ser primer capaces de migrar a través d'una membrana porosa i després han de degradar una matriu extracel·lular de Matrigel (BD Bioscience) per tal d'envair-la. D'aquesta manera, l'assaig avalua tant la capacitat de migració com la de invasió.

El primer que cal fer en l'assaig és el recobriment del Transwell™ amb Matrigel. En aquest treball s'ha utilitzat Matrigel lliure de factors amb una dilució 1:3 (en medi MEM). Es col·loquen 30 µl del Matrigel diluït per la cara inferior del Transwell™ i es deixa assecat 30 minuts a l'incubador. Un cop assecat es col·loquen els Transwell™ en una placa M24 i s'afegeixen 500 µl de medi a la part inferior i 100 µl dins del Transwell™.

A continuació, es tripsinitzen les cèl·lules tractades o transfectades prèviament i es sembren 20.000 cèl·lules/Transwell™ dins de l'insert. Es deixen migrar les cèl·lules durant 8 hores i finalment es fixen tant dins com fora de l'insert amb PFA 8%. Les cèl·lules que no han migrat són les que romanen dintre del pou, per tant aquestes s'eliminen amb un cotó, amb compte de que no quedin cèl·lules dins del pou. Les cèl·lules amb capacitat per migrar i envair es trobaran dins del Matrigel. Aquestes cèl·lules es tenyeixen amb Hoechst i es compten. Tots els experiments es fan per duplicat amb almenys 3 repeticions. El nombre de nuclis tenyits amb Hoechst presents en la zona del Matrigel es quantifica utilitzant el ImageJ.

1.8. Tractaments i drogues utilitzades en aquest treball

| Droga | Proveïdor | Nº Catàleg | Concentració Stock | Diluent |
|---------|---------------|------------|--------------------|---------------|
| HGF | Peprtech | 315-20 | 100 µg/mL | PBS + 0,1%BSA |
| SU11274 | Sigma-Aldrich | S9820 | 2mM | DMSO |

| | | | | |
|------------------------|---------------|-----------|-----------|---------------|
| Bafilomicina A1 | Santa Cruz | Sc-201550 | 0,5 mM | DMSO |
| Cloroquina | Sigma-Aldrich | C6628 | 25 mM | PBS |
| FH535 | Sigma-Aldrich | F5682 | 10mM | DMSO |
| Wnt3a | Peprtech | 315-20 | 100 µg/mL | PBS + 0,1%BSA |
| DKK-1 | Peprtech | 120-45 | 100 µg/mL | PBS + 0,1%BSA |
| Rapamicina | Sigma-Aldrich | R8781 | 2mM | DMSO |

Taula 1. Drogues i tractaments utilitzats en aquest treball

1.9. Producció de lentivirus i infecció

1.9.1. Transfecció amb polietilenamina (PEI)

La majoria de les membranes cel·lulars tenen càrrega neta negativa, sent molt difícil que les molècules amb càrrega negativa, com són els àcids nucleics, puguin travessar-les. Els lípids catiónics, com la polietilenamina (PEI), condensen el DNA plasmídic, neutralitzant així les càrregues negatives i protegint-lo de l'acció de les DNAses. Els agregats resultants tenen alta afinitat per les cèl·lules, donant lloc a una alta efectivitat de transfecció (Florea et al. 2002). La polietilenamina (PEI; Sigma-Aldrich) s'utilitza des de 1995 com a vector de concentració i presenta l'avantatge que no requereix d'alta confluència en el cultiu i és força econòmic.

La transfecció cel·lular amb PEI es realitza en medi sense sèrum ni antibiòtics, ja que el PEI produeix forats a les cèl·lules i aquests podrien resultar tòxics. Per a cada µg de DNA a transfectar es dilueixen 5µl de PEI 1x (10µM) en 4 volums de solució estèril de NaCl 150mM. El DNA es dilueix també en NaCl 150mM en el mateix volum que està diluït el PEI. Un cop es tenen les dues barreges per separat, la solució de PEI s'afegeix damunt de la del DNA i es vorteja durant 30-60 segons. La barreja es deixa reposar durant 20 minuts a temperatura ambient, durant els quals es formen els complexos de PEI i DNA. La solució

de transfecció s'afegeix damunt la placa de cultiu gota a gota. A les 3 hores després de la transfecció es canvia el medi que conté els complexos per medi de cultiu complert.

1.9.2. Producció de lentivirus en la línia cel·lular HEK 293T.

Degut a la gran quantitat de partícules lentivirals necessàries per a infectar els cultius, és necessari partir d'almenys 3 plaques p100 de cèl·lules a una concentració aproximada de $3,5 \times 10^5$ cèl·lules per placa. L'endemà de ser sembrades les cèl·lules, es canvia el medi per medi DMEM sense antibiòtic ni sèrum, i es mantenen en repòs a l'incubador mentre es prepara la barreja de transfecció.

Es transfecta un total de 40 µg de DNA per placa, que correspon als tres vectors plasmídics en proporció 3:2:1. És a dir, 20 µg del plasmidi lentiviral d'interès, 13 µg del plasmidi empaquetador psPAX2 i 7 µg del plasmidi pMD2G, que codifica per la coberta vírica. Per tant es necessiten 200 µl de PEI i tant el DNA com el PEI es resuspendran en 1ml de NaCl 150mM estèril. S'afegeix la solució de PEI sobre la de DNA, es vorteja 1 minuts i es deixa reposar 20 minuts. A continuació s'afegeix la barreja gota a gota a la placa de HEK 293T i es deixa a l'incubador durant 3 hores. Passat aquest temps s'aspira el medi sense sèrum ni antibiòtic que conté el PEI i el DNA a la campana de seguretat Bio2A i s'afegeix medi complert de HEK 293T. A partir de les 24 hores el medi ja conté nombrosos virus. Normalment es recull el medi amb les partícules víriques al cap de 3 dies després de la transfecció. Tot el procés es duu a terme a la campana de seguretat Bio2A. El medi recollit que conté els virus es centrifuga 5 minuts a 2000 rpm i després es filtra a través d'un filtre de xeringa de 0,45 µm, per tal d'eliminar qualsevol cèl·lula que pugui quedar en el medi. Si l'eficàcia de producció de virus és bona, aquest medi es pot utilitzar directament per infectar les cèl·lules de glioma, com és el nostre cas. Els virus es guardaran a -80°C.

1.9.3. Transducció de línies cel·lulars mitjançant lentivirus.

Un cop obtinguda la concentració de cèl·lules desitjada en la placa de cultiu en repòs en l'incubador a 37°C en atmosfera humida al 5% de CO₂, s'afegeix al pou que volem infectar el medi amb partícules lentivirals (diluint 1:3 en medi normal) més Polybrene (Hexadimethrine Bromide, un polímer catiònic que augmenta l'eficiència de la infecció)

(Sigma-Aldrich) a una concentració final de 8 µg/ml en la campana Bio2A. Les línies cel·lulars es deixen en contacte amb el virus durant 24 hores i posteriorment reemplaçem el medi, les cèl·lules hauran incorporat el DNA en uns 4 dies, temps en que es podrà començar a fer els tractaments corresponent o a processar les mostres per analitzar-les.

1.10. Transfeccions amb Lipofectamina

| Gen | Plasmidi | Cedit per |
|---------------------------|---------------|---|
| WT β-catenina | pcDNA3-His | Mireia Duñach (UAB, Barcelona) |
| Y142F β-catenina | pcDNA3-His | Mireia Duñach (UAB, Barcelona) |
| Y654F β-catenina | pcDNA3-His | Mireia Duñach (UAB, Barcelona) |
| S37Y β-catenina | pcDNA3-His | Antonio Garcia de Herreros (UPF-IMIM, Barcelona) |
| Ptf-LC3 | pEGFP-C1+mRFP | T Yoshimori (Osaka University, Osaka, Japan) |
| TOP-luc | | Antonio Garcia de Herreros (UPF-IMIM, Barcelona) |
| Ds-red | | Carme Gallego (Inst. Biol. Molecular, CSIC,Barcelona) |
| Empaquetador Virus | psPAX2 | Dieter Trono (Lausana, Suïssa) |
| Coberta vírica | pMD2G | Dieter Trono (Lausana, Suïssa) |

Taula 3. Construccions plasmídiques de sobreexpressió utilitzades en aquest treball

En aquelles cèl·lules on la transfecció resulta especialment difícil s'utilitza la Lipfectamina (LFT; Invitrogen), una mescla de liposomes amb càrrega positiva que tenen la capacitat d'unir-se al DNA i traspasar les membranes plasmàtiques amb càrregues negatives. En el nostre treball s'utilitzen dos tipus de LFT, per una banda la LFT2000 per transfectar plasmidis (Taula 3) i per l'altra la LFT RNAimax amb la qual es transfecten els siRNA (Taula 2). En tots dos casos, les cèl·lules de les línies de GBM es sembren en pous de M24 a una confluència del 70% un dia abans de ser transfectades.

| Gen | Codi |
|--------------------------|------------|
| β-Catenina humana | VPDSIRNA2D |
| GAPDH humana | PDSIRNA2D |

Taula 2. *siRNAs* utilitzats en aquest treball de la casa Sigma-Aldrich (validated predesigned Mission siRNA).

L'endemà es canvia el medi complet per medi Optimem (200 µl/pou; Invitrogen) i es procedeix a fer la barreja de transfecció. Per a la LFT2000 es prepara per una banda la mix de DNA (1 µg DNA/50 µl Optimem) i per l'altra la mescla de la LFT (1,5µl LFT2000/50 µl Optimem). En el cas de LFT RNAimax es prepara la mescla dels siRNA en 25 µl d'Optimem (a una concentració de 80 nM per als siRNA) i la mescla de la LFT RNAimax (1 µl LFT/25 µl Optimem). En tots dos casos, les mescles s'incuben primer 5 minuts per separat i a continuació s'afegeix el DNA sobre la mescla de LFT i s'incuba 15-20 minuts a temperatura ambient, per a que es formin els complexos dels àcids nucleics amb la LFT. Finalment els 100/50 µl de la mescla resultant s'afegeixen gota a gota sobre les cèl·lules que es troben amb medi Optimem. A les 3 o 6 hores (LFT2000 o LFT RNAimax, respectivament) de transfecció s'aspira el medi per eliminar els complexos i s'afegeix medi complet.

2. TÈCNIQUES DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR.

2.1. Construccions plasmídiques per al silenciament gènic.

En enginyeria genètica, es considera un vector a una molècula de DNA que pugui utilitzar-se per introduir una seqüència de DNA en una cèl·lula, dins la qual es mantindrà i es replicarà. Generalment es tracta d'un plasmidi. Els plasmidis són petites molècules de DNA circular extracromosòmic que es troben en molts bacteris. Es repliquen de forma independent del cromosoma principal i es poden trobar múltiples còpies del plasmidi en una mateixa cèl·lula.

Els virus són entitats infeccioses que contenen l'àcid nucleic que codifica per a la seva pròpia estructura, però que no tenen tota la maquinària enzimàtica d'una cèl·lula. Per tal de replicar-se envaeixen una cèl·lula i utilitzant la maquinària d'aquesta per a expressar el seu genoma viral. En enginyeria genètica s'utilitzen els virus com a vectors, ja que permeten introduir un plasmidi a l'interior de la cèl·lula gràcies al mecanisme infecció del virus. S'utilitzen virus defectius, és a dir, que no són capaços de replicar-se i produir nous virus, ja que s'ha substituït el genoma viral pel plasmidi d'interès.

2.1.1. Construccions de shRNA.

| Vector | Gen | Codi |
|-----------------|-----------|---|
| PkLopuro | scrambled | TRCN0000000001 Sigma-Aldrich, Mission shRNA. |
| PkLopuro | TCF4 | TRCN0000015037 Sigma-Aldrich Mission shRNA. |
| PkLopuro | p62 | TRCN0000007237 Sigma-Aldrich Mission shRNA. |
| FSV | control | Cedit Dr. Dolcet (IRBLleida) |
| FSV | Caspasa8 | Cedit Dr. Dolcet (IRBLleida) |
| FSV | ATG5 | Cedit Dr. Dolcet (IRBLleida) |

Taula 4. shRNAs utilitzats en el nostre estudi. Taula on es mostra els shRNA utilitzats i el plasmidi on es troben.

La interferència de RNA mitjançant shRNAi (*short RNA interference*) induïx la degradació d'un RNA missatger concret, mitjançant la utilització de siRNA (*small interfering RNA*) que són fragments de RNA entre 22 i 25 nucleòtids, derivats de la fragmentació del RNA lineal de doble cadena que s'uneix a les seqüències de RNA homòlogues induint la seva degradació (R. Nelson 2003) (Fig 24).

La tècnica d'interferència del RNA s'utilitza àmpliament per a silenciar l'expressió gènica d'una seqüència específica.

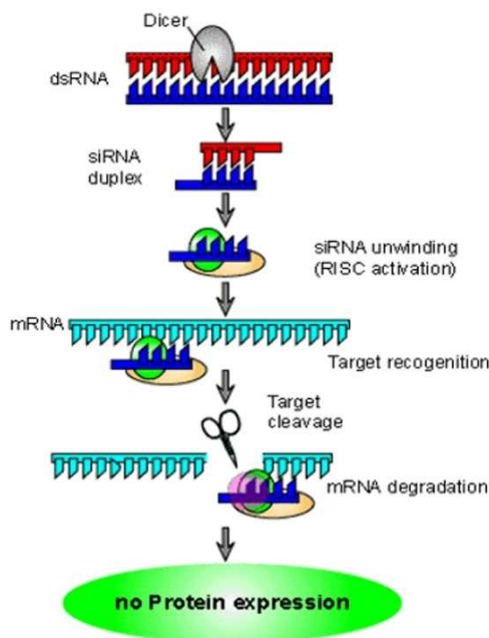


Figura 24: Via d'interferència del RNA. DICE, un membre de la família de RNAsa III, talla de forma dependent d'ATP les cadenes llargues de RNA de doble cadena formant el siRNA. Aquests siRNAs un cop relaxats s'incorporen dintre el complex inductor del silenciament del RNA (RISC). Un cop la cadena simple anti-sense està unida a RISC, dirigeix aquest cap al mRNA que li és complementari i es dona un tall endonucleòtic de la cadena del mRNA, truncant així la traducció del mRNA.

2.2. Amplificació en cadena de la polimerasa.

2.2.1. Extracció del mRNA.

Per a l'extracció de RNA dels cultius cel·lulars s'utilitza el kit comercial Macherey-Nagel, conjuntament amb la digestió amb DNAsa I, que ens permet eliminar tot el DNA genòmic contaminant que pugui quedar en la mostra i que ens podria portar a amplificacions des del DNA genòmic. Un cop extret el RNA es quantifica al Nanodrop (ND-1000 UV/Vis Spectrofotometer, de Nanodrop Technologies). Els lisats de RNA es guarden a -80°C .

2.2.2. cDNA

El cDNA s'obté del RNA a partir de la reacció de transcripció reversa (RT), que es realitza segons el protocol de l'enzim retro-transcriptasa de Taqman (Applied Biosystems) a partir d'1 µg de RNA. La reacció conté MgCl₂, dNTPs, hexàmers, inhibidors de RNases i la retrotranscriptasa en les proporcions indicades pel distribuïdor. Primer es posen les mostres de RNA (1 µg) 2 minuts a 90°C i tot seguit s'hi afegeix la barreja de reacció i s'inicia el programa de la transcripció reversa: 10 minuts a 25°C, 60 minuts a 42°C i 5 minuts a 95°C. Quan acaba la reacció, es procedeix a realitzar la PCR en temps real (RT-PCR).

2.2.3. RT-PCR

La tècnica de la PCR en temps real utilitza una sonda específica per a cada gen a analitzar, tant les sondes (20x) com la "mix" (2x) són d'Applied Biosystems. Aquesta sonda està marcada amb un fluorocrom (FAM) que el termociclador CFX96™ de Bio- Rad llegeix i quantifica. El programa que utilitzem és el següent: 2 minuts a 50°C i 10 minuts a 95°C per a activar la reacció, seguit de 40 cicles a 95°C durant 15 segons i 1 minut a 60°C. Els resultats s'obtenen en forma de Ct (Cycle Threshold), que és el cicle de PCR on comença el creixement exponencial del producte de la PCR. Per tant, com més cDNA del gen hi hagi en la mostra de partida, més baix serà el Ct.

La quantitat relativa de mRNA de cada gen es calcula de la següent manera:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen GAPDH}$$

I respecte la mostra control:

$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ mostra control} - \Delta Ct \text{ mostra}$$

A partir d'aquests càlculs la concentració relativa del mRNA respecte al control és $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$. De cada mostra se'n fan tres rèpliques, de les quals es calculen la mitjana i errors estàndard.

Els gens analitzats i la referència de cada sonda es troben a la taula 2.

| Gen | Codi |
|--------------------------|---------------|
| SQSTM1/p62 humana | Hs00177654_m1 |
| TCF4 humà | Hs00162613_m1 |
| GAPDH humana | Hs99999905_m1 |

Taula 5. Sondes utilitzades per l'anàlisi en la RT-PCR

2.3. Immunodetecció de proteïnes.

2.3.1. Western blot .

Amb la finalitat d'estudiar els nivells de expressió de les diferents proteïnes en distintes condicions, utilitzem la tècnica del Western blot. Aquesta tècnica consisteix en la separació de proteïnes en gels de acrilamida depenent del seu pes molecular, la posterior transferència a membranes de PVDF (Immunobilon P; Millipore) i finalment la seva detecció amb anticossos específics contra les formes de les proteïnes de interès.

En el nostre cas treballarem amb dos tipus de mostres, per una banda amb lisats cel·lulars tant de línies com de casos primaris, però també treballarem amb homogenats obtinguts directament de les biòpsies dels pacients.

L'extracció de proteïna total

En el cas de lisats cel·lulars, després del pertinent tractament, les cèl·lules van ser rentades dues vegades amb PBS i a continuació es va procedir a la extracció proteica pertinent. L'extracció proteica s'ha de fer el més ràpid i eficient possible, per evitar degradacions i per a què l'extracte representi fidelment l'estat fisiològic de la cèl·lula viva. D'aquesta manera s'obté una barreja desnaturalitzada dels components cel·lulars. És un mètode d'extracció eficient perquè trenca les interaccions entre les proteïnes i permet l'alliberament de les proteïnes unides a estructures macromoleculares. A més el detergent

Materials i mètodes

desnaturalitza i inactiva la majoria d'enzims, incloses les proteases que podrien danyar l'extracte. El tampó de lisis per cultius cel·lulars conté Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM i 2% de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). Finalment les mostres són bullides durant 3 minuts a 95°C.

Amb els homogenats de teixit, el teixit es va tractar amb un tampó específic per aquests (tampó homogenats) que conté 20mM Tris pH7,4, 100 mM NaCl, 10mM EDTA, 0,5% Deoxicolat, 1% SDS, 0,5% Igepal, 5M urea i inhibidors de proteases i de fosfatases (Na ortovanadat sòdic, β -glicerofosfat, Complete™ protease inhibitors (Roche) i NaF) concentracions. Les peces d'homogenats van ser transferides a un homogeneïtzador amb 100 μ l de tampó i digerides mecànicament. Posteriorment, es van centrifugar a 4°C durant 10 minuts per tal d'eliminar el teixit que no s'havia degradat.

Quantificació de proteïnes pel mètode Lowry

La quantificació de proteïnes abans de migrar les mostres en gels SDS-PAGE és necessària per a la posterior interpretació dels resultats. Si les diferents mostres, d'un mateix experiment per a la immunodetecció de proteïnes, no estan igualment carregades al gel, no es podran extraure conclusions, ja que no se sabrà si les diferències són degudes només a la càrrega o als efectes del nostre tractament. Per fer-ho, utilitzarem el mètode de Lowry amb el reactiu de Biorad. El primer pas serà realitzar una recta patró amb BSA amb diferents quantitats d'aquests (0, 1, 2, 5, 10 i 15 μ g) per després poder extrapolar la absorbància de les nostres mostres. A continuació afegirem les diferents mostres. Tant la recta patró com amb les nostres mostres s'afegiran per duplicat, en una placa de 96 (M96). Tot seguit es barregeren els reactius A i S (en proporció 50:1), i s'afegeix la barreja als pous amb les mostres (25 μ L a cada pou). A continuació s'hi afegeix el substrat fluorogènic (reactiu B, 200 μ L per pou), i es deixa produir la reacció durant 10 minuts. Passat aquest temps es llegeix la placa a una absorbència de 655nm.

| Anticòs | Proveïdor | Nº Catàleg | Aplicació | Dilució |
|---|-----------------|------------|-----------|-----------------|
| β-Catenina | BD Biosciences | 610153 | WB ICQ | 1:1000 1:600 |
| β-Catenina N-terminal | Cell signalling | 9581 | ICQ | 1:500 |

| | | | | |
|--------------------------|-------------------|---------------|------------|-----------------|
| β-Catenina activa | Merck-Millipore | 8E7 | WB ICQ | 1:1000 1:400 |
| PY142 β-Catenina | Abcam | Ab277798 | WB ICQ | 1:1000 1:200 |
| AKT | Santa Cruz | sc-1618 | WB | 1:3000 |
| PS473AKT | Cell Signalling | 9271S | WB | 1:1000 |
| Beclin1 | Novus Biologicals | NB110-87318 | WB | 1:10000 |
| BrdU | Dako | M0744 | ICQ | 1:150 |
| Caspasa8 | Calbiochem | AM46 | WB | 1:2000 |
| Cdc25a | Santa Cruz | sc-97 | WB | 1:1000 |
| c-Met | Santa Cruz | sc-10 | WB ICQ | 1:1000 1:300 |
| c-Met | Santa Cruz | sc-161 | ICQ | 1:300 |
| PY1234/5 c-Met | Cell Signaling | 3126 | WB ICQ | 1:1000 |
| Cyclin D1 | BD Biosciences | DCS-6; 556470 | WB | 1:1000 |
| ERK | BD Biosciences | 610124 | WB | 1:2000 |
| PERK | Cell Signalling | 9107 | WB | 1:1000 |
| FAK | Cell signaling | 13009P | WB ICQ | 1:1000 |
| PY379 FAK | Cell signalling | 8556P | WB | 1:1000 |
| Ki67 | Santa Cruz | Sc-15402 | ICQ ICH | 1:1000 RTU |
| LC3 | Novus Biologicals | NB100-2331 | WB ICQ | 1:3000 1:300 |
| N-Cadherina | Zymed | 33-3900 | WB | 1:500 |
| P62 | Novus Biologicals | NBP1-48320 | WB ICQ | 1:3000 1:300 |
| P70S6K | Cell Signalling | 2055 | WB | 1:1000 |

Materials i mètodes

| | | | | |
|--------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------------|
| PS209 EIF4E | Cell Signalling | 9741 | WB | 1:1000 |
| Snail/Slug | Abam | Ab6337 | WB ICQ | 1:1000 1:300 |
| TCF1 | Cell Signalling | C46C7 | WB | 1:2000 |
| TCF4 | Upstate | 05-511 | WB | 1:500 |
| TFEB | Bethyl Laborathories | A303-673A | WB ICQ | 1:1000 1:100 |
| Ubiquitina | Santa Cruz | Sc-8017 | WB | 1:500 |
| β-Actina | Sigma-Aldrich | A5441 | WB | 1:10000 |

Taula 6. Anticossos primaris utilitzats en aquest treball. S'indica la casa comercial, nº catàleg, aplicació i dilució. ICQ: Immunocitoquímica, WB: Western blot, ICH: Immunocitoquímica, RTU: Ready to Use

| Anticòs | Proveïdor | Nº Catàleg | Aplicació | Dilució |
|---------------------------------------|---------------------|------------|-----------|----------|
| Ratoli- IgG HRP | Sigma-Aldrich | A9044 | WB | 1:10.000 |
| Conill-IgG HRP | Sigma-Aldrich | A0545 | WB | 1:10.000 |
| Cabra-IgG HRP | Sigma-Aldrich | A5420 | WB | 1:10.000 |
| Mouse IgG AlexaFluor 594 | Molecular Probes | A11005 | ICQ | 1:600 |
| Mouse IgG Alexa Fluor 488 | Molecular Probes | A11029 | ICQ | 1:600 |
| Rabbit IgG Alexa Fluor 488 | Molecular Probes | A11034 | ICQ | 1:600 |
| Mouset IgG Alexa Fluor 488 | Molecular Probes | A11034 | ICQ | 1:600 |

Taula 7. Anticossos secundaris utilitzats en aquest treball. S'indica la casa comercial, nº catàleg, aplicació i dilució. ICQ: Immunocitoquímica, WB: Western blot.

Electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

Els gels desnaturalitzants de poliacrilamida en presència de SDS s'utilitzen per a separar barreges proteiques complexes segons el seu pes molecular. Es preparen a partir de la solució ACRYL/BIS™ (Amresco), que és una solució al 40% acrilamida amb un 1% de bis-acrilamida. La reacció de polimerització es realitza amb 0,1% de TEMED (Sigma-Aldrich) com a iniciador de la reacció i el persulfat d'amoni al 0,05 % com a catalitzador.

S'utilitzen gels discontinus, és a dir, formats per dos parts amb percentatges d'acrilamida diferents. En la part superior (o gel concentrador) on es carreguen les mostres, hi fem un percentatge baix d'acrilamida (5%) que es prepara en tampó Tris-HCL 0,5 mM a pH 6,8, i serveix per a portar totes les proteïnes del pouet al mateix temps a l'entrada del gel separador. El gel separador es prepara en tampó Tris-HCL 1,5 mM a pH 8,8, el seu percentatge d'acrilamida depèn del pes molecular de les proteïnes que volem separar, i és el que realment separa les proteïnes segons el seu pes molecular. Per a proteïnes de baix pes molecular s'utilitzen gels amb un percentatge superior d'acrilamida que l'utilitzat per a separar proteïnes d'alt pes molecular. Primer es polimeritza el gel separador en la part inferior, i quan aquest estigui completament polimeritzat, construïm el concentrador a la part superior on afegirem una pinta per tal de fer els pouets.

Les mostres ja quantificades es preparen afegint tampó de càrrega 5x (10% SDS, 375 mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 25% β -mercaptoetanol i Blau de bromofenol, i es carreguen al gel. En un dels pous es carrega un marcador de pes molecular pretenyit (Fisher Scientific) per a poder interpretar quina és cadascuna de les bandes que s'obtidran agafant-lo com a referència. L'electroforesi es migra a un amperatge constant de 20mA, tot i que quan les mostres entren al gel separador es pot pujar a 25mA, el gel es migra en tampó de migració (glicina 110mM, Tris 24mM, SDS 0,1%) en el sistema HoefferSE260 (Amersham Biosciences).

Transferència de proteïnes.

La transferència de proteïnes es fa en un sistema de transferència semisec. Primer de tot, i mentre el gel està corrent, cal hidratar la membrana de PVDF (Immobilon P) en metanol

Materials i mètodes

100% durant uns dos minuts i després cal submergir-la en tampó de transferència (48mM Tris, 0,0375% SDS, 39mM glicina i 20% metanol), en el qual també s'ha de submergir el paper de transferència, per tal d'equilibrar-los.

Un cop el gel acabi de córrer també cal submergir-lo en tampó de transferència durant un parell de minuts. Un cop equilibrats es pot començar la transferència, es col·loquen 2 papers de transferència sobre el l'ànode, a sobre es posa la membrana de PVDF, a sobre el gel de poliacrilamida, i dos papers de transferència més. Ens assegurem que no es formin bombolles entre el gel i la membrana i posem la tapa (càtode). La transferència s'inicia a un amperatge constant de 0,8 mA per cm² de membrana. La transferència dura 1h. El sistema utilitzat és Hoeffer TE70XP (Amersham Biosciences).

Immunodetecció de proteïnes.

Un cop finalitzada la transferència proteica, la membrana es posa en solució ponceau que es capaç de tenyir la membrana d'una forma reversible i ens permetrà fer-nos una idea de la carrega proteica. A continuació, es renta en TBS-T (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween20) i tot seguit es bloqueja en solució de bloqueig (TBS-T al 5% de llet desnatada en pols o *bovine serum albumine*-BSA) durant 1 hora a temperatura ambient.

Després del bloqueig es fan tres rentats de 10 minuts en TBS-T i s'incuba amb una dilució en TBS-T de l'anticòs primari (taula 6) amb 0,02% d'Azida sòdica per evitar contaminació bacteriana i així poder-lo reutilitzar. La incubació s'acostuma a deixar durant tota la nit a 4°C, tot i que en casos d'anticossos primaris molt potents pot ser suficient amb una incubació d'una hora a temperatura ambient (β -actina).

Després de la incubació, la solució de l'anticòs es recupera i es guarda a 4°C amb azida sòdica al 0,02% per a poder-se reutilitzar. Amb la membrana es fan 3 rentats de 10 min en TBS-T, i després s'incuba 1 hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari (taula 7), que es dilueix en solució de bloqueig. Passat aquest temps, la membrana es 3 renta 3 vegades amb TBS-T (de 10 minuts cada rentat).

L'anticòs secundari és el que permet fer la detecció perquè està conjugat a peroxidasa, i per a detectar-la s'utilitzen uns reactius comercials que oxiden el luminol (de manera

anàloga a com ho faria amb l'aigua oxigenada), donant una senyal luminiscent. Hi ha bàsicament dos tipus d'aquests reactius, que s'utilitzen segons si es preveu tenir molta o poca senyal luminiscent, EZ-ECL (Biological Industries) i SuperSignal West Dura (Millipore), respectivament. Després s'exposa el senyal luminiscent sobre films (Fujifilm) tot utilitzant una solució reveladora i una fixadora i l'aparell Optimax de Protec.

2.3.2. Immunocitoquímica

La immunocitoquímica (ICQ) és una tècnica que mitjançant la utilització de anticossos específics conjugats amb fluorocroms ens permet identificar la localització cel·lular de les proteïnes de interès.

Les cèl·lules es creixen sobre cobreobjectes de vidre col·locats en plaques de M24, als quals prèviament se'ls ha fet un recobriment amb poli-D-lisina a 15 µg/mL durant 1 hora a temperatura ambient. Aquest recobriment permetrà a les cèl·lules adherir-se correctament als vidres. Passat aquest temps realitzarem 3 rentats amb aigua i deixarem assecar els cobreobjectes.

Plantem 15.000 cèl·lules per cubreobjecte, deixem que s'adhereixen i tractarem. Quan el tractament acabi, fixarem les cèl·lules amb PFA al 4% 15 minuts a temperatura ambient, per tal de preservar intacta la estructura de la cèl·lula i mantindrà la localització de les proteïnes. A continuació es fan tres rentats amb PBS, aspirant suaument i amb compte de no deixar eixugar els pouets.

Abans de la incubació amb l'anticòs primari, cal incubar durant una hora en solució de bloqueig (PBS amb 5% de sèrum de cavall, 5% de sèrum fetal boví, 0,2 % de glicina, 0,1 % de tritó X-100). Durant el procés de bloqueig en realitat es donen dos processos, ja que el Tritó permet la permeabilització de les membranes, fet que permetrà l'accés dels anticossos als seus antígens específics; al l'hora gràcies a l'acció del Sèrum i la glicina és fa el bloqueig dels llocs d'unió inespecífics.

L'anticòs primari (Taula 6) s'incuba durant 16 hores a 4°C. Després de tres rentats amb PBS s'incuba durant 1 hora amb l'anticòs secundari i el Hoechst33258 (0,5 µg/mL) per marcar els nuclis (Taula 7). Aquesta incubació es realitza a les fosques ja que l'anticòs

Materials i mètodes

secundari està marcat amb fluorescència. En acabar es fan tres rentats de 10 minuts en PBS i per la ICQ durant més temps el cobreobjectes seran muntats sobre portaobjectes amb Mowiol (Mowiol 4-88, glicerol 50%, 0.2M Tris-HCl pH 8.5) assecats i guardats a 4°C a la foscor. La seva observació i la presa de fotos es farà al microscopi òptic invertit d'epifluorescència Olympus IX70 (10x, 0,3 NA i 20x, 0,4 NA) i equipat amb fluorescència i camera (Olympus OM-4 Ti). Les imatges es prenen utilitzant el programa DPM manager.

2.3.3. Immunocitoquímica

Tissue Microarray (TMA)

Els òrgans i tumors dels ratolins s'extreuen del animal i immediatament es fixen amb formol durant 24 hores a 4°C. Posteriorment, depenent de la tècnica histològica que volem utilitzar, es poden realitzar dos protocols diferents. Per fer protocols d'immunohistoquímica, els teixits s'inclouen en parafina i posteriorment es fan seccions de 5 µm amb un micròtom per tal de fer tincions d'Hematoxilina-Eosina (H-E) a fi d'estudiar la histologia de cada teixit o tincions d'antígens específics per l'anàlisi de marcadors proteics.

Abans de començar el procés, els talls de 5 µm de parafina es posen a secar a una estufa de 65°C durant 1 hora, després es realitza un pretractament de desparafinació i rehidratació del teixit. Posteriorment es submergeixen els portaobjectes en un tampó que conté 50x Tris/EDTA a pH 9 a 95°C durant 20 minuts, utilitzant un aparell de pretractament PTLINK (DAKO), per tal de recuperar els antígens emmascarats durant la preparació dels teixits per a la tinció (*epitope retrieval*). Abans de la tinció, els talls de parafina s'incuben amb 0,3% de H₂O₂ per bloquejar la peroxidasa endògena i disminuir el fons quan utilitzem el cromogen. Després es fan tres rentats amb PBS i ja podem aplicar l'anticòs primari (Taula 6) durant 20-30 minuts a temperatura ambient. Posteriorment a la incubació es fan tres rentats amb PBS i s'aplica l'anticòs secundari. Si s'utilitza directament l'anticòs secundari unit a la peroxidasa (HRP) s'incuba durant 30 minuts, en canvi si s'utilitza un sistema d'amplificació del senyal, s'incuba primer l'anticòs unit a biotina durant 30 minuts, després es fan tres rentats amb PBS i s'incuba el teixit amb Streptavidina unida a peroxidasa (HRP) durant 15 minuts, tot a temperatura ambient. Finalment per tal de

visualitzar la reacció s'aplica el cromogen de diaminobenzidina (DAB) i es contra tenyeix amb Hematoxilina per marcar els nuclis de les cèl·lules del teixit analitzat.

2.3.4. Assaig d'activitat luciferasa

Per tal de determinar la activitat transcripcional de β -catenina es va realitzar un assaig luciferasa amb el plasmidi reporter TOP-Flash (cedit per la Dr. Garcia de Herreros, IMIM, Barcelona) que conté el gen de la luciferasa sota el control de un promotor sintètic amb tres còpies del lloc d'unió de TCF a β -catenina. Les línies cel·lulars de GBM, es va sembrar en plaques de 24 pouets (M24), i es van transfectar utilitzant Lipofectamina 2000 (Invitrogen) tal i com s'especifica a l'apartat 1.10., amb el reporter TOP-Flash. Després de 24 hores, les cèl·lules es van tractar segons correspongui durant 24 hores més. Un cop finalitzat aquest temps les cèl·lules es van lisar amb 60 μ l de tampó de lisi de luciferasa (glicina 25 mM pH=7,8, Mg_2SO_4 15 mM, 1% TX-100, EGTA 5mM) i movent durant 15 minuts sobre gel. Es van transferir 30 μ l del lisat a plaques de 96 pouets i es va afegir a sobre del lisat 30 μ l del tampó d'assaig de luciferasa a una concentració final de glicina 25 mM, $KHPO_4$ 15 mM pH=7,8, Mg_2SO_4 15 mM, 1% TX -100, EGTA 5 mM, que conté 1 mM de ditiotreitòl, 2 mM d'ATP, 100mM d'acetil-coenzim A i 100 mM de luciferina). L'activitat luciferasa es va mesurar utilitzant un luminòmetre de microplaques (Nunc™). Després de la mesura de la luciferasa, amb el lisat restant es va quantificar la proteïna utilitzant el mètode de Lowry, per a normalitzar els valors de l'activitat de la luciferasa.

2.3.5. Assaig de β -galactosidasa

Per tal d'analitzar l'activitat β -galactosidasa associada a la senescència cel·lular vam utilitzar cèl·lules en cultiu fixades amb un buffer de PBS amb 0.5% de glutaraldehid. En primer lloc, les cèl·lules s'incuben amb buffer de PBS amb 2mM de $MgCl_2$ durant 10 minuts i posteriorment s'incuben amb la solució X-gal, composta per 20mg/ml X-Gal (Sigma-Aldrich), 5mM $K_3Fe(CN)_6$, 5mM $K_4Fe(CN)_6$, i 2mM $MgCl_2$ en un buffer de PBS a pH6. La incubació es du a terme almenys 2 hores dins d'una estufa a 37°C on es va comprovant la tinció, ja que les cèl·lules adopten un color verd turquesa molt característic de la tinció senescent. És molt important realitzar aquesta tinció a pH6 o inclús a pH5, ja que l'activitat

β -galactosidasa dels lisosomes només es activa a pH àcid. Per tal de poder comparar les mostres analitzades, l'assaig es va dur a terme amb totes les mostres simultàniament.

3. Citometria de Flux

3.1. Assaig d'AnnexinaV

Les cèl·lules es van tractar durant 48 hores segons correspongui. Passat aquest temps es van rentar amb PBS, tripsinitzar, centrifugar (5 minuts a 1000 rpm) i rentar 2 cops amb PBS. A continuació es van resuspendre en 50 μ l de *Binding Buffer* 1X (BD Falcon) i es van tenyir amb 2 μ L d'AnnexinaV FITC/APC (Immunotools) i 3 μ L de Iodur de Propidi (0,02 mg/ml; Sigma-Aldrich). Passats 15 minuts en la foscor, es va afegir 200 μ l de *Binding Buffer* 1X i les cèl·lules van ser avaluades en la fluorescència a través de citometria de flux. Els resultats van ser analitzats utilitzant el programa Win MDI 2.9, pel càlcul del nombre de cèl·lules vives, en apoptosi inicial, apoptosi tardana i necrosi.

| | |
|---|-------------------------------------|
| Q1: -An/+PI Cèl·lules Necròtiques | Q2: +An/+PI Apoptosis tardana |
| Q3: -An/-PI Cèl·lules vives | Q4: +An/-PI Apoptosis propera |

Taula 8: Quadre representatiu d'un assaig d'AnnexinaV. Cada quadrant ens informa de l'estat de les cèl·lules en base a la tinció amb AnnexinaV i Iodur de Propidi (PI).

4. Animals d'experimentació

4.1. Consideracions prèvies

Els mètodes experimentals utilitzats en els animals de laboratori que es detallen a continuació s'han desenvolupant seguint les recomanacions recollides per les disposicions legals següents:

Llei 5/1995, de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.

Decret 214/1997, de 30 de juliol, que desenvolupa l'esmentada llei.

Reial Decret 1201/2005, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.

Tots els procediments utilitzats es van realitzar sota la supervisió del personal pertinent de la nostra institució, respectant totes les disposicions legals i ètiques vigents per a la manipulació d'animals d'experimentació. A més, el present treball ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Lleida.

4.2. Animals i tractaments

4.2.1 Ratolins SCID

Els ratolins SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) es caracteritzen per la incapacitat de donar una resposta immune adequada a causa de l'absència o defectuositat dels limfòcits T i B, degut a una mutació recessiva en el cromosoma 16. A nivell funcional, aquesta mutació provoca que el sistema immunològic no maduri i aquests ratolins no poden combatre infeccions ni rebutjar tumors o trasplantaments. Aquests ratolins s'utilitzen com a model animal per l'estudi de tumors subcutanis o *xenografts*.

4.2.2 Tumors subcutanis en ratolins SCID

Per l'estudi de la proliferació dels tumors subcutanis o *xenografts in vivo* es van utilitzar ratolins SCID d'aproximadament 8-12 setmanes d'edat i un pes comprès entre els 20-25 grams. El menjar i l'aigua estaven disponibles *ad libitum*. La temperatura de l'estabulari era de 21°C amb un cicle de llum/fosc de 12:12. Es va injectar subcutàniament 3×10^6 cèl·lules de la línia cel·lular U87-MG control (shRNA scrambled) o amb el TCF4 silenciada (shRNA TCF4). El creixement tumoral es va mesurar cada dos dies mitjançant un peu de rei digital i quan el tumor va arribar a uns 100 mm³ es va iniciar el tractament. Els ratolins es van tractar amb PBS (vehicle) o CQ a 25mg/kg (dissolt en PBS) intraperitonealment cada

Materials i mètodes

dia durant dos setmanes. Finalment, els animals es van sacrificar per dislocació cervical quant el tumor va adquirir un tamany màxim de 2,5 cm³ o quan les condicions de l'animal no eren les adequades. El volum tumoral es va calcular d'acord amb la fórmula TV (Tumor Volume): $(d^2 \times D)/2$, on la lletra d equival al diàmetre més curt i la lletra D al més llarg.

Els tumors dels ratolins s'extreuen del animal i immediatament es fixen amb formol al 24 hores a 4°C. A continuació es van processar per a l'anàlisi immunohistoquímic (apartat 2.3.3.).

5. Eines bioinformàtiques

Image J és un programa de processament d'imatge digital de domini públic programat en Java. Aquesta aplicació permet visualitzar i manejar imatges obtingudes a partir de qualsevol microscopi. És molt útil ja que permet editar o donar color a qualsevol imatge, quantificar intensitats, comptar punts, seleccionar regions d'interès, desenvolupar anàlisis de colocalització, entre d'altres moltes funcions.

<http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Gliovis és una plataforma per al processament de bases de dades existents en glioma. És una eina que permet analitzar expressions de gens, corbes de supervivència, correlacions, etc. d'una forma molt fàcil i intuïtiva.

<https://gliovis.shinyapps.io/GlioVis/>

Resultats

**Capítol 1: β -Catenina nuclear fosforilada en
Y142 s'acumula en astrocitomes i GBM i
promou invasió cel·lular**

1.1. Cultius primaris establerts a partir de biòpsies de pacients mostren positivitat pel marcador astrocític GFAP

Per tal de treballar amb un model el més semblant possible a la malaltia que pateixen els pacients, el nostre grup va establir un acord amb la Unitat de Neurocirurgia de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova (HUAV) per a la cessió de mostres de malalts operats d'un glioma. El teixit derivat de cirurgia és disgregat i posat en cultiu per tal d'establir cultius primaris derivats de biòpsies de pacients. Per tal de comprovar que el que establím en cultiu es tracta efectivament de cèl·lules de glioma, es va analitzar mitjançant immunocitoquímica la presència de "Glial Fibrillari Acidic Protein" (GFAP). És tracta d'una proteïna que marca els filaments intermedis dels astròcits i que s'utilitza com a marcador específic d'aquests. La immunotinció contra GFAP en cultius primaris de gliomes de diferents graus mostra un immunomarcatge citoplasmàtic positiu, i per tant, confirma la naturalesa astrocitària d'aquests tipus de tumors (Fig. 25).

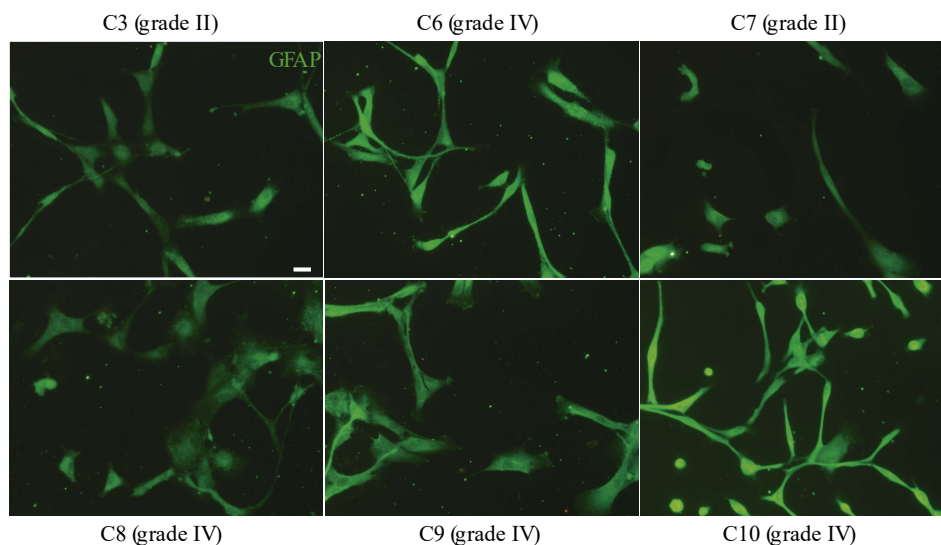


Figura 25. Cultius primaris de glioma expressen GFAP. Immunotinció contra el marcador astrocitària GFAP en cultius primaris establerts a partir de biòpsies de pacients del HUAV, astrocitomes de grau II i GBM (grau IV) (Barra 15 μ m).

1.2. Diferents formes de β -catenina es localitzen en el nucli en línies cel·lulars de GBMs i en cultius primaris d'astrocitomes i GBM.

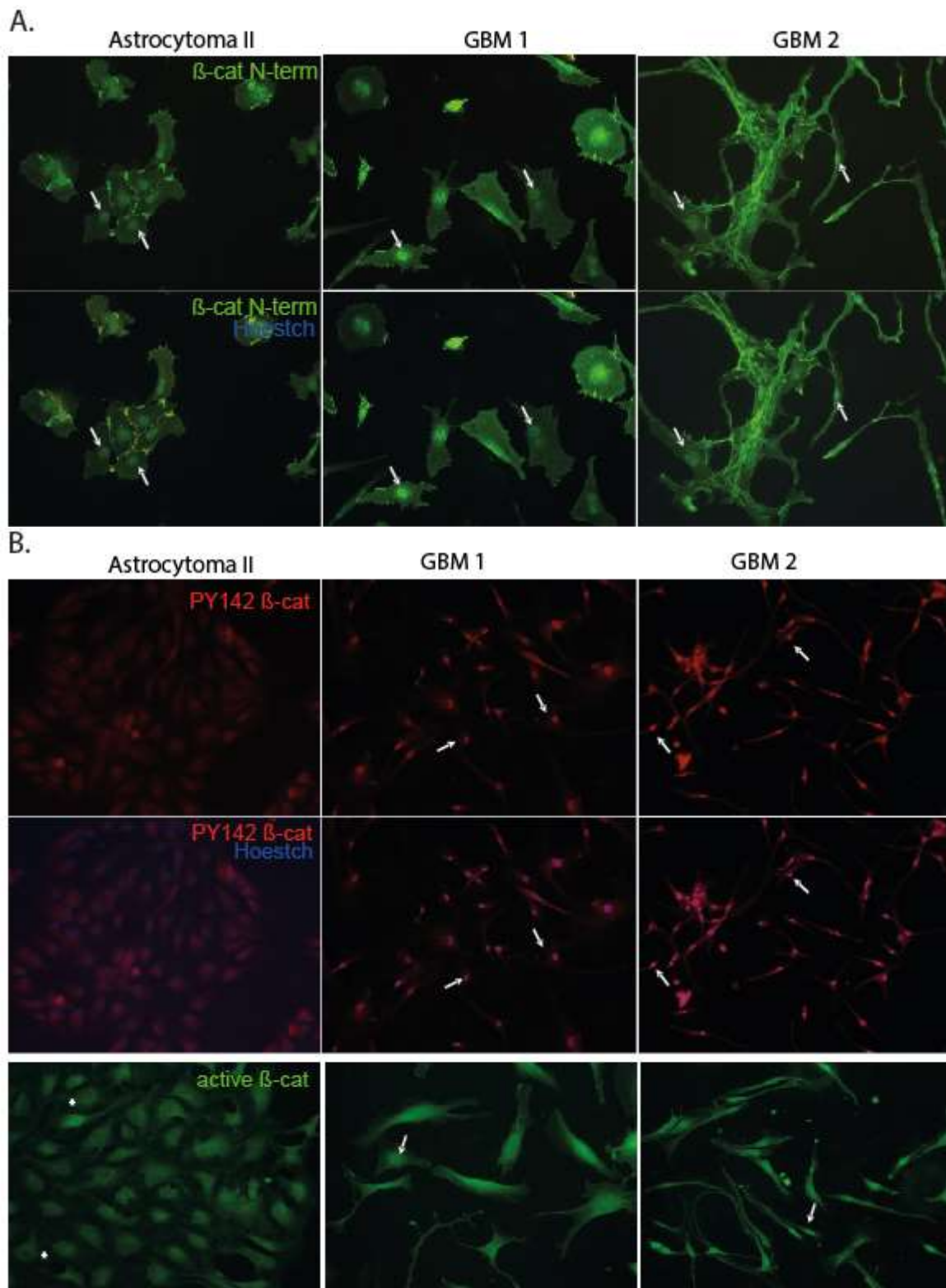


Figura 26. Diferents formes de β -catenina presenten localització nuclear en cultius primaris d'astrocitomes i GBM. Immunocitoquímica contra β -catenina total (epítol N-terminal; N-term)(A), PY142- β -catenina i β -catenina activa i marcades amb Hoechst en (B) cultius primaris d'un astrocitoma de grau II i en dos de GBM (grau IV). Les fletxes indiquen immunoreactivitat positiva en el nucli en GBM, mentre els asteriscs immunotinció perinuclear i negativa als nuclis en astrocitomes de grau II en la tinció contra β -catenina activa. Barres=15 μ m

β -catenina és un proteïna implicada en proliferació i en migració mitjançant la seva participació en la via Wnt canònica i en els complexos d'adhesió. β -catenina juga un paper fonamental en el desenvolupament, però també en situacions patològiques com el càncer (Ciani and Salinas 2005). β -catenina és troba sovint sobreexpressada en càncer degut a mutacions o a alteracions en la seva via (V. S. W. Li et al. 2012). En GBM no s'han descrit mutacions en β -catenina, però sí en elements que la regulen com APC o silenciaments epigenètics d'antagonistes de la via WNT. Es per tant, que ens vam plantejar estudiar-la en aquest treball.

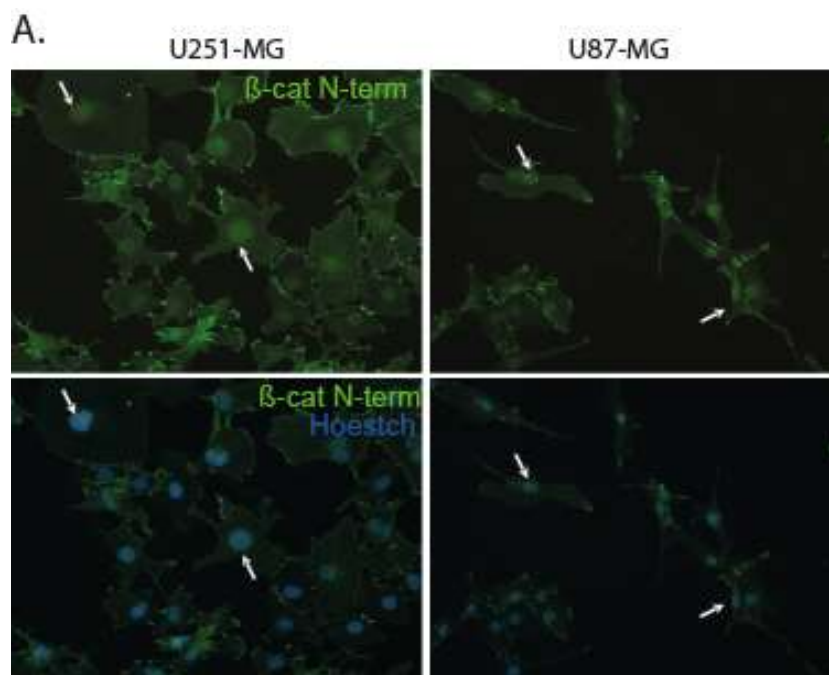
Per tal d'analitzar la localització de les diferents formes de β -catenina es va realitzar un estudi immunocitoquímic en les línies cel·lulars de GBM, U251-MG i U87-MG, i en cultius primaris d'astrocitoma (grau II) i GBM (grau IV).

La immunotinció contra β -catenina total (utilitzant anticossos contra la regió N-terminal de β -catenina; N-term) va revelar la presència d'una fracció nuclear en les línies de GBM i en cultius primaris d'astrocitoma i GBM. A més a més, també es va detectar la localització esperable entre els contactes cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-substrat, on β -catenina participa en l'adhesió cel·lular (Fig. 26/27A). Mitjançant l'ús d'anticossos fosfoespecífics contra β -catenina fosforilada en Y142, vàrem estudiar la seva localització subcel·lular en gliomes. Remarcablement, el marcatge contra la forma de β -catenina fosforilada en Y142 (PY142- β -catenina), és detectable ja en condicions basals del cultiu, evidenciant uns nivells relativament alts i estables d'aquesta forma en cultius de glioma. La immunotinció contra PY142- β -catenina va mostrar una localització citoplasmàtica difusa i nuclear en cèl·lules U251-MG, i predominantment nuclear en cèl·lules U87-MG. En els cultius primaris es van

Resultats

obtenir resultats similars: les tincions citoplasmàtica i nuclear són presents en gliomes de graus baixos, però de forma interessant la localització és manté en GBMs, on els nivells de immunotinció augmenten considerablement comparats amb els dels astrocitomes (Fig. 26/27B).

També vàrem analitzar la forma de β -catenina defosforilada en S/T (β -catenina activa en la via Wnt canònica). La immunotinció per aquesta forma va mostrar una localització nuclear en cèl·lules de GBM, a més, d'una localització citoplasmàtica i en la membrana cel·lular. Per contra, en astrocitomes de baix grau (grau II) la β -catenina activa és clarament citoplasmàtica, sent la tinció nuclear completament negativa en contraposició al que succeeix en cèl·lules de GBM (Fig. 26/27B). Per tant, cultius primaris de glioma i línies de GBM mostren una important fracció nuclear de β -catenina, i d'acord amb això, una part d'aquesta es troba fosforilada en Y142 en astrocitomes i GBM, mentre que la β -catenina activa sols es troba present al nucli en cèl·lules de GBM.



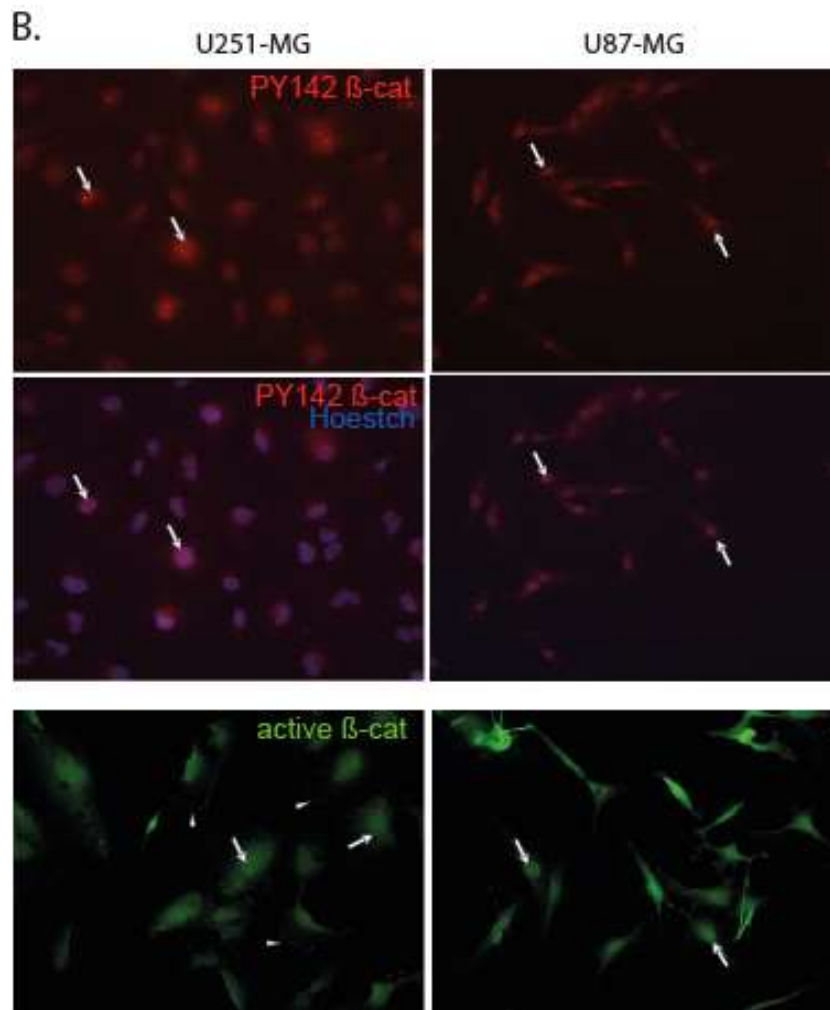


Figura 27. Diferents formes de β -catenina presenten localització nuclear en línies cel·lulars de GBM. Immunocitoquímica contra β -catenina total (epítol N-terminal; N-term) (A), PY142- β -catenina i β -catenina activa i marcadés amb Hoechst (B) en les línies cel·lulars U251-MG i U87-MG (grau IV). Les fletxes indiquen immunoreactivitat positiva en el nucli en GBM, mentre els asteriscs immunotinció perinuclear i negativa als nuclis en astrocitomes de grau II en la tinció contra β -catenina activa. Barres=15 μ m

Resultats

1.3. Estudi de les diferents formes de β -catenina en homogentats de biòpsies d'astrocitomes i de GBMs

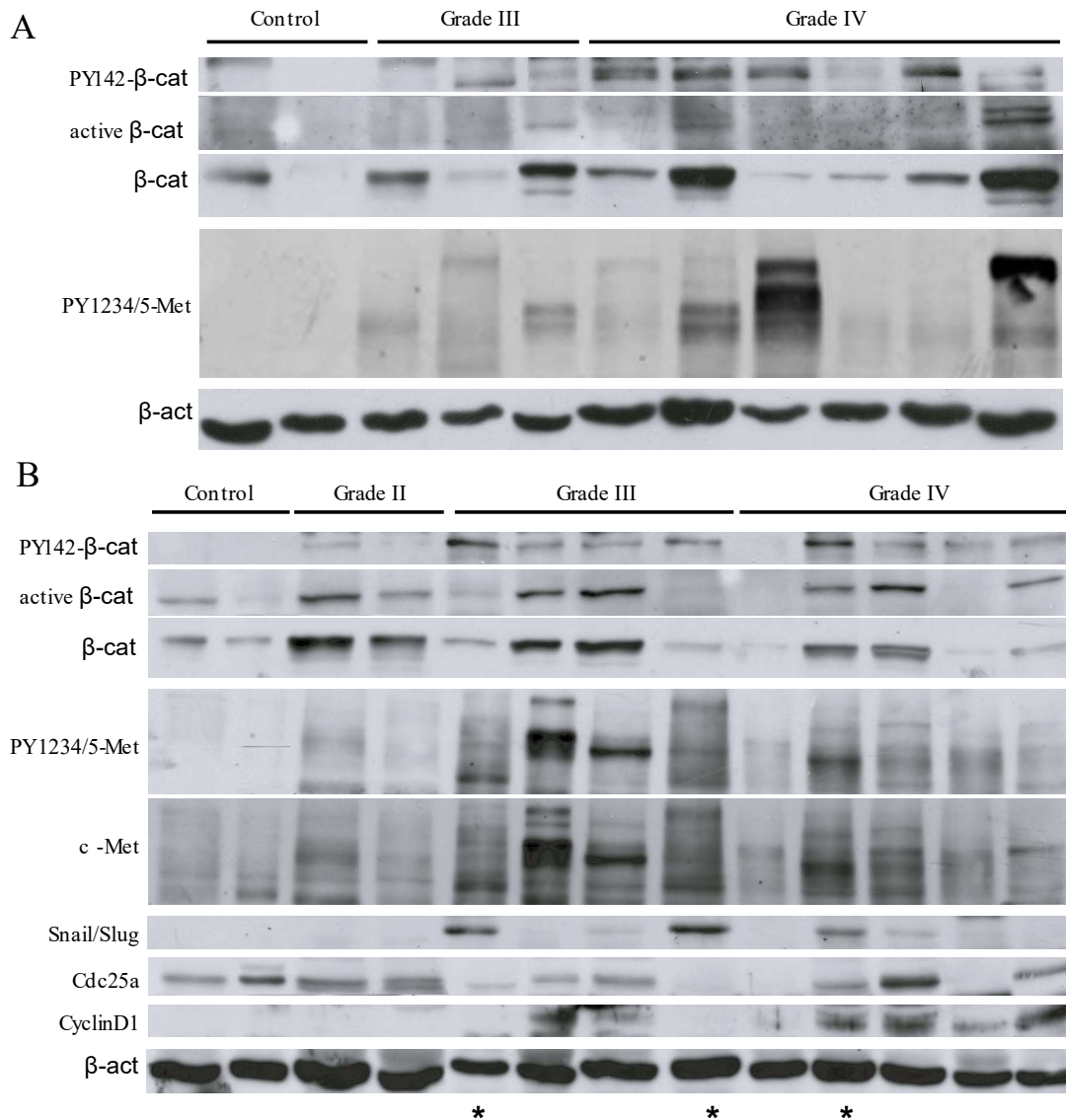


Figura 26. Diferents formes de β -catenina presenten localització nuclear en cultius primaris d'astrocitomes i GBM. Immunocitoquímica contra β -catenina total (epítot N-terminal; N-term)(A), PY142- β -catenina i β -catenina activa i marcades amb Hoechst en (B) cultius primaris d'un astrocitoma de grau II i en dos de GBM (grau IV). Les fletxes indiquen immu als nuclis en astrocitomes de grau II en la tinció contra β -catenina activa. Barres=15 μ m noreactivitat positiva en el nucli en GBM, mentre els asteriscs immunotinció perinuclear i negativa

Per tal d'estudiar la presència de diferents formes de β -catenina en un model el més proper possible al malalt, es va decidir treballar directament amb lisats proteics obtinguts a partir de biòpsies congelades. Es van incloure mostres de teixit control de cervell humà (mostres post-mòrtem extretes d'autòpsies i cedides pel Dr. I. Ferrer, Hospital de Bellvitge, Barcelona) i biòpsies d'astrocitomes de grau II i III i GBM, on es van analitzar els nivells de les diferents formes de β -catenina mencionades anteriorment mitjançant Western blot, així com possibles gens diana regulats per aquestes i de rellevància en la progressió del glioma. β -catenina activa es va detectar en un dels quatre controls analitzats, però els seus nivells incrementen en astrocitomes de grau II i en algunes mostres de grau III i IV, alhora que correlacionen amb els nivells de β -catenina totals, tal i com s'esperaria al ser la forma que s'estabilitza en la via Wnt (Fig. 28). A diferència de la forma activa, l'anàlisi de la forma PY142- β -catenina va indicar que aquesta es detecta en la majoria de les biòpsies d'astrocitomes d'alt grau (III) i GBMs, mentre que en els astrocitomes de baix grau (II) i en mostres control apareixen nivells molt baixos o indetectables. Aquests resultats indiquen una forta presència de PY142- β -catenina en biòpsies d'astrocitomes d'alt grau i en GBMs (Fig. 28). Sorprenentment, PY142- β -catenina s'acumula de forma independent a la β -catenina total i a l'activa en biòpsies d'astrocitomes de grau III i GBMs.

1.4. PY142 β -catenina nuclear, Snail/Slug i c-Met es troben presents en biòpsies d'astrocitomes i GBM

A fi d'avaluar amb més profunditat els nivells i la localització cel·lular de les diferents formes de β -catenina en gliomes, vam realitzar un estudi immunohistoquímic en un microarray de teixit (TMA). El TMA és una tècnica que permet analitzar un gran nombre de mostres, utilitzant un petit cilindre de teixit. El TMA que es va construir incloïa biòpsies d'astrocitomes de grau II i III i GBMs. El marcatge contra β -catenina activa es va trobar ja present en citoplasma en astrocitomes de grau II, III i en GBMs (Fig. 29A). Sorprenentment, en canvi, la localització nuclear de β -catenina activa és exclusiva de GBM, sent completament absent en astrocitomes, en concordança amb els resultats

Resultats

obtinguts mitjançant immunocitoquímica en cultius primaris . L'anàlisi del Histoscore va indicar que β -catenina activa localitza en el nucli del 71% de les mostres de GBM, mentre que no es troba nuclear en cap mostra d'astrocitoma ($p < 0.00001$; Pearson; Taula 9).

| β-catenina activa nuclear | | | |
|---|----------------|----------------|--------------|
| | Negatiu | Positiu | Total |
| Astrocitomes | 15 (100%) | 0 (0%) | 15 (100%) |
| GBMs | 16 (29%) | 39 (71%) | 55 (100%) |
| p-valor < 0, 00001 | | | |

Taula 9. Anàlisi estadístic del estudi immunohistoquímic de la localització de la β -catenina activa. Associació entre la positivitat/negativitat de la localització nuclear de la β -catenina activa en gliomes (astrocitomes vs GBMs). Freqüència absoluta (i percentatges) es mostra per a cada tipus de glioma. El p-value es obtingut a partir del test Pearson per tal de obtindre la significança.

La següent forma analitzada va ser la PY142 β -catenina. La tinció d'aquesta senyala una localització citoplasmàtica i concentrada en nuclis en astrocitomes de grau II, III i GBM. L'anàlisi estadístic denota que els nivells de marcatge nuclear augmenten en astrocitomes (grau II i III) en un 37% respecte a les mostres de GBM. (p -value = 0,01; Fig. 29; Taula 10). En resum i en concordança amb els resultats obtinguts mitjançant l'immunocitoquímica de cultius cel·lulars, en l'estudi del TMA PY142 β -catenina presenta un localització nuclear en astrocitomes i GBM, mentre que β -catenina activa es troba nuclear només en mostres de GBM. Aquests resultats demostren que la β -catenina activa i la PY142 són dos formes diferents que s'acumulen independentment en el nucli durant la progressió tumoral d'astrocitoma a GBM.

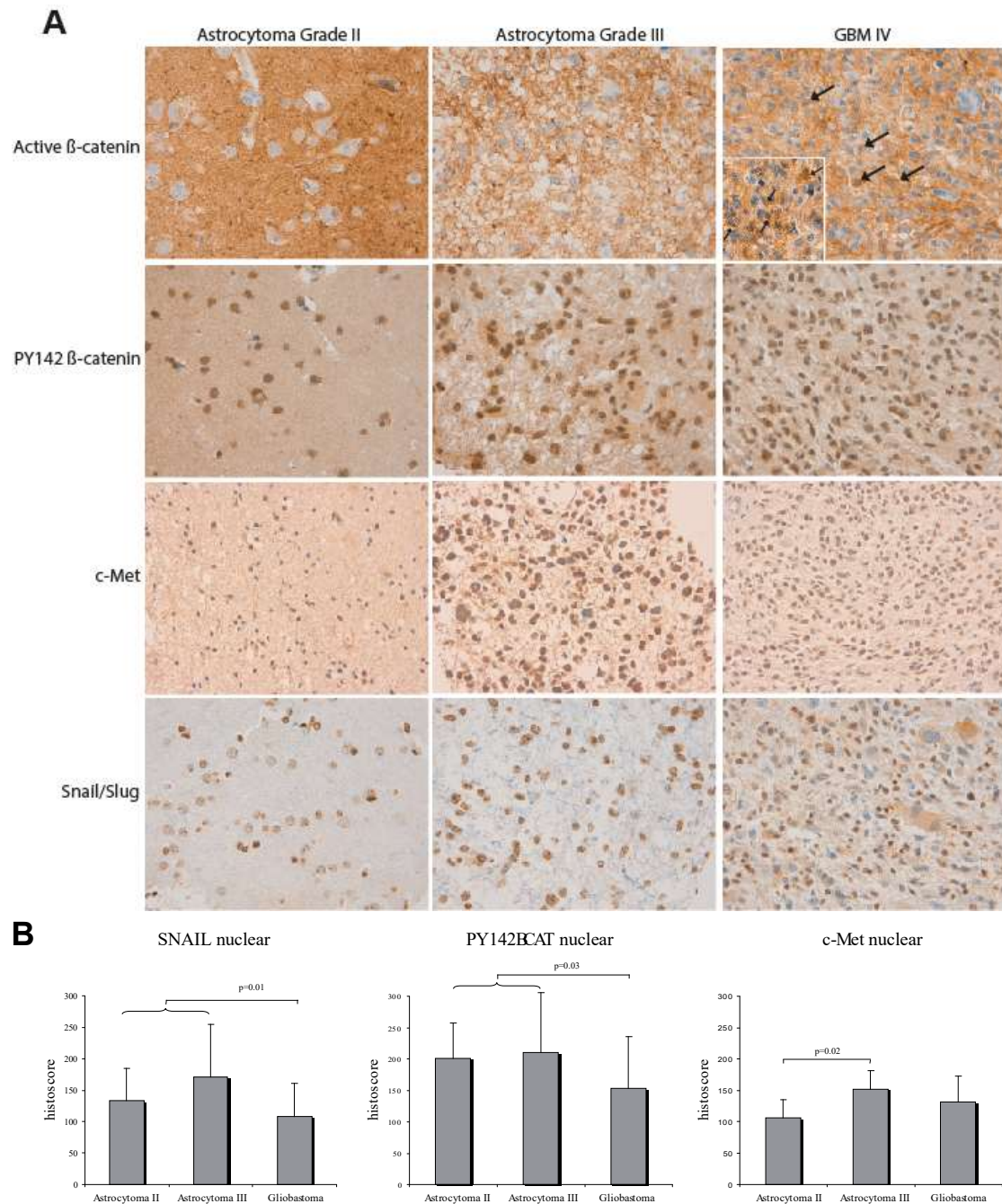


Figura 29. Els nivells de PY142 β -catenina nuclear, Snail/Slug i c-Met canvien durant la progressió tumoral en astrocitoma i GBM (A) Immunotincions representatives de β -catenina, PY142- β -catenina, Snail/Slug i c-Met en mostres de grau II, III i IV en un TMA. Els nuclis es van tnyir amb hematoxilina. Les fletxes indiquen marcatge nuclear de la β -catenina activa en GBM. (B) Anàlisi estadística (test de Mann-Whitney) dels Histoscore obtinguts del TMA. La gràfica representa la mitjana dels nivells de tinció amb la desviació estàndard en les barres.

Resultats

c-Met és un receptor tirosina cinasa que durant el desenvolupament neuronal fosforila β -catenina en el residu Y142 (David et al. 2008), que freqüentment es troba hiperactiu en GBM (Birchmeier et al. 2003; Koochekpour et al. 1997; W. Liu et al. 2011; Xie et al. 2012) i associat a recurrències (W. Liu et al. 2011). És per això que es estudiar si l'activació de c-Met correlacionava amb el nivells de PY142 β -catenina en biòpsies de glioma (en homogenats i en el TMA), com a possible cinasa que fosforila β -catenina en Y142. Es van analitzar els nivells de c-Met total i de la seva forma activa fosforilada en Y1234/5 (PY1234/5 c-Met) en homogenats de cervell control, astrocitomes (grau II i III) i GBM. El Western blot contra PY1234/5 c-Met mostra un nivells alts de fosforilació en astrocitomes d'alt grau i GBM, confirmant que c-Met es troba freqüentment activat (Fig 28). No obstant això, PY142 β -catenina i PY1234/5 c-Met no semblen correlacionar en la mateixa mostra. D'altra banda, l'anàlisi immunohistoquímica del TMA denota una fracció predominantment nuclear de c-Met en biòpsies de glioma (Fig. 29), tal i com es va observar en cultius primaris (Fig. 30), que és més patent en astrocitomes d'alt grau i GBM. L'anàlisi estadística indica que c-Met nuclear augmenta en astrocitomes de grau III comparat amb grau II (p-value =0,03; Fig. 29B). A més, en astrocitomes d'alt grau (III) s'observa una correlació significativa entre els nivells nuclears de c-Met i els de PY142 β -catenina, mitjançant l'anàlisi estadística de la immunohistoquímica realitzada al TMA (p=0,04; Pearson).

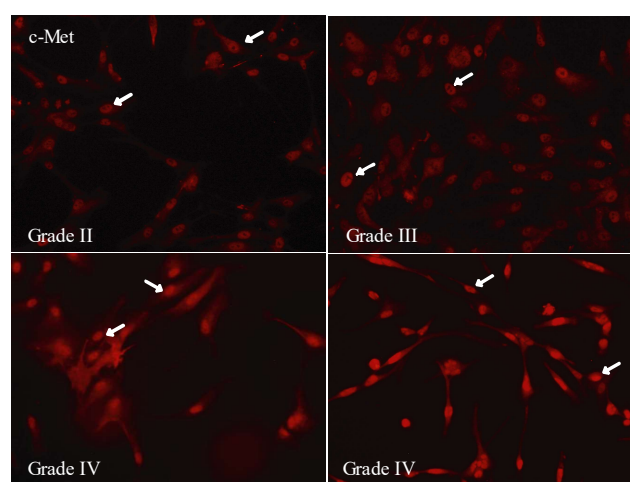


Figura 30. Immunotinció contra c-Met en cultius primaris d'astrocitomes i GBMs
Immunocitoquímica contra c-Met (utilitzant l'anticòs SC-161) en cultius primaris d'astrocitomes (grau II i III) i GBMs. Les fletxes indiquen localització nuclear de c-Met.

Donat que β -catenina senyalitza transcripcionalment, a continuació es van avaluar possibles dianes de β -catenina activa i PY142 en biòpsies de glioma. Es va valorar l'expressió de CiclinaD1 i Cdc25a, conegudes dianes de la via Wnt canònica, que es troben implicades en la progressió del cicle cel·lular, i la seva desregulació s'associa a tumorogènesis (Vijayakumar et al. 2011; Yamashita et al. 2010). Per altra banda, Snail/Slug ha sigut àmpliament estudiat com a marcador pro-invasiu, regulat tant per les vies HGF/c-Met com per la senyalització Wnt (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005; García de Herreros and Baulida 2012; Grotegut et al. 2006). L'anàlisi mitjançant Western blot va mostrar que nivells alts de Cdc25a i CiclinaD1 estan presents en aquelles mostres que presenten nivells alts de β -catenina total i de la forma activa en gliomes de grau III i IV (Fig. 28B). Per altra banda, Cdc25a es detecta en tots els graus i en mostres de cervell control, mentre que en canvi, CiclinaD1 no es detecta en els controls ni en astrocitomes de grau II, i sols es troba present en gliomes d'elevada malignitat (astrocitomes grau III i GBMs) (Fig. 28B). Significativament, alts nivells de Snail/Slug són detectats en aquelles biòpsies d'astrocitomes d'alt grau i GBM que a la seva volta presenten nivells alts de PY142- β -catenina (Fig. 28B). Més enllà, l'anàlisi immunohistoquímic de Snail/Slug en biòpsies de gliomes mostra una localització predominantment nuclear en astrocitomes i GBM (sent superior en astrocitomes; p-value =0,01), d'acord amb la funció com a factor de transcripció que exerceix. (Fig. 29; Taula 10). En conjunt, l'estudi de possibles dianes de β -catenina en biòpsies de gliomes apunta a una relació entre els nivells de β -catenina activa i els de CiclinaD1, i suggereix una relació entre PY142 β -catenina i Snail/Slug en astrocitomes d'alt grau i GBMs.

| | | | | | p-value | |
|--|-----------------|----|---------|-------|---------------------|------------------|
| | | n | Mitjana | sd | Astros II vs III | Astros vs GBM |
| c-Met citosòlica | Astrocitomes | 16 | 108,44 | 11,21 | 0,21 | 0,74 |
| | Astrocitoma II | 7 | 145,71 | 35,05 | | |
| | Astrocitoma III | 7 | 120,71 | 29,78 | | |
| | Glioblastoma | 55 | 110,74 | 34,10 | | |
| c-met nuclear | Astrocitomes | 16 | 131,88 | 36,82 | 0,02 | 0,97 |
| | Astrocitoma II | 7 | 105,71 | 30,06 | | |
| | Astrocitoma III | 8 | 151,25 | 30,06 | | |
| | Glioblastoma | 54 | 131,59 | 41,06 | | |
| Snail/Slug nuclear | Astrocitomes | 16 | 157,03 | 70,29 | 0,27 | 0,01 |
| | Astrocitoma II | 7 | 132,50 | 52,22 | | |
| | Astrocitoma III | 8 | 171,25 | 83,28 | | |
| | Glioblastoma | 56 | 108,26 | 51,86 | | |
| PY142 β-Cat nuclear | Astrocitomes | 16 | 209,69 | 75,88 | 0,41 | 0,03 |
| | Astrocitoma II | 7 | 200,00 | 56,43 | | |
| | Astrocitoma III | 8 | 210,00 | 95,33 | | |
| | Glioblastoma | 25 | 152,53 | 82,44 | | |
| PY142βCat citosòlica | Astrocitomes | 8 | 115,63 | 46,40 | 0,15 | 0,48 |
| | Astrocitoma II | 3 | 75,00 | 47,70 | | |
| | Astrocitoma III | 4 | 135,00 | 26,50 | | |
| | Glioblastoma | 11 | 138,64 | 47,75 | | |
| β-catenina activa citosòlica | Astrocitomes | 15 | 133,67 | 32,65 | 0,21 | 0,25 |
| | Astrocitoma II | 7 | 145,71 | 35,05 | | |
| | Astrocitoma III | 7 | 120,71 | 29,78 | | |
| | Glioblastoma | 55 | 116,95 | 41,26 | | |

Taula 10. Anàlisi estadística de l'estudi immunohistoquímic en TMA. Es mostren els valors dels Histoscore en la immunoquímica de c-Met, Snail/Slug, PY142 β -catenina i β -catenina activa en mostres d'astrocitomes grau II, III i GBMs. La mitjana i la desviació estàndard és mostrada per als astrocitomes (en conjunt o separats) i GBMs. El p-value s'ha obtingut mitjançant el test de Mann-whitney, mostrant les diferències entre astrocitomes de grau II i III (separadament), o bé entre astrocitomes (en conjunt) i GBMs. Els p-value significatius apareixen en negreta.

1.5. Els factors de transcripció TCF s'acumulen en astrocitomes i GBMs i correlacionen amb PY142- β -catenina, que senyalitza transcripcionalment.

Els factors de transcripció TCF treballen juntament amb β -catenina en la senyalització de la via Wnt (Cadigan 2012). Degut a l'important funció que desenvolupen es va decidir analitzar el nivells de TCF1 i TCF4 en homogenats de teixits en biòpsies de diferent grau histopatològic mitjançant Western blot. TCF1 es detecta en mostres de grau II, III i IV (Fig. 31A) i a més d'això, les biòpsies de grau III i GBM que tenen nivells alts de TCF1 i TCF4 corresponen a aquelles que expressen també nivells elevats de PY142 β -catenina (Fig. 31A; les mostres que expressen nivells alts de PY142 β -catenina estan marcades amb un asterisc). La correlació entre els factors de transcripció i la forma fosforilada sembla suggerir que PY142 β -catenina és important en la regulació transcripcional de TCF. Per tal d'estudiar amb més profunditat aquesta possible relació, vam realitzar un assaig luciferasa amb el plasmidi TOP-Flash, el qual reporta l'activitat transcripcional de β -catenina. El plasmidi TOP-Flash va ser co-transfectat juntament amb diferents formes mutants de β -catenina: wild-type (WT), un mutant no fosforilable en Y142 (Y142F) i un altre no fosforilable en Y654 (Y654F; vàrem descriure prèviament que aquest residu no és important per la funció de β -catenina com a co-factor transcripcional; David et al., 2008). Mentre l'expressió de les formes WT o del mutant Y654F produeixen uns valors similars d'activitat transcripcional de β -catenina, el mutant Y142F bloqueja potentment l'activitat transcripcional de β -catenina, reduint-la en aproximadament un 80% respecte a la forma WT (Fig. 31B). Aquests resultats demostren que la fosforilació en el residu Y142 és essencial per a l'activitat transcripcional de β -catenina, d'acord amb resultats previs del grup obtinguts en neurones (David et al. 2008).

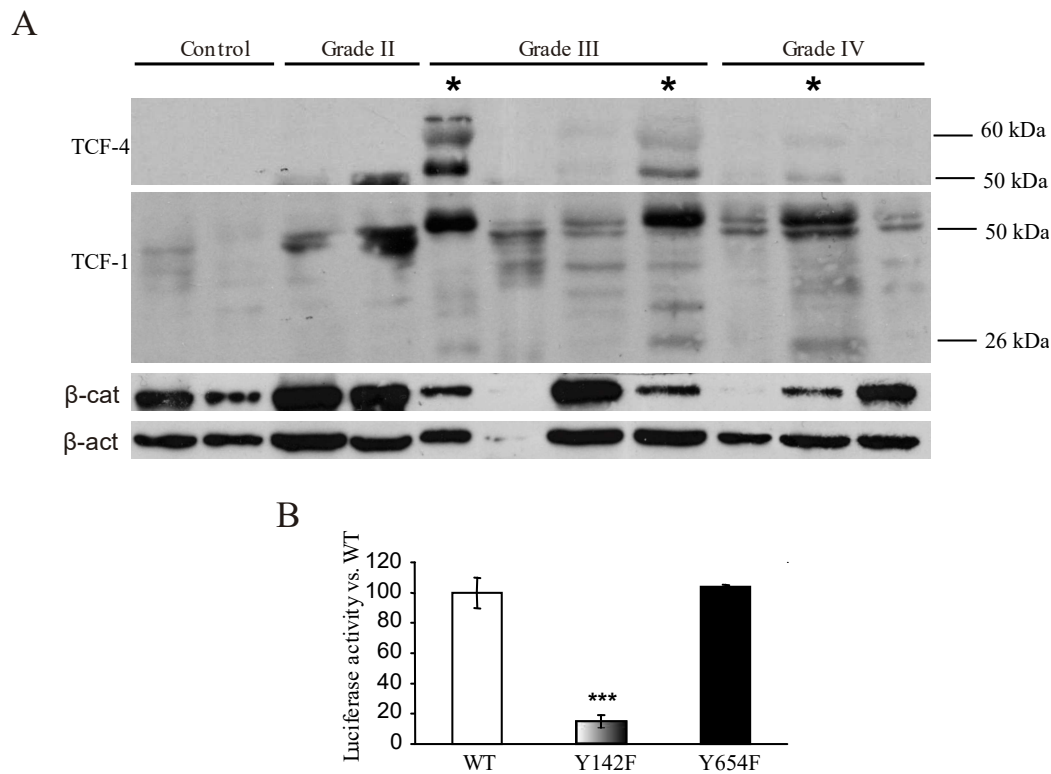


Figura 31. PY142 β -catenina senyalitza transcripcionalment en GBM. (A) Anàlisi mitjançant Western blot dels nivells de TCF4 i TCF1 en homogenats de biòpsies en cervell control (post-mortem), astrocitomes de grau II i III i GBM, així com de β -catenina i β -actina (control de càrrega). L'anticòs contra TCF4 detecta un rang de bandes entre \sim 60-80 kDa, mentre que l'anticòs contra TCF1 detecta principalment una banda de 50 kDa i d'altres entre \sim 30-50 kDa. Els asteriscs indiquen mostres de grau III i IV que expressen nivells alts de TCFs, i alta PY142- β -catenina (senyalats també amb asterisc en la Fig. 2B). (B) Assaig Luciferasa que mostra l'activitat transcripcional de les diferents formes de β -catenina referides a la forma WT. Cèl·lules de U87-MG es van transfectar amb construccions WT, Y142F i Y654F de β -catenina juntament amb el plasmidi TOP-Flash (***) $p < 0,001$)

1.6. HGF regula els nivells de PY142 β -catenina i Snail/Slug en cèl·lules de GBM

El següent punt de interès va ser estudiar la regulació existent entre les vies de c-Met i PY142 β -catenina i sobre l'expressió del marcador de migració Snail/Slug en cèl·lules de GBM, d'acord amb la relació establerta entre aquests marcadors en els estudis de TMA. Es va modular la via HGF/c-Met mitjançant tractaments cel·lulars amb HGF (el lligand específic del receptor c-Met) per tal d'activar-la, o amb l'inhibidor específic de c-Met SU11274 (Berthou et al. 2004) per tal de disminuir la seva activitat.

Les cèl·lules U87-MG es van estimular amb HGF (100 ng/ml; 10 minuts) en absència o presència del inhibidor SU11274 (2 μ M; 16 hores) en situació de privació de sèrum i els lisats cel·lulars van ser analitzats per Western blot amb anticossos contra PY1234/5 c-Met (forma activa de c-Met) i c-Met total. Els nivells elevats de la forma activa de c-Met mostren l'activació del receptor posterior a l'estimulació amb HGF i a la vegada la seva inhibició amb el tractament amb SU11274 (Figura 32), mentre que els nivells total de c-Met no canvien significativament.

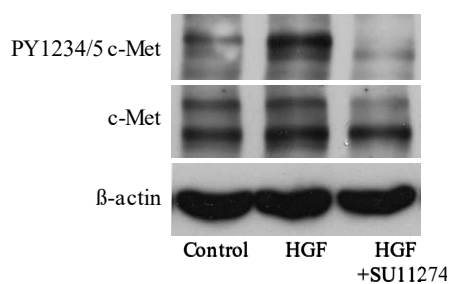


Figura 32. Activació i inhibició de c-Met en cèl·lules U87-MG. Lisats cel·lulars de U87-MG control (privades de sèrum 16 h), tractades amb HGF (10 min, 100 ng/ml) i/o SU11274 (2 μ M, 16h) i analitzats per als nivells de PY1234/5 c-Met i c-Met total. β -actina es va utilitzar com a control de càrrega.

A continuació es va voler relacionar l'activació/inhibició de c-Met amb possibles canvis en els nivells de PY142 β -catenina, així com amb els marcadors pro-migratoris Snail/Slug i N-cadherina. Cèl·lules U87-MG es van estimular amb HGF a diferents temps (10, 25, 50 minuts). Es va observar un augment en els nivells de PY142 β -catenina i també de Snail/Slug i N-cadherina de forma dependent de l'estimulació amb HGF (Fig. 33A). La quantificació dels nivells de PY142 β -catenina va demostrar que l'estimulació amb HGF (100 ng/ml) produeix un pic d'inducció de la forma fosforilada als 25 minuts amb un increment de tres vegades sobre els nivells de les cèl·lules no tractades (Fig 33B). Així mateix, la quantificació dels nivells de Snail/Slug també mostrà un augment significatiu després de l'estimulació amb HGF (Fig. 33B).

Resultats

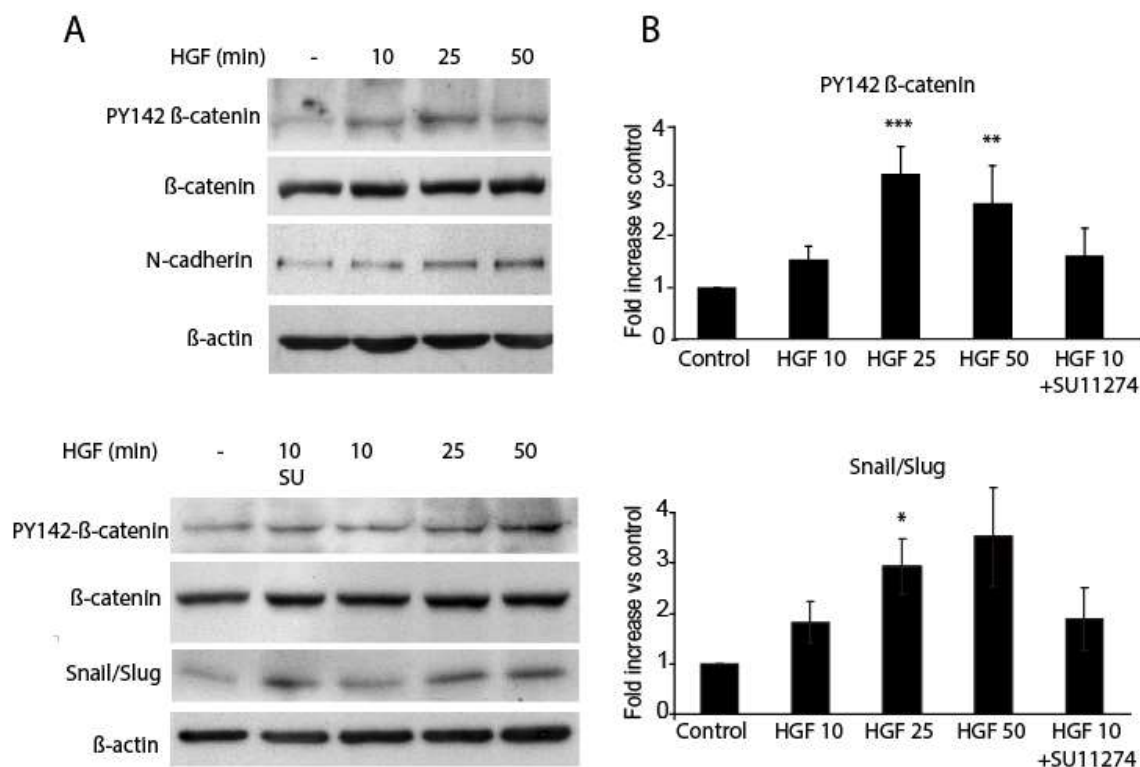


Figura 33. La senyalització de HGF regula el nivells de PY142-β-catenina i Snail/Slug en cèl·lules de GBM. (A) Lisats cel·lulars de U87-MG deprivades de sèrum (16 hores) o tractades amb HGF (100 ng/ml) i Su11274 (2μM; 16 hores) tal i com s'indica. β-actina s'utilitza com a control de carrega (B) Quantificacions dels nivells de PY142 β-catenina (gràfic superior) i Snail/Slug (gràfic inferior) normalitzats respecte als nivells de β-actina. Els resultats de les quantificacions es mostren com a l'increment respecte al control no tractat. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; estadística t-student).

Per contra, el tractament de cèl·lules U87-MG amb SU11274 no va afectar els nivells de PY142 β-catenina, encara que va mostrar una tendència a disminuir els nivells de Snail/Slug a 10 minuts d'estimulació amb HGF (Fig. 33). Recapitulant, els nostres resultats suggereixen que l'estimulació amb HGF incrementa el nivells de PY142 β-catenina, Snail/Slug i N-cadherina en GBM. En canvi, l'absència de l'efecte de l'inhibidor de c-Met sobre els nivells de PY142 β-catenina, es podria deure a l'existència d'altres cinases que regulen la fosforilació de PY142 β-catenina, a més de c-Met, en un punt inferior de la via de senyalització per HGF. Alternativament, fragments proteolítics actius de c-Met que no poden ser inhibits per l'inhibidor i que romandrien constitutivament actius podrien fosforilar PY142 β-catenina (veure Discussió).

1.7. Efecte de la inhibició de c-Met sobre la migració i proliferació en cèl·lules de GBM.

Independentment de l'afectació de PY142 β -catenina, també vam estudiar l'efecte de l'activació i de la inhibició de la via HGF/Met mitjançant l'estimulació per HGF i la inhibició per SU11274 sobre la capacitat de migració i de proliferació de les cèl·lules de GBM. Per tal d'estudiar la migració/invasió es van dur a terme assajos Transwell™, on les cèl·lules de glioma han de ser capaces primer de migrar a través d'una membrana porosa i posteriorment han d'envair una matriu de Matrigel. Cèl·lules U251-MG i U87-MG es van estimular amb HGF (durant les 8 hores que dura l'assaig) amb o sense SU11274 (pretractament previ de 16 hores i després es va mantindre l'inhibidor les 8 hores que dura l'assaig). El tractament amb HGF no va augmentar la capacitat de invasió de les cèl·lules de GBM, mentre que la inhibició de c-Met (SU11274) la va disminuir fortament (entre un 70 i 60%, respectivament, en cèl·lules U251-MG i U87-MG, respecte la capacitat d'invasió de cèl·lules control no tractades (Fig. 34). Aquest resultat indica que l'activació de la via c-Met és un factor important en la capacitat invasiva de les cèl·lules de GBM.

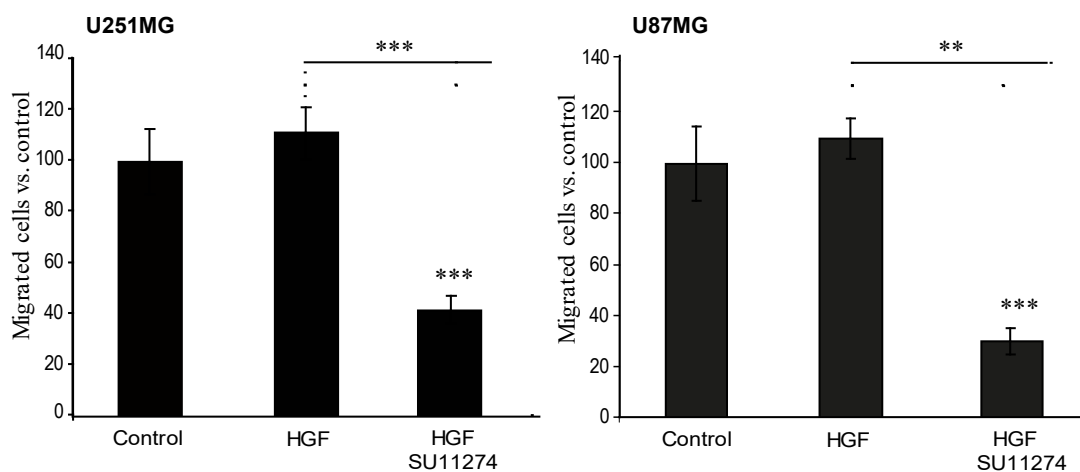


Figura 34. L'inhibidor de c-Met redueix la capacitat d'invasió de cèl·lules de GBM. Cèl·lules U87-MG control, tractades amb HGF (100ng/ml) amb o sense SU11274 (2 μ M, pretractades 16 hores) van migrar a través d'una membrana i després van envair una matriu de Matrigel durant 8 hores. Els resultats mostren les cèl·lules invasives (recollides en la capa de Matrigel) i normalitzats respecte al control i expressats com a increment (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; t-student)

Resultats

Així mateix vàrem estudiar l'efecte de la modulació de c-Met sobre la capacitat de proliferació de les cèl·lules de GBM (U251-MG i U87-MG), utilitzant l'estimulació per HGF (100 ng/ml) i l'inhibidor SU11274 (2 μ M) en un assaig de creixement en colònies de 12 dies. El tractament amb HGF va produir un increment significatiu en el nombre de colònies (un 40% i 35% en U251-MG i U87-MG), mentre que el tractament amb SU11274 el va reduir fortament (50% i 60% en U251-MG i U87-MG) (Fig. 35A). A més a més, vam notar que les cèl·lules tractades amb l'inhibidor experimenten un canvi de morfologia, presentant un fenotip epitelial i un marcat augment de mida en concordança amb la baixa capacitat de migració que presenten aquestes cèl·lules al ser tractades amb l'inhibidor (Fig. 35B).

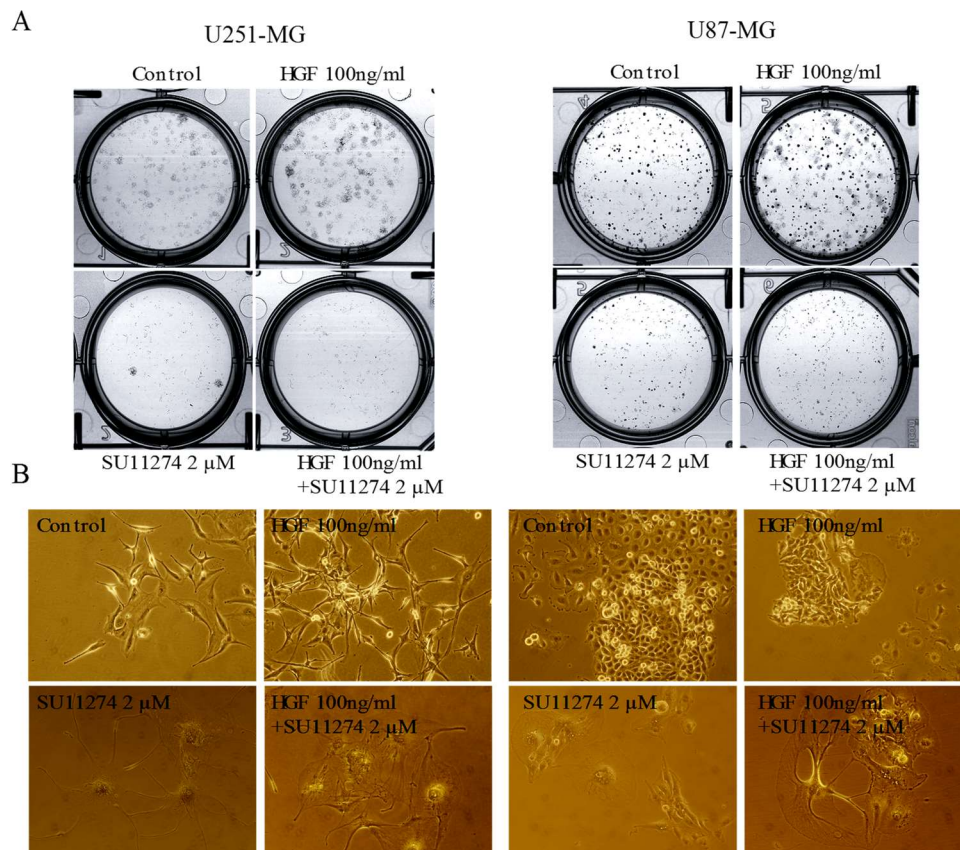


Figura 35. La inhibició de c-Met redueix el creixement en colònies. (A) Assaig clonogènic en cèl·lules U251-MG i U87-MG tractades amb HGF (100ng/ml) o SU11274 (2 μ M) durant 12 dies. (B) Imatges representatives en contrast de fase dels clons formats al cap de 12 dies.

1.8. PY142 β -catenina disminueix l'adhesió cel·lular i promou la migració i invasió de cèl·lules de GBM

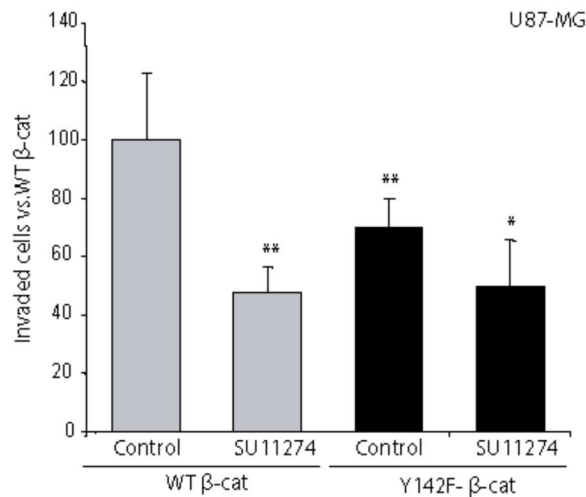


Figura 36. PY142- β -catenina promou migració i invasió de cèl·lules de GBM. (A) Assaig de Transwell™ en cèl·lules U87-MG que expressen les formes WT o Y142F de β -catenina, no tractades o pretractades amb SU11272 (2 μ M, 16 hores). El gràfic representa els valors normalitzats respecte a cèl·lules no tractades que expressen β -catenina WT (* p <0,05; ** p <0,01; t-student)

Diversos estudis demostren la importància de la fosforilació en residus Y de β -catenina per tal d'induir la migració i disminuir l'adhesió cel·lular (W. J. Nelson and Nusse 2004). Així, al nostre grup va decidir estudiar la implicació de PY142 β -catenina en la migració i invasió i de cèl·lules de GBM utilitzant assajos de Transwell i d'adhesió. Amb aquest fi, vam utilitzar el mutant Y142F de β -catenina, que no és capaç de ser fosforilat en aquest residu Y i per tant és inactiu. Cèl·lules U87-MG que expressen el mutant Y142F van mostrar una disminució en la capacitat de invasió un 30% menor que les cèl·lules que expressen β -catenina WT (utilitzada com a control; Fig.36).

D'altra banda, en línia amb resultats anteriors utilitzant l'inhibidor de c-Met, cèl·lules U87-MG que expressen tant la forma WT com el mutant Y142F de β -catenina mostren una reducció en la capacitat de invasió quan són tractades amb SU11274 comparat amb cèl·lules no tractades (Fig. 36).

Resultats

A continuació es va analitzar l'efecte del mutant Y142F sobre la capacitat d'adhesió de les cèl·lules, mitjançant assajos d'adhesió (*spreading assays*). En aquest tipus d'experiment la baixa capacitat d'adherir-se s'associa amb una alta capacitat migratòria (Z. Li et al. 2006). Es permet que les cèl·lules s'adhereixin sobre una matriu de fibronectina durant 30 minuts, i tot seguit es fixen les cèl·lules i es compten aquelles que mantenen la seva morfologia rodona, les quals es considera que presenten baixa capacitat d'adhesió. D'aquesta manera, les cèl·lules transfectades solament amb el plasmidi DsRed (utilitzat com a control de transfecció) o bé, co-transfectades amb DsRed i β -catenina, i tractades amb HGF van mostrar un increment del 20% en el nombre de cèl·lules rodones (és a dir, pobrament adherides i altament migratòries) comparat amb les cèl·lules no tractades (Fig. 37). Aquest resultat està amb concordança amb la funció descrita (Grotegut et al. 2006) per a l'HGF com a inductor de la capacitat migratòria de les cèl·lules de glioma. D'altra banda, les cèl·lules que expressaven el mutant Y142F de β -catenina mostraren una reducció del 20% en el nombre de cèl·lules rodones comparat amb les transfectades amb la forma WT, indicant que el mutant Y142F augmenta l'adhesió de les cèl·lules U87-MG (Fig. 37). Aquestes dades demostren que la forma PY142 β -catenina redueix l'adhesió i que augmenta la capacitat migratòria de cèl·lules de GBM. D'altra banda, a diferència de l'efecte sobre adhesió que va promoure l'estimulació amb HGF en cèl·lules que expressen la forma WT, en cèl·lules transfectades amb el mutant Y142F el tractament amb HGF no va promoure el fenotip migratori (no s'observen diferències significatives en el nombre de cèl·lules rodones transfectades amb el mutant Y142F tractades amb HGF o no tractades; Fig. 37). Per tant, aquests resultats indiquen que la forma PY142 β -catenina és necessària per reduir l'adhesió i per la migració de les cèl·lules U87-MG. A més, l'augment en la capacitat de migració induïda per HGF sembla degut a la senyalització a través de PY142 β -catenina, donat que el mutant Y142F bloqueja l'efecte de l'HGF sobre la capacitat de migració present en cèl·lules control o que expressen β -catenina WT.

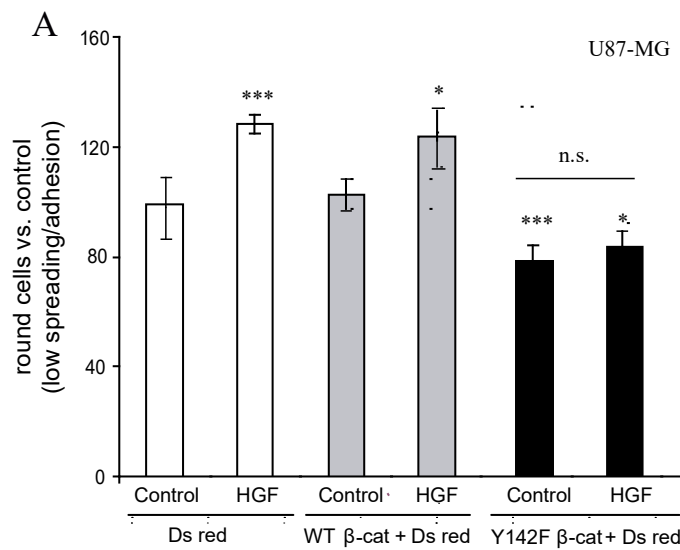


Figura 37. PY142-β-catenina disminueix l'adhesió de cèl·lules de GBM (A) Assaig d'adhesió en cèl·lules U87-MG que expressen la proteïna fluorescent DsRed (control) i cotransfecció de DsRed amb les formes WT o Y142F de β-catenina. Les cèl·lules es van tractar amb HGF (100 ng/ml). Els gràfics mostren el nombre de cèl·lules rodones (per tant, que presenten baixa adhesió i alta migració) normalitzades respecte al control. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,005$; t-student).

Per tal de corroborar aquestes conclusions, es van realitzar experiments d'invasió en Transwell utilitzant cultius primaris de GBMs (cultius C65 i C18) transfectats amb la forma WT o Y142F de β-catenina. Com era d'esperar, el tractament amb HGF va incrementar la capacitat de migració i invasió de les cèl·lules de GBMs que expressaven β-catenina WT comparat amb les cèl·lules no tractades. Per contra, en les cèl·lules que expressaven el mutant Y142F, l'efecte de l'HGF no s'observava (no es troben canvis en el nombre de cèl·lules invasives entre cèl·lules tractades amb HGF respecte al control no tractat (Fig. 38), suggerint així que la senyalització per HGF implica la forma PY142-β-catenina en cultius primaris de GBMs. El tractament combinat amb HGF i l'inhibidor de c-Met va reduir el nombre de cèl·lules invasives tant en cèl·lules que expressen la forma WT com la Y142F de β-catenina (45%-60% per sota del control; Fig. 38), tal i com succeïa en les línies cel·lulars de GBM (Fig. 37). Aquests resultats demostren la implicació de PY142-β-catenina en la invasió del GBM, en part deguda a la seva inducció en la senyalització per HGF.

Resultats

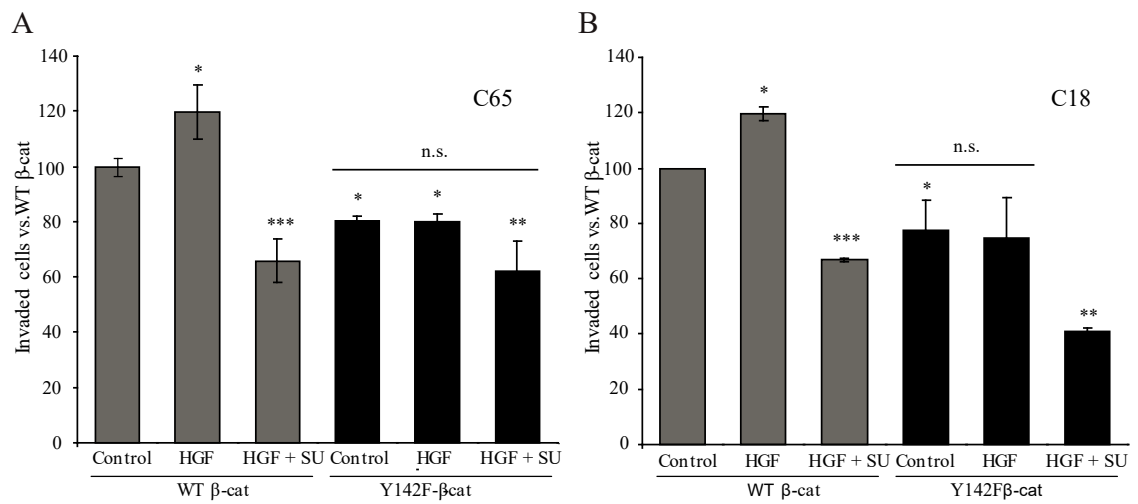


Figura 38. PY142- β -catenina promou la migració/invasió en cultius primaris de GBMs (A i B) Assaigs Transwell™ en cultius primaris de GBM C65 (A) i C18 (B). Cèl·lules de GBM que expressen les formes WT o Y142F de β -catenina es van tractar amb HGF i/o SU11274. El gràfics representen els valors de cèl·lules invasives normalitzats respecte a les cèl·lules no tractades que expressen β -catenina WT (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; t-student)**

**Capítol 2. La inhibició de la via Wnt/ β -Catenina
sobreregula p62 i sensibilitza les cèl·lules de
Glioblastoma a la mort cel·lular induïda per
bloquejants de l'autofàgia**

2.1. Els nivells de p62 incrementen en GBM i correlacionen inversament amb β -catenina

L'autofàgia és un procés pel qual es promou la degradació d'òrgànuls i de proteïnes mal plegades amb el fi d'obtenir energia en determinats contextos cel·lulars. A més, en quant a la senyalització per la via Wnt/ β -catenina s'ha descrit una funció de l'autofàgia en la inhibició d'aquesta via (Petherick et al. 2013). Així, s'ha descrit la degradació de com a mínim dos dels components de la via mitjançant el flux autofàgic, Dishevelled i β -catenina (Petherick et al. 2013; Pulvirenti et al. 2011). D'altra banda, un treball previ havia apuntat a una repressió transcripcional de *p62* per part de β -catenina. El nostre objectiu va ser estudiar com la inhibició de la via Wnt/ β -catenina podia modular p62 i l'autofàgia en el

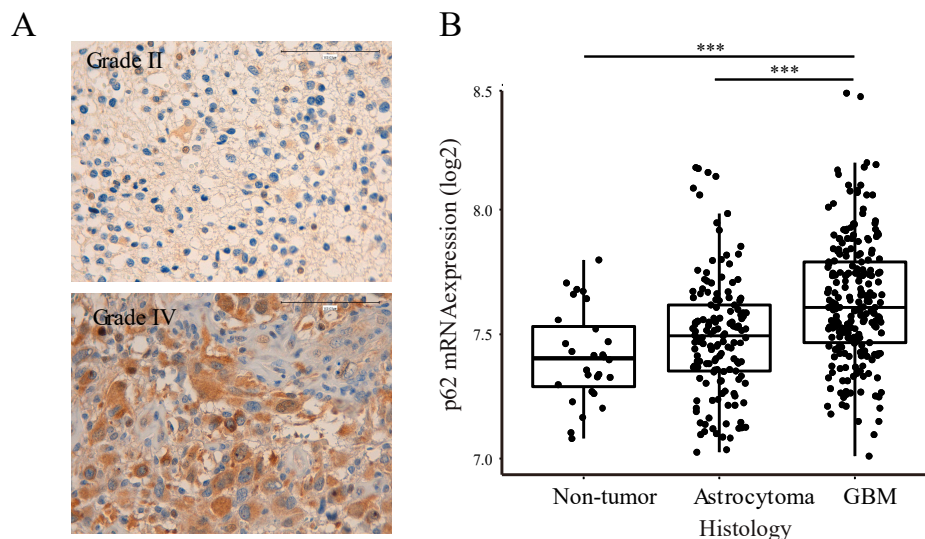


Figura 39. Els nivells de p62 incrementen en GBM. (A) Imatges representatives de la ICH de p62 en un astrocitoma de grau II i un GBM (grau IV). Els nuclis van ser co-tenyits amb hematoxilina (B) Estudi dels nivells de mRNA de p62 en mostres no tumorals, d'astrocitomes (grau II i III) i GBMs analitzades mitjançant la plataforma Gliovis. *** $p < 0,001$ (test de Turkey).

GBM, amb el propòsit de poder afectar la viabilitat de les cèl·lules de GBM. Per tal d'analitzar els nivells de p62 en mostres de gliomas de diferents grau, es va realitzar un estudi immunohistoquímic en un "Tissue MicroArray" (TMA) en una sèrie de 7 astrocitomes difús, 7 astrocitomes anaplàsics i 57 GBMs. Els resultats mostraren (Fig. 39A/B) que p62 es troba ja expressada en astrocitomes de grau II, però la seva expressió

Resultats

incrementa en GBMs comparat amb astrocitomes de baix grau (8,78 vegades; $p=0,03$). L'anàlisi utilitzant la plataforma Gliovis (Bowman et al. 2017) confirma uns nivells de expressió a nivell de mRNA de p62 més elevats en GBM comparat amb mostres no tumorals i astrocitomes ($p<0,001$; Fig. 39B).

Com s'ha comentat abans, un estudi previ en càncer de colon (Petherick et al. 2013) havia descrit la relació inversa entre els nivells de p62 i de β -catenina. L'anàlisi utilitzant la plataforma Gliovis va demostrar també la correlació inversa entre els nivells de mRNA de p62 i de β -catenina ($p=0,01$) en GBM (Fig. 40A). Aquesta relació es va confirmar a nivell proteic en cultius primaris i línies cel·lulars de GBMs (Fig. 40B). Finalment per estudiar la

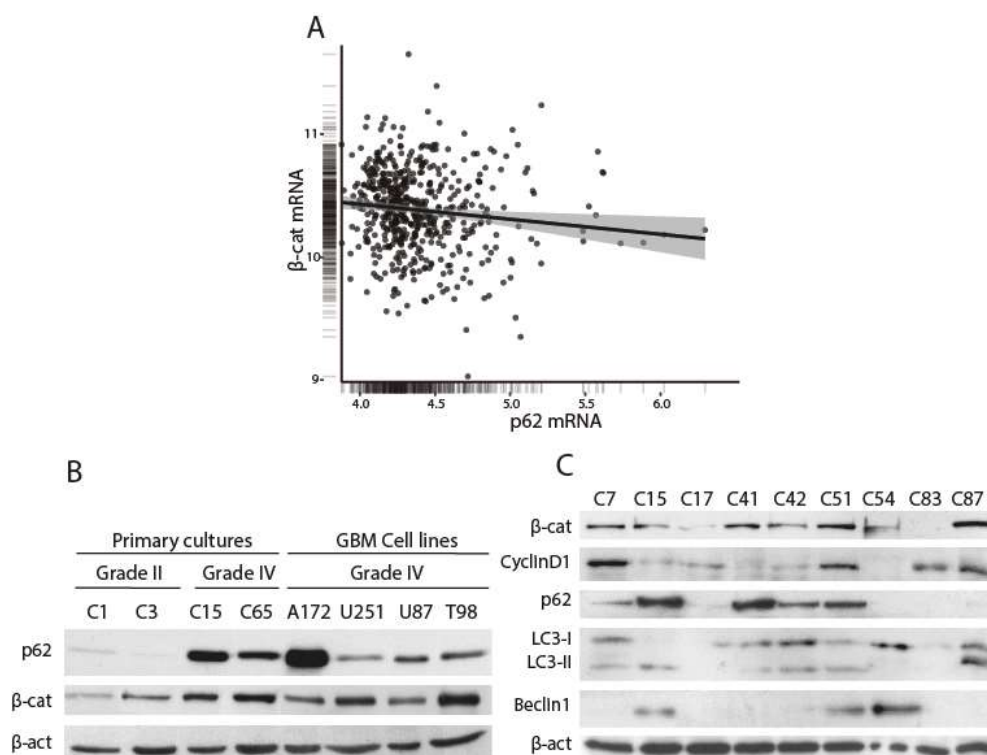


Figura 40. Els nivells de p62 i β -catenina correlacionen inversament en GBM . A) Correlació entre els nivells de expressió de mRNA de β -catenina i p62 en mostres de GBM utilitzant la plataforma Gliovis. Correlació mitjançant el test de Pearson. **(B)** Anàlisi dels nivells proteics de p62 i β -catenina en cultius primaris d'astrocitoma grau II i GBM i línies cel·lulars de GBM. **(C)** Estudi per WB de marcadors autofàgics, β -catenina i ciclinaD1 en cultius primaris de GBM (grau IV). La β -actina és utilitzada com a control de carrega

relació inversa entre l'autofàgia i la via Wnt es va analitzar l'expressió tant de marcadors autofàgics (LC3-II, p62, Beclin1) com del gen diana de Wnt/ β -catenina, ciclinaD1 en cultius

primaris derivats de GBMs (Fig. 40C). Els resultat mostren una cop més la relació inversa existent entre ambdues vies en un gran nombre dels casos analitzats.

2.2. La via Wnt/ β -catenina, a través de TCF/ β -catenina, regula transcripcionalment l'expressió de p62

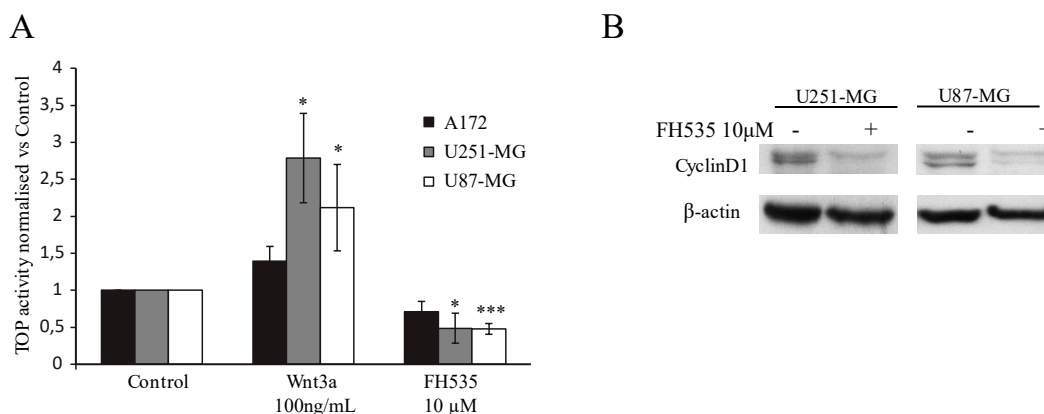


Figura 41. FH535 inhibeix la via Wnt/ β -catenina. (A) L'activitat transcripcional de β -catenina es va determinar utilitzant el plasmidi reporter TOP-Flash en cèl·lules de GBM A172, U251-MG i U87-MG. L'activitat relativa de la luciferasa es va determinar 48 hores després de la transfecció. Les cèl·lules es van tractar amb Wnt3a o FH535 durant les últimes 24 hores. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (B) Anàlisi dels nivells de CiclinaD1 en cèl·lules U251-MG i U87-MG tractades amb FH535 (10 μ M, 24h) mostren una reducció en l'expressió del gen diana. β -actina és utilitzada com a control de càrrega

Per tal d'estudiar com la senyalització Wnt/ β -catenina regula p62 vam tractar cultius de GBM (línies cel·lulars o cultius primaris derivats de biòpsies) amb Wnt3a, lligand canònic d'aquesta via i per tant capaç d'activar-la, o amb un inhibidor farmacològic específic de TCF (FH535) que afecta a la unió entre β -catenina i TCF (Handeli and Simon 2008). Primer, vam comprovar si els dos tractaments eren capaços d'activar o inhibir, respectivament, la via. Per fer-ho es va realitzar una assaig luciferasa expressant el vector TOP-Flash, on un promotor sintètic de TCF que conté tres llocs d'unió per β -catenina (TTTG) controla la expressió del gen reporter de la luciferasa (Miravet et al. 2002). Les cèl·lules de GBM transfectades amb el vector TOP-Flash es van tractar amb Wnt3a (100ng/ml) o FH535 (10

Resultats

μM) durant 24 hores i es va confirmar que Wnt3a és capaç d'induir l'activitat transcripcional de TCF mitjançant l'augment de l'activitat luciferesa; en canvi, FH535 la va disminuir i per tant inhibeix la via (Fig. 41A). A més a més, es va analitzar l'expressió dels nivells de CyclinaD1, un gen diana clàssic d'aquesta via, en les cèl·lules tractades amb FH535, on i tal i com esperàvem la seva expressió es trobà disminuïda (Fig. 41B).

Es va procedir per tant a l'estudi dels nivells de p62. Les línies cel·lulars de GBM es van tractar amb Wnt3a o FH535 durant 24 hores. Es va observar que el Wnt3a és capaç de disminuir els nivells de mRNA de p62 en la línia cel·lular A172. Per contra, FH535 va augmentar els nivells de p62 a nivell de mRNA i proteïna en les línies cel·lulars U251-MG i U87-MG i en cultius primaris, mentre que no va tenir efecte en la línia A172 (Figs. 43A i

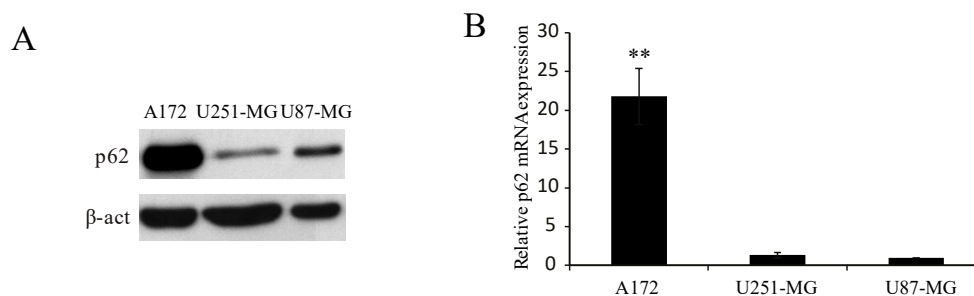


Figura 42. Nivells d'expressió basal de p62 en línies cel·lulars de GBM. Nivells proteics (A) i de mRNA (B) de p62 en línies cel·lulars A172, U251-MG i U87-MG de GBM. (A) β -actina és utilitzada com a control de carrega. (B) Els resultats de qRT-PCR són normalitzats respecte als nivells de mRNA de GAPDH. Les barres de error indiquen mitjana \pm s.e.m. ** $p < 0,01$.

43B). Les diverses línies de GBM que hem analitzat presenten nivells molt diferents de p62, sent molt superiors en A172 (Fig. 42). Aquest fet podria explicar la diferent resposta que presenten davant la modulació de la via, ja que en la línia A172 al ser tant alts els nivells de p62 l'inhibidor no seria capaç de induir més la seva expressió, però per contra Wnt3a sí seria capaç de disminuir-los.

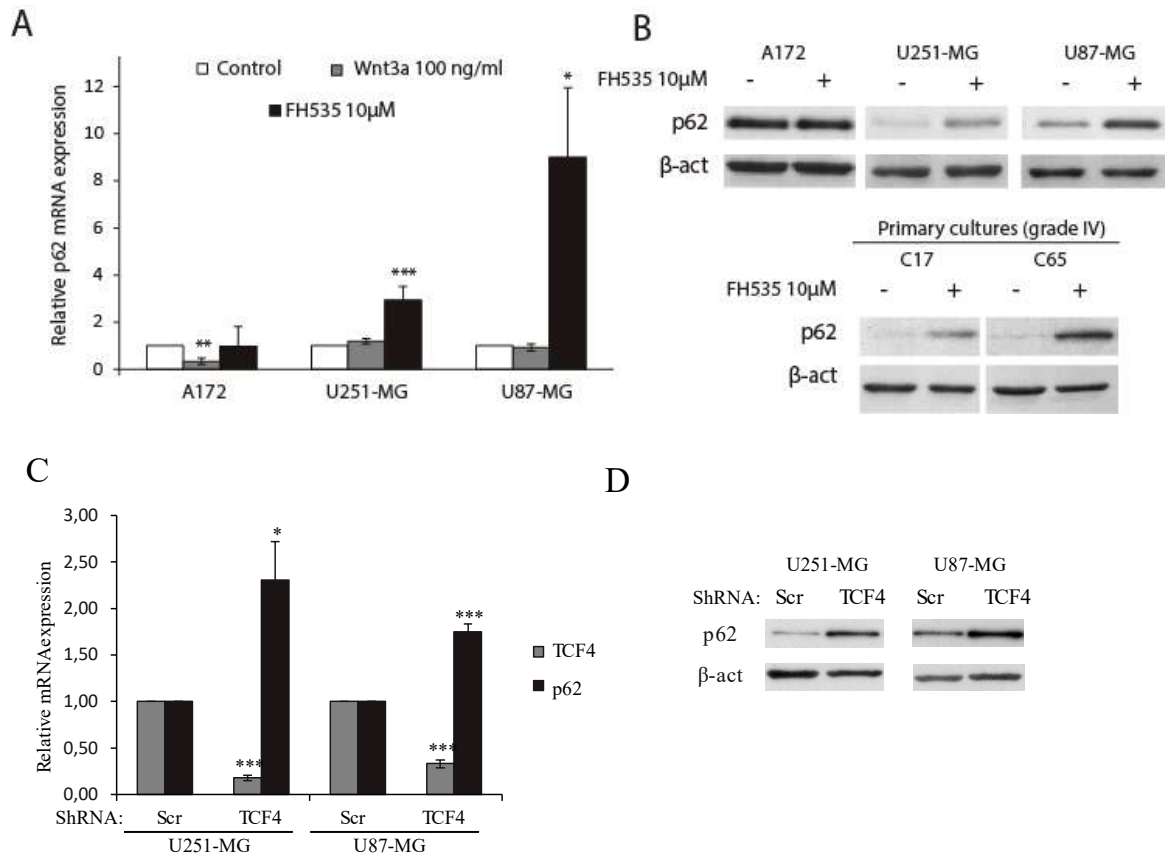


Figura 43. La inhibició de TCF sobrerregula transcripcionalment p62. (A) Línies cel·lulars de GBM es van tractar amb Wnt3a 100 ng/ml i FH535 10 µM durant 24 hores. Els nivells de mRNA de p62 van ser analitzats per qRT-PCR i els resultats normalitzats respecte als nivells de GAPDH. Els valors corresponen a les mitjanes i les desviacions estàndards derivats de tres experiments diferents realitzats en triplicat. (B) L'anàlisi per immunoblot dels nivells de p62 en línies cel·lulars (A172, U251-MG i U87-MG) i cultius primaris (C17 i C65) de GBM després del tractament amb FH535 (10µM, 24 hores). β-actina va ser utilitzada com a control de càrrega. (C i D) Les línies cel·lulars U251-MG i U87-MG es van infectar amb un lentivirus que contenia un shRNA contra TCF4 (shRNA TCF4) i es van analitzar mitjançant qRT-PCR el nivells de TCF4 i de p62 (C) i mitjançant Western blot els de p62 (D). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$

Resultats

Per tal de validar els resultats obtinguts amb l'inhibidor farmacològic de TCF, vam infectar cèl·lules de glioma amb lentivirus per permetre l'expressió d'un ShRNA contra TCF4. Les cèl·lules infectades presentaven una disminució d'entre un 60-80% en la expressió a nivell de mRNA de TCF4, comparat amb cèl·lules que expressaven un ShRNA "scrambled" (Scr) o control (Fig. 43C). En paral·lel amb aquests resultats, aquestes mateixes cèl·lules van mostrar un increment de p62 tant a nivell de mRNA (1,8-2,3 d'increment respecte al scr; Fig. 43C) com de proteïna (Fig. 43D), tal i com havíem observat amb l'inhibidor farmacològic de TCF. Per tant, podem afirmar que la inhibició o silenciament gènic de TCF causen un augment dels nivells de p62 en cèl·lules de GBM.

Com que β -catenina actua com a co-factor transcripcional de TCF, ens vam plantejar estudiar el paper de β -catenina en la regulació de p62. El primer pas va ser transfectar cèl·lules de GBM amb un siRNA contra β -catenina o GAPDH (utilitzat com a control). Tal i

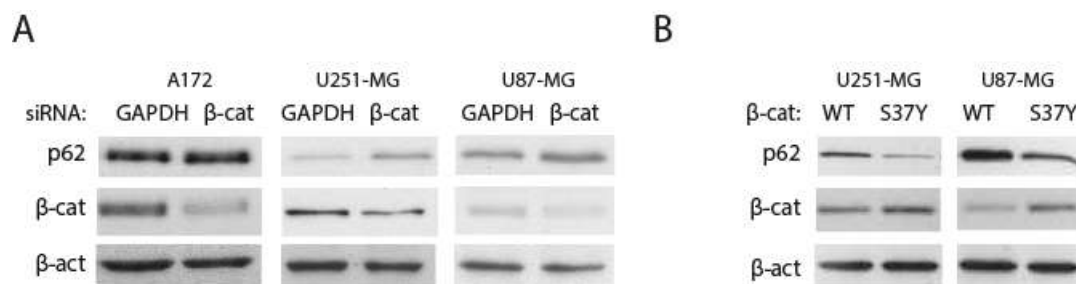


Figura 44. La modulació dels nivells de β -catenina afecta p62 (A i B) Cèl·lules A172, U251-MG i U87-MG van ser transfectades amb un siRNA de GAPDH (com a control) i de β -catenina (A), o bé amb β -catenina WT i S37Y (B) i els lisats cel·lulars es van analitzar per p62 i β -catenina a 48h. β -actina s'utilitza com a control de càrrega.

com esperàvem, es va observar una baixada dels nivells de β -catenina i en paral·lel una pujada dels de p62 en cèl·lules transfectades amb el siRNA de β -catenina respecte al control, en cèl·lules U251-MG i U87-MG, però no en la A172 (Fig. 44A) tal i com succeïa amb l'inhibidor FH535. Per contra, cèl·lules que sobreexpressaven una β -catenina mutant estable (S37Y) que no pot ser degradada, mostraven uns nivells més alts de β -catenina i una disminució en p62 comparat amb les cèl·lules transfectades amb la forma wild type (WT) de β -catenina, confirmant així la regulació de p62 a nivell també de β -catenina (Fig. 44B). Així, els resultats van demostrar que la senyalització per β -catenina/TCF reprimeix transcripcionalment p62 en GBM.

2.3. La inhibició de la senyalització Wnt/ β -catenina incrementa el flux autofàgic en GBM

p62 es una proteïna ben coneguda, que entre d'altres funcions, intervé en el procés autofàgic, concretament com a component dels autofagosomes, reconeixent agregats proteics poliubiquitinants i unint-los a LC3, per tal de segrestar-los als autofagosomes i degradar-los. Degut a que anteriorment havíem demostrat que la via Wnt/ β -catenina regula els nivells de p62, ens vam preguntar si potser també podia regular el flux autofàgic, on p62 juga un paper fonamental. Es van tractar cèl·lules de GBM A172, U251-MG i U87-MG amb l'inhibidor FH535 (10 μ M, 24h) i es van analitzar mitjançant Western blot els nivells de LC3, observant un conversió i acumulació de la forma LC3-II en cèl·lules tractades. Aquest augment indica que hi ha un increment en el nombre d'autofagosomes, però aquest pot ser degut tant a un bloqueig de l'autofàgia (acumulació d'autofagosomes) o també a una inducció del flux, i per tant un augment del nombre de autofagosomes. A més a més, en paral·lel es va observar una disminució de les proteïnes poliubiquitinades en cèl·lules tractades, les quals són degradades durant l'autofàgia, suggerint per tant, una desregulació del flux autofàgic (Fig. 45A). Per tal de comprovar si la desregulació es tracta d'una inducció o un bloqueig del flux autofàgic, es va utilitzar BafilomicinaA1 (Baf), un inhibidor de la bomba V-ATPasa lisosomal que evita la fusió dels autofagosomes amb els lisosomes i per tant bloqueja el flux autofàgic (Klionsky et al. 2016). Si es tracta d'una inducció de l'autofàgia, els nivells de LC3-II després del bloqueig amb Baf seran més alts que amb Baf sola, ja que hi ha més flux i per tant s'acumulen més autofagosomes. Per contra, si es tracta d'un bloqueig, els nivells de LC3-II després del tractament amb Baf seran iguals que en el tractament únic amb el bloquejant de l'autofàgia, ja que el bloqueig ja existia i no es podrien acumular més autofagosomes. Així, es van tractar cèl·lules de GBM amb FH535 durant 24 hores i les últimes dues hores amb o sense combinació amb Baf (5nM) per tal de bloquejar el flux. El cotractament amb FH533 i Baf produeix un increment dels nivells de LC3-II majors que el que es produeixen Baf sola en línies cel·lulars i cultius primaris de GBM. Per exemple, en la línia U87-MG, el doble tractament amb FH535 i Baf produeix un increment de 5,3 vegades en els nivells de LC3-II respecte al

Resultats

control, mentre que Baf sola sols produeix un increment en els nivells de LC3-II de 3,4 vegades. Per tant, essent majors els nivells de LC3-II amb el tractament combinat es tracta d'una inducció. Resultats similars es van obtenir amb la línia cel·lular U251-MG i amb cultius primaris (Fig. 45B). Aquests resultats mostren una inducció del flux autofàgic en cèl·lules de GBM quan TCF és inhibït.

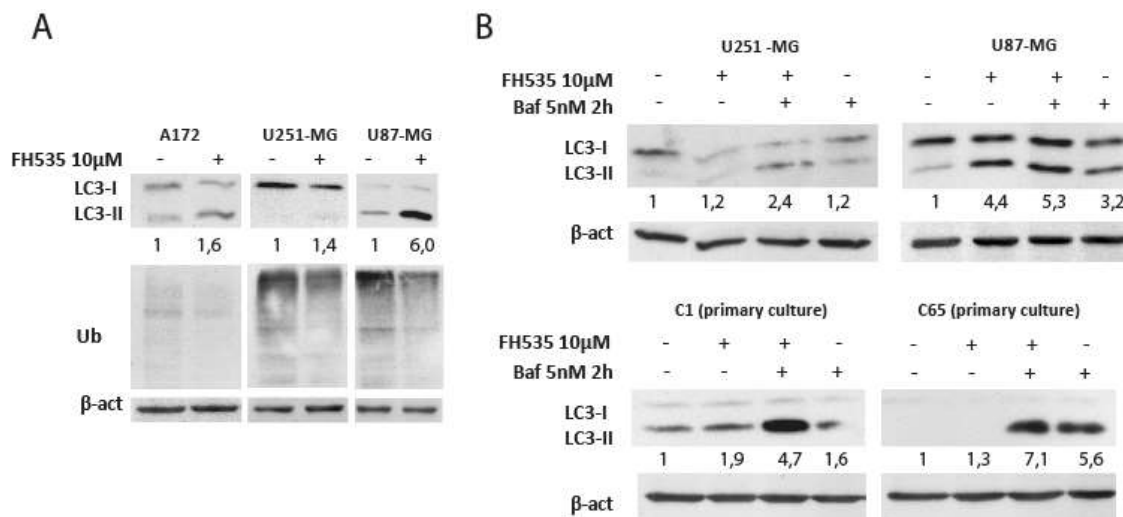


Figura 45. La inhibició de TCF incrementa el flux autofàgic en GBM. (A) Lisats cel·lulars de A172, U251-MG i U87-MG tractats o no amb FH535 (10 µM, 24h) van ser immunoblots contra LC3 i per detectar proteïnes poli-ubiquïtinitzades (B) Les línies cel·lulars U251-MG i U87-MG GBM i els cultius primaris C17 i C65 van ser tractats amb FH535 durant 24h i les últimes dues hores amb Baf 5nM. El lisats cel·lulars van ser blotats contra LC3 i β-actina com a control de càrrega. Els valors indiquen el increment respecte als controls no tractats.

Ens vam preguntar quines podien ser les conseqüències d'una inhibició a un nivell més "upstream", concretament a nivell del complex de receptors de Wnt. Així, vam tractar cèl·lules U251-MG i U87-MG amb DKK-1, un antagonista fisiològic dels lligands Wnts que inhibeix LRP5/6. Tal i com es va fer anteriorment amb el FH535, vam tractar cèl·lules amb DKK-1 (100 ng/ml; 24h) sol o amb combinació amb Baf i, tal i com esperàvem, es va aconseguir una major conversió de LC3-II en el tractament combinat comparat amb Baf sola. Aquest resultat novament suggereix que la inhibició de la via Wnt, aquest cop a nivell de receptor, mitjançant el tractament amb DKK-1 induïx el flux autofàgic (Fig. 46).

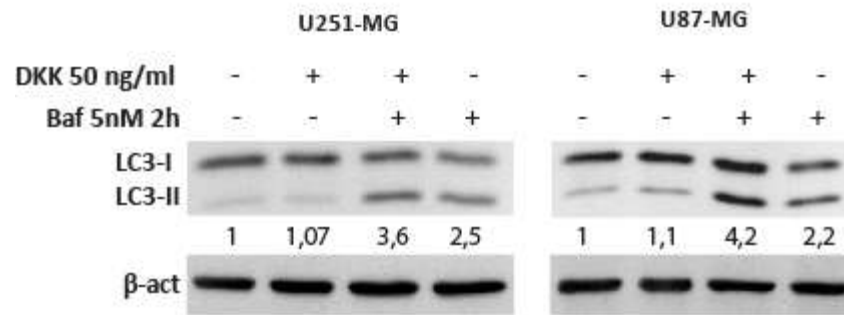


Figura 46. DKK incrementa el flux autofàgic en GBM. (A) Cèl·lules U251-MG i U87-MG van ser tractades amb DKK (50ng/ml) durant 24 hores i les últimes dues amb Baf 5nM. El lisats cel·lulars van ser blotats contra LC3 i β -actina com a control de càrrega. Els valors indiquen el increment respecte als controls no tractats.

Per tal d'estudiar l'autofàgia una de les tècniques més acurades i que dóna informació més conclouent és la transfecció amb el plasmidi del tàndem (ptLC3/mRFP-EGFP), capaç de monitoritzar el flux autofàgic (Kimura, Noda, and Yoshimori 2007). Es tracta d'una construcció que permet l'expressió d'una proteïna de fusió amb les proteïnes fluorescents mRFP i EGFP fusionades a la proteïna dels autofagosomes LC3. La proteïna EGFP perd la fluorescència a pH baix, és a dir, quan es fusionen els autofagosomes amb els lisosomes. Per contra, la fluorescència de mRFP és estable en els autofagolisosomes. Per tant, aquest assaig ens permet distingir els autofagosomes, on la fluorescència serà groga degut a la co-localització de la fluorescència verda i roja, mentre que els autofagolisosomes seran rojos, degut a la degradació de la proteïna verda. Una acumulació de autofagosomes indicarà un bloqueig de l'autofàgia. El tractament amb Rapamicina (500nM; 24 hores), un inductor ben conegut de l'autofàgia mitjançant la inhibició de mTOR, produeix un increment del nombre de punts rojos (autofagolisosomes) respecte al control. Per contra, tractament amb CQ (25 μ M; 24 hores) que bloqueja l'autofàgia produeix augment de punts grocs (autofagosomes, co-localització punts verds i rojos). Els tractaments amb els inhibidors de la via Wnt, DKK o FH535, produeix un patró similar a la Rapamicina, augmentant el nombre de punts rojos i per tant dels autofagolisosomes, indicatiu d'una inducció del flux autofàgic (Fig. 47). Per tant, estos resultats estarien en concordança amb l'anàlisi de la conversió de LC3 (Fig. 46).

Resultats

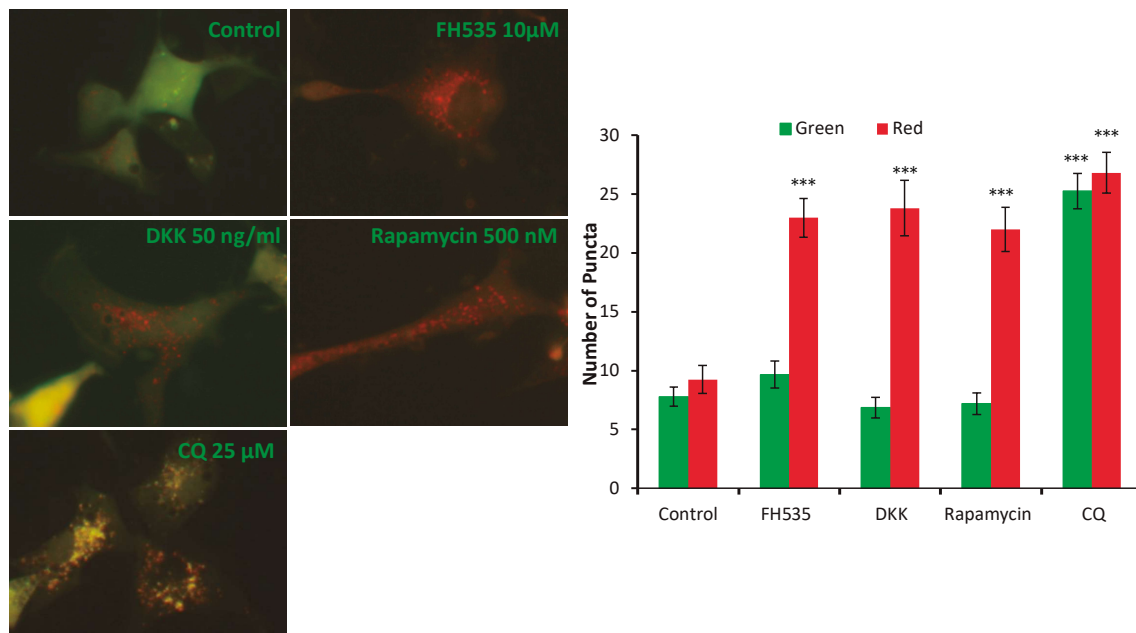


Figura 47. Inhibició de la via Wnt/ β -catenina incrementa el flux autofàgic en GBM. Imatges representatives de cèl·lules de U87-MG transfectades amb el plasmid ptfLC3 tractades tal i com està indicat. Cèl·lules amb co-localització en el puntejat de LC3 de fluorescència roja i verda (taronja) mostren els autofagosomes. Mentre aquelles cèl·lules amb únicament puntejat roig, indiquen autofagolisosomes. El nombre de punts per cèl·lula verds i rojos va ser comptat i representat al gràfic de barres. Les dades corresponen a la mitjana \pm s.e.m de almenys 40 cèl·lules diferents de 10 camps en tres independents experiments. *** $p < 0,001$.

Finalment, com a tercera tècnica per assegurar-nos de l'efecte de la inhibició de la via Wnt sobre l'autofàgia, vam utilitzar la immunocitoquímica contra p62 i LC3, dos components dels autofagosomes. Cèl·lules U87-MG es van tractar amb dues dosis de FH535 o amb els tractaments control, l'inductor de l'autofàgia Rapamicina i els bloquejants Baf i CQ. La Rapamicina va incrementar moderadament el nombre de punts ("puncta") positius per p62 i per LC3, degut als autofagosomes produïts en la inducció de l'autofàgia. Per altra banda, Baf i CQ produeix un gran augment del puntejat positiu per p62 i per LC3; a més a més, aquests punts són més grans, possiblement a conseqüència de la fusió dels autofagosomes produït pel bloqueig de l'autofàgia. Tal i com esperàvem, el tractament amb FH535 va produir un increment del marcatge puntejat i el nombre de punts positius/cèl·lula tant per LC3 com per p62, tal i com succeïa amb el tractament amb Rapamicina (Fig 48).

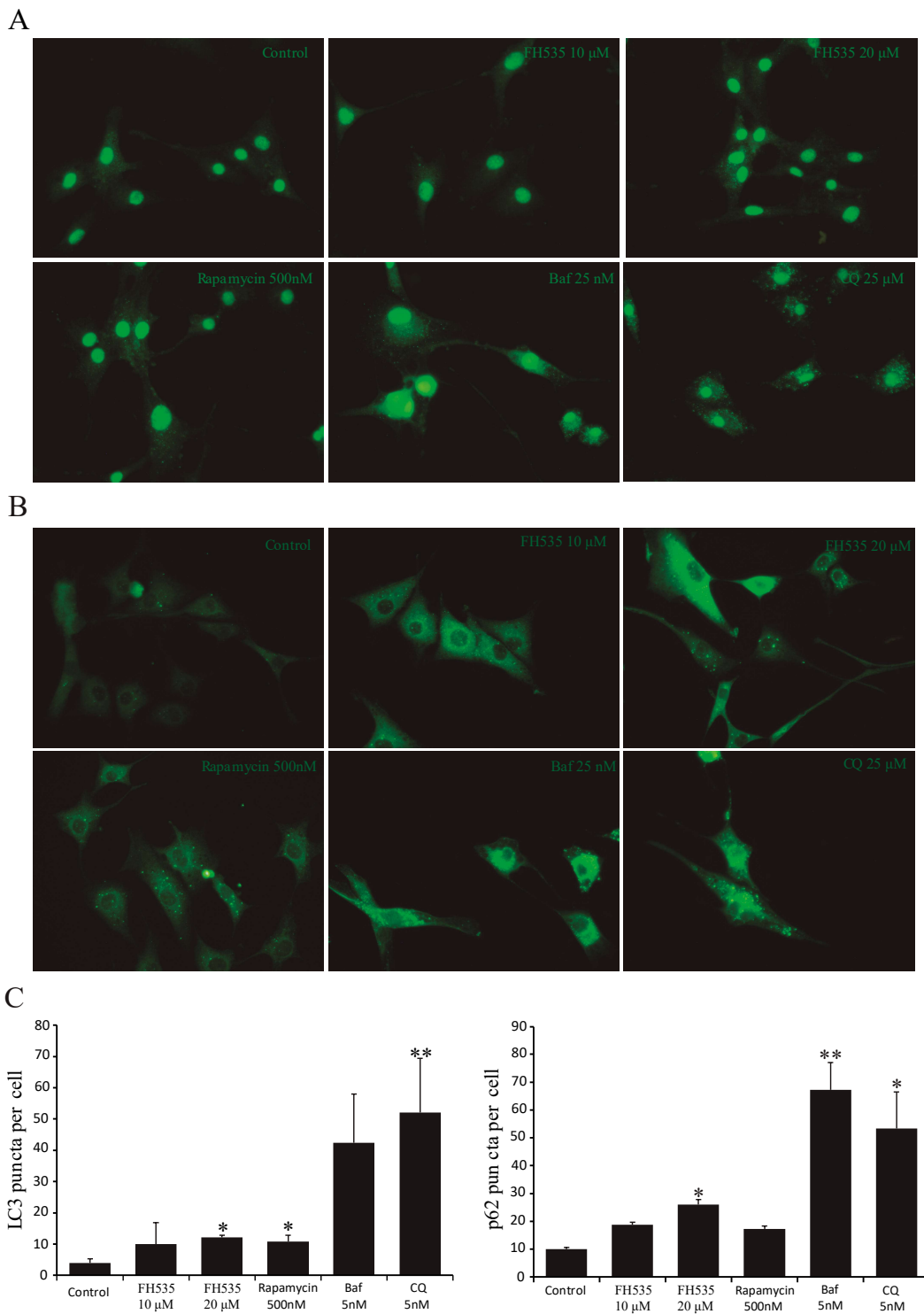
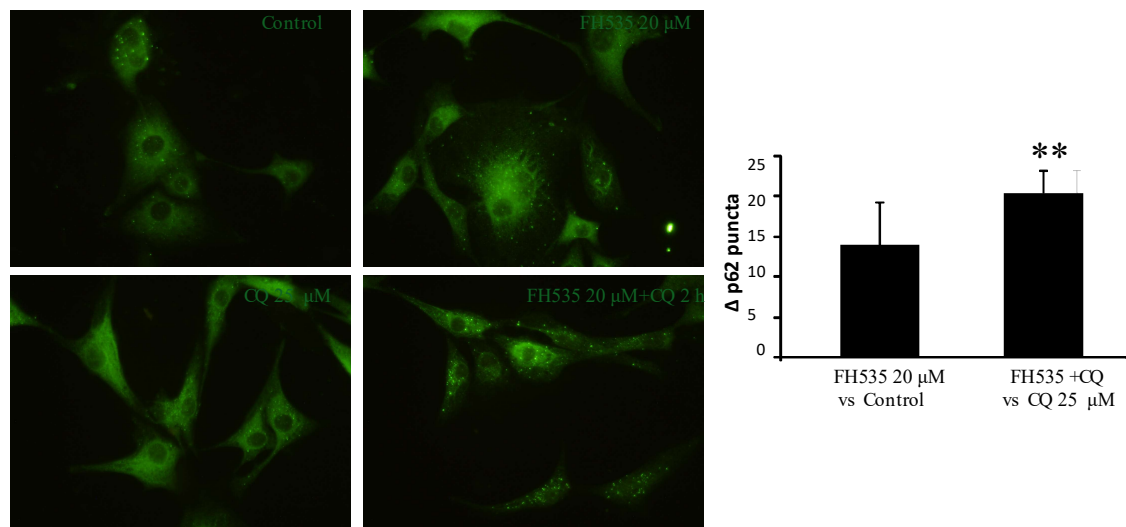


Figura 48. La inhibició de TCF incrementa l'immunomarcatge puntejat positiu per p62 i LC3 en cèl·lules de GBM. Immunocitoquímica contra LC3 (A) i p62 (B) en cèl·lules U87-MG tractades durant 24 hores tal i com està indicat. (C) El nombre de punts positius per LC3 i p62 per cèl·lula van ser comptat utilitzant el programa ImageJ. Les barres de error indiquen \pm s.e.m; * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$.

Resultats

Per a demostrar concloentment que l'augment de marcatge puntejat produït per FH535 es correspon amb una inducció del flux autofàgic i no un bloqueig, vam realitzar marcatges immunocitoquímics contra LC3 i p62, però en cèl·lules co-tractades amb l'inhibidor de TCF (FH535) combinat amb CQ. Els resultats van mostrar un major increment en el nombre de punts positius per LC3 i p62 quan comparem co-tractament de FH535 més CQ vs CQ sola comparat amb FH535 sol vs el control (Fig 49). Així els nostres resultats demostren que la inhibició de TCF promou el flux autofàgic en GBM.

A



B

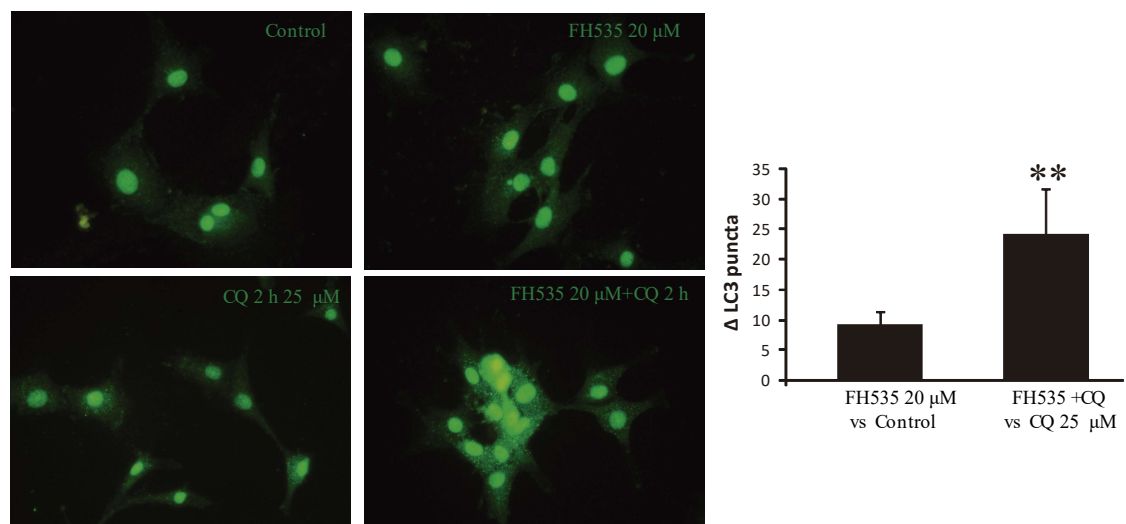


Figura 49. FH535 incrementa el puntejat positiu per p62 i LC3 i el flux autofàgic en GBM. Immunotincions contra LC3 (A) i p62 (B) i Hoechst (nuclis) en cèl·lules de U87-MG. Les cèl·lules van ser tractades en absència o presència de FH535 (10 μ M, 24h) i CQ (25 μ M, últimes 2h). El nombre de punts va ser comptat utilitzant el ImageJ. Els gràfics mostren el increment de punts de LC3 (A) i p62 (B) quan el tractament doble amb FH535 i CQ vs CQ sola el comparem amb el tractament amb FH535 vs cèl·lules no tractades. ** $p < 0,01$

2.4. La inhibició de TCF disminueix la senyalització per mTOR i produeix la translocació nuclear de TFEB

mTOR és una S/T cinasa que ocupa una posició central en moltes vies de senyalització, on integra estímuls positius i negatius que poden desembocar en autofàgia (Laplante and Sabatini 2009, 2013).

Per aquesta raó, la següent pregunta que ens vam fer és si la inhibició de la via Wnt conduïa a autofàgia mitjançant la inhibició de mTOR. Per tal d'estudiar-ho, es van tractar cèl·lules de GBM amb diferents dosis de FH535 (10 i 20 μ M) i amb Rapamicina, com a control positiu de la inhibició de mTOR. Es van analitzar els nivells de fosforilació de PT389 70S6K, un dels substrats de mTOR, en cèl·lules tractades i es va observar que FH535 reduïa els nivells de fosforilació de PT389 70S6K, semblant a com ho fa Rapamicina (Fig. 50A), indicant que mTOR s'inhibeix pel tractament amb FH535. També vàrem estudiar els inputs de mTOR, i concretament vam analitzar l'estatus de fosforilació d'AKT i d'ERK, proteïnes que regulen positivament mTOR mitjançant la inhibició de TSC1/2 (Laplante and Sabatini 2013). Així la inhibició de l'activitat d'AKT i ERK condueix a la inhibició de mTOR i per tant, desencadena el flux autofàgic. El tractament amb FH535 de cèl·lules U251-MG i U87-MG va disminuir els nivells de fosforilació d'AKT i ERK en la línia U87-MG, però no en la U251-MG, suggerint que al menys en part, la inhibició de TCF afecta la via AKT/ERK i consegüentment produeix la inhibició de mTOR (Fig. 50). Per tant, els nostres resultats

Resultats

indiquen que la inhibició de TCF disminueix l'activitat de mTOR per tal d'induir autofàgia, i almenys en la línia U87-MG ho fa mitjançant AKT i ERK.

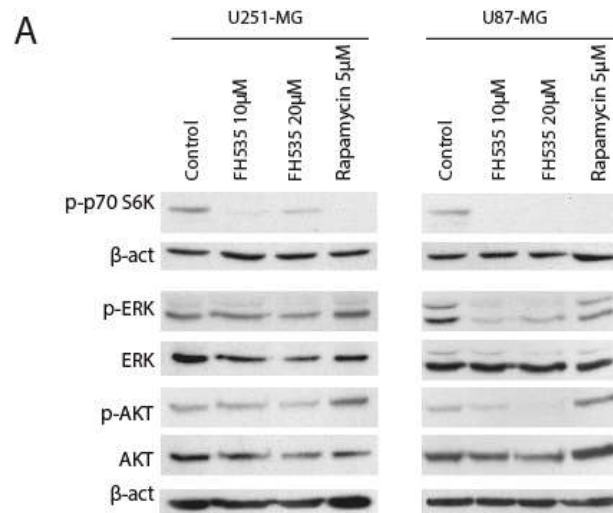


Figura 50. La inhibició de TCF disminueix l'activitat mTOR (A) Cèl·lules U251-MG i U87-MG tractades amb 10 µM, 20 µM de FH535 o 5 µM de Rapamicina durant 24 hores. Es van analitzar els nivells de fosforilació de p70S6K (T389), AKT (S473) i ERK (Y202/204) i es van comparar amb els nivells de proteïna total de AKT i ERK.

Tal i com s'ha comentat amb anterioritat, TFEB és un màster regulador que controla la biogènesi lisosomal, regulant gens del la "Coordinated Lysosomal Expression and Regulation" (CLEAR), entre els que destaca p62 (Laplante and Sabatini 2009; Settembre et al. 2013).

Degut a que la inhibició de TCF induïa autofàgia i augmentava els nivells de p62, vam voler estudiar si aquests efectes podien ser produïts a l'activació de TFEB. Cèl·lules U251-MG i U87-MG es van tractar amb FH535 (10 i 20 µM; 24 hores) i també en privació de nutrients (24 hores en medi sense sèrum) com a control positiu de la inhibició de mTOR que produeix la defosforilació TFEB i la seva translocació a nucli. Els lisats cel·lulars es van analitzar per Western blot utilitzant anticossos contra TFEB. Lisats obtinguts de cèl·lules control (condicions basals) van mostrar dues bandes per TFEB, una que correspon a la proteïna fosforilada (banda de dalt) i un altra a la proteïna defosforilada i activa (banda inferior) que correspondria a la fracció que transloca a nucli, segons està descrit (Laplante and Sabatini 2013; Martina et al. 2012; Roczniak-Ferguson et al. 2012). En condicions de privació de nutrients, quan mTOR està inactiu i l'autofàgia augmentada, sols es va

observar la banda defosforilada corresponent a la forma activa nuclear de TFEB, tal i com s'esperava. Sorprenentment, el tractament amb FH535 també va produir un augment de la banda inferior no fosforilada, indicant la inhibició de TCF activava TFEB (Fig 51A). Per tal de confirmar aquest resultat, vam estudiar la translocació a nucli de TFEB mitjançant immunocitoquímica. Sota condicions control, TFEB es localitzava al citoplasma (en la regió

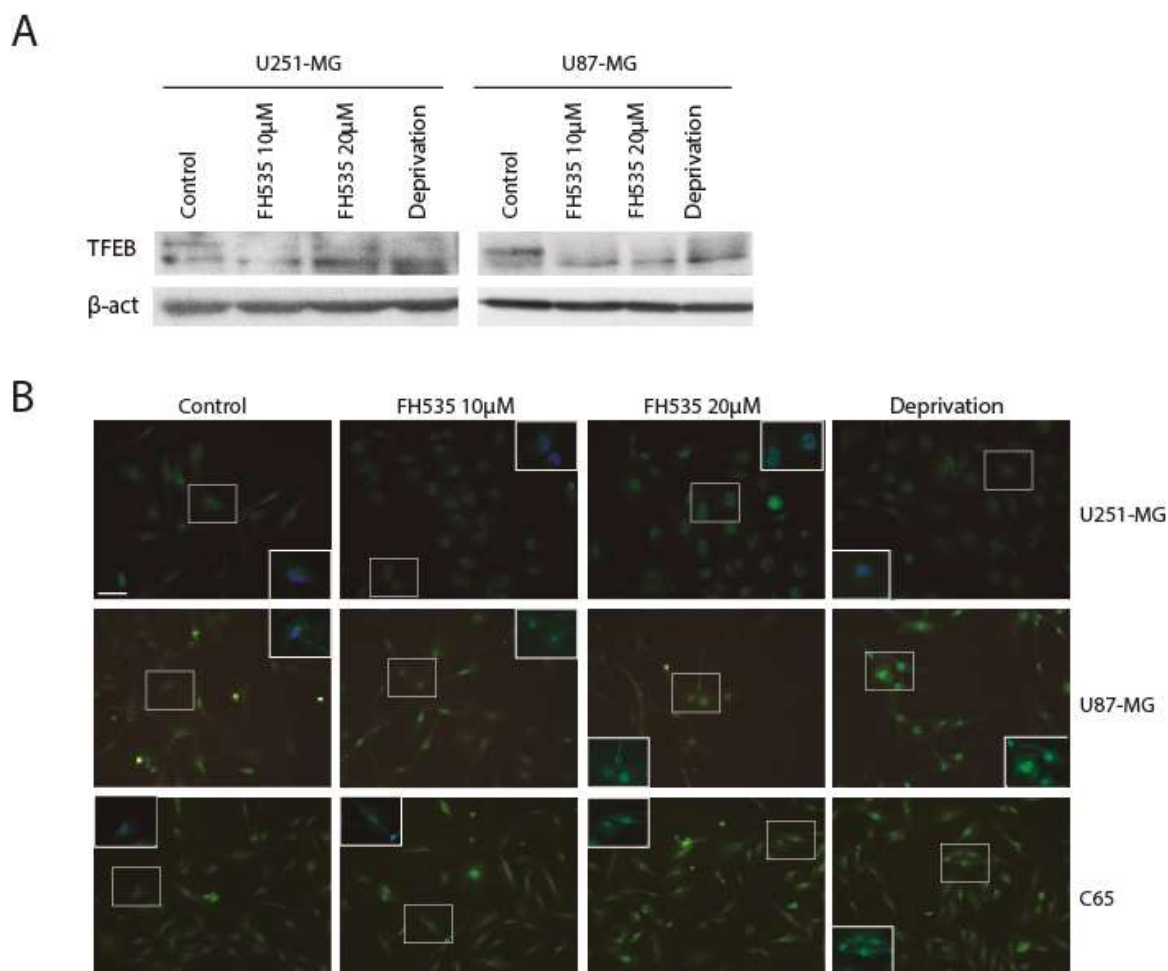


Figura 51. La Inhibició de TCF promou la translocació nuclear de TFEB. (A) Immunoblot de TFEB en cèl·lules no tractades de U251-MG i U87-MG, tractades amb FH535 o condicions de privació de sèrum durant 24 hores. La banda superior correspon a la forma fosforilada/inactiva de TFEB, mentre la banda de sota correspon a la forma no fosforilada, tal i com mostra el control de privació. β -actina es utilitza com a control de carrega. (B) Immunotinció de TFEB en línies cel·lulars U251-MG i U87-MG i en el cultiu primari C65 tractades amb FH535 o en condicions de privació comparades amb condicions control. Les caixes mostren la tinció amb TFEB i Hoechst, on es pot observar la colocalització en el tractament amb FH535 i condicions de privació

Resultats

perinuclear), mentre que en condicions de privació de sèrum TFEB es localitzava predominantment a nucli. De forma molt clara, el tractament amb FH535 va promoure la localització nuclear de TFEB tant en línies cel·lulars com en cultius primaris de GBM (Fig. 52B). Aquest resultat indiquen que la inhibició de TCF indueix l'autofàgia mitjançant la inhibició de la via mTOR i la posterior activació i translocació nuclear de TFEB. Aquest mecanisme també explicaria que FH535 augmenti l'expressió de p62.

2.5. La inhibició de TCF disminueix la migració de cèl·lules de GBM

Un dels principals problemes en el GBM és l'alta recurrència, degut a l'elevat grau d'infiltració que presenta aquest tipus de tumor i que fa impossible la seva completa resecció quirúrgica (Weller et al. 2015). Per aquesta raó, una teràpia que lluiti contra aquest aspecte, intentant reduir el potencial invasiu de les cèl·lules tumorals, seria una molt bona possible estratègia terapèutica. La implicació de la via Wnt en processos de migració i invasió ha sigut amplament descrita (Lamouille, Xu, and Derynck 2014). És per això, que ens vam plantejar quin seria l'efecte de la inhibició de TCF i dels bloquejants de l'autofàgia sobre la capacitat de migració de cèl·lules de GBM en un assaig de "tancament de ferida" (*wound healing*). El tractament amb FH535 va disminuir el tancament de la ferida (va reduir la migració de les cèl·lules) fins un 50% i 40% en U251-MG i U87-MG, respectivament, respecte al control (Fig 53A). Per tal de confirmar aquest resultat, vam realitzar el mateix tipus d'assaig en cèl·lules U87-MG on TCF4 havia estat silenciada mitjançant la tècnica del shRNA. El shRNA de TCF4 va reduir un 25 % el tancament de la ferida (Fig. 53B), corroborant les dades obtingudes amb FH535. Per contra, cèl·lules tractades amb Baf i CQ no van mostrar cap efecte en la capacitat de migració (Fig. 53A).

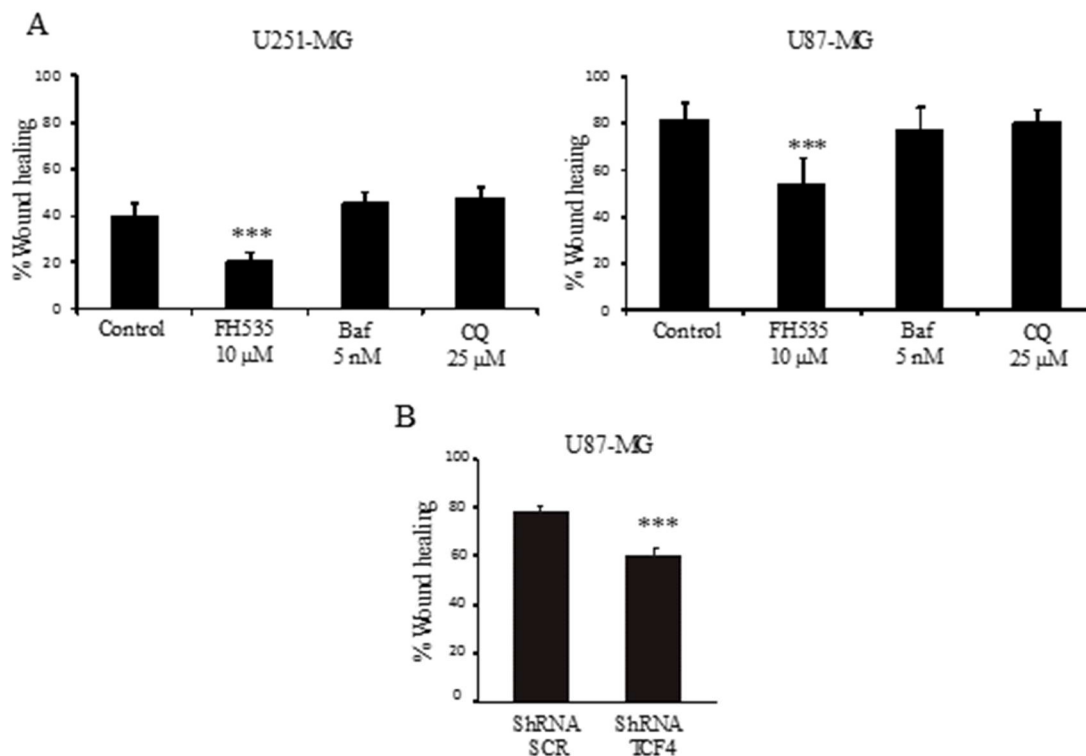


Figura 53. La inhibició de TCF, però no els bloquejants d'autofàgia, disminueixen la capacitat de migració de cèl·lules de GBM. El gràfics mostren el % de tancament de la ferida en cèl·lules U251-MG i U87-MG tractades com està indicat (A); o cèl·lules U87-MG control (shRNA Scr) i silenciades per TCF4 (shRNA TCF4) (B). Les barres indiquen mitjana \pm s.e.m. *** $p < 0,001$.

2.6. La inhibició de TCF disminueix la proliferació de cèl·lules de GBM

L'autofàgia i la proliferació cel·lular estan subjectes a una complexa regulació, on mTOR uneix els dos processos regulant positivament el creixement cel·lular i negativament l'autofàgia. A més a més, la senyalització oncogènica de Wnt/ β -catenina està implicada en proliferació i incrementa l'activitat de mTOR (Inoki et al. 2006; Niehrs and Acebron 2012; Pulvirenti et al. 2011). Per tant, vàrem analitzar els efectes de la inhibició de TCF o dels bloquejants de l'autofàgia sobre la proliferació de cèl·lules de GBM. Les línies cel·lulars U251-MG i U87-MG es van tractar amb FH535, Baf o CQ i es van fer recomptes cel·lulars utilitzant Blau Tripà (per tal de comptar sols les cèl·lules vives). Addicionalment, vam realitzar una immunocitoquímica contra el marcador de Ki67, que està present en

Resultats

cèl·lules proliferatives. Els recomptes cel·lulars ens van mostrar que el nombre de cèl·lules en els tractaments amb Baf a 48 hores era significativament menor en les dos línies, d'altra banda FH535 i CQ sols mostren una reducció en proliferació en la línia U87-MG. (Fig. 54A). Per altra banda, l'immunomarcatge per Ki67 en cèl·lules tractades durant 48 hores va indicar que mentre el tractament amb FH535 mostrava un % de cèl·lules positives per Ki67 similar al control, els bloquejants de l'autofàgia disminuïren el nombre de cèl·lules positives per Ki67 i per tant que estan ciclant, d'acord amb l'assaig previ.

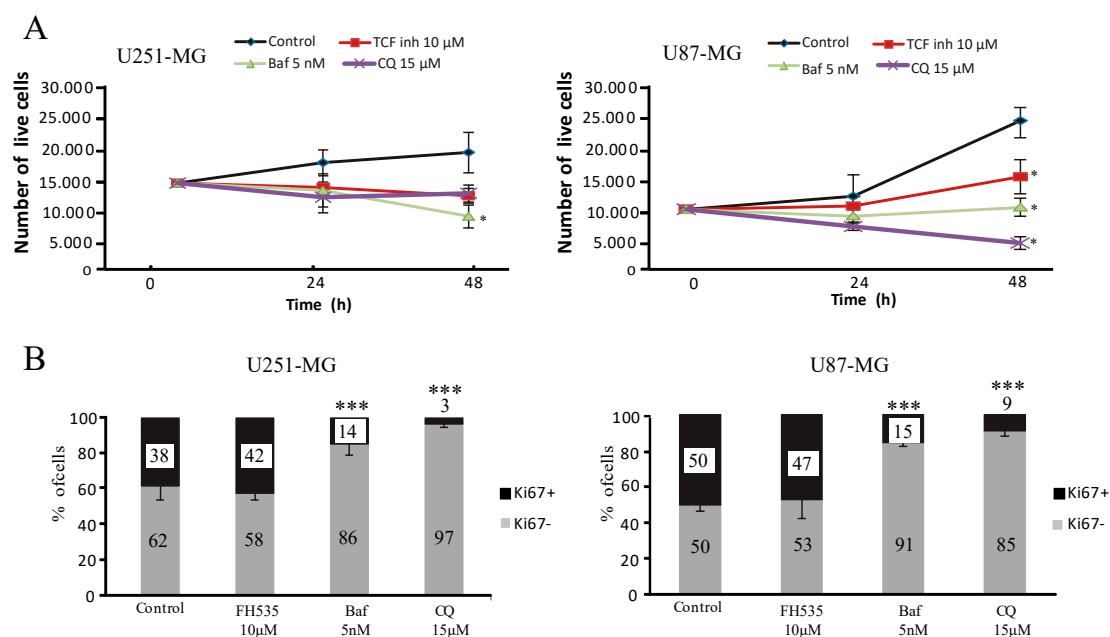


Figura 54. La inhibició de TCF disminueix la proliferació i el nombre de cèl·lules positives per Ki67 en GBM. Les cèl·lules vives de les línies cel·lulars U251-MG i U87-MG tractades amb FH535 μM, Baf 5 nM i CQ 15 nM es van comptar a 24 i 48 hores utilitzant l'exclusió de la tinció Blau de Tripà (A) o bé van ser immunotenyides a 24h amb anticossos contra el marcador proliferatiu Ki67 (B). Les barres indiquen mitjana ± s.e.m. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$.

Conseqüentment, en conjunt els resultats ens indiquen que la inhibició de TCF produeix una disminució en el nombre de cèl·lules a 48 hores, mentre que no produeix efecte en nombre de cèl·lules positives per Ki67. D'altra banda, els bloquejants del fluxe autofàgic produeixen una disminució de la proliferació a 48 hores i en el nombre de nuclis positius per Ki67 en línies cel·lulars de GBM (Fig 54A, 54B).

Per tal de confirmar els resultats de la inhibició de TCF, es va estudiar com afecta el silenciament de TCF4 en la proliferació de cèl·lules U87-MG. Tant els recomptes cel·lulars com l'immunomarcatge per Ki67 van mostrar que el silenciament de TCF4 redueix la proliferació de cèl·lules de glioma (Fig. 55A/B). A més a més, l'assaig clonogènic va posar de manifest una reducció del 35 % en el nombre de colònies formades per les cèl·lules en què TCF4 havia estat silenciada comparat amb cèl·lules control (Scrambled shRNA; Fig. 55C). Aquests resultats estan en concordança amb els obtinguts amb l'inhibidor farmacològic FH535 en proliferació.

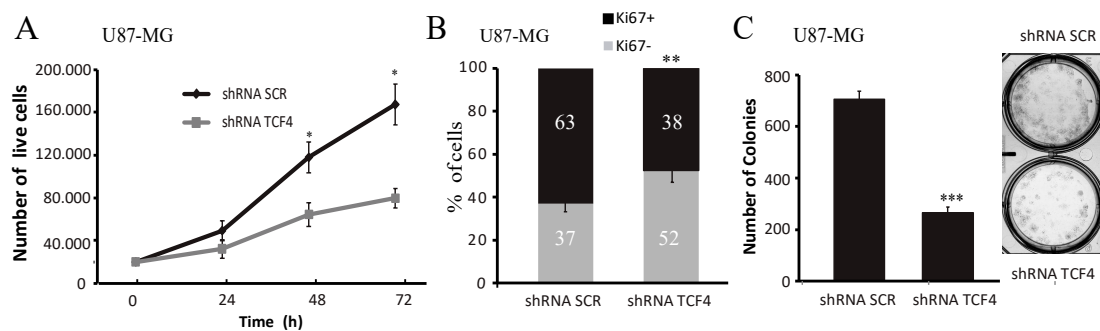


Figura 55 El silenciament de TCF4 disminueix la proliferació de cèl·lules de GBM. Cèl·lules U87-MG control (shRNA scr) o amb silenciades per TCF4 (shRNA TCF4) es van tenir amb Blau Tripà i comptar a 24, 48 i 72 hores (A), o bé es van immunotenyir amb anticossos contra Ki67 (B) o es van cultivar a baixa densitat en un assaig clonogènic (creixement en colònies). El nombre de colònies es va comptar i es mostren imatges representatives dels pous en cada condició (C). Les barres indiquen mitjana \pm s.e.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.7. La doble inhibició de TCF i de l'autofàgia promou apoptosi en cèl·lules de GBM mitjançant un mecanisme dependent de Caspasa-8 i de p62

La inhibició de TCF condueix a una inducció de l'autofàgia acompanyada d'una disminució en la proliferació cel·lular. Diversos estudis mostren que la sobrerregulació de l'autofàgia seguida del seu bloqueig pot ser un mecanisme per a induir mort en cèl·lules canceroses (S. W. Lee et al. 2015). És per això que ens vam preguntar quin seria l'efecte de tractar conjuntament cèl·lules de GBM amb l'inhibidor de TCF i Baf/CQ durant 48 hores. Primer, es va estudiar si els tractaments senzills afectaven significativament la viabilitat cel·lular. Per tal d'analitzar l'efecte dels inhibidors de TCF i de l'autofàgia es van tractar cèl·lules de ambdues línies cel·lulars amb diferents concentracions de l'inhibidor de TCF i els bloquejants de l'autofàgia (Baf i CQ) durant 48 hores i a continuació es va realitzar un assaig de viabilitat utilitzant el reactiu WST-1. Els resultats mostren que encara que a dosis altes disminueixen moderadament però significativament la viabilitat de les cèl·lules de GBM (un 20% a una dosis de 20 μ M de FH535 i 10 nM Baf, i un 30% en la CQ a 50 μ M) aquests efectes són petits (Fig. 56).

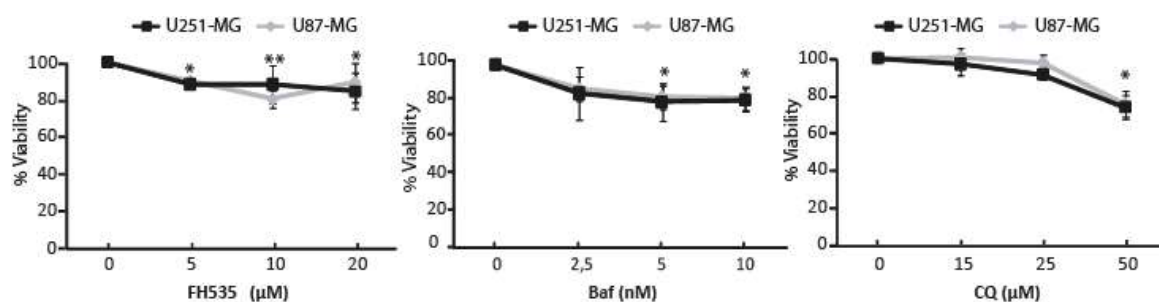


Figura 56. Dosi dependència en assaigs de viabilitat de cèl·lules U87-MG i U251-MG utilitzant el reactiu WST-1 després de 48 hores de tractament amb FH535, Baf o CQ a les dosis indicades. Les barres de error indiquen \pm s.e.m. * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$.

A continuació, es va estudiar l'efecte del tractament combinat en les línies U251-MG i U87-MG mitjançant recompte cel·lular amb Blau Tripà i assaig de viabilitat amb el reactiu WST-1. Sorprenentment, el tractament combinat amb FH535 i els bloquejadors de l'autofàgia, va reduir significativament en un 70 % el nombre de cèl·lules en els recomptes així com un 50% la viabilitat comparada amb els controls no tractats. A més, els resultats també són significativament diferents respecte els tractaments individuals, suggerint que

el tractament conjunt té un efecte sinèrgic. (Fig. 57A/B). Per tal de validar els resultats amb l'inhibidor, es va realitzar l'assaig de viabilitat WST-1 utilitzant de nou les cèl·lules silenciades per TCF4 i tractades amb Baf (2,5, 5 i 10 nM) o CQ (15, 25 i 50 μ M) durant 48 hores. En paral·lel amb els resultats observats amb FH535, les cèl·lules mancades de TCF4 i tractades amb Baf i la CQ van demostrar una disminució significativa de la viabilitat si les comparem amb les cèl·lules control (ShRNA SCR) tractades amb Baf o CQ (Fig. 57C), mostrant de nou l'efecte sinèrgic entre del silenciament de TCF4 i el bloqueig de l'autofàgia en la pèrdua de viabilitat, respecte els resultats de viabilitat del silenciament de TCF4 sol (Fig. 55).

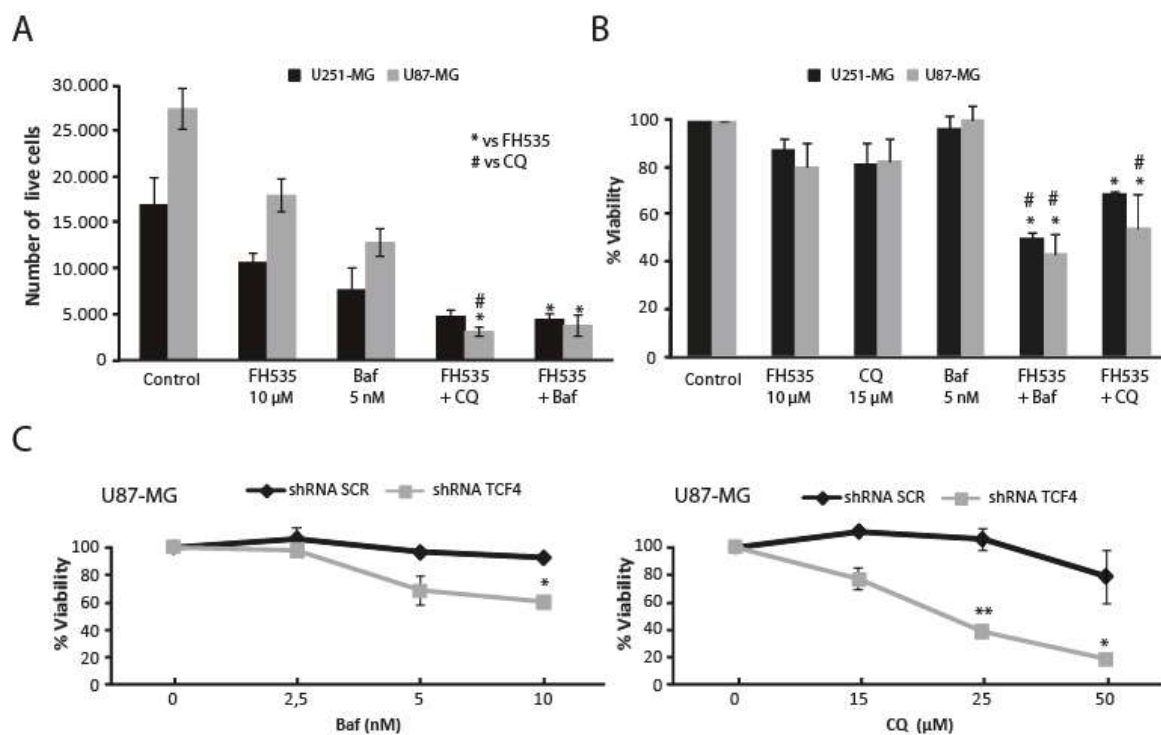
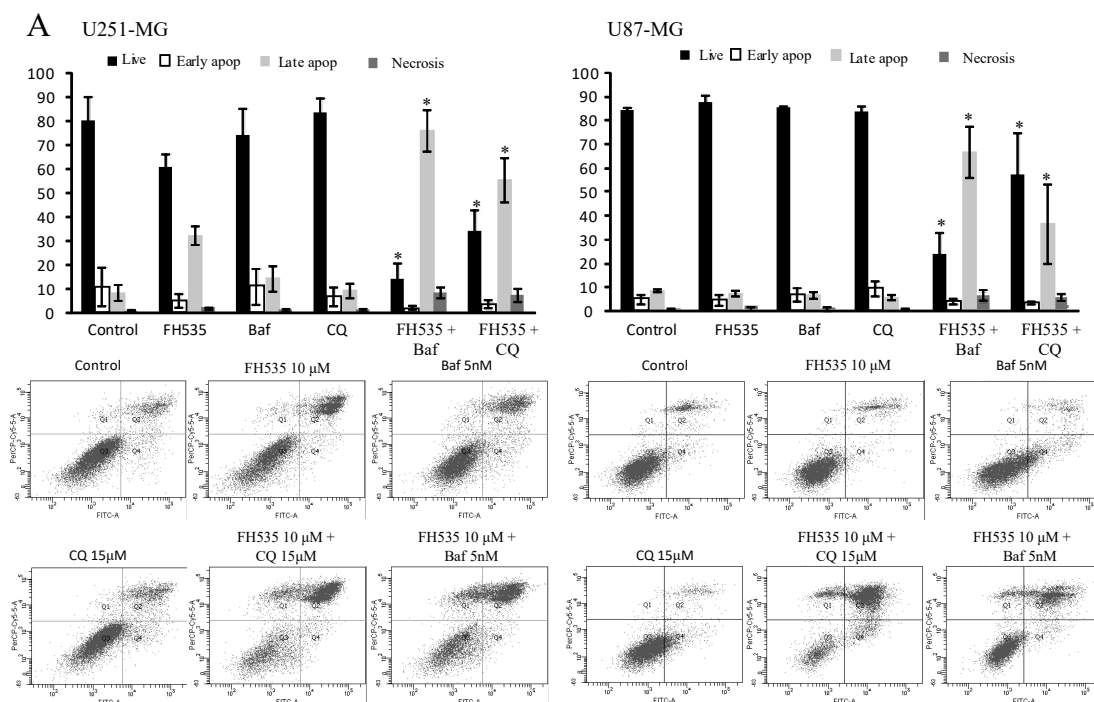


Figura 57. La inhibició de TCF i el bloqueig de l'autofàgia produeixen un efecte sinèrgic en proliferació i viabilitat cel·lulars. Cèl·lules U251-MG i U87-MG es van tractar de forma individual o combinada a les dosis indicades, i al cap de 48 hores es van comptar amb Blau Tripà (A) o bé es van realitzar assaigs de viabilitat amb el reactiu WST-1 (B). * Indica que el valor p es compara respecte a FH535 sol, mentre que amb # el p es compara respecte al tractament amb els bloquejants de l'autofàgia sols (Baf or CQ); * o # $p < 0,05$ i *** $p < 0,001$. (A i B). (C) Cèl·lules U87-MG control o deficientes de TCF4 es van tractar amb els bloquejants de l'autofàgia (Baf i CQ) durant 48 hores abans de l'assaig de viabilitat amb el reactiu WST-1. * indica el valor p comparant les cèl·lules control amb les deficientes per TCF4. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$

Resultats

Un cop observada aquesta important pèrdua de viabilitat cel·lular amb el doble tractament, el següent pas va ser determinar si l'efecte sobre la viabilitat era degut a un defecte en proliferació o bé degut a la inducció de mort cel·lular. Mitjançant citometria de flux utilitzant el marcatge amb Annexina V i iodur de propidi (PI) vàrem calcular el % de de cèl·lules vives, en apoptosi inicial, apoptosi tardana o necrosis en cèl·lules tractades amb FH535, Baf o CQ sols o en combinació durant 48 hores. Els resultats van demostrar que els tractaments individuals amb FH535, Baf o CQ no presentaven diferències amb les cèl·lules no tractades, presentant majoritària una població de cèl·lules vives (Fig. 58A), de manera que aquests tractaments individuals no indueixen mort, sinó que els efectes que observàvem en la disminució lleugera de la viabilitat cel·lular (Fig. 56) serien únicament defectes en proliferació, tal i com s'havia observat (Fig. 55). En canvi, els tractaments combinats van induir una disminució important de la població de cèl·lules vives i un augment del % de cèl·lules que es troben en apoptosi (principalment en apoptosi tardana) en les dues línies U87-MG i U251-MG (Fig. 58A). Per tal de confirmar que el doble tractament induïa apoptosi vam tenyir les cèl·lules amb el colorant Hoechst. Aquesta tinció ens permet detectar si el DNA està condensat en el nucli o si hi ha



B

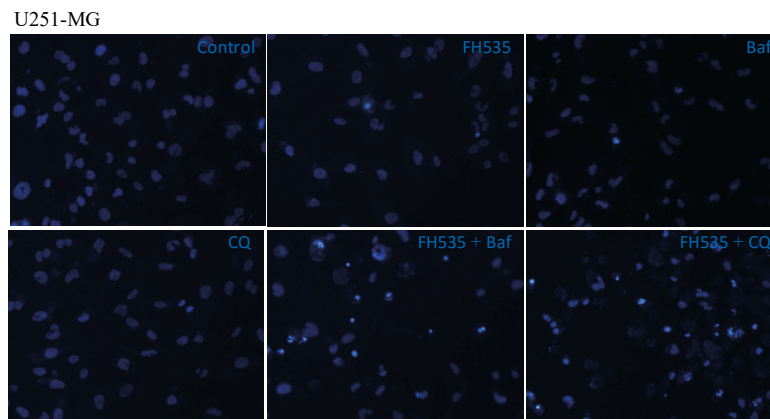


Figura 58. La inhibició doble de TCF i l'autofàgia sensibilitza les cèl·lules de GBM per a la mort cel·lular. (A) Cèl·lules de les línies cel·lulars U251-MG i U87-MG es van analitzar per AnnexinaV/PI per tal de calcular la població cel·lular viva, en apoptosi propera, tardana i necròtiques. Les cèl·lules es van tractar tal i com s'indica durant 48 h. Imatges significatives dels perfils de citometria de flux amb la tinció per AnnexinaV en l'eix X i la de PI en l'eix Y. * $p < 0.05$. (B) Cèl·lules U251-MG incubades amb tractaments simples o dobles i tenyides amb Hoechst. Els nuclis apoptòtics condensats s'observen en les cèl·lules doblement tractades amb l'inhibidor de TCF i Baf/CQ.

fragmentació nuclear, característiques principals de l'apoptosi. La tinció dels nuclis en tractaments simples (FH535, Baf i CQ) a 48 h, va mostrar una morfologia relaxada dels nuclis, tal i com s'observava en els nuclis de les cèl·lules control. En canvi, els tractaments combinats (FH535 més Baf/CQ) van denotar un nucli brillant i puntejats en la tinció de Hoechst, indicatiu de la condensació del DNA, suggerint que es tractava de nuclis apoptòtics (Fig. 58B).

L'estreta relació entra autofàgia i apoptosi ha estat amplament estudiada. A més a més recentment s'ha descrit un paper fonamental de l'autofàgia en l'activació de la Casp8, on part de la seva activació per proteòlisis es desenvoluparia en els autofagosomes, amb un paper essencial per a p62, ja que condueix la Casp8 al autofagosoma (S. Huang et al. 2013; M. M. Young et al. 2012). Per aquesta raó ens vam plantejar si la inducció de la mort causada pel tractament combinat amb inhibidors de TCF i de l'autofàgia implicava el processament proteolític de Casp8. Vam analitzar la Casp8 i els seus fragments en cèl·lules de U87-MG mitjançant Western blot, el què va revelar la presència del fragment actiu p18

Resultats

de Casp8 sols en el tractament combinat amb l'inhibidor de TCF i Baf, però no amb els tractaments individuals (on s'observava el fragment p43). Així, tal i com esperàvem, el fragment de Casp8 actiu (p18) sols s'acumula en el tractament combinat quan es produeix la mort apoptòtica (Fig. 59A). Aquests resultats indicaven que caspasa-8 podia jugar un paper important en la inducció de la mort i per tal de confirmar la seva implicació es van infectar cèl·lules de GBM amb lentivirus que contenen un shRNA contra caspasa-8. El Western blot contra la Casp8 en cèl·lules infectades amb un lentivirus control (FSV) o que expressen el shRNA de Casp8 mostrà una disminució en la seva expressió, confirmant un correcte silenciament (Fig. 59). Tal i com s'havia fet abans, aleshores es van aplicar els tractaments individuals (FH535 i Baf) i el combinat, en cèl·lules U87-MG que expressaven el vector buit (FSV) o el shRNA contra Casp8 i es van analitzar les poblacions de cèl·lules vives i apoptòtiques mitjançant tinció amb Annexina V/PI. En cèl·lules control el tractament dual és l'únic que produeix apoptosi, tal i com s'havia observat abans. Sorprenentment, en canvi, en cèl·lules silenciades per Casp8, el tractament dual va produir una disminució de la població apoptòtica inferior a la observada amb el tractament dual en cèl·lules control (FSV), en concret una reducció del 15% d'apoptosi (Fig. 59B/C). Per tant, aquests resultats suggereixen que, en part, la mort causada pel tractament dual amb FH535 i Baf implica l'activació de la Casp8.

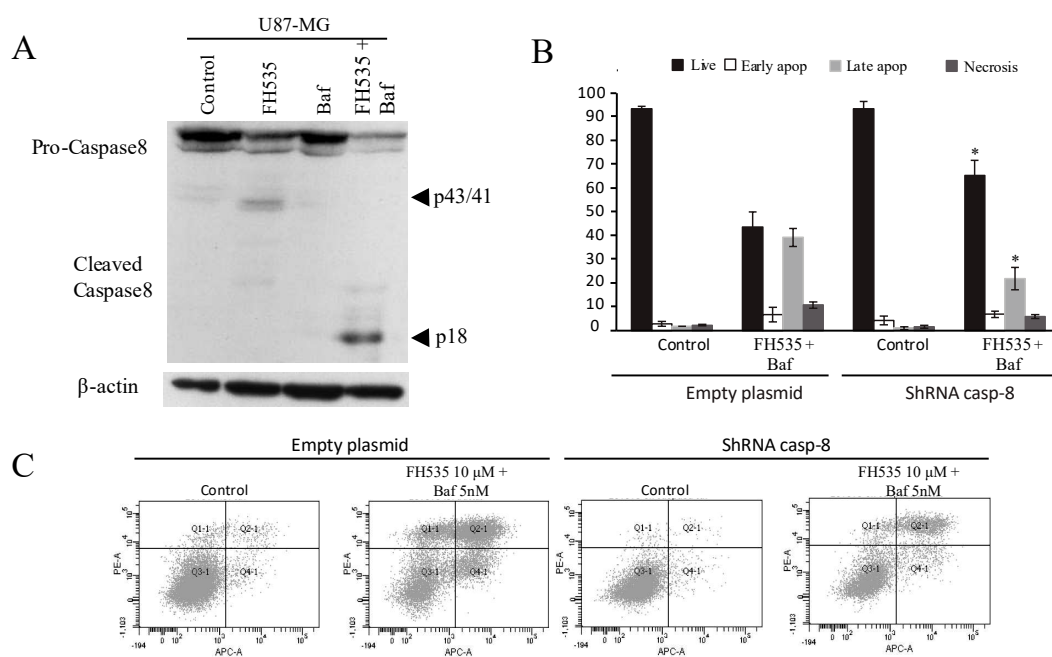


Figura 59. La apoptosi causada per la inhibició de TCF i de l'autofàgia està mediada per Casp8. (A) Immunoblot contra Casp8 en cèl·lules U87-MG que mostra el fragment actiu de Casp8 (p18) després del tractament doble amb FH535 i Baf. p43 correspon a un pro-fragment de Casp8 no actiu (S. Huang et al. 2013). β -actina s'utilitza com a control de càrrega. (B i C) Assaig de Annexina V/PI en cèl·lules control (vector buit, FSV) i en cèl·lules amb la Casp8 silenciada totes elles tractades amb FH535 i Baf durant 48 hores.

Tal i com he esmenat amb anterioritat, els autofagosomes juguen un paper molt important en l'activació de casapasa-8, ja que en ells sembla que té lloc el processament proteolític, on a més p62 hi fa una funció important actuant com a plataforma pel processament (S. Huang et al. 2013). Cal recordar que tal i com s'ha demostrat anteriorment, la inhibició de la via Wnt/ β -catenina elevava els nivells de p62 i per tant,

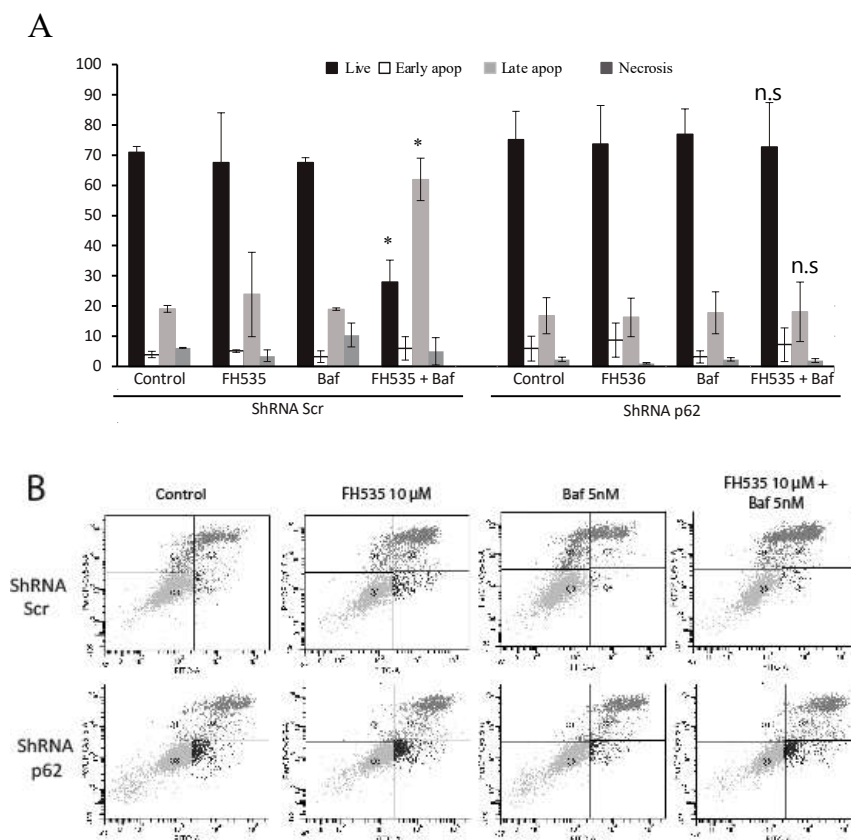


Figura 60. p62 es necessari per a la apoptosi causada per la inhibició de TCF i Baf. Assaig de AnnexinaV/PI en cèl·lules de U87-MG control (scr shRNA) o amb p62 silenciada (shRNA p62) tractades com s'indica durant 48 hores. n.s.: no significant respecte a les cèl·lules scr shRNA

Resultats

ens va semblar interessant estudiar la implicació de p62 en la inducció de la mort. Per aquesta raó ens vam plantejar si la inducció de la mort causada pel tractament dual era dependent de p62. Per aquest fi, vam silenciar p62 utilitzant un shRNA específic (Fig. 60). Tal i com ho havíem fet en l'experiment de silenciament de Casp8, es van tractar cèl·lules U87-MG silenciades per a p62 o control (scrambled shRNA) amb FH535 i Baf, sols i en combinació, i es va fer l'anàlisi per citometria de flux amb AnnexinaV i PI. Sorprenentment, es va observar que en absència de p62 la mort causada pel tractament combinat desapareixia completament, indicant que la sobreexpressió de p62 causada per la inhibició de TCF és necessària per a la inducció de l'apoptosi (Fig. 60A). En canvi, l'apoptosi s'observava en les cèl·lules control, d'acord amb els resultats previs. Aquest resultat demostra que, mitjançant la inducció de p62 i de l'autofàgia, FH535 sensibilitza les cèl·lules de GBM a la mort induïda per els bloquejadors de l'autofàgia. A més a més, l'apoptosi es dona mitjançant l'acumulació de fragments actius de Casp8, en un procés en què p62 juga un paper essencial.

2.8. El silenciament de TCF4 i l'administració de CQ redueixen el creixement tumoral *in vivo*

Finalment, vam decidir estudiar l'efecte del silenciament de TCF4 juntament amb el tractament amb CQ en ratolins SCID, per tal de validar *in vivo* els resultats observats *in vitro*. El primer que vam avaluar va ser l'efecte de silenciar TCF4 sobre el creixement dels xenografts de U87-MG. Els tumors formats a partir de cèl·lules silenciades per TCF4 mostraren un creixement molt més lent que aquells formats a partir de cèl·lules control (expressant un shRNA scrambled, scr), demostrant l'important paper que juga TCF4 en el creixement tumoral (Fig. 70A). A més a més, l'immunomarcatge contra Ki67 en els tumors extrets dels ratolins va posar de manifest un menor nombre de cèl·lules positives per Ki67 en els tumors que procedien de cèl·lules silenciades per TCF4 respecte als tumors control (Fig. 70C). Per altra banda, la immunotinció contra p62 va mostrar un marcatge més intens citoplasmàtic en els tumors silenciats per TCF4 que en els tumors control, confirmant així el resultat de la sobreexpressió de p62 obtinguts *in vitro* (Fig. XC). En segon lloc, es va

voler analitzar l'efecte sinèrgic anti-tumoral del silenciament de TCF4 junt al tractament amb CQ. D'aquesta manera un cop els xenografts s'havien format i assolit una mida de 100 mm^3 , als ratolins se'ls va punxar intraperitonealment CQ (25 mg/kg) o vehicle (PBS) cada dia durant uns 15 dies. El tractament amb CQ no va tindre cap efecte sobre el creixement tumoral dels tumors controls ni sobre la immunotinció contra Ki67 (Fig. 70B/C) que era semblant a la dels animals tractats amb vehicle. Per contra, el tractament amb CQ en els ratolins amb els tumors on TCF4 estava silenciats va produir una reducció significativa de la mida del tumor, demostrant l'efecte sinèrgic del silenciament de TCF4 i el tractament amb CQ (Fig. 70B), amb concordança amb els resultats obtinguts *in vitro*. L'immunomarcatge contra p62 en tumors tractats amb CQ mostrava un patró puntejat, senyalant l'acumulació dels autofagosomes i per tant, l'esperat bloqueig de l'autofàgia (Fig. 70C) i en els tumors on TCF4 havia estat silenciats s'evidenciava un marcatge citoplasmàtic denotant la sobrerregulació de p62. En conclusió, els resultats *in vivo* van validar en resultats previs en cultiu i van demostrar que afectar combinadament TCF4 i el flux autofàgic pot reduir el creixement tumoral, probablement mitjançant la inducció de la mort cel·lular regulada per p62.

Resultats

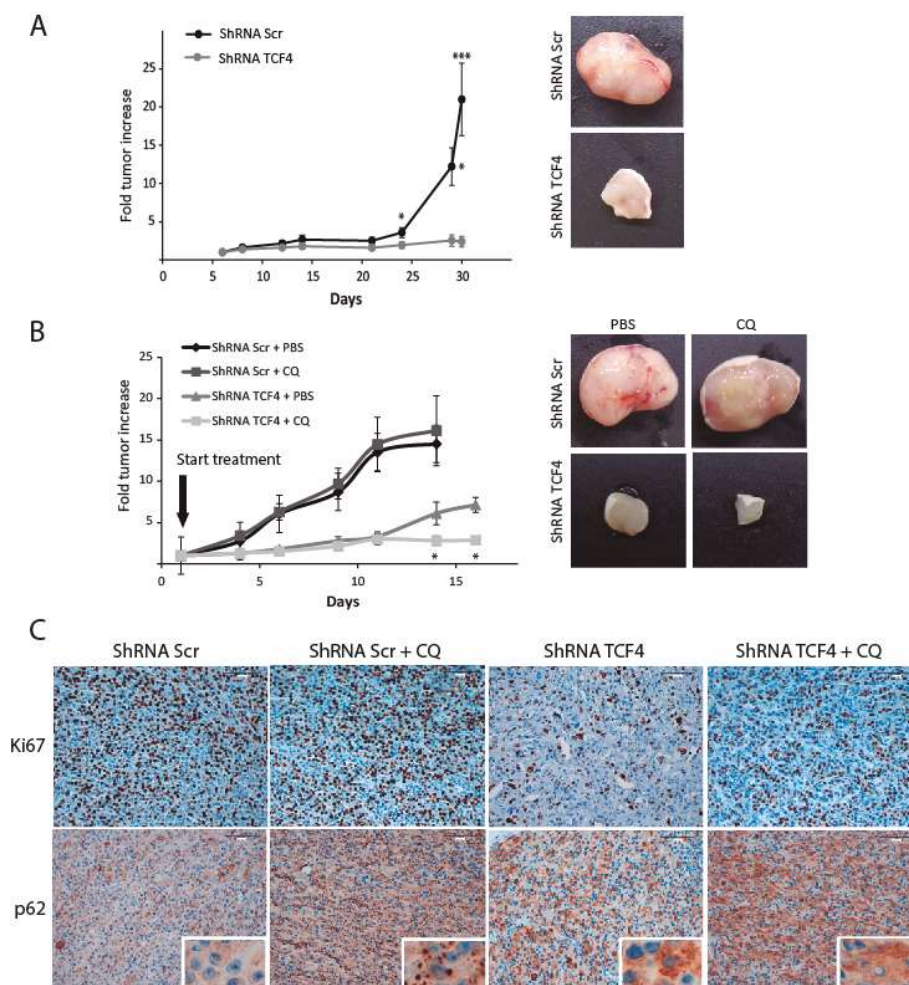
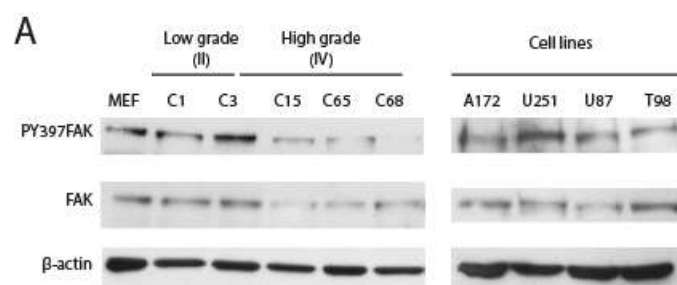


Figura 70. La doble inhibició de TCF4 i de l'autofàgia in vivo redueixen el creixement tumoral (A) Imatges representatives dels xenografts en ratolí formats a partir de cèl·lules U87-MG control (scrambled, scr) o amb el TCF4 silenciats. Els tumors van créixer durant 30 dies i després els ratolins van ser sacrificats. Seguidament els tumors van ser preparats per a immunotinció. Esquerra, gràfic que mostra el creixement tumoral amb el temps dels xenografts de U87-MG (control o silenciament de TCF4). Dreta, imatges representatives dels tumors en cada condició. (B) Es van injectar cèl·lules U87-MG control o amb TCF4 silenciats i un cop els tumors van arribar a la mida adequada (100mm³), es van tractar els ratolins intraperitonealment amb CQ (25mg/kg) o PBS diàriament durant 15 dies. Esquerra, creixement tumoral amb el temps. Dreta, imatges representatives dels tumors. Els resultats són expressats com a mitjana \pm s.e.m. (C) Immunotincions contra els marcadors Ki67 i p62 en xenografts control o amb TCF4 silenciats, tractats amb CQ o vehicle. Barra= 100 μ m. * p <0,05, *** p <0,001.

**Capítol 3: La inhibició farmacològica de FAK
indueix autofàgia i senescència en
Glioblastoma**

3.1. Expressió dels nivells de FAK i de PY397 FAK en línies cel·lulars de GBM i cultius primaris de glioma.

FAK és una proteïna que es localitza i regula les adhesions focals. En càncer es troba sovint alterada, ja sigui per un augment en el nombre de còpies o perquè altres elements alterats ja en càncer la regulen. En els tumors, FAK desenvolupa principalment dos tipus de funcions: d'una banda està implicada en migració i invasió, i d'altra banda regula proliferació i supervivència, mitjançant funcions dependents i independents de la funció catalítica (Yoon et al. 2015). Per totes aquestes raons, ens vam plantejar estudiar els nivells total de FAK i de la forma fosforilada en el residu Y397 (la qual s'autofosforila, donant lloc a l'activació del domini catalític) en mostres de cultius primaris de gliomes (graus II i IV) i línies cel·lulars de GBM. L'anàlisi mitjançant Western blot va mostrar que les el nivells d'expressió de FAK i de PY397 FAK són més elevats en graus baixos que en graus alts (Fig. 71A). Entre les línies cel·lulars, la U251-MG i la U87-MG són les que aparentment presenten més FAK actiu (Fig. 71A). A més, l'anàlisi utilitzant la plataforma Gliovis (Bowman et al. 2017) mostrava uns resultats similars en quant als nivells d mRNA, essent significativament superiors en astrocitomes que en GBMs (8,76 vs 8.63; p-value 0,02) (Fig. 71B). Els resultats que s'observen a la figura corresponen a la base de dades Rembrandt, però l'anàlisi utilitzant altres bases de dades mostren uns resultats similars (TCGA, Gravendeel), suggerint que es tracta d'uns resultats robusts en contraposició en el que s'havia descrit fins ara (Jones et al. 2001).



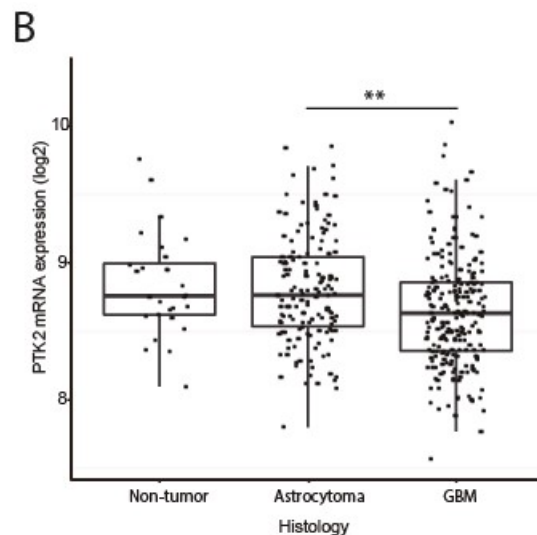


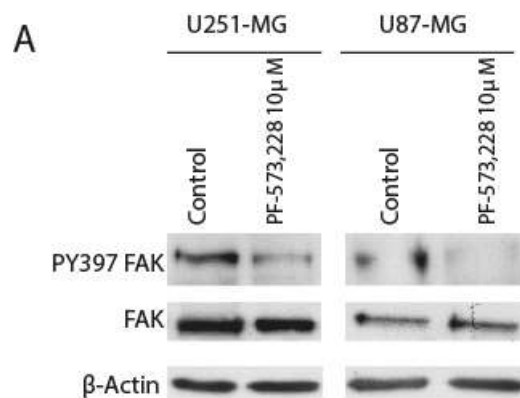
Figura 71. Els nivells de FAK total i de la forma fosforilada en Y397 (PY397 FAK) disminueixen en GBMs. A) Nivells de pY397 FAK i FAK total en Mouse Embryonic Fibroblast (MEFS, lisat cel·lular cedit per la Dra. Bhardwaj), cultius primaris de gliomes (grau II i IV) i línies cel·lulars de GBMs. La β -actina s'utilitza com a control de càrrega. B) Anàlisi mitjançant la plataforma Gliovis dels nivells de mRNA de PTK2 (que codifica per FAK) en mostres no tumorals, astrocitomes i GBMs. ** p value < 0,01.

3.2. La inhibició farmacològica de FAK promou l'autofàgia

Donada la implicació de FIP200, una proteïna inhibidora de FAK (Abbi et al. 2002) en la inducció de l'autofàgia (H. Wei et al. 2014) vam voler estudiar com la inhibició de FAK afectava el flux autofàgic. A més a més, hi ha diverses molècules inhibidores de FAK que es troben en assajos clínics; entre elles, la que més avançada es troba és PF-573,271 que es troba en Fase I. Un inhibidor derivat d'aquest (PF-573,228) és l'utilitzat en aquest treball. En aquest estudi vam decidir utilitzar el PF-573,228 perquè és específic de FAK, i ens permetia estudiar les funcions dependents de FAK. En canvi el PF-573,271 inhibeix tant FAK com PYK2 (Stokes et al. 2011).

El primer que vam fer va ser comprovar que l'inhibidor (PF-573,228) podia actuar sobre l'activitat catalítica de FAK. Les cèl·lules de GBM U251-MG i U87-MG es van tractar amb l'inhibidor a una concentració 10 μ M durant 24 hores, i els lisats cel·lulars es van analitzar per als nivells de PY397 FAK i FAK total. Tal i com esperàvem els nivells de PY397 FAK van disminuir amb el tractament amb l'inhibidor, mentre que els de FAK total no canviaven (Fig. 72A). Aquest resultat suggerien que l'inhibidor disminueix l'activitat de FAK. D'altra

banda, es va poder observar com les cèl·lules tractades amb l'inhibidor durant 24 hores mostraven un canvi morfològic, sent més grans i planes possiblement degut a un efecte sobre la remodelació de les adhesions focals, o a la inducció de processos senecents (Fig. 72B). Finalment vam realitzar una ICQ contra FAK total en cèl·lules U251-MG per veure la localització de FAK quan la seva funció catalítica era inhibida. En condicions control, FAK es troba en la membrana plasmàtica, mentre quan les cèl·lules es tracten amb l'inhibidor de FAK (10 μ M; 24 hores) aquest desapareix de la membrana plasmàtica, podent correlacionar els nivells de FAK activa (PY397 FAK) amb la localització en membrana (Fig. 72. C) (adhesions focals). Aquest resultat indica que al inhibir la fosforilació en el residu Y397 de FAK, aquesta no pot realitzar la seva funció en el reciclat i dinàmica de les adhesions focals en la via de senyalització de les integrines, per lo que ja no s'acumula en les adhesions focals de la membrana cel·lular (Mclean et al. 2005; Ren et al. 2000). Aquest resultat estan en concordança amb l'efecte dels inhibidors de FAK, modificant el reciclatge dels contactes de les adhesions focals (Slack-Davis et al. 2007; Webb et al. 2004)



Resultats

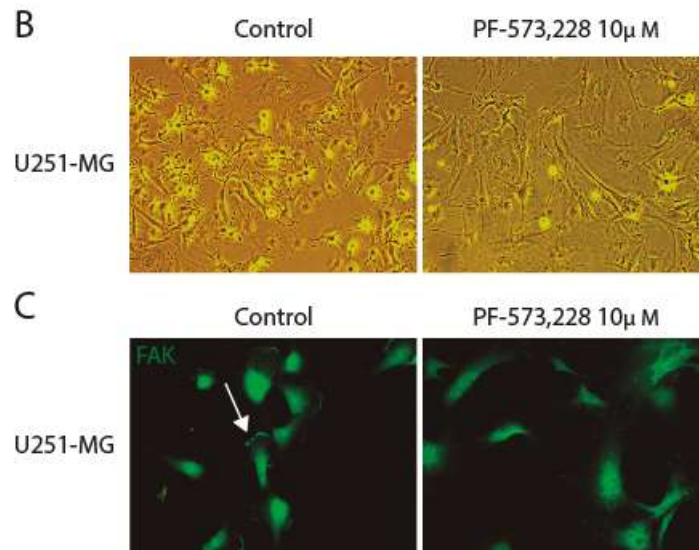


Figura 72. El inhibidor de FAK, PF-573,228, disminueix els nivells de pY397 FAK i produeix un canvi morfològic en cèl·lules de GBM. A) Nivells de pY397 FAK i de FAK total en cèl·lules U87-MG i U251-MG tractades 24 hores amb PF-573,228 10µM. La β -actina s'utilitza com a control de càrrega. B) Fotos en contrast de fases de cèl·lules de GBM U251-MG tractades durant 24 hores amb PF-573,228 10µM. C) ICQ contra FAK en cèl·lules U251 control i tractades amb l'inhibidor de FAK durant 24 hores.

Un cop comprovada l'activitat de l'inhibidor, ens vam plantejar estudiar el seu efecte sobre el flux autofàgic en cèl·lules de GBM. El primer que vam fer va ser monitoritzar els nivells de LC3. Tal i com s'ha explicat al capítol 2, un augment dels nivells de LC3-II indica un augment en el nombre d'autofagosomes, però aquest augment pot ser tant degut a una inducció del flux autofàgic com a un bloqueig i per tant acumulació dels autofagosomes. Per distingir les dues opcions és necessari, per tant, el tractament amb Baf. Es van tractar cèl·lules de GBM U251-MG i U87-MG amb l'inhibidor de FAK (10 µM, 24 hores) sol o en combinació amb Baf (5 nM, 2 hores). El tractament senzill amb l'inhibidor ja va incrementar els nivells de LC3-II respecte cèl·lules control. A més, el tractament amb l'inhibidor de FAK i Baf va mostrar uns nivells majors de conversió de LC3-I en LC3-II que el tractament amb Baf sol (Fig. 73A). Per tant, l'estudi de LC3-II va suggerir que la inhibició de FAK augmentava el fluxe autofàgic. A més, es van analitzar els nivells proteics de p62 en cèl·lules tractades amb l'inhibidor de FAK i es va observar una disminució d'aquests, que pot explicar-se per la degradació d'aquesta proteïna per autofàgia. Resultats similars es van observar en cultius primaris. En conjunt, aquests

resultats suggereixen que l'inhibidor de FAK és capaç d'induir el flux autofàgic en línies cel·lulars i cultius primaris de GBM (Fig. 73B).

Tal i com vam fer al capítol 2, vam voler monitoritzar el flux autofàgic mitjançant una altra tècnica, la transfecció amb el plasmidi tàndem (ptfL3/mRFP-EGFP), donat que és una de les tècniques més acurades per estudiar el estatut del flux autofàgic. Breument recordar, que quan s'obté un puntejat roig, com amb el tractament amb Rapamicina, indica una inducció del flux autofàgic; en canvi, quan aquest puntejat és groc, indica bloqueig de l'autofàgia, com succeeix amb el tractament amb CQ. Cèl·lules U87-MG transfectades amb la construcció tàndem i tractades amb l'inhibidor de FAK (10 μ M, 24 hores) van mostrar un patró puntejat de fluorescència vermella, tal i com succeïa amb la Rapamicina (Fig. 74), suggerint per tant que l'inhibidor induïa el flux autofàgic, en concordança amb les conclusions extretes de l'anàlisi dels nivells de LC3 i p62.

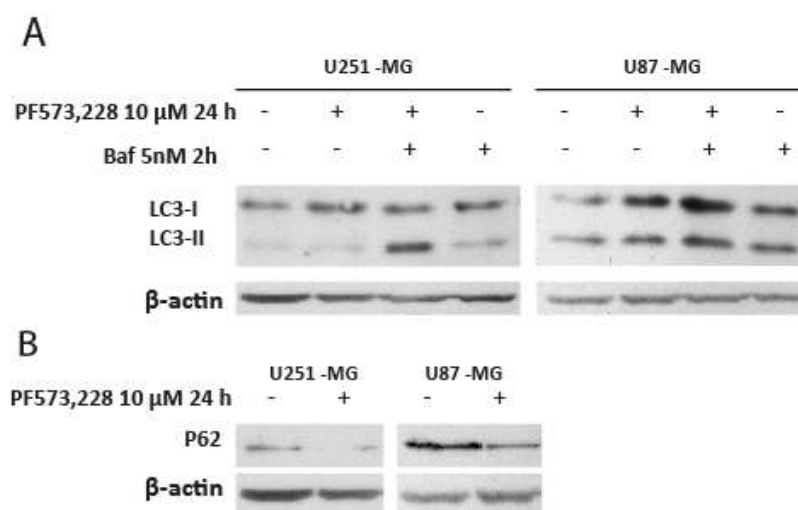


Figura 73. El inhibidor de FAK, PF-573,228, incrementa la conversió de LC3-II i redueix els nivells de p62. A) Les línies cel·lulars U251-MG i U87-MG GBM van ser tractats amb PF-573,228 10 μ M durant 24 hores i les últimes dues hores amb Baf 5 nM. El lisats cel·lulars van ser immunoblotats contra LC3. La β -actina es va utilitzar com a control de càrrega. Els valors indiquen l'increment respecte als controls no tractats. B) Nivells de p62 en cèl·lules U251-MG i U87-MG tractades amb PF-573,228 10 μ M durant 24h. β -actina com a control de càrrega.

Resultats

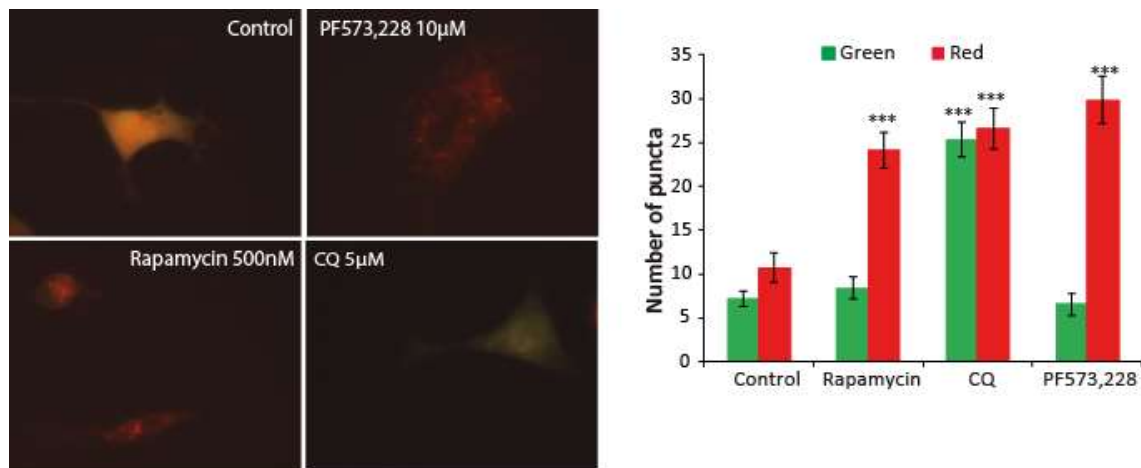


Figura 74. La inhibició FAK incrementa el flux autofàgic en GBM. Imatges representatives de cèl·lules U87-MG transfectades amb el plasmidi ptfLC3 tractades com s'indica. La colocalització en el puntejat de LC3 de fluorescència roja i verda (groc) indica autofagosomes. En canvi, un patró puntejat roig denota autofagolisosomes. El nombre de punts verds i rojos per cèl·lula va ser comptat i representat en el gràfic de barres. Les dades corresponen a la mitjana \pm s.e.m de > 40 cèl·lules diferents procedents de 10 camps fotogràfics en tres experiments independents (***) $p < 0,001$.

3.3. La inhibició de FAK promou l'autofàgia a través de la inhibició de mTOR

Un dels mecanismes principals pels que s'indueix l'autofàgia és mitjançant la inhibició de mTOR. A més, l'activació de mTOR es produeix per l'activació de AKT que porta a la inhibició de TSC1 (Fig. 19) (Martina et al. 2012), de manera que la inhibició de mTOR s'associa amb una inhibició de l'activitat AKT. D'altra banda, és conegut que la senyalització per FAK comporta l'activació d'AKT (Brami-Cherrier et al. 2014). Per tant, ens vam preguntar si la inducció del flux autofàgic resultant de la inhibició farmacològica de FAK es produïa via AKT i mTOR. Cèl·lules U251-MG i U87-MG es van tractar amb l'inhibidor de FAK (PF-573,228, 24 hores, 10 μ M) i es van analitzar primer els nivells de PS473 AKT (forma activa d'AKT) i els nivells totals d'AKT. Tal i com esperàvem es va observar una disminució en els nivells de PS473 AKT en cèl·lules tractades respecte de les cèl·lules control, mentre que els nivells totals d'AKT no canviaven, suggerint una inhibició de la via AKT (Fig. X). A més, aquests resultats estarien en concordança amb l'efecte causat per

altres inhibidors de FAK, com TAE-226 (Watanabe et al. 2008), tot i que en aquest treball la inhibició d'AKT es va relacionar amb supervivència i apòptosi (no autofàgia). A continuació es va analitzar l'activació de mTOR, mitjançant l'anàlisi d'una de les seves dianes, EIF4E. Les cèl·lules tractades amb l'inhibidor mostraren una disminució en els nivells de PS209 EIF4E (forma activa fosforilada d'EIF4E) suggerint –al menys pel que fa a aquesta diana- que la senyalització per mTOR es trobava disminuïda quan inhibíem FAK (Fig. 75). En resum vam concloure que la inhibició de FAK induïx el flux autofàgic a través de la inhibició d'AKT i mTOR.

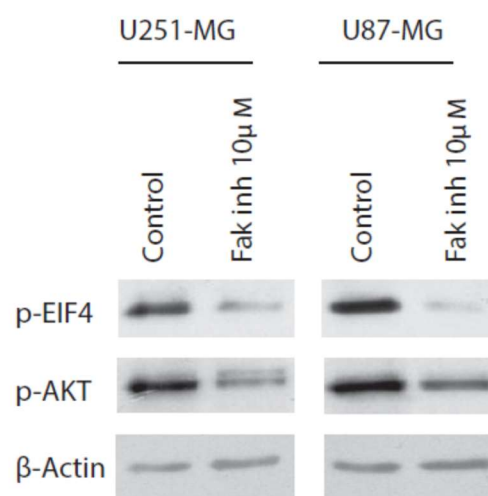


Figura 75. La inhibició de FAK disminueix l'activitat mTOR (A) Cèl·lules U251-MG i U87-MG tractades amb 10 µM de PF-573,228 durant 24 hores. Es van analitzar els nivells de fosforilació de PS209 EIF4E i PS473 AKT. β-actina s'utilitza com a control de càrrega.

3.4. La inhibició de FAK promou un descens en la viabilitat i la proliferació cel·lulars

FAK s'ha implicat amplament en proliferació i supervivència cel·lular en càncer (Brami-Cherrier et al. 2014), mitjançant el control de la progressió en cicle cel·lular (J. H. Zhao, Reiske, and Guan 1998) i la resistència a mort per anoikis (Frisch et al. 1996) entre d'altres mecanismes. D'aquesta manera la inhibició de FAK podria ser una estratègia per evitar la progressió tumoral.

Resultats

Per aquest motiu, vàrem estudiar l'efecte de la inhibició de FAK sobre la viabilitat i la proliferació de cèl·lules de GBM (U251-MG i U87-MG) tractades amb PF-573,228. L'anàlisi de la viabilitat cel·lular es va mesurar utilitzant el reactiu WST-1 que mesura activitat mitocondrial. Les cèl·lules es van tractar amb diferents concentracions de l'inhibidor de FAK (5, 10, 20, 40 μM) durant 48 hores. Els resultats van mostrar que la inhibició de FAK produeix una disminució en viabilitat a dosis altes (40 μM) en U251-MG i una lleugera disminució ja des de 10 μM en U87-MG (Fig. 76A). No obstant, cap concentració va produir una disminució en viabilitat superior al 50% en cap de les dues línies cel·lulars (Fig. 76A). Cal destacar que una baixada en la viabilitat pot ser deguda a una disminució en la proliferació o a canvis en la supervivència (mort cel·lular). Per comprovar aquestes dues possibilitats, primer vam estudiar la capacitat de proliferació de les cèl·lules tractades amb l'inhibidor de FAK (15 dies) en un assaig de creixement en clons. El tractament amb l'inhibidor va reduir fortament, en un 70% aproximadament en les dues línies, el nombre de colònies finals respecte a la situació control (Fig. 76B, 76C). A més, les cèl·lules van mostrar un acusat canvi de morfologia, tornant-se molt més planes, grans i menys refringents en microscòpia de contrast de fase (Fig. 76D).

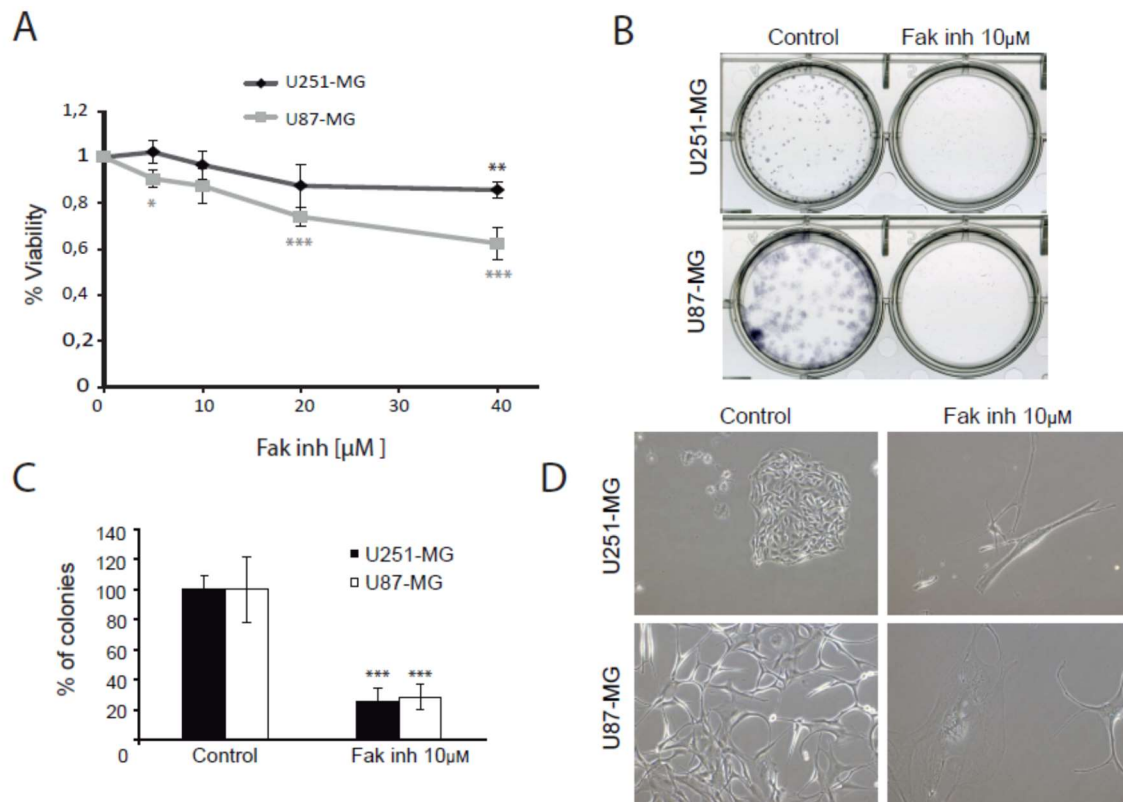


Figura 76. La inhibició de FAK afecta la viabilitat i la proliferació de les cèl·lules de GBM.
 A) Dosi dependència de la viabilitat de cèl·lules U87-MG i U251-MG tractades amb PF-573,228 a les dosis indicades durant 48h, utilitzant el reactiu WST-1. B i C) Assaig clonogènic de cèl·lules tractades amb l'inhibidor durant 15 dies respecte cèl·lules no tractades (B) i quantificació del nombre de colònies obtingut en cada condició (C). Les barres de error indiquen \pm s.e.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$. D) Imatges representatives en contrast de fase de les cèl·lules en l'assaig clonogènic (creixement en colònies).

Per tal de comprovar aquest resultat en proliferació, el següent pas va ser realitzar assaigs d'incorporació de BrdU i immunotincions contra el marcador de proliferació Ki67. Es van tractar les cèl·lules de GBM amb l'inhibidor de FAK durant 24 hores a 10 μ M. En concordança amb els resultats previs es va observar una disminució en el % de en la incorporació de BrdU (Fig. 77A) i de cèl·lules positives per Ki67 (Fig. 77B). El inhibidor de FAK produeix una disminució d'un 60% i 85 % en l'incorporació de BrdU i d'un 75% 20% en l'immunomarcatge contra ki67 en les línies cel·lulars en U251-MG i U87-MG. Aquest resultats en conjunt indiquen que la disminució en viabilitat deguda a la inhibició de FAK

Resultats

reflectiria un efecte sobre la proliferació. No vam realitzar un estudi detallat sobre mort cel·lular en resposta al tractament, però la tinció dels nuclis amb Hoechst va indicar l'absència de nuclis condensats després de la incubació amb l'inhibidor (Fig. 77A/B).

3.5. La inhibició de FAK redueix la migració cel·lular.

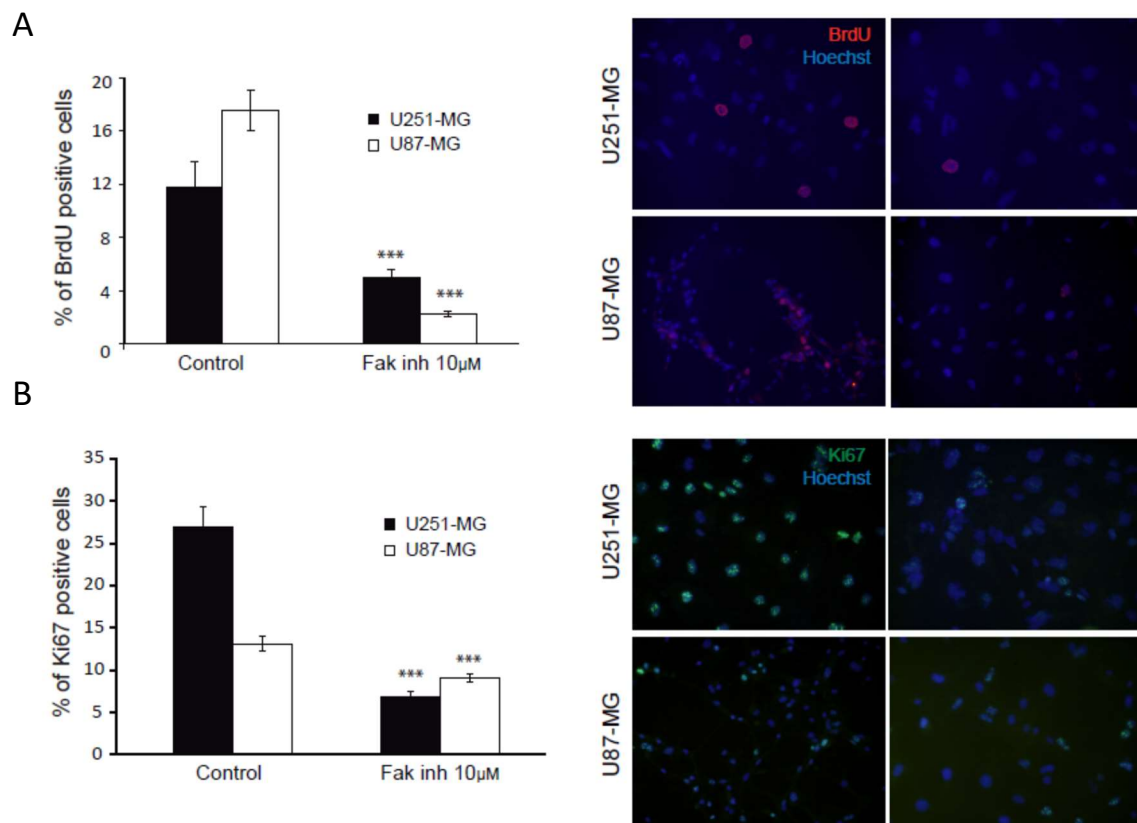


Figura 77. Efecte de la inhibició de FAK en la proliferació cel·lular. Les cèl·lules U251-MG i U87-MG tractades amb PF-573,228 (10 µM, 24 hores) es van immunotenyir amb anticossos contra el marcador proliferatiu Ki67 (A) o contra BrdU (B). El nombre de nuclis positius respecte als nuclis totals tenyits amb Hoechst va ser quantificat i es mostra en el gràfic de barres. Les barres indiquen mitjana \pm s.e.m. *** $p < 0,001$.

Una funció principal de FAK és promoure la migració cel·lular, mitjançant la remodelació de les adhesions focals (Ward et al. 2013) i la inducció de la transcripció de gens implicats en EMT (Avizienyte et al. 2002). L'elevada migració cel·lular confereix als gliomes la capacitat d'envair altres zones del cervell, fent impossible la seva completa resecció quirúrgica i sent una de les principals raons per les què es presenten les recurrències

(Golubovskaya et al. 2013). Així un tractament que afecti la capacitat migratòria/invasiva del GBM seria un bon terapèutic.

Per aquest motiu, el següent objectiu en aquest part del nostre treball va ser investigar com el tractament amb l'inhibidor PF-573,228 afectava la capacitat de migració de cèl·lules de GBM, mitjançant l'assaig de tancament de ferida (*wound healing*). El tractament amb l'inhibidor de FAK va reduir en un 40 % i 50 % el tancament de la ferida a 24 hores respecte la situació control en les línies U251-MG i U87-MG, respectivament (Fig. 78). Aquests resultats indiquen que FAK està implicat en la migració de les cèl·lules de GBM i l'inhibidor PF-573,228 redueix sensiblement aquesta capacitat.

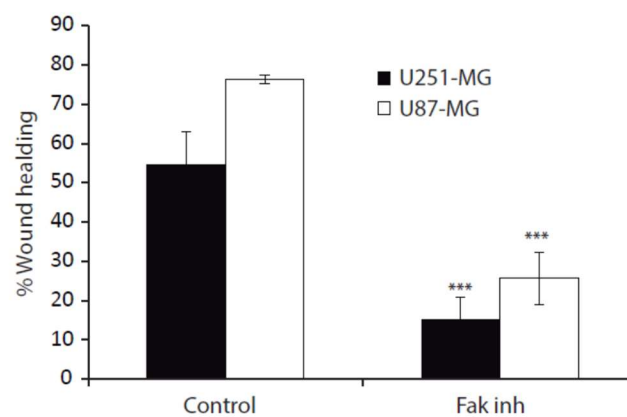


Figura 78. La inhibició de FAK disminueixen la capacitat de migració de cèl·lules de GBM. El gràfic mostra el % de tancament de la ferida en cèl·lules U251-MG i U87-MG no tractades o tractades amb l'inhibidor PF-573,228 durant 24 hores. Les barres indiquen mitjana \pm s.e.m. *** $p < 0.001$.

3.6. La inhibició de FAK produeix un fenotip senescent

La senescència cel·lular es defineix com un programa fisiològic d'arrest del creixement cel·lular, que pot ser activada per senyals d'estrès endògenes o exògenes. La senescència cel·lular pot ser induïda en resposta a l'activació d'oncogenes i actuaria com una barrera front a la tumorigènesi. A més, les cèl·lules poden induir senescència quan són exposades a quimioterapèutics. D'altra banda, les cèl·lules canceroses poden desenvolupar

Resultats

senescència i romandre inactives i posteriorment contribuir a la progressió i a la resistència tumoral (Y. Zhang and Yang 2011). La senescència es caracteritza per un conjunt de canvis fenotípics, on les cèl·lules es tornen més grans, planes, vacuolitzades i de vegades multinucleades (Muñoz-Espín and Serrano 2014). A més, recentment s'ha descrit que l'autofàgia i la senescència actuen conjuntament en el desenvolupament del càncer. D'una banda, l'autofàgia és un dels inductors de la senescència i d'altra banda, durant la senescència s'indueix autofàgia, incloent l'expressió de diversos ATGS (A. R. J. Young et al. 2009).

Degut a que el tractament amb l'inhibidor de FAK induïa autofàgia i produïa uns canvis fenotípics compatibles amb senescència, ens vam plantejar estudiar si la inhibició de FAK conduïa a senescència. A més, la senescència es caracteritza per una disminució en la proliferació cel·lular, degut al arrest del cicle cel·lular que produeix la senescència (Muñoz-Espín and Serrano 2014). El tractament amb PF573,228 a la vegada, també reduïa la proliferació, tant en el assaig d'incorporació de BrdU com en la tinció per Ki67 (Fig. 77).

Un marcador característic de la senescència és l'activitat de la β -galactosidasa (β -gal), degut a una variant d'aquest enzim activa a pH 6,0 present en les cèl·lules senescentes. Aquesta activitat es basa en el increment de lisosomes, que permet la detecció de la β -gal a un pH subòptim (pH 6,0), que possiblement reflecteix l'augment de l'autofàgia en cèl·lules senescentes juntament amb l'augment de mida dels lisosomes (Narita, Young, and Narita 2009).

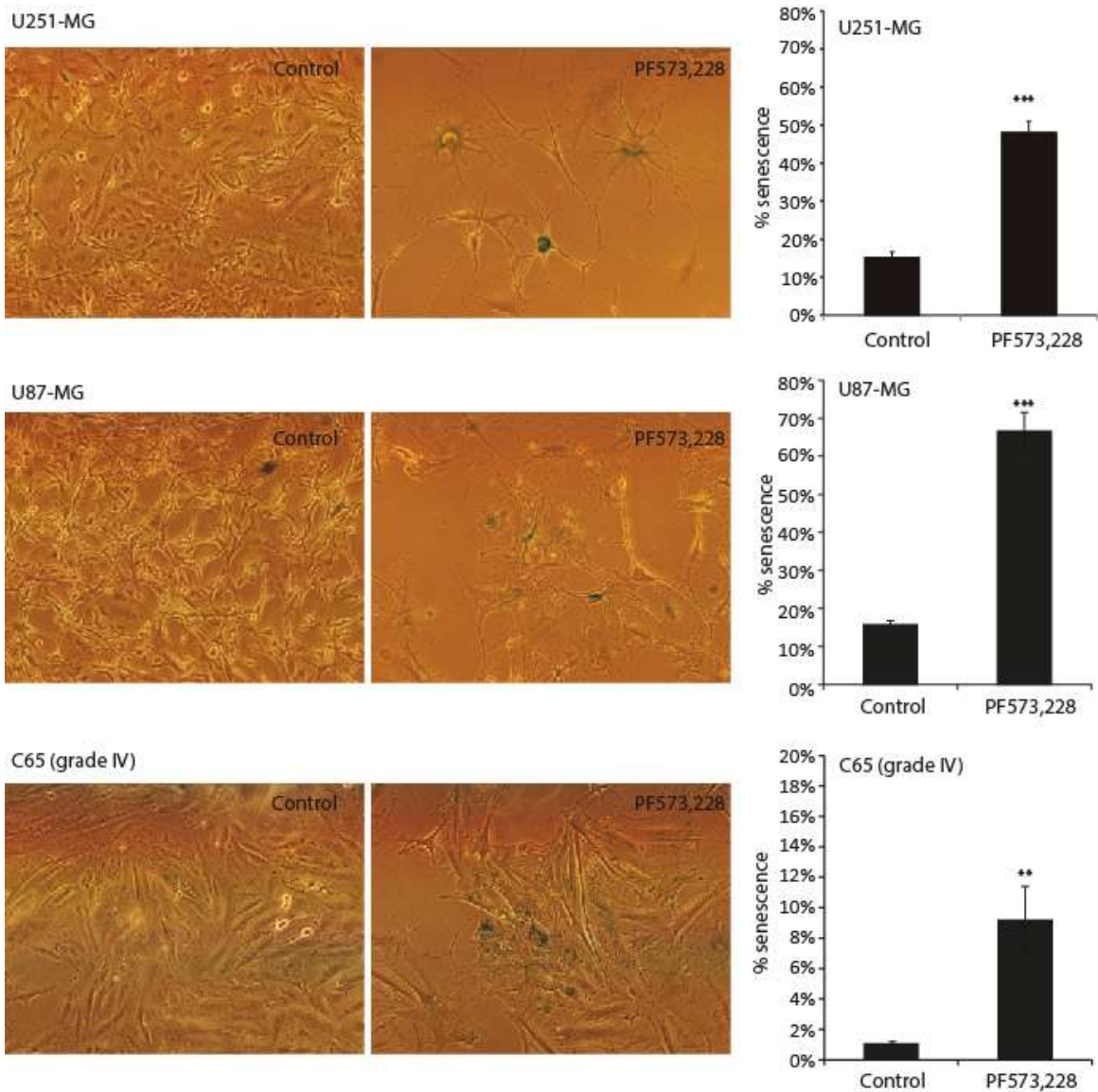
Amb aquests antecedents, vam desenvolupar assaigs per detectar l'activitat β -gal que ens permet identificar les cèl·lules senescentes. La presència d'aquest enzim transforma el compost X-Gal en un precipitat blau que tenyeix les cèl·lules. Les cèl·lules U251-MG, U87-MG i cèl·lules del cas primari C65 es van tractar durant 5 dies amb l'inhibidor de FAK (10 μ M) i posteriorment es va realitzar l'assaig β -gal. En tots tres casos, el tractament amb PF-573,228 va augmentar el nombre de cèl·lules positives per β -gal, sent més significatiu en les línies cel·lulars U251-MG i U87-MG, on es va observar un increment del 40% i 60% aproximadament, respectivament, en el nombre de cèl·lules β -gal positives respecte el control, mentre que en el cas primari l'increment va ser d'un 10% respecte el control (Fig.

79). Les diferències entre les línies cel·lulars i el cas primari possiblement es deuen al creixement més lent que presenta el cultiu primari *in vitro*. D'aquesta manera, els resultats van indicar que la inhibició farmacològica de FAK, a llarg termini, indueix possiblement senescència.

Altres marcadors canònics de senescència inclouen els inhibidors de CDK (*Cyclin Dependent Kinase*) p21 i p27 (codificats per *CDKN1A* i *CDKN1B*, respectivament). La inhibició dels complexos formats per CDK-ciclina produeix un arrest de proliferació (Chicas et al. 2010). L'anàlisi de tots dos inhibidors de cicle en les cèl·lules tractades amb l'inhibidor de FAK a 3 i 5 dies, va mostrar un augment en els nivells de p21 i p27 (Fig. 79), suggerint un arrest del cicle cel·lular compatible amb un fenotip senescent. En conjunt, aquestes dades senyalen que la inhibició de FAK, amb l'inhibidor PF 573,228, indueixen un fenotip senescent, caracteritzat per un canvi morfològic, arrest del cicle cel·lular amb augment dels nivells d'expressió dels inhibidors de cicle p21 i p27 i augment de l'activitat β -gal.

Resultats

A.



B.

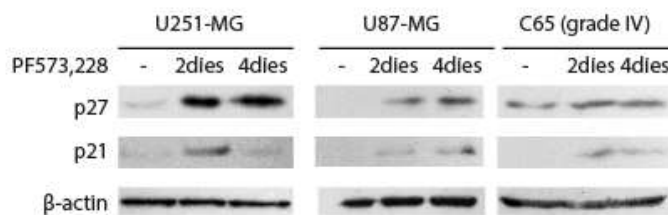


Figura 79. La inhibició de produïx un fenotip compatible amb senescència en cèl·lules de GBM. Assaig d'activitat β -gal en cèl·lules U251-MG, U87-MG i C65 tractades amb l'inhibidor PF-573,228 a 10 μ M durant 5 dies. Imatges representatives Barra (A) i quantificació del nombre de cèl·lules positives per β -gal. Les barres indiquen mitjana \pm s.e.m. ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$. (B). Anàlisi dels nivells de p21 i p27 en cèl·lules U251-MG, U87-MG i C65 tractades amb l'inhibidor de FAK durant 2 i 4 dies. β -actina s'utilitza com a control de càrrega

Discussió

1. β -Catenina nuclear fosforilada en Y142 s'acumula en astrocitomes i GBMs i promou invasió cel·lular

β -catenina és una component important en la via de senyalització Wnt canònica, que desenvolupa funcions clau en situacions fisiològiques i de malaltia. Com a component dels contactes entre cèl·lules, β -catenina també controla l'adhesió i la migració cel·lulars. En glioma són freqüents uns nivells d'expressió de β -catenina alts, trobant-se ja presents en astrocitomes i mantenint-se fins a GBMs (Sareddy et al. 2009). A més a més, la senyalització per Wnt/ β -catenina, que està regulada pels pro-oncogens PLAG2 i FoxM1 durant la gliomagènesi, mantenint-la activa (N. Zhang et al. 2011; Zheng et al. 2010).

En la primera part del treball, hem identificat una fracció nuclear de la forma PY142 β -catenina que és important per a la senyalització transcripcional en GBM. Cal emfatitzar que la forma PY142 β -catenina és diferent de la forma clàssica de β -catenina activa en la via Wnt (defosforilada en Ser/Thr). PY142 β -catenina s'acumula ja en nucli en mostres d'astrocitomes (grau II i III) i correlaciona amb les biòpsies de gliomes que presenten nivells alts dels marcadors de migració Snail/Slug. Altrament, la β -catenina activa (defosfo Ser/Thr) sols es localitza a nucli en GBMs, però no en els d'astrocitomes, i sembla correlacionar amb els nivells de CiclinaD1 en mostres de biòpsies. Per tant, els nostres resultats demostren que les dues formes de β -catenina s'acumulen de forma diferent en la progressió d'astrocitoma a GBM i en diferents mostres de GMS.

La fosforilació de β -catenina en el residu Y142 es regula *in vitro* per les tirosines cinases citosòliques Fer i Fyn i pel receptor tirosina cinasa c-Met (David et al. 2008; F.-I. Huang et al. 2012; Jamieson, Sharma, and Henderson 2014; Piedra et al. 2003). Es sap que el receptor c-Met interacciona amb β -catenina (Monga et al. 2002) i el que nivells de PY142 β -catenina augmenten en neurones hipocampals en desenvolupament quan aquestes són estimulades amb HGF (David et al. 2008). En el nostre estudi hem mostrat la presència d'uns nivells relativament alts i detectables en condicions basals de PY142 β -catenina en biòpsies i en cultius cel·lulars de GBM. D'altra banda, hem observat que la senyalització per HGF regula els nivells PY142 β -catenina en la línia cel·lular U87. A més, aquesta línia

Discussió

cel·lular expressa constitutivament HGF i c-Met (Garnett et al. 2013; Martens et al. 2006; Xie et al. 2012), suggerint que la senyalització autocrina o paracrina d'HGF/c-Met pot ser la responsable dels nivells basals de PY142 β -catenina presents en GBM.

La capacitat de migració alta de les cèl·lules d'astrocitomes i GBM són característiques típiques d'aquest tipus de tumor que contribueixen a la elevada infiltració en el teixit del cervell normal. Aquesta és una de les raons per a la reaparició del tumor i de les recurrències en els pacients de gliomes després del tractament amb radioteràpia i quimioteràpia (Louis 2006). És destacable que els experiments on s'utilitza la forma mutada Y142F β -catenina (no fosforilable) indiquen que HGF promou migració cel·lular i invasió mitjançant la forma PY142 β -catenina en línies cel·lulars i cultius derivats de biòpsies de GBM, perquè la forma mutada aboleix l'efecte causat per HGF.

L'estudi sobre els nivells de c-Met totals i els de c-Met actiu (PY1234/5 c-Met) va demostrar que augmenten en biòpsies d'astrocitomes de grau III i GBMs (comparat amb el teixit control i amb astrocitomes de grau II) tal i com succeeix amb els nivells de PY142 β -catenina i d'acord amb la sobreexpressió de c-Met en GBM (Koochekpour et al. 1997). No s'observa, però una correlació directa entre els nivells de c-Met i els de PY142 β -catenina en cada mostra mitjançant l'anàlisi per Western blot. És interessant, d'altra banda, que HGF disminueix l'adhesió cel·lular (en l'assaig d'*spreading*) i incrementa la migració i invasió cel·lular (en l'assaig Transwell), d'acord amb el seu rol pro-migratori (Grotegut et al. 2006). Els nostres resultats a més destaquen que aquest efecte es perd en cèl·lules de cultius primaris de GBMs que expressen el mutant Y142F β -catenina. Per tant, aquest resultat indiquen que la senyalització per HGF promou la migració i invasió en cèl·lules de GBM, mitjançant la regulació dels nivells PY142 β -catenina promovent una disminució de l'adhesió al substrat.

El tractament amb l'inhibidor de c-Met SU11274 no va afectar els nivells de PY142 β -catenina, però va reduir significativament la invasió cel·lular en línies cel·lulars i cultius primaris de GBM. Aquest resultat confirmen el paper clau de c-Met en progressió tumoral (Boccaccio and Comoglio 2006; Garnett et al. 2013; Guessous et al. 2010; Martens et al. 2006; Navis et al. 2013). L'absència d'efecte sobre els nivells de PY142 β -catenina

quan s'inhibeix c-Met amb l'inhibidor no va permetre concloure si és c-Met qui fosforila aquest residu de la β -catenina en cèl·lules de GBM i suggereix la possible implicació d'altres cinases. El processament proteolític de c-Met ha sigut amplament descrit; a més a més la presència d'un possible fragment de c-Met en el nucli ha sigut caracteritzada en altres càncers molt invasius, com el de mama (F Ancot et al. 2009; Frédéric Ancot et al. 2012; Matteucci, Bendinelli, and Desiderio 2009). La presència d'aquests fragments proteolítics de c-Met podria explicar la tinció de c-Met nuclear observada en biòpsies d'astrocitomes i GBM en el TMA i en cultius cel·lulars. Fragments catalíticament actius de c-Met, amb els quals no podria interaccionar SU11274 (i per tant no seria capaç d'inhibir-lo) podrien regular els nivells de PY142 β -catenina en GBM, explicant els nivells basals de PY142 β -catenina i la incapacitat de ser regulats per l'inhibidor de c-Met. Aquesta hipòtesi es recolza amb la correlació observada entre els nivells nuclears de PY142 β -catenina i de c-Met en astrocitomes d'alt grau.

Els nivells de β -catenina activa van correlacionar amb els de Cdc25a i CiclinaD1, dos importants i coneguts reguladors del cicle cel·lular i gens diana de la via Wnt/ β -catenina (Niehrs and Acebron 2012; Vijayakumar et al. 2011), en homogenats obtinguts a partir de biòpsies de gliomes. Aquestes observacions estan en concordança amb el paper clàssic de la senyalització Wnt en proliferació cel·lular (Niehrs and Acebron 2012). Les proteïnes Snail/Slug indueixen un fenotip pro-mesenquimal (normalment funcionen com a repressors transcripcionals) i controlen la migració cel·lular per sota de diverses vies de senyalització (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005; Peinado, Olmeda, and Cano 2007). A més, les proteïnes Snail/Slug ja s'havien proposat com a responsables de la invasió de cèl·lules de GBM (Han et al. 2011; H. W. Yang et al. 2010). En aquest treball, hem demostrat que els nivells de Snail/Slug incrementen a la vegada que els de PY142 β -catenina en cèl·lules de GBM tractades amb HGF. L'anàlisi estadístic realitzat sobre les biòpsies del TMA va indicar que PY142 β -catenina nuclear i Snail/Slug nuclear tenen un pic en els nivells d'expressió en astrocitomes de grau III. Mitjançant Western blot, es va observar que els nivells de PY142 β -catenina augmenten en mostres d'astrocitomes de grau III i GBM, comparats a mostres control i astrocitomes de baix grau. Cal emfatitzar que nivells elevats

de PY142 β -catenina es troben presents en aquelles mostres amb alts nivells també de Snail/Slug, relacionant la forma PY142 β -catenina de nou amb la capacitat de migració cel·lular en GBM. Per tant, la forma PY142 β -catenina podria ser utilitzada com un biomarcador de l'elevada capacitat de migració del GBM. Degut a que diferents formes de la β -catenina estan involucrades en la progressió tumoral de GBM, són necessaris més estudis sobre la senyalització induïda per β -catenina per avaluar-la com a possible diana terapèutica en GBM.

2. La inhibició de la via Wnt/ β -catenina sobreregula p62 i sensibilitza les cèl·lules de Glioblastoma a la mort cel·lular induïda per bloquejants de l'autofàgia

Des del descobriment de l'activació aberrant de la senyalització Wnt/ β -catenina en càncer, el disseny de molècules petites i d'estratègies que tenen com a diana aquesta via ha estat en el punt de mira de molts equips d'investigació i d'empreses farmacèutiques (Barker and Clevers 2006; Clevers and Nusse 2012; Dihlmann and von Knebel Doeberitz 2005). El compost FH535 es va identificar com a inhibidor de la via Wnt/ β -catenina amb propietats anti-proliferatives (Handeli and Simon 2008). En aquesta segona part del nostre treball, hem investigat si la inhibició de TCF, una família de factors de transcripció que junt amb β -catenina regulen l'expressió de gens diana de Wnt, es pot utilitzar per interrompre la progressió tumoral del GBM. La repressió del gen autofàgic p62 per TCF/ β -catenina descrita prèviament (Petherick et al. 2013) ens va portar a avaluar les possibles conseqüències que la inhibició de TCF podia tenir sobre l'autofàgia del GBM. El nostre treball demostra primer que la inhibició de la via Wnt (utilitzant l'inhibidor farmacològic FH535 o silenciament de TCF4 o β -catenina) sobreregula els nivells de p62 en GBM. Per contra, la forma mutant de β -catenina que l'estabilitza, redueix els nivells d'expressió de p62, com seria esperable. Segon, seguit de la inhibició de TCF (amb l'inhibidor farmacològic o amb inhibidors fisiològics com DKK) hem observat un increment del flux autofàgic a conseqüència, possiblement, de la sobreregulació dels nivells de p62 (Pankiv et al. 2007).

Intentant aprofundir en les vies de senyalització implicades, hem trobat que la inhibició de la senyalització TCF/ β -catenina s'associa amb una reducció de la activitat de mTOR (trobant disminuïdes diferents dianes) i de forma interessant, que promou la translocació nuclear del regulador autofago-lisosomal TFEB (Martina et al. 2012), sent aquest un altre mecanisme responsable de la inducció del flux autofàgic. Finalment, cal destacar que la inducció de l'autofàgia mitjançant la inhibició de TCF/ β -catenina sensibilitza les cèl·lules de GBM per als bloquejants de l'autofàgia, conduïnt-les a la mort per apoptosi. Així, per tant, el tractament combinat de la inhibició de TCF i de l'autofàgia indueixen la mort cel·lular en GBM i redueix el creixement tumoral *in vivo*.

p62 és una proteïna essencial en l'autofàgia, que actua com receptor del "cargó" per a incorporar-lo als autofagosomes. A més, p62 és degradada també per autofàgia, per la qual cosa els seus nivells sovint correlacionen inversament amb el flux autofàgic (Jiang and Mizushima 2015). D'altra banda, moltes vies regulen l'expressió de p62 (Moscat and Diaz-Meco 2009; Puissant, Fenouille, and Auberger 2012), entre les que trobem la senyalització per Ras, dificultant qualsevol interpretació basada només en els seus nivells. Diversos estudis, així com els nostres propis, indiquen que p62 s'incrementa en línies cel·lulars, biòpsies i cultius primaris de GBM comparat amb els gliomes de baix grau. Aquest resultat suggereixen que la autofàgia es troba més elevada en GBM que en astrocitoma i teixit del sistema nerviós central (Jennewein et al. 2016). En paral·lel, Gao et al. (Gao et al. 2010) també descriuen nivells alts de p62 en estadis finals de càncer de colon quan es compara amb l'inici del desenvolupament de la malaltia. Al dit anteriorment, cal afegir que p62 i Dvl2 (una proteïna scaffold de la via Wnt) correlacionen indicant que l'autofàgia regula negativament la via Wnt, mitjançant la degradació de Dvl2 i també de β -catenina (Gao et al. 2010; Ma et al. 2015; Petherick et al. 2013). Els nostres resultats indiquen una situació similar en GBM. El gen diana de Wnt, CiclinaD1 presenta nivells alts d'expressió en aquelles mostres que expressen nivells baixos de p62 i/o de Beclin1, correlacionant per tant, negativament l'autofàgia i la via Wnt en GBMs. La des-repressió de p62, utilitzant FH535 (el qual afecta a la unió entre β -catenina i TCF) o silenciament de TCF4 o β -catenina, produeix així mateix l'augment d'expressió de p62 i la inducció del flux autofàgic. Aquesta

Discussió

darrera conclusió es recolza amb experiments on s'analitzen els nivells de p62 i LC3 després del tractament amb Baf i en assajos on s'analitza l'estatus del flux autofàgic utilitzant el constructe tàndem de LC3. Cal ressaltar que el flux autofàgic també s'accelera amb el tractament amb DKK, demostrant que actuant a nivell dels receptors canònics de Wnt afecta igualment positivament l'autofàgia i suggerint per tant la producció autocrina de factors Wnt en les cèl·lules de GBM. Recollint tot el que s'ha dit, les nostres dades senyalen que la inhibició de la senyalització per Wnt per diferents mitjans causa un augment de l'autofàgia; oposadament, estudis previs destacaven la capacitat de l'autofàgia per a reduir la senyalització de la via Wnt, mitjançant la degradació de components essencials d'aquesta (Gao et al. 2010; Petherick et al. 2013). Aquesta regulació creuada dibuixa una complicada relació entre la via Wnt i l'autofàgia en les fases inicials, la progressió i recurrència del càncer que caldrà aclarir i explotar.

En el nostre treball també vàrem estudiar els mecanismes pels quals es desenvolupa l'autofàgia com a conseqüència de la inhibició de TCF/ β -catenina i es analitzar l'estatus de mTOR1, un dels components essencials de la iniciació de l'autofàgia. En condicions de disponibilitat de nutrients, mTOR resideix en la superfície dels lisosomes on funciona com a detector de la quantitat de nutrients. Una de les funcions de mTOR1 davant l'abundància de nutrients és induir la traducció de proteïnes i inhibir l'autofàgia (Saxton and Sabatini 2017). La via Wnt mitjançant la inhibició de GSK3 activa la via mTOR per a estimular la síntesi proteica, necessària durant la proliferació (Inoki et al. 2006). En canvi, GSK3 és un inhibidor del creixement cel·lular, que és bloquejat en ser fosforilat per AKT quan s'activa mTOR en resposta a factors de creixement com IGF (Musgrove and Sutherland 1993). Els nostres resultats vam demostrar que en situacions d'inhibició de TCF disminueix la senyalització per mTOR, detectant una disminució en la fosforilació de la seva diana, p70S6K (Saxton and Sabatini 2017).

En els darreres anys, TFEB s'ha postulat com un màster regulador de l'autofàgia i de la biogènesi lisosomal, promovent l'expressió de p62 i Lamp1, entre d'altres gens (Laplanche and Sabatini 2013; Napolitano and Ballabio 2016; Sardiello et al. 2009; Settembre et al. 2011). Sota condicions de privació de nutrients, mTOR1 es troba inhibida i es desplaça del lisosoma, sent incapaç de fosforilar TFEB, que el retenia en el lisosoma, produint per tant

la seva activació. Conseqüentment, TFEB defosforilat transloca a nucli on regula l'expressió de diversos gens (Roczniak-Ferguson et al. 2012; Settembre et al. 2012). En aquest treball, nosaltres hem trobat que la inducció de l'autofàgia a causa de la inhibició de TCF (en paral·lel a l'efecte produït per la privació de sèrum) ocasiona la defosforilació i la translocació nuclear de TFEB tant en línies cel·lulars com en cultius primaris de GBM. Així doncs, les nostres dades aclareixen dos possibles mecanismes pels qual es produiria la inducció de l'autofàgia com a resultat de la inhibició de la via Wnt β -catenina: 1) la desrepressió de *p62*, i 2) mitjançant l'activació de TFEB i la inducció de gens pro-autofàgics, incloent *p62*.

També es va estudiar l'efecte de inhibir TCF en la proliferació i la migració cel·lular. La disminució de l'activitat de TCF o bé el silenciament de TCF4 redueixen la proliferació i la capacitat de formar colònies de les cèl·lules de GBM, en concordança amb l'efecte pro-proliferatiu àmpliament conegut de la via Wnt/ β -catenina (Niehrs and Acebron 2012). Cal ressaltar que aquest resultats *in vitro* es van confirmar també en els nostres experiments *in vivo* en xenografts de ratolí. Així, els tumors que es formen a partir de cèl·lules de GBM en què TCF4 havia estat silenciats eren més petits i mostraven un menor nombre de cèl·lules positives per Ki67 que aquells formats a partir de cèl·lules control. No sols es va trobar una descens en proliferació, sinó que en assaigs *in vitro* la inhibició de TCF també va produir una disminució en la migració de cèl·lules de GBM en experiments de tancament de ferida. Els pacients que pateixen GBM presenten un mal pronòstic en part produït per l'aparició de probables recurrències que s'originen a partir de cèl·lules altament migratòries que es dispersen cap a altres zones del cervell malgrat una resecció quirúrgica extensa del tumor. D'aquesta manera, fàrmacs que disminueixin la capacitat de migrar com l'inhibidor de TCF semblarien adequats per al tractament dels pacients i reduir l'aparició de recurrències.

Globalment, les nostres troballes proposen que interferint amb la funció de TCF utilitzant molècules petites que puguin creuar la barrera hemato-encefàlica podria ajudar a controlar el creixement i la progressió del GBM. Cal destacar, en contraposició però, que els nostres resultats també impliquen que inhibir la via Wnt en GBM com a via pro-

Discussió

oncogènica, podria tenir conseqüències negatives en els pacients, donat que condueix a la sobre-regulació d'una via adaptativa de supervivència i de resistència com és l'autofàgia. Assaigs clínics haurien de discriminar el balanç d'aquests diferents efectes en pacients.

La inducció de l'autofàgia pot ser una estratègia per a sensibilitzar les cèl·lules canceroses a bloquejants del fluxe autofàgic. Per exemple, diversos estudis senyalen que la inducció de l'autofàgia per Temozolomida sensibilitza a les cèl·lules de GBM per la mort cel·lular amb bloquejants de l'autofàgia (Golden et al. 2014; Kanzawa et al. 2004; S. W. Lee et al. 2015). Així, vam decidir estudiar l'efecte de la doble inhibició, de TCF i de l'autofàgia (utilitzant Baf o CQ) en cèl·lules de GBM. Vam trobar que el tractament combinat (al contrari dels tractaments senzills amb l'inhibidor de TCF o amb els bloquejants de l'autofàgia sols) comprometia la viabilitat cel·lular i conduïa les cèl·lules de GBM a la mort cel·lular, tal i com ho demostrava l'anàlisi utilitzant els assaigs de WST i d'Annexina V, respectivament. S'ha descrit que la membrana de l'autofagosoma pot funcionar com a plataforma per afavorir el processament i l'activació de Casp8 i així iniciant la cascada d'activació de les Caspases que desencadena l'apoptosi (M. M. Young et al. 2012). Per aquest motiu, vàrem estudiar el possible processament de Casp8 en les condicions del doble tractament. Vam trobar que el tractament dual causava el processament de Casp8, resultant en l'acumulació del fragment actiu de Casp8 p18. En canvi, el tractament senzill només amb l'inhibidor de TCF va resultar en un fragment intermedi (p47). Encara més, vam poder il·lustrar mitjançant l'ús de cèl·lules on p62 o Casp8 havien estat silenciades, que el mecanisme de mort causat pel tractament dual involucrava el processament de Casp8, possiblement en la superfície dels autofagosomes (S. Huang et al. 2013). Així, cèl·lules que expressaven un shRNA contra Casp8 sotmeses al tractament combinat mostraven una disminució del 15% de la població apòptica. A més, les nostres dades assenyalen que l'increment en els nivells de p62 causats per la inhibició de TCF/ β -catenina, és essencial i juga un paper clau en la inducció de mort cel·lular. És a dir, en cèl·lules en què l'expressió de p62 estava silenciada, el tractament dual amb l'inhibidor de TCF i Baf revertia completament la mort cel·lular. Aquests resultats suggereixen que

p62 és clau en el processament de Casp8 i els bloquejants de l'autofàgia permeten l'acumulació de p18 que seria responsable de l'apoptosi.

Els experiments *in vivo* en xenografts van reforçar el paper crític de la regulació de p62. Els tumors formats a partir de cèl·lules amb TCF4 silenciats presentaven una immunitinció citoplasmàtica de p62 més forta que aquells formats a partir de cèl·lules control, indicant altre cop la sobrerregulació de p62 quan TCF es trobava silenciada. D'altra banda, tots dos tipus de tumors (control i silenciats per TCF4) i tractats amb CQ mostren un patró de tinció puntejat, confirmant el bloqueig del flux autofàgic i l'acumulació de p62 en autofagosomes. Finalment, els tumors formats a partir de cèl·lules silenciades per TCF4 i tractades amb CQ van mostrar un tamany més petit que els controls, indicant un efecte sinèrgic entre el silenciament de TCF4 i el tractament amb CQ, d'acord amb les dades *in vitro*.

En resum basat en les nostres dades proposem que la inhibició de TCF/ β -catenina actua de dos formes per augmentar els nivells de p62 i el flux autofàgic: des-repressió de p62 i inhibició de mTOR dirigits per l'activació de TFEB (Fig. 80). Enfortit pels experiments amb els shRNA, la sobrerregulació de p62 sembla ser un pas clau per promoure aquesta mort cel·lular en GBM induïda pel co-tractament amb els bloquejants de l'autofàgia i l'inhibidor de TCF. D'aquesta manera, un tractament combinat que impliqui la inhibició de la via Wnt i de l'autofàgia podria fonamentar una nova aproximació terapèutica per al GBM. Per últim, els nostres resultats demostrant que l'antagonista de Wnt Dkk-1 també induïx l'autofàgia (igual que el silenciament o la inhibició de TCF/ β -catenina) demostra per primera vegada que la relació entre l'autofàgia i la via Wnt és controlada des del complex de receptors Wnt i en un context fisiològic. És interessant que DKK-3 ha estat recentment identificat com a biomarcador elevat en sobredants de línies cel·lulars altament autofàgiques de melanoma.

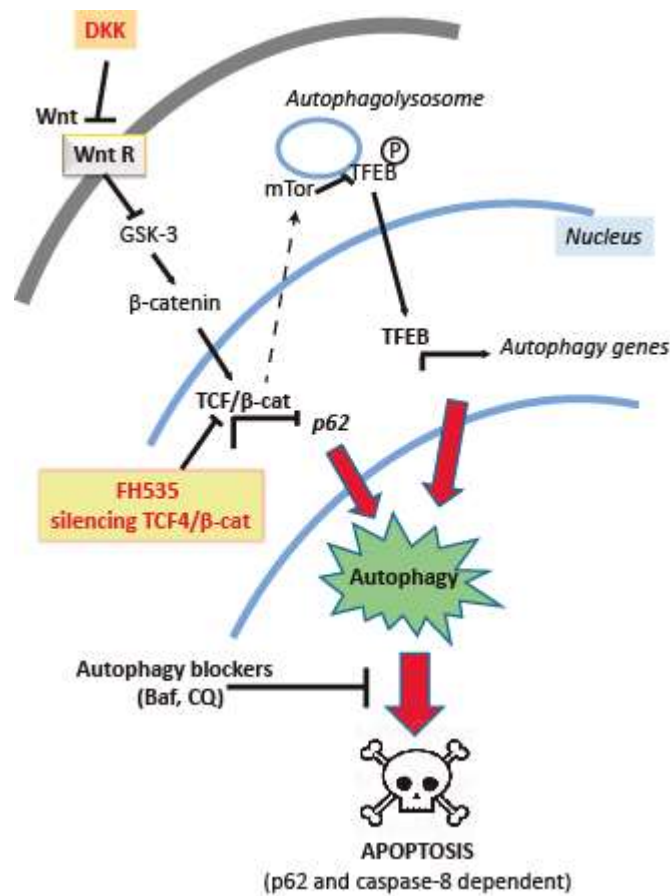


Figura 80. Model per a la inducció de l'autofàgia com a conseqüència de la inhibició de la via Wnt i per a la mort cel·lular en GBM causada per la doble inhibició de Wnt i l'autofàgia. La inhibició o el silenciament de la funció de TCF/ β -catenina (β -cat) desreprimeix p62, produint la inducció del flux autofàgic i la disminució de la proliferació. DKK també incrementa el flux autofàgic, suggerint que la autofàgia pot ser regulada a nivell dels receptors de Wnt. L'increment en el flux autofàgic s'associa amb una disminució en l'activitat de MTOR i la translocació nuclear de la forma no fosforilada de TFEB, promovent la transcripció de p62. La inhibició de GSK-3 depenent de Wnt pot concedir a l'activació de mTOR (Inoki et al. 2006), malgrat això el mecanisme roman desconegut (línia discontinua). L'increment del flux autofàgic com a conseqüència de la inhibició de TCF provoca la mort cel·lular quan es tracta amb els bloquejadors de l'autofàgia, mitjançant un mecanisme on p62 i el processament de caspasa-8, probablement en els autofagosomes, són necessaris.

3. La inhibició farmacològica de FAK induïx autofàgia i senescència en Glioblastoma

FAK és un element clau en la comunicació entre els estímuls extracel·lulars i la senyalització intracel·lular mitjançant les adhesions focals (Sulzmaier et al., 2014). FAK també controla processos de supervivència i migració cel·lulars (B. Y. Lee et al., 2015). D'altra banda, FIP200, una proteïna que inhibeix FAK, ha estat amplament descrita com inductora del flux autofàgic (H. Wei et al., 2014; Huijun Wei et al., 2011).

En aquesta part del nostre treball, hem descrit l'expressió de FAK i de la seva forma activa en gliomes de diferents graus, disminuint la seva expressió en graus alts, en contraposició amb el que s'havia descrit (Jones et al., 2001). D'altra banda, hem demostrat la importància de la senyalització per FAK en la capacitat de supervivència, proliferació i migració de les cèl·lules de GBM. La inhibició de FAK, per una banda, produeix la inducció de flux autofàgic mitjançant la inhibició de AKT i de mTOR (disminució de la seva diana pEIF4E). D'altra banda, produeix un fenotip senescent caracteritzat per una baixada en proliferació, associada a un augment dels inhibidors de cicle p21 i p27, un canvi en la morfologia cel·lular i un augment de l'activitat β -gal.

Típicament, FAK es troba sobreexpressada en tumors, i en gliomes s'havia descrit que el seu augment en graus alts comparat amb astrocitomes de baix grau (Jones et al., 2001). En aquest treball hem observat que els nivells d'expressió de FAK disminueixen en tumors d'alt grau (GBM) comparat a astrocitomes de grau baix, analitzant lisats cel·lulars i confirmat en l'anàlisi *in silico* utilitzant les bases de dades disponibles on s'analitzen un nombre de casos molt elevat. Malgrat això, hi ha diversos assajos clínics que exploten FAK com a diana (no obstant, no en GBM) amb resultats esperançadors, possiblement degut a que la FAK es troba implicada tant a nivell del tumor com del microambient (J. B. Stokes et al., 2011). A més, encara que no s'observa una sobreexpressió de FAK en GBMs, FAK és actiu en aquest tumor en condicions basals i pot ser inhibit per PF-573,228.

Un altre dels aspectes que abordem en aquest treball és la relació entre autofàgia i FAK. Diversos estudis descriuen la funció de FIP200 en la inhibició de FAK (Abbi et al., 2002),

mentre que altres es centren en la implicació de FIP200 en la inducció del procés autofàgic, a nivell d'iniciació de l'autofàgia, formant part del complex de ULK (H. Wei et al., 2014; Huijun Wei et al., 2011). Ens va cridar l'atenció que la depleció de FAK condueix a una inhibició dels contactes cel·lulars que portava Src actiu a autofagosomes, augmentant la supervivència de cèl·lules de carcinoma de pell (Sandilands et al., 2011), un fet que posava un punt d'atenció en els assaigs que utilitzen inhibidors de FAK en monoteràpia. Aquests són aparentment les poques referències que lliguen autofàgia i FAK, fet que ens va animar a investigar aquesta relació en GBM. A més a més, una de les vies a través de les quals FAK senyalitza és la via PI3K (Sonoda, Watanabe, Matsumoto, Aizu-Yokota, & Kasahara, 1999), que a la seva vegada activa mTOR, un dels principals efectors de l'autofàgia (Martina et al., 2012). En el nostre estudi descrivim que la inhibició de FAK indueix el flux autofàgic mitjançant la inhibició d'AKT i mTOR. Possiblement la inducció de l'autofàgia quan FAK està inhibit sigui un mecanisme per fer front a el què en cèl·lules no canceroses donaria lloc a mort. D'aquesta forma, les cèl·lules de GBM haurien trobat un mecanisme de supervivència i evasió de la mort, adaptant-se a l'estrès que els provoca la pèrdua de FAK, semblant al descrit per Sandilands (Sandilands et al., 2011).

Un altre efecte de la inhibició de FAK és en supervivència i proliferació (Lim, Chen, et al., 2008). D'una banda, sembla lògic pensar que la inducció de proliferació es deu a la senyalització per PI3K/mTOR, una via amplament descrita en proliferació (Laplante and Sabatini 2012). D'altra banda, FAK pot localitzar a nucli on interacciona amb p53 produint la seva degradació en un mecanisme independent del seu domini catalític. Les nostres dades indiquen una lleugera disminució en la viabilitat de cèl·lules de GBM quan FAK és inhibit durant 24 hores, probablement degut a una disminució en proliferació i no a una inducció de mort cel·lular. Altres estudis on s'utilitzaven altres inhibidors de FAK van descriure una inducció d'apoptosi (Slack-Davis et al., 2007b; Sonoda et al., 1999). Pot ser que en la inducció de la apoptosi sigui necessari inhibir la funció de FAK com a proteïna adaptadora (Lim et al., 2010, 2012; Lim, Chen, et al., 2008), que sovint és independent de l'activitat catalítica. PF-573,228 és un inhibidor catalític que possiblement no seria capaç de inhibir la funció com a proteïna adaptadora (Lim, Chen, et al., 2008; Jayme B Stokes et al., 2011). D'altra banda, l'absència d'efecte en mort cel·lular també podria ser deguda a

que l'inhibidor utilitzat en aquest estudi inhibeix únicament FAK (Jayme B Stokes et al., 2011; Wang et al., 2011; Yue et al., 2015). Algunes de les funcions que duria a terme FAK quan és inhibit podrien ser desenvolupades per PYK2, proteïna molt semblant a FAK (Fan & Guan, 2011). En molts dels estudis on utilitzen inhibidors de FAK, sembla que l'apoptosi es desencadeni quan els inhibidors que s'utilitzen no són específics de FAK i també tenen la capacitat d'inhibir PYK2 (Crompton et al., 2013; B. Y. Lee et al., 2015).

El glioma presenta una alta invasivitat, fet que facilita la seva dispersió i dificulta la completa resecció quirúrgica, afavorint la reaparició de recurrències (Ostrom, Gittleman, Stetson, Virk, & Barnholtz-Sloan, 2015). Aquest fet provoca que el temps de supervivència per als pacients que pateixen un glioma sigui molt baix (Jansen, Yip, & Louis, 2010). La senyalització per FAK està implicada en migració, ja sigui intervenint en la remodelació de les adhesions focals (Zhu et al., 2009) o en la inducció de gens implicats en EMT, caderina o MMPs (Avizienyte et al., 2002; Tancioni et al., 2014). El nostre treball demostra que PF573,228 disminueix la capacitat de migració de les cèl·lules de glioma. Aquests resultats estarien en concordança amb l'efecte d'altres inhibidors (TAE226) en diferents models (B. Y. Lee et al., 2015), sent a més a més, un mecanisme que seria dependent de l'activitat cinasa de FAK. D'aquesta manera, la inhibició de FAK com a diana terapèutica ens permetria actuar contra l'alta capacitat de migració de les cèl·lules de GBM i en principi disminuir la recurrència. Aquesta capacitat està sent explotada en diversos assaigs clínics en diferents tipus de tumors (Golubovskaya et al., 2013; B. Y. Lee et al., 2015). Dir alguna paraula per prevenir la metastasi en aquest contexte estaria bé per donar suport.

Diversos estudis indiquen que la inducció de la senescència cel·lular disminueix la proliferació, migració, invasió i metastasi de cèl·lules canceroses (Zhang & Yang, 2011). La senescència actuaria d'una forma beneficiosa inhibint, en principi, la progressió tumoral. El nostre treball descriu que la inhibició de FAK desemboca en un fenotip senescent.

Autofàgia i senescència són dos processos cel·lulars altament relacionats. Diversos treballs han descrit que una autofàgia sostinguda pot desembocar en fenòmens de senescència, quan les cèl·lules no poden suportar un excés d'autofàgia (Andrew R J Young et al., 2009). D'altra banda, diversos estudis descriuen que l'autofàgia és activada sota la

Discussió

inducció de senescència (OIS, Oncogen Induced Senescence), possiblement produït per un feedback negatiu en la via mTOR que produeix una inducció de gens essencials per l'autofàgia (Gewirtz, 2013; Salama, Sadaie, Hoare, & Narita, 2014). A més, l'autofàgia realitza una funció essencial en la secreció de senyals necessàries per la senescència (citocines, quemoquines...), que ajuden a reforçar el fenotip senescent i que aquest s'estengui a les cèl·lules veïnes mitjançant un mecanisme conegut com SAPS (Senescence-Associated Secretory Phenotype) (Salama et al., 2014). De manera que l'autofàgia a més de facilitar la transició d'un fenotip proliferatiu a un de senescent, ajudaria a controlar la qualitat d'aquest darrer (Jones et al., 2001).

Un altre estudi indica que la OIS es dona juntament amb la degradació de Lamin B1 (LMNB1). Es tracta d'un componen de la làmina nuclear que s'exporta al citoplasma juntament amb fragments d'heterocromatina (CCFs, Cytoplasmic Chromatin Fragments) mitjançant la interacció amb LC3, i una vegada al citoplasma és degradada per a produir l'activació de p53 i RB1 que indueixen el fenotip senescent final (Galluzzi, Bravo-San Pedro, & Kroemer, 2016).

En conclusió, tots aquest estudis, juntament amb els nostres, suggereixen que l'autofàgia pot ser un sistema complementari a la regulació epigenètica, per a aconseguir unes característiques bioquímiques típiques del fenotip senescent, ajudant a la ràpida remodelació proteica (Mosieniak et al., 2012; Salama et al., 2014; Andrew R J Young et al., 2009).

En la lluita contra el càncer s'ha buscat aconseguir la completa eliminació del tumor, però les cèl·lules canceroses són molt heterogènies i tenen la capacitat d'adaptar-se ràpidament a quimioterapèutics i a variacions en l'ambient. Per tant, els últims esforços en investigació terapèutica suggereixen que les teràpies inductores de senescència accelerada o causada per estrès, podrien millorar el tractament contra el càncer (Jonathan A Ewald, Desotelle, Wilding, & Jarrard, 2010). Aquestes teràpies busquen aconseguir la supressió en proliferació d'aquelles cèl·lules resistents al tractament convencional, mantenint estable el volum tumoral, a més d'intentar reduir els efectes secundaris (J. A. Ewald, Desotelle, Wilding, & Jarrard, 2010; M. Lee & Lee, 2014).

D'altra banda, es creia que el SAPS afectava únicament al microambient de manera pro-oncogènica i afavorint el creixement del tumor, però recentment s'ha descrit que els factors secretats posseeixen acció anti-tumorogènica promovent l'activació del sistema immune. Aquest fet provoca l'atracció i penetració dels macròfags i limfòcits en el microambient tumoral i l'eliminació de les cèl·lules senescentes (J. A. Ewald et al., 2010; M. Lee & Lee, 2014).

En conclusió en aquest tercer i últim capítol hem descrit que l'inhibició farmacològica de FAK amb PF573,227 indueix el flux autofàgic, disminueix la migració i la proliferació i resulta en un fenotip senescent en GBM. Aquests resultats suggereixen que la inhibició de FAK podria ser una bona diana terapèutica. No obstant, són necessaris més estudis per abordar l'eficàcia de l'inhibidor en models in vivo i per tal de comprovar si en els tumors cerebrals la inducció de senescència mitjançant la inhibició de FAK és un mecanisme pro- o anti-tumoral.

Conclusions

Conclusions

PRIMERA. Els nivells de les formes PY142 β -catenina i β -catenina activa incrementen amb la malignitat en gliomes. La forma PY142 β -catenina presenta localització nuclear, ja des d'astrocitomes de baix grau, mentre la forma activa és nuclear solament en GBM.

SEGONA. La forma PY142 β -catenina actua a través de regulació transcripcional en GBM.

TERCERA. La senyalització per HGF incrementa el nivells de PY142 β -catenina en cèl·lules de GBM U87-MG i la

QUARTA. La forma PY142 β -catenina redueix l'adhesivitat cel·lular, promou la migració/invasió de cèl·lules de GBM i s'associa a nivells incrementats d'Snail/Slug.

CINQUENA. La inhibició farmacològica de c-Met redueix la capacitat d'invasió de cèl·lules de GBM.

SISENA . Els nivells de p62 augmenten en gliomes d'alt grau. A més, existeix una correlació inversa entre els marcadors d'autofàgia i la via Wnt canònica.

VUITENA. La via Wnt/ β -catenina reprimeix p62, mentre que la inhibició de TCF/ β -catenina l'incrementa.

NOVENA. La inhibició farmacològica o el silenciament gènic de TCF/ β -catenina, o el tractament amb l'inhibidor fisiològic de Wnt DKK-1, incrementen el flux autofàgic.

DESENA. La inhibició de la via Wnt canònica produeix la inhibició de mTOR, així com l'activació i translocació nuclear de TFEB.

ONZENA. La disminució de la senyalització de TCF o el bloqueig de l'autofàgia disminueixen la proliferació de cèl·lules de GBM.

DOTZENA. La inhibició de TCF, però no el bloqueig de l'autofàgia, disminueix la migració de cèl·lules de GBM.

TRETZENA. La disminució de la senyalització per TCF redueix el creixement tumoral *in vivo* en models de xenografts.

Conclusions

CATORZENA. La doble inhibició de TCF i de l'autofàgia promou apoptosi, en un mecanisme dependent de p62 i parcialment de Casp8 en cèl·lules de GBM.

QUINZENA. La disminució de TCF junt al bloqueig de l'autofàgia redueix el creixement tumoral en models de xenografts i pot ser una possible diana terapèutica pel GBM.

SETZENA. FAK i la seva forma activa són presents ja en gliomes de baix grau; d'altra banda, l'expressió de FAK disminueix en gliomes d'alt grau comparat amb gliomes de baix grau.

DISSETENA. La inhibició de l'activitat catalítica de FAK, amb l'inhibidor PF-573,228, incrementa el flux autofàgic, mitjançant la inhibició d'AKT/mTOR.

DIVUITENA. La disminució de la senyalització per FAK disminueix la migració i la proliferació cel·lulars en GBM.

DINOVENA. El tractament amb l'inhibidor farmacològic de FAK PF-573,228 produeix un canvi fenotípic compatible amb senescència cel·lular, caracteritzat per un augment dels inhibidors de cicle p21 i p27 i de l'activitat β -gal.

.

Bibliografia

- Abbi, S. et al. 2002. "Regulation of Focal Adhesion Kinase by a Novel Protein Inhibitor FIP200." *Molecular Biology of the Cell* 13(9): 3178–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12221124> (April 7, 2017).
- Almeida, E A et al. 2000. "Matrix Survival Signaling: From Fibronectin via Focal Adhesion Kinase to c-Jun NH(2)-Terminal Kinase." *The Journal of cell biology* 149(3): 741–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10791986> (April 11, 2017).
- Anastas, Jamie N, and Randall T Moon. 2013. "WNT Signalling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer." *Nature reviews. Cancer* 13(1): 11–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23258168> (July 9, 2014).
- Ancot, F et al. 2009. "Proteolytic Cleavages Give Receptor Tyrosine Kinases the Gift of Ubiquity." *Oncogene* 28(22): 2185–95. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/onc.2009.88> (February 6, 2017).
- Ancot, Frédéric et al. 2012. "Shedding-Generated Met Receptor Fragments Can Be Routed to Either the Proteasomal or the Lysosomal Degradation Pathway." *Traffic* 13(9): 1261–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22672335> (February 6, 2017).
- Archbold, H C, Y X Yang, L Chen, and K M Cadigan. 2012. "How Do They Do Wnt They Do?: Regulation of Transcription by the Wnt/ β -Catenin Pathway." *Acta physiologica (Oxford, England)* 204(1): 74–109. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21624092> (March 17, 2016).
- Ashton, Gabrielle H. et al. 2010. "Focal Adhesion Kinase Is Required for Intestinal Regeneration and Tumorigenesis Downstream of Wnt/c-Myc Signaling." *Developmental Cell* 19(2): 259–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20708588> (April 8, 2017).
- Avizienyte, Egle et al. 2002. "Src-Induced de-Regulation of E-Cadherin in Colon Cancer Cells Requires Integrin Signalling." *Nature cell biology* 4(8): 632–38. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncb829> (April 8, 2017).
- Bachelder, Robin E et al. 2005. "Glycogen Synthase Kinase-3 Is an Endogenous Inhibitor of

Bibliografia

- Snail Transcription: Implications for the Epithelial-Mesenchymal Transition." *The Journal of cell biology* 168(1): 29–33. <http://jcb.rupress.org/content/168/1/29.long> (November 6, 2013).
- Barbero, Simone et al. 2009. "Caspase-8 Association with the Focal Adhesion Complex Promotes Tumor Cell Migration and Metastasis." *Cancer Research* 69(9). <http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/9/3755.long> (April 7, 2017).
- Barker, Nick, and Hans Clevers. 2006. "Mining the Wnt Pathway for Cancer Therapeutics." *Nature reviews. Drug discovery* 5(12): 997–1014. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd2154> (April 3, 2017).
- Barrallo-Gimeno, Alejandro, and M Angela Nieto. 2005. "The Snail Genes as Inducers of Cell Movement and Survival: Implications in Development and Cancer." *Development* 132(14): 3151–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983400> (January 10, 2016).
- Barrow-McGee, Rachel, and Stéphanie Kermorgant. 2014. "Met Endosomal Signalling: In the Right Place, at the Right Time." *The international journal of biochemistry & cell biology* 49: 69–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24440758> (March 21, 2016).
- Barsukov, Igor L et al. 2003. "Phosphatidylinositol Phosphate Kinase Type 1gamma and beta1-Integrin Cytoplasmic Domain Bind to the Same Region in the Talin FERM Domain." *The Journal of biological chemistry* 278(33): 31202–9. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M303850200> (April 5, 2017).
- Baulida, Josep, and Antonio García de Herreros. 2015. "Snail1-Driven Plasticity of Epithelial and Mesenchymal Cells Sustains Cancer Malignancy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1856(1): 55–61.
- Berthou, Sylvie et al. 2004. "The Met Kinase Inhibitor SU11274 Exhibits a Selective Inhibition Pattern toward Different Receptor Mutated Variants." *Oncogene* 23(31): 5387–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064724> (April 17, 2017).
- Birchmeier, Carmen, Walter Birchmeier, Ermanno Gherardi, and George F Vande Woude.

2003. "Met, Metastasis, Motility and More." *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(12): 915–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685170> (October 14, 2015).
- Bleau, Anne-Marie et al. 2009. "PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells." *Cell stem cell* 4(3): 226–35. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590909000101> (April 20, 2017).
- Boccaccio, Carla, and Paolo M Comoglio. 2006. "Invasive Growth: A MET-Driven Genetic Programme for Cancer and Stem Cells." *Nature reviews. Cancer* 6(8): 637–45. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1912> (February 6, 2017).
- Bowman, Robert L et al. 2017. "GlioVis Data Portal for Visualization and Analysis of Brain Tumor Expression Datasets." *Neuro-oncology* 19(1): 139–41. <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article-lookup/doi/10.1093/neuonc/now247> (February 15, 2017).
- Boya, Patricia, Fulvio Reggiori, and Patrice Codogno. 2013. "Emerging Regulation and Functions of Autophagy." *Nature cell biology* 15(7): 713–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817233> (July 14, 2016).
- Brami-Cherrier, Karen et al. 2014. "FAK Dimerization Controls Its Kinase-Dependent Functions at Focal Adhesions." *The EMBO journal* 33(4): 356–70. <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1002/emboj.201386399> (April 5, 2017).
- Brembeck, Felix H. et al. 2004. "Essential Role of BCL9-2 in the Switch between Beta-Catenin's Adhesive and Transcriptional Functions." *Genes & development* 18(18): 2225–30. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=517514&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (February 19, 2016).
- Bruna, Alejandra et al. 2007. "High TGFbeta-Smad Activity Confers Poor Prognosis in Glioma Patients and Promotes Cell Proliferation Depending on the Methylation of

Bibliografia

- the PDGF-B Gene.” *Cancer cell* 11(2): 147–60.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610806003813> (April 2, 2017).
- Cadigan, Ken M. 2008. “Wnt-Beta-Catenin Signaling.” *Current biology : CB* 18(20): R943-7.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982208010579> (March 1, 2016).
- Cadigan, Ken M. 2012. “TCFs and Wnt/ β -Catenin Signaling: More than One Way to Throw the Switch.” *Current topics in developmental biology* 98: 1–34.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305157> (March 17, 2016).
- Cadigan, Ken M, and Marian L Waterman. 2012. “TCF / LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus.” *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(11): a007906–a007906.
<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a007906>
(February 6, 2017).
- Cance, William G, Elena Kurenova, Timothy Marlowe, and Vita Golubovskaya. 2013. “Disrupting the Scaffold to Improve Focal Adhesion Kinase-Targeted Cancer Therapeutics.” *Science signaling* 6(268): pe10.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23532331> (April 14, 2017).
- Canel, Marta, Alan Serrels, Margaret C Frame, and Valerie G Brunton. 2013. “E-Cadherin-Integrin Crosstalk in Cancer Invasion and Metastasis.” *Journal of cell science* 126(Pt 2): 393–401. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.100115> (April 8, 2017).
- Chan, P C et al. 1999. “Suppression of Ultraviolet Irradiation-Induced Apoptosis by Overexpression of Focal Adhesion Kinase in Madin-Darby Canine Kidney Cells.” *The Journal of biological chemistry* 274(38): 26901–6.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480899> (April 5, 2017).
- Chen, Jian, Renée M McKay, and Luis F Parada. 2012. “Malignant Glioma: Lessons from Genomics, Mouse Models, and Stem Cells.” *Cell* 149(1): 36–47.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3719882&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (January 21, 2016).
- Chen, Shu-Yi, and Hong-Chen Chen. 2006. “Direct Interaction of Focal Adhesion Kinase

- (FAK) with Met Is Required for FAK to Promote Hepatocyte Growth Factor-Induced Cell Invasion." *Molecular and cellular biology* 26(13): 5155–67. <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.02186-05> (April 8, 2017).
- Chen, Xiao Lei et al. 2012. "VEGF-Induced Vascular Permeability Is Mediated by FAK." *Developmental cell* 22(1): 146–57. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3266538&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov&rendertype=abstract> (March 17, 2016).
- Chen, Yongqiang, and Daniel J Klionsky. 2011. "The Regulation of Autophagy - Unanswered Questions." *Journal of cell science* 124(Pt 2): 161–70. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3037094&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov&rendertype=abstract> (March 14, 2016).
- Chicas, Agustin et al. 2010. "Dissecting the Unique Role of the Retinoblastoma Tumor Suppressor during Cellular Senescence." *Cancer cell* 17(4): 376–87. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610810000723> (April 15, 2017).
- Chourasia, A. H. et al. 2015. "Mitophagy Defects Arising from BNip3 Loss Promote Mammary Tumor Progression to Metastasis." *EMBO reports* 16(9): 1145–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26232272> (April 21, 2017).
- Ciani, Lorenza, and Patricia C Salinas. 2005. "WNTs in the Vertebrate Nervous System: From Patterning to Neuronal Connectivity." *Nature reviews. Neuroscience* 6(5): 351–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15832199> (January 4, 2016).
- Clevers, Hans, and Roel Nusse. 2012. "Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease." *Cell* 149(6): 1192–1205. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412005867> (July 9, 2014).
- David, Monica D et al. 2008. "Signalling by Neurotrophins and Hepatocyte Growth Factor Regulates Axon Morphogenesis by Differential Beta-Catenin Phosphorylation." *Journal of cell science* 121(Pt 16): 2718–30. <http://jcs.biologists.org/content/121/16/2718.long> (November 12, 2013).

Bibliografia

- Demuth, Tim, and Michael E Berens. 2004. "Molecular Mechanisms of Glioma Cell Migration and Invasion." *Journal of neuro-oncology* 70(2): 217–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15674479> (April 20, 2017).
- Denton, Donna, Tianqi Xu, and Sharad Kumar. 2015. "Autophagy as a pro-Death Pathway." *Immunology and Cell Biology* 93(1): 35–42. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/icb.2014.85> (July 8, 2016).
- Dihlmann, Susanne, and Magnus von Knebel Doeberitz. 2005. "Wnt/beta-Catenin-Pathway as a Molecular Target for Future Anti-Cancer Therapeutics." *International journal of cancer* 113(4): 515–24. <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.20609> (April 3, 2017).
- Florea, Bogdan I, Clare Meaney, Hans E Junginger, and Gerrit Borchard. 2002. "Transfection Efficiency and Toxicity of Polyethylenimine in Differentiated Calu-3 and Nondifferentiated COS-1 Cell Cultures." *AAPS pharmSci* 4(3): E12. <http://link.springer.com/10.1208/ps040312> (April 19, 2017).
- Frame, Margaret C et al. 2010. "The FERM Domain: Organizing the Structure and Function of FAK." *Nature reviews. Molecular cell biology* 11(11): 802–14. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm2996> (April 11, 2017).
- Frisch, S M, K Vuori, E Ruoslahti, and P Y Chan-Hui. 1996. "Control of Adhesion-Dependent Cell Survival by Focal Adhesion Kinase." *The Journal of cell biology* 134(3): 793–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8707856> (April 11, 2017).
- Füllgrabe, Jens, Daniel J Klionsky, and Bertrand Joseph. 2014. "The Return of the Nucleus: Transcriptional and Epigenetic Control of Autophagy." *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(1): 65–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24326622> (July 14, 2016).
- Furnari, Frank B et al. 2007. "Malignant Astrocytic Glioma: Genetics, Biology, and Paths to Treatment." *Genes & development* 21(21): 2683–2710. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17974913> (February 15, 2015).
- Galavotti, S et al. 2013. "The Autophagy-Associated Factors DRAM1 and p62 Regulate Cell

- Migration and Invasion in Glioblastoma Stem Cells." *Oncogene* 32(6): 699–712. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22525272> (April 21, 2017).
- Galluzzi, Lorenzo et al. 2015. "Autophagy in Malignant Transformation and Cancer Progression." *The EMBO journal* 34(7): 856–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25712477> (July 8, 2016).
- Gao, Chan et al. 2010. "Autophagy Negatively Regulates Wnt Signalling by Promoting Dishevelled Degradation." *Nature Cell Biology* 12(8): 781–90. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncb2082> (November 2, 2016).
- García de Herreros, Antonio, and Josep Baulida. 2012. "Cooperation, Amplification, and Feed-Back in Epithelial-Mesenchymal Transition." *Biochimica et biophysica acta* 1825(2): 223–28. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X12000054> (February 6, 2017).
- Garnett, Jeannine et al. 2013. "Regulation of HGF Expression by Δ EGFR-Mediated c-Met Activation in Glioblastoma Cells." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 15(1): 73–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23359207> (February 19, 2016).
- Gentile, Alessandra, Livio Trusolino, and Paolo M Comoglio. 2008. "The Met Tyrosine Kinase Receptor in Development and Cancer." *Cancer metastasis reviews* 27(1): 85–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18175071> (July 8, 2016).
- Gherardi, Ermanno, Walter Birchmeier, Carmen Birchmeier, and George Vande Woude. 2012. "Targeting MET in Cancer: Rationale and Progress." *Nature reviews. Cancer* 12(2): 89–103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22270953> (December 3, 2015).
- Golden, Encouse B et al. 2014. "Chloroquine Enhances Temozolomide Cytotoxicity in Malignant Gliomas by Blocking Autophagy." *Neurosurgical focus* 37(6): E12. <http://thejns.org/doi/10.3171/2014.9.FOCUS14504> (April 3, 2017).
- Golubovskaya, Vita M et al. 2013. "Pharmacologic Blockade of FAK Autophosphorylation Decreases Human Glioblastoma Tumor Growth and Synergizes with Temozolomide."

Bibliografia

12(February): 162–72.

Golubovskaya, Vita M. et al. 2008. “p53 Regulates FAK Expression in Human Tumor Cells.” *Molecular Carcinogenesis* 47(5): 373–82.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17999388> (April 13, 2017).

Gong, Jingjing et al. 2014. “STAT3 down Regulates LC3 to Inhibit Autophagy and Pancreatic Cancer Cell Growth.” *Oncotarget* 5(9): 2529–41.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24796733> (April 21, 2017).

Grotegut, Stefan, Dietrich von Schweinitz, Gerhard Christofori, and François Lehenbre.

2006. “Hepatocyte Growth Factor Induces Cell Scattering through MAPK/Egr-1-Mediated Upregulation of Snail.” *The EMBO journal* 25(15): 3534–45.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1538570&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (November 6, 2013).

Guessous, Fadila et al. 2010. “An Orally Bioavailable c-Met Kinase Inhibitor Potently Inhibits Brain Tumor Malignancy and Growth.” *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*

10(1): 28–35.

<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=10&issue=1&spage=28> (February 6, 2017).

Gump, Jacob M., and Andrew Thorburn. 2011. “Autophagy and Apoptosis: What Is the Connection?” *Trends in Cell Biology* 21(7): 387–92.

Han, Sung-Pil et al. 2011. “SNAIL Is Involved in the Proliferation and Migration of Glioblastoma Cells.” *Cellular and molecular neurobiology* 31(3): 489–96.

<http://link.springer.com/10.1007/s10571-010-9643-4> (February 6, 2017).

Hanahan, D, and R A Weinberg. 2000. “The Hallmarks of Cancer.” *Cell* 100(1): 57–70.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> (July 10, 2014).

Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The Next Generation.” *Cell* 144(5): 646–74.

Handeli, S., and J. A. Simon. 2008. “A Small-Molecule Inhibitor of Tcf/ -Catenin Signaling

- down-Regulates PPAR and PPAR Activities.” *Molecular Cancer Therapeutics* 7(3): 521–29. <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-07-2063>.
- He, Congcong, and Daniel J Klionsky. 2009. “Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy.” *Annual review of genetics* 43: 67–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19653858> (July 8, 2016).
- Hegi, Monika E et al. 2005. “MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma.” *The New England journal of medicine* 352(10): 997–1003. <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043331> (April 20, 2017).
- Heinrich, Timo et al. 2013. “Fragment-Based Discovery of New Highly Substituted 1H-pyrrolo[2,3-B]- and 3H-imidazolo[4,5-B]-Pyridines as Focal Adhesion Kinase Inhibitors.” *Journal of medicinal chemistry* 56(3): 1160–70. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm3016014> (April 14, 2017).
- Heuberger, Julian, and Walter Birchmeier. 2010. “Interplay of Cadherin-Mediated Cell Adhesion and Canonical Wnt Signaling.” *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(2): a002915. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2828280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 4, 2016).
- Huang, Fang-I et al. 2012. “Hepatocyte Growth Factor Activates Wnt Pathway by Transcriptional Activation of LEF1 to Facilitate Tumor Invasion.” *Carcinogenesis* 33(6): 1142–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22436613> (February 6, 2016).
- Huang, Shengbing, Koichi Okamoto, Chunrong Yu, and Frank A Sinicrope. 2013. “p62/sequestosome-1 up-Regulation Promotes ABT-263-Induced Caspase-8 Aggregation/activation on the Autophagosome.” *The Journal of biological chemistry* 288(47): 33654–66. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M113.518134> (February 15, 2017).
- Huber, A H, and W I Weis. 2001. “The Structure of the Beta-catenin/E-Cadherin Complex

Bibliografia

- and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by Beta-Catenin." *Cell* 105(3): 391–402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348595> (March 17, 2016).
- Hurley, James H., and Brenda A. Schulman. 2014. "Atomistic Autophagy: The Structures of Cellular Self-Digestion." *Cell* 157(2): 300–311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.070>.
- Infante, Jeffrey R et al. 2012. "Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Phase I Dose-Escalation Trial of PF-00562271, an Inhibitor of Focal Adhesion Kinase, in Advanced Solid Tumors." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30(13): 1527–33. <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2011.38.9346> (April 12, 2017).
- Inoki, Ken et al. 2006. "TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth." *Cell* 126(5): 955–68. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406010166> (February 15, 2017).
- Jain, Mayur V. et al. 2013. "Interconnections between Apoptotic, Autophagic and Necrotic Pathways: Implications for Cancer Therapy Development." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17(1): 12–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301705> (April 21, 2017).
- Jamieson, Cara, Manisha Sharma, and Beric R Henderson. 2014. "Targeting the β -Catenin Nuclear Transport Pathway in Cancer." *Seminars in cancer biology* 27: 20–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24820952> (February 19, 2016).
- Jennewein, Lukas et al. 2016. "Diagnostic and Clinical Relevance of the Autophago-Lysosomal Network in Human Gliomas." *Oncotarget* 7(15): 20016–32. <http://www.oncotarget.com/abstract/7910> (April 3, 2017).
- Jiang, Peidu, and Noboru Mizushima. 2015. "LC3- and p62-Based Biochemical Methods for the Analysis of Autophagy Progression in Mammalian Cells." *Methods (San Diego, Calif.)* 75: 13–18. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202314003843> (April 3, 2017).

- Johansen, Terje, and Trond Lamark. 2011. "Selective Autophagy Mediated by Autophagic Adapter Proteins." (March): 279–96.
- Jones, G, J Machado, M Tolnay, and A Merlo. 2001. "PTEN-Independent Induction of Caspase-Mediated Cell Death and Reduced Invasion by the Focal Adhesion Targeting Domain (FAT) in Human Astrocytic Brain Tumors Which Highly Express Focal Adhesion Kinase (FAK)." *Cancer research* 61(15): 5688–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479198> (April 13, 2017).
- Kahlert, U D, G Nikkhah, and J Maciaczyk. 2013. "Epithelial-to-Mesenchymal (-like) Transition as a Relevant Molecular Event in Malignant Gliomas." *Cancer Letters* 331(2): 131–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.12.010>.
- Kaminsky, Vitaliy O. et al. 2012. "Suppression of Basal Autophagy Reduces Lung Cancer Cell Proliferation and Enhances Caspase-Dependent and -Independent Apoptosis by Stimulating ROS Formation." *Autophagy* 8(7): 1032–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22562073> (April 21, 2017).
- Kang, R, H J Zeh, M T Lotze, and D Tang. 2011. "The Beclin 1 Network Regulates Autophagy and Apoptosis." *Cell Death and Differentiation* 18(4): 571–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21311563> (April 21, 2017).
- Kang, Yu et al. 2013. "Role of Focal Adhesion Kinase in Regulating YB-1-Mediated Paclitaxel Resistance in Ovarian Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 105(19): 1485–95. <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djt210> (April 8, 2017).
- Kanzawa, T et al. 2004. "Role of Autophagy in Temozolomide-Induced Cytotoxicity for Malignant Glioma Cells." *Cell death and differentiation* 11(4): 448–57. <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cdd.4401359> (April 3, 2017).
- Kaur, Jasvinder, and Jayanta Debnath. 2015. "Autophagy at the Crossroads of Catabolism and Anabolism." *Nature reviews. Molecular cell biology* 16(8): 461–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26177004> (July 8, 2016).

Bibliografia

- Kaza, Niroop, Latika Kohli, and Kevin A. Roth. 2012. "Autophagy in Brain Tumors: A New Target for Therapeutic Intervention." *Brain Pathology* 22(1): 89–98. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3639.2011.00544.x> (July 14, 2016).
- Kim, Kang Ho et al. 2013. "Wnt/ β -Catenin Signaling Is a Key Downstream Mediator of MET Signaling in Glioblastoma Stem Cells." *Neuro-oncology* 15(2): 161–71. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3548587&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (February 19, 2016).
- Kim, Kook Hwan, and Myung-Shik Lee. 2014. "Autophagy--a Key Player in Cellular and Body Metabolism." *Nature reviews. Endocrinology* 10(6): 322–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24663220> (July 8, 2016).
- Kimura, Shunsuke, Takeshi Noda, and Tamotsu Yoshimori. 2007. "Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3." *Autophagy* 3(5): 452–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17534139> (October 6, 2016).
- Klaus, Alexandra, and Walter Birchmeier. 2008. "Wnt Signalling and Its Impact on Development and Cancer." *Nature reviews. Cancer* 8(5): 387–98. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc2389> (November 7, 2013).
- Kleihues, Paul et al. 2002. "The WHO Classification of Tumors of the Nervous System." *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61(3): 215-25-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895036> (February 21, 2016).
- Klionsky, Daniel J et al. 2016. "Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (3rd Edition)." <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356> (1): 1–222.
- Knævelsrud, Helene, Sven R Carlsson, and Anne Simonsen. 2013. "SNX18 Tubulates Recycling Endosomes for Autophagosome Biogenesis." *Autophagy* 9(10): 1639–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24113029> (April 21, 2017).
- Konstantinidou, Georgia et al. 2013. "RHOA-FAK Is a Required Signaling Axis for the Maintenance of KRAS-Driven Lung Adenocarcinomas." *Cancer discovery* 3(4): 444–

57. <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2159-8290.CD-12-0388> (April 12, 2017).
- Koochekpour, S et al. 1997. "Met and Hepatocyte Growth Factor/scatter Factor Expression in Human Gliomas." *Cancer research* 57(23): 5391–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393765> (February 19, 2016).
- Kroemer, Guido, Guillermo Mariño, and Beth Levine. 2010. "Autophagy and the Integrated Stress Response." *Molecular Cell* 40(2): 280–93.
- Kruppa, Antonina J., John Kendrick-Jones, and Folma Buss. 2016. "Myosins, Actin and Autophagy." *Traffic* 17(8): 878–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27146966> (April 21, 2017).
- Lamouille, Samy, Jian Xu, and Rik Derynck. 2014. "Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition." *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(3): 178–96. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3758> (July 8, 2016).
- Lan, Fengming et al. 2011. "Antitumor Effect of Aspirin in Glioblastoma Cells by Modulation of β -catenin/T-Cell Factor-Mediated Transcriptional Activity." *Journal of neurosurgery* 115(4): 780–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21721879> (July 8, 2016).
- Laplanche, Mathieu, and David M Sabatini. 2009. "mTOR Signaling at a Glance." *Journal of cell science* 122(Pt 20): 3589–94. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.051011> (February 15, 2017).
- Laplanche, Mathieu, and David M Sabatini. 2012. "mTOR Signaling in Growth Control and Disease." *CELL* 149(2): 274–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>.
- Regulation of mTORC1 and Its Impact on Gene Expression at a Glance." *Journal of cell science*. 2013. "Regulation of mTORC1 and Its Impact on Gene Expression at a Glance." *Journal of cell science* 126(Pt 8): 1713–19. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.125773> (February 15, 2017).
- Lawson, Christine, and David Schlaepfer. 2012. "Integrin Adhesions: Who's on First?"

Bibliografia

- What's on Second? Connections between FAK and Talin." *Cell Adhesion & Migration* 6(4): 302–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983197> (April 7, 2017).
- Lee, Brian Y., Paul Timpson, Lisa G. Horvath, and Roger J. Daly. 2015. "FAK Signaling in Human Cancer as a Target for Therapeutics." *Pharmacology and Therapeutics* 146: 132–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25316657> (April 11, 2017).
- Lee, Seung Woo et al. 2015. "The Synergistic Effect of Combination Temozolomide and Chloroquine Treatment Is Dependent on Autophagy Formation and p53 Status in Glioma Cells." *Cancer letters* 360(2): 195–204. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383515001032> (April 3, 2017).
- Lee, Yeri et al. 2016. "WNT Signaling in Glioblastoma and Therapeutic Opportunities." *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 96(2): 137–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26641068> (March 1, 2016).
- Li, Vivian S W et al. 2012. "Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex." *Cell* 149(6): 1245–56. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412005302> (August 18, 2015).
- Li, Xiao-Yan et al. 2011. "Snail1 Controls Epithelial-Mesenchymal Lineage Commitment in Focal Adhesion Kinase-Null Embryonic Cells." *The Journal of cell biology* 195(5): 729–38. <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201105103> (April 8, 2017).
- Li, Zhiping et al. 2006. "Cyclin D1 Regulates Cellular Migration through the Inhibition of Thrombospondin 1 and ROCK Signaling." *Molecular and cellular biology* 26(11): 4240–56. <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.02124-05> (February 6, 2017).
- Lim, Ssang-Taek, Xiao Lei Chen, et al. 2008. "Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced p53 Degradation." *Molecular cell* 29(1): 9–22. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276507008842> (April 8, 2017).
- Lim, Ssang-Taek, David Mikolon, Dwayne G Stupack, and David D Schlaepfer. 2008. "FERM Control of FAK Function: Implications for Cancer Therapy." *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 7(15): 2306–14. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.6367> (April

- 5, 2017).
- Linares, Juan F. et al. 2013. "K63 Polyubiquitination and Activation of mTOR by the p62-TRAF6 Complex in Nutrient-Activated Cells." *Molecular Cell* 51(3): 283–96.
- Liu, Rong, Xiaoyong Zhi, and Qing Zhong. 2015. "ATG14 Controls SNARE-Mediated Autophagosome Fusion with a Lysosome." *Autophagy* 11(5): 847–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25945523> (April 21, 2017).
- Liu, Wei et al. 2011. 18 *Journal of Clinical Neuroscience C-Met Expression Is Associated with Time to Recurrence in Patients with Glioblastoma Multiforme.*
- Lobo, M, and I Zachary. 2000. "Nuclear Localization and Apoptotic Regulation of an Amino-Terminal Domain Focal Adhesion Kinase Fragment in Endothelial Cells." *Biochemical and biophysical research communications* 276(3): 1068–74. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X00935472> (April 11, 2017).
- Louis, David N. 2006. "Molecular Pathology of Malignant Gliomas." *Annual review of pathology* 1(1): 97–117. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039109> (February 23, 2016).
- Louis, David N. 2007. "The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System." *Acta neuropathologica* 114(2): 97–109. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1929165&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (July 11, 2014).
- Luo, Ming et al. 2013. "Distinct FAK Activities Determine Progenitor and Mammary Stem Cell Characteristics." *Cancer research* 73(17): 5591–5602. <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-13-1351> (April 8, 2017).
- Ma, Benyu et al. 2015. "The Wnt Signaling Antagonist Dapper1 Accelerates Dishevelled2 Degradation via Promoting Its Ubiquitination and Aggregate-Induced Autophagy." *The Journal of biological chemistry* 290(19): 12346–54. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M115.654590> (April 3, 2017).

Bibliografia

- MacDonald, Bryan T, Keiko Tamai, and Xi He. 2009. "Wnt/beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases." *Developmental cell* 17(1): 9–26. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580709002573> (July 11, 2014).
- Macintosh, Robin L. et al. 2012. "Inhibition of Autophagy Impairs Tumor Cell Invasion in an Organotypic Model." *Cell Cycle* 11(10): 2022–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580450> (April 21, 2017).
- Madan, Rashna et al. 2006. "Focal Adhesion Proteins as Markers of Malignant Transformation and Prognostic Indicators in Breast Carcinoma." *Human pathology* 37(1): 9–15. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817705005319> (April 13, 2017).
- Mariño, Guillermo et al. 2014. "Self-Consumption: The Interplay of Autophagy and Apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(2): 81–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24401948> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3970201/pdf/nihms560579.pdf> (July 14, 2016).
- Maroun, Christiane R., and Tracey Rowlands. 2014. "The Met Receptor Tyrosine Kinase : A Key Player in Oncogenesis and Drug Resistance." *Pharmacology and Therapeutics* 142(3): 316–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.12.014> (July 8, 2016).
- Martens, Tobias et al. 2006. "A Novel One-Armed Anti-c-Met Antibody Inhibits Glioblastoma Growth in Vivo." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12(20 Pt 1): 6144–52. <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-05-1418> (February 6, 2017).
- Martina, Jose A, Yong Chen, Marjan Gucek, and Rosa Puertollano. 2012. "MTORC1 Functions as a Transcriptional Regulator of Autophagy by Preventing Nuclear Transport of TFEB." *Autophagy* 8(6): 903–14. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.19653> (February 15, 2017).
- Matteucci, Emanuela, Paola Bendinelli, and Maria Alfonsina Desiderio. 2009. "Nuclear

- Localization of Active HGF Receptor Met in Aggressive MDA-MB231 Breast Carcinoma Cells." *Carcinogenesis* 30(6): 937–45. <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgp080> (February 6, 2017).
- Mclean, Gordon W et al. 2005. "REVIEWS THE ROLE OF FOCAL ADHESION KINASE IN CANCER – A NEW THERAPEUTIC OPPORTUNITY." 5(July): 505–15.
- Miller, Nichol L G et al. 2012. "Rgnef (p190RhoGEF) Knockout Inhibits RhoA Activity, Focal Adhesion Establishment, and Cell Motility Downstream of Integrins." ed. Maddy Parsons. *PloS one* 7(5): e37830. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0037830> (April 8, 2017).
- Miravet, Susana et al. 2002. "The Transcriptional Factor Tcf-4 Contains Different Binding Sites for β -Catenin and Plakoglobin." *Journal of Biological Chemistry* 277(3): 1884–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11711551> (April 6, 2017).
- Mizushima, Noboru, and Masaaki Komatsu. 2011. "Autophagy: Renovation of Cells and Tissues." *Cell* 147(4): 728–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078875> (July 14, 2014).
- Mizushima, Noboru, Tamotsu Yoshimori, and Beth Levine. 2010. "Primer Methods in Mammalian Autophagy Research." : 313–26.
- Monga, Satdarshan P S et al. 2002. "Hepatocyte Growth Factor Induces Wnt-Independent Nuclear Translocation of Beta-Catenin after Met-Beta-Catenin Dissociation in Hepatocytes." *Cancer research* 62(7): 2064–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929826> (February 6, 2017).
- Moon, Randall T, Aimee D Kohn, Giancarlo V De Ferrari, and Ajamete Kaykas. 2004. "WNT and Beta-Catenin Signalling: Diseases and Therapies." *Nature reviews. Genetics* 5(9): 691–701. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372092> (October 28, 2016).
- Morokoff, Andrew, Wayne Ng, Andrew Gogos, and Andrew H Kaye. 2015. "Molecular Subtypes, Stem Cells and Heterogeneity: Implications for Personalised Therapy in

Bibliografia

- Glioma." *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 22(8): 1219–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25957782> (February 20, 2016).
- Moscat, Jorge, and Maria T Diaz-meco. 2013. "p62 : A Versatile Multitasker Takes on Cancer." 37(6): 230–36.
- Moscat, Jorge, and Maria T. Diaz-Meco. 2009. "p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer." *Cell* 137(6): 1001–4. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409006199> (April 3, 2017).
- Mukhopadhyay, Subhadip et al. 2014. "Autophagy and Apoptosis: Where Do They Meet?" *Apoptosis* 19(4): 555–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24415198> (April 21, 2017).
- Muñoz-Espín, Daniel, and Manuel Serrano. 2014. "Cellular Senescence: From Physiology to Pathology." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(7): 482–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954210> (April 15, 2017).
- Musgrove, E A, and R L Sutherland. 1993. "Acute Effects of Growth Factors on T-47D Breast Cancer Cell Cycle Progression." *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 29A(16): 2273–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8110499> (April 6, 2017).
- Nager, Mireia et al. 2012. "β-Catenin Signalling in Glioblastoma Multiforme and Glioma-Initiating Cells." *Chemotherapy Research and Practice* 2012: 192362. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3286890&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (February 19, 2016).
- Náger, Mireia et al. 2015. "Nuclear Phosphorylated Y142 β-Catenin Accumulates in Astrocytomas and Glioblastomas and Regulates Cell Invasion Nuclear Phosphorylated Y142 B-Catenin Accumulates in Astrocytomas and Glioblastomas and Regulates Cell Invasion." *Cell Cycle* . <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kccy20>.
- Napolitano, Gennaro, and Andrea Ballabio. 2016. "TFEB at a Glance." *Journal of cell*

- science* 129(13): 2475–81. <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.146365> (April 3, 2017).
- Narita, Masako, Andrew R J Young, and Masashi Narita. 2009. "Autophagy Facilitates Oncogene-Induced Senescence." *Autophagy* 5(7): 1046–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19652542> (April 15, 2017).
- Nascimbeni, Anna Chiara, Patrice Codogno, and Etienne Morel. 2017. "Phosphatidylinositol-3-Phosphate in the Regulation of Autophagy Membrane Dynamics." *The FEBS Journal*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27973739> (April 21, 2017).
- Navis, Anna C et al. 2013. "Effects of Dual Targeting of Tumor Cells and Stroma in Human Glioblastoma Xenografts with a Tyrosine Kinase Inhibitor against c-MET and VEGFR2." ed. Joseph Najbauer. *PloS one* 8(3): e58262. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0058262> (February 6, 2017).
- Nelson, Roxanne. 2003. "Small Interfering RNAs Target HIV." *The Lancet* 361(9376): 2214. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12856703> (April 2, 2017).
- Nelson, W James, and Roel Nusse. 2004. "Convergence of Wnt, Beta-Catenin, and Cadherin Pathways." *Science (New York, N.Y.)* 303(5663): 1483–87. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3372896&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (January 20, 2016).
- Niehrs, Christof, and Sergio P Acebron. 2012. "Mitotic and Mitogenic Wnt Signalling." *The EMBO journal* 31(12): 2705–13. <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2012.124> (February 6, 2017).
- Nusse, R, and H E Varmus. 1982. "Many Tumors Induced by the Mouse Mammary Tumor Virus Contain a Provirus Integrated in the Same Region of the Host Genome." *Cell* 31(1): 99–109. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6297757> (February 19, 2016).
- Ohgaki, Hiroko, Young-Ho Kim, and Joachim P Steinbach. 2010. "Nervous System Tumors Associated with Familial Tumor Syndromes." *Current opinion in neurology* 23(6):

Bibliografia

- 583–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042217> (March 17, 2016).
- Ojha, Rani, Mohammad Ishaq, and ShrawanKumar Singh. 2015. "Caspase-Mediated Crosstalk between Autophagy and Apoptosis: Mutual Adjustment or Matter of Dominance." *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 11(3): 514. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26458576> (April 21, 2017).
- Ostrom, Quinn T et al. 2015. "Epidemiology of Gliomas." *Cancer treatment and research* 163: 1–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25468222> (February 19, 2016).
- Panda, Prashanta Kumar et al. 2015. "Mechanism of Autophagic Regulation in Carcinogenesis and Cancer Therapeutics." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 39: 43–55.
- Pankiv, Serhiy et al. 2007. "p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy." *The Journal of biological chemistry* 282(33): 24131–45. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M702824200> (April 3, 2017).
- Paw, Ivy et al. 2015. "Mechanisms Regulating Glioma Invasion." *Cancer letters* 362(1): 1–7. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383515001950> (February 21, 2016).
- Peinado, Héctor, David Olmeda, and Amparo Cano. 2007. "Snail, Zeb and bHLH Factors in Tumour Progression: An Alliance against the Epithelial Phenotype?" *Nature reviews. Cancer* 7(6): 415–28. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2131> (October 31, 2013).
- Petherick, Katy J et al. 2013. "Autolysosomal β -Catenin Degradation Regulates Wnt-Autophagy-p62 Crosstalk." *The EMBO journal* 32(13): 1903–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23736261> (October 6, 2016).
- Piedra, Jose et al. 2003. "p120 Catenin-Associated Fer and Fyn Tyrosine Kinases Regulate Beta-Catenin Tyr-142 Phosphorylation and Beta-Catenin-Alpha-Catenin Interaction." *Molecular and cellular biology* 23(7): 2287–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12640114> (February 19, 2016).

- Pietrocola, Federico et al. 2013. "Regulation of Autophagy by Stress-Responsive Transcription Factors." *Seminars in Cancer Biology* 23(5): 310–22.
- Polakis, Paul. 2012. "Drugging Wnt Signalling in Cancer." *The EMBO journal* 31(12): 2737–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22617421> (July 8, 2016).
- Pontén, J, and E H Macintyre. 1968. "Long Term Culture of Normal and Neoplastic Human Glia." *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 74(4): 465–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4313504> (April 2, 2017).
- Puissant, Alexandre, Nina Fenouille, and Patrick Auberger. 2012. "When Autophagy Meets Cancer through p62/SQSTM1." *American journal of cancer research* 2(4): 397–413. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22860231> (April 3, 2017).
- Pulvirenti, Teodoro et al. 2011. "Dishevelled 2 Signaling Promotes Self-Renewal and Tumorigenicity in Human Gliomas." *Cancer research* 71(23): 7280–90. <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-1531> (February 15, 2017).
- Ren, X D et al. 2000. "Focal Adhesion Kinase Suppresses Rho Activity to Promote Focal Adhesion Turnover." *Journal of cell science*: 3673–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11017882> (April 23, 2017).
- Roczniak-Ferguson, Agnes et al. 2012. "The Transcription Factor TFEB Links mTORC1 Signaling to Transcriptional Control of Lysosome Homeostasis." *Science signaling* 5(228): ra42. <http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scisignal.2002790> (February 15, 2017).
- Rubinsztein, David C., Guillermo Mariño, and Guido Kroemer. 2011. "Autophagy and Aging." *Cell* 146(5): 682–95.
- Sakai, Katsuya, Shunsuke Aoki, and Kunio Matsumoto. 2015. "Hepatocyte Growth Factor and Met in Drug Discovery." *Journal of biochemistry* 157(5): 271–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25770121> (March 21, 2016).
- Samuel, Michael S et al. 2011. "Actomyosin-Mediated Cellular Tension Drives Increased

Bibliografia

- Tissue Stiffness and β -Catenin Activation to Induce Epidermal Hyperplasia and Tumor Growth." *Cancer cell* 19(6): 776–91. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610811001668> (April 11, 2017).
- Sandilands, Emma et al. 2011. "Autophagic Targeting of Src Promotes Cancer Cell Survival Following Reduced FAK Signalling." *Nature Publishing Group* 14(1): 51–60. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2386>.
- Sardiello, Marco et al. 2009. "A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function." *Science (New York, N.Y.)* 325(5939): 473–77. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1174447> (April 3, 2017).
- Sareddy, Gangadhara Reddy et al. 2009. "Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf Signaling Pathway in Human Astrocytomas." *Neurochemistry international* 55(5): 307–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19576519> (February 19, 2016).
- Saxton, Robert A., and David M. Sabatini. 2017. "mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease." *Cell* 168(6): 960–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28283069> (April 6, 2017).
- Schlaepfer, D D, C R Hauck, and D J Sieg. 1999. "Signaling through Focal Adhesion Kinase." *Progress in biophysics and molecular biology* 71(3–4): 435–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10354709> (April 7, 2017).
- Settembre, Carmine et al. 2011. "TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis." *Science (New York, N.Y.)* 332(6036): 1429–33. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1204592> (April 3, 2017).
- Settembre, Carmine et al. 2012. "A Lysosome-to-Nucleus Signalling Mechanism Senses and Regulates the Lysosome via mTOR and TFEB." *The EMBO journal* 31(5): 1095–1108. <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2012.32> (April 3, 2017).
- Settembre, Carmine, Alessandro Fraldi, Diego L. Medina, and Andrea Ballabio. 2013. "Signals from the Lysosome: A Control Centre for Cellular Clearance and Energy Metabolism." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14(5): 283–96. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3565> (July 14, 2016).

- Shibue, Tsukasa et al. 2012. "The Outgrowth of Micrometastases Is Enabled by the Formation of Filopodium-like Protrusions." *Cancer discovery* 2(8): 706–21. <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2159-8290.CD-11-0239> (April 8, 2017).
- Singh, Sheila K et al. 2004. "Identification of Human Brain Tumour Initiating Cells." *Nature* 432(7015): 396–401. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549107> (July 21, 2014).
- Slack-Davis, J. K. et al. 2007. "Cellular Characterization of a Novel Focal Adhesion Kinase Inhibitor." *Journal of Biological Chemistry* 282(20): 14845–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395594> (April 12, 2017).
- Stiles, Charles D, and David H Rowitch. 2008. "Glioma Stem Cells: A Midterm Exam." *Neuron* 58(6): 832–46. <http://www.cell.com/article/S0896627308004947/fulltext> (February 21, 2016).
- Stokes, Jayme B et al. 2011. "Inhibition of Focal Adhesion Kinase by PF-562,271 Inhibits the Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer Concomitant with Altering the Tumor Microenvironment." *Molecular cancer therapeutics* 10(11). <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-11-0261> (April 12, 2017).
- Stone, Rebecca L et al. 2014. "Focal Adhesion Kinase: An Alternative Focus for Anti-Angiogenesis Therapy in Ovarian Cancer." *Cancer biology & therapy* 15(7): 919–29. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.28882> (April 13, 2017).
- Sturm, Dominik et al. 2012. "Article Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma." : 425–37.
- Sturm, Dominik et al. 2016. "New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs." *Cell* 164(5): 1060–72. <http://www.cell.com/article/S0092867416000556/fulltext> (February 26, 2016).
- Sulzmaier, Florian J, Christine Jean, and David D Schlaepfer. 2014. "FAK in Cancer :

Bibliografia

- Mechanistic Findings and Clinical Applications." *Nature Publishing Group* 14(9): 598–610. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3792>.
- Tai, Yu-ling, Lih-chyang Chen, and Tang-long Shen. 2015. "Emerging Roles of Focal Adhesion Kinase in Cancer." 2015.
- Tancioni, Isabelle et al. 2014. "FAK Inhibition Disrupts a B 5 Integrin Signaling Axis Controlling Anchorage-Independent Ovarian Carcinoma Growth." 13(August): 2050–62.
- Tanjoni, Isabelle et al. 2010. "PND-1186 FAK Inhibitor Selectively Promotes Tumor Cell Apoptosis in Three-Dimensional Environments." *Cancer biology & therapy* 9(10): 764–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20234191> (April 12, 2017).
- Thiery, Jean Paul, Hervé Acloque, Ruby Y J Huang, and M Angela Nieto. 2009. "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease." *Cell* 139(5): 871–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945376> (July 10, 2014).
- Tomita, Naoki et al. 2013. "Structure-Based Discovery of Cellular-Active Allosteric Inhibitors of FAK." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 23(6): 1779–85. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X13000802> (April 12, 2017).
- Tracy, K. et al. 2007. "BNIP3 Is an RB/E2F Target Gene Required for Hypoxia-Induced Autophagy." *Molecular and Cellular Biology* 27(17): 6229–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17576813> (April 21, 2017).
- Trusolino, Livio, Andrea Bertotti, and Paolo M Comoglio. 2010. "MET Signalling: Principles and Functions in Development, Organ Regeneration and Cancer." *Nature reviews. Molecular cell biology* 11(12): 834–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21102609> (July 8, 2016).
- Tsujimoto, Y, and S Shimizu. 2005. "Another Way to Die: Autophagic Programmed Cell Death." *Cell Death and Differentiation* 12: 1528–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16247500> (April 21, 2017).
- Valencia, Tania et al. 2014. "Metabolic Reprogramming of Stromal Fibroblasts through

- p62-mTORC1 Signaling Promotes Inflammation and Tumorigenesis.” *Cancer Cell* 26(1): 121–35.
- Valenta, Tomas, George Hausmann, and Konrad Basler. 2012. “The Many Faces and Functions of β -Catenin.” *The EMBO Journal* 31(12): 2714–36. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3380220&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (October 17, 2015).
- van Veelen, Wendy et al. 2011. “ β -Catenin Tyrosine 654 Phosphorylation Increases Wnt Signalling and Intestinal Tumorigenesis.” *Gut* 60(9): 1204–12. <http://gut.bmj.com/content/60/9/1204.abstract> (March 17, 2016).
- Veikkola, T, M Karkkainen, L Claesson-Welsh, and K Alitalo. 2000. “Regulation of Angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors.” *Cancer research* 60(2): 203–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10667560> (April 8, 2017).
- Verhaak, Roel G W et al. 2010. “Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1.” *Cancer cell* 17(1): 98–110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20129251> (July 11, 2014).
- Vijayakumar, Sapna et al. 2011. “High-Frequency Canonical Wnt Activation in Multiple Sarcoma Subtypes Drives Proliferation through a TCF/ β -Catenin Target Gene, CDC25A.” *Cancer cell* 19(5): 601–12. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3116447&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (February 19, 2016).
- Walsh, Colin et al. 2010. “Oral Delivery of PND-1186 FAK Inhibitor Decreases Tumor Growth and Spontaneous Breast to Lung Metastasis in Pre-Clinical Models.” *Cancer biology & therapy* 9(10): 778–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20234193> (April 12, 2017).
- Wang, R. C. et al. 2012. “Akt-Mediated Regulation of Autophagy and Tumorigenesis Through Beclin 1 Phosphorylation.” *Science* 338(6109): 956–59.

Bibliografia

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23112296> (April 21, 2017).
- Wang, Yongyao et al. 2016. "SNARE-Mediated Membrane Fusion in Autophagy." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 60: 97–104. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27422330> (April 21, 2017).
- Ward, Kristy K et al. 2013. "Inhibition of Focal Adhesion Kinase (FAK) Activity Prevents Anchorage-Independent Ovarian Carcinoma Cell Growth and Tumor Progression." *Clinical & experimental metastasis* 30(5): 579–94. <http://link.springer.com/10.1007/s10585-012-9562-5> (April 8, 2017).
- Watanabe, N. et al. 2008. "Dual Tyrosine Kinase Inhibitor for Focal Adhesion Kinase and Insulin-like Growth Factor-I Receptor Exhibits Anticancer Effect in Esophageal Adenocarcinoma In Vitro and In Vivo." *Clinical Cancer Research* 14(14): 4631–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18628478> (April 15, 2017).
- Webb, Donna J et al. 2004. "FAK-Src Signalling through Paxillin, ERK and MLCK Regulates Adhesion Disassembly." *Nature cell biology* 6(2): 154–61. <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb1094> (April 23, 2017).
- Wei, H., C. Wang, C. M. Croce, and J.-L. Guan. 2014. "p62/SQSTM1 Synergizes with Autophagy for Tumor Growth in Vivo." *Genes & Development* 28(11): 1204–16. <http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.237354.113> (April 14, 2017).
- Wei, Yongjie et al. 2013. "EGFR-Mediated Beclin 1 Phosphorylation in Autophagy Suppression, Tumor Progression, and Tumor Chemoresistance." *Cell* 154(6): 1269–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24034250> (April 21, 2017).
- Weiner, T M, E T Liu, R J Craven, and W G Cance. 1993. "Expression of Focal Adhesion Kinase Gene and Invasive Cancer." *Lancet (London, England)* 342(8878): 1024–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8105266> (April 13, 2017).
- Weller, Michael et al. 2015. "Glioma." *Nature Reviews Disease Primers* 1: 15017. <http://www.nature.com/articles/nrdp201517> (March 17, 2016).
- Westhoff, M. A. et al. 2004. "Src-Mediated Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase

- Couples Actin and Adhesion Dynamics to Survival Signaling.” *Molecular and Cellular Biology* 24(18): 8113–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15340073> (April 7, 2017).
- White, Eileen. 2012. “Deconvoluting the Context-Dependent Role for Autophagy in Cancer.” *Nature Reviews Cancer* 12(6): 401–10. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc3262> (July 14, 2016).
- Wu, Wenxian et al. 2016. “FUNDC1 Is a Novel Mitochondrial-Associated-Membrane (MAM) Protein Required for Hypoxia-Induced Mitochondrial Fission and Mitophagy.” *Autophagy* 12(9): 1675–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27314574> (April 21, 2017).
- Xie, Qian et al. 2012. “Hepatocyte Growth Factor (HGF) Autocrine Activation Predicts Sensitivity to MET Inhibition in Glioblastoma.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(2): 570–75. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3258605&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (January 25, 2016).
- Yamashita, Yoji et al. 2010. “CDC25A mRNA Levels Significantly Correlate with Ki-67 Expression in Human Glioma Samples.” *Journal of neuro-oncology* 100(1): 43–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20217459> (February 19, 2016).
- Yang, Hong Wei et al. 2010. “SNAI2/Slug Promotes Growth and Invasion in Human Gliomas.” *BMC cancer* 10(1): 301. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-301> (February 6, 2017).
- Yang, Zhifen, and Daniel J Klionsky. 2010. “Eaten Alive: A History of Macroautophagy.” *Nature cell biology* 12(9): 814–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811353> (July 8, 2016).
- Yang, Zhineng J et al. 2011. “The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications.” *Molecular cancer therapeutics* 10(9): 1533–41.

Bibliografia

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878654> (July 14, 2016).
- Yoon, Hyunho, Joshua P Dehart, James M Murphy, and Ssang-taek Steve Lim. 2015. "Understanding the Roles of FAK in Cancer : Inhibitors , Genetic Models , and New Insights." 63(2): 114–28.
- Young, Andrew R J et al. 2009. "Autophagy Mediates the Mitotic Senescence Transition." *Genes & development* 23(7): 798–803. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279323> (April 15, 2017).
- Young, Megan M. et al. 2012. "Autophagosomal Membrane Serves as Platform for Intracellular Death-Inducing Signaling Complex (iDISC)-Mediated Caspase-8 Activation and Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 287(15): 12455–68. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.309104> (July 14, 2016).
- Zhang, Kailiang et al. 2012. "Wnt/beta-Catenin Signaling in Glioma." *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 7(4): 740–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22454041> (March 17, 2016).
- Zhang, Nu et al. 2011. "FoxM1 Promotes β -Catenin Nuclear Localization and Controls Wnt Target-Gene Expression and Glioma Tumorigenesis." *Cancer cell* 20(4): 427–42. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3199318&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (February 19, 2016).
- Zhang, Yi, and Jin-ming Yang. 2011. "The Impact of Cellular Senescence in Cancer Therapy: Is It True or Not?" *Acta Pharmacologica Sinica* 32(10): 1199–1207. <http://www.nature.com/doi/10.1038/aps.2011.108> (April 15, 2017).
- Zhao, J H, H Reiske, and J L Guan. 1998. "Regulation of the Cell Cycle by Focal Adhesion Kinase." *The Journal of cell biology* 143(7): 1997–2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9864370> (April 11, 2017).
- Zhao, Jihe, and Jun-Lin Guan. 2009. "Signal Transduction by Focal Adhesion Kinase in Cancer." *Cancer metastasis reviews* 28(1–2): 35–49. <http://link.springer.com/10.1007/s10555-008-9165-4> (April 8, 2017).

- Zheng, Hongwu et al. 2010. "PLAGL2 Regulates Wnt Signaling to Impede Differentiation in Neural Stem Cells and Gliomas." *Cancer cell* 17(5): 497–509. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610810001479> (February 19, 2016).
- Zhu, Yuan, and Luis F Parada. 2002. "The Molecular and Genetic Basis of Neurological Tumours." *Nature reviews. Cancer* 2(8): 616–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154354> (February 21, 2016).
- Zois, Christos E. et al. 2011. "'Autophagic Flux'; in Normal Mouse Tissues: Focus on Endogenous LC3A Processing." *Autophagy* 7(11): 1371–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21997374> (April 21, 2017).

Annex

Publicacions

1. *Inhibition of Wnt/ β -catenin signalling upregulates p62 and sensitizes glioblastoma cells to autophagy blockers.*

Nàger M, Sallán MC, Visa A, Santacana M, Macià A, Cantí C & Herreros J. (under review)

2. *Nuclear phosphorylated Y142 β -catenin accumulates in astrocytomas and glioblastomas and regulates cell invasion.*

Nàger M, Santacana M, Bhardwaj D, Valls J, Ferrer I, Nogués P, Cantí C, Herreros J. *Cell Cycle*. 2015;14(22):3644-55.

3. *Voltage-gated calcium channel blockers deregulate macroautophagy in cardiomyocytes.*

Pushparaj C, Das A, Purroy R, **Nàger M**, Herreros J, Pamplona R, Cantí C. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015 Nov;68:166-75.

4. *Histone deacetylase inhibitors promote glioma cell death by G2 checkpoint abrogation leading to mitotic catastrophe.*

Cornago M, Garcia-Alberich C, Blasco-Angulo N, Vall-Llaura N, **Nàger M**, Herreros J, Comella JX, Sanchis D, Llovera M. *Cell Death Dis*. 2014 Oct 2;5:e1435.

5. *T-type calcium channel blockers inhibit autophagy and promote apoptosis of malignant melanoma cells.*

Das A, Pushparaj C, Herreros J, **Nàger M**, Vilella R, Portero M, Pamplona R, Matias-Guiu X, Martí RM, Cantí C. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013 Nov;26(6):874-85.

6. *Chemokines induce axon outgrowth downstream of Hepatocyte Growth Factor and TCF/ β -catenin signaling.*

Bhardwaj D, **Náger M**, Camats J, David M, Benguria A, Dopazo A, Cantí C, Herreros J.
Front Cell Neurosci. 2013 Apr 30;7:52.

7. *β -Catenin Signalling in Glioblastoma Multiforme and Glioma-Initiating Cells.*

Náger M, Bhardwaj D, Cantí C, Medina L, Nogués P, Herreros J.
Chemother Res Pract. 2012;2012:192362.

Review Article

β -Catenin Signalling in Glioblastoma Multiforme and Glioma-Initiating Cells

Mireia Nager,¹ Deepshikha Bhardwaj,¹ Carles Cantí,¹ Loreta Medina,¹
Pere Nogués,² and Judit Herreros¹

¹Departments of Basic Medical Sciences and Experimental Medicine, IRBLleida University of Lleida, 25198 Lleida, Spain

²Neurosurgery Unit, University Hospital Arnau de Vilanova, 25198 Lleida, Spain

Correspondence should be addressed to Judit Herreros, j.herreros@cmb.udl.cat

Received 19 April 2011; Revised 23 November 2011; Accepted 24 November 2011

Academic Editor: Paolo Pronzato

Copyright © 2012 Mireia Nager et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Glioblastoma multiforme (GBM) is a commonly occurring brain tumor with a poor prognosis. GBM can develop both “de novo” or evolve from a previous astrocytoma and is characterized by high proliferation and infiltration into the surrounding tissue. Following treatment (surgery, radiotherapy, and chemotherapy), tumors often reappear. Glioma-initiating cells (GICs) have been identified in GBM and are thought to be responsible for tumors initiation, their continued growth, and recurrence. β -catenin, a component of the cell-cell adhesion complex and of the canonical Wnt pathway, regulates proliferation, adhesion, and migration in different cell types. β -catenin and components of the Wnt canonical pathway are commonly overexpressed in GBM. Here, we review previous work on the role of Wnt/ β -catenin signalling in glioma initiation, proliferation, and invasion. Understanding the molecular mechanisms regulating GIC biology and glioma progression may help in identifying novel therapeutic targets for GBM treatment.

1. Introduction

Gliomas are the most common primary malignancies in the central nervous system, comprising a heterogeneous group of tumors that display some histological similarities to glia (mainly, astrocytes in astrocytomas and oligodendrocytes in oligodendrogliomas). Astrocytomas account for the majority of gliomas, which can be classified into four different grades according to the World Health Organization (WHO) classification system [1, 2]: grade I and grade II astrocytomas are slow-growing less aggressive tumors, whereas grade III and IV gliomas are malignant tumors characterized by high proliferation rate (grade III) and the presence of necrotic tissue and/or angiogenic activity (grade IV). The most malignant form, glioblastoma multiforme (GBM, grade IV), is one of the most aggressive and lethal forms of cancer with an average survival time of 15 months after diagnosis [3, 4]. Standard treatment consists of surgical removal of the tumor, followed by chemotherapy and radiotherapy. Temozolomide, an oral alkylating agent, is the most commonly used chemotherapy treatment [5]. Importantly, a high infiltration capacity of individual cells over long distances,

already present in grade II gliomas, hinders complete tumor resection and most likely contributes to recurrence [6].

GBMs can present as primary or secondary. Primary or “de novo” GBMs, representing the majority of GBM cases, arise without any prior evidence of a lower-grade precursor lesion and more commonly affect older patients (mean age of 62 years). Secondary GBMs progress from a lower-grade glioma and typically develop in younger patients (median age of 45 years). Gliomas exhibit a vast array of genetic changes that contribute to the malignant phenotype [6–10]. These include loss of function mutations in the p53 tumor suppressor and hyperactivation of receptor tyrosine kinase (RTK) signalling, such as epidermal growth factor receptor (EGFR), platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), and the receptor for hepatocyte growth factor c-Met. The signalling cascades downstream of activated RTK often result in activation of Ras and AKT. Mutations in tumor suppressors such as phosphatase and tensin homolog (PTEN) and neurofibromatosis 1 (NF1) that normally control these pathways further contribute to oncogenesis [2, 3, 6–10]. Based on its gene expression profile, GBM can be further classified into proneural, neural, mesenchymal,

and classical types [8, 9]. This classification should allow a molecular stratification of GBM cases with important therapeutic implications.

Here we focus our attention on Wnt/ β -catenin signalling, a pathway primarily involved in embryogenesis and displaying important functions in adulthood when aberrant Wnt signalling has been linked to disease and cancer [11–14]. Understanding how β -catenin signalling regulates gliomagenesis and tumor progression may lead to novel therapeutic interventions in GBM. Firstly, therefore, we discuss the role of glioma-initiating cells (GICs), a type of “cancer stem cells,” in glioma development and evidence suggesting that Wnt/ β -catenin signalling regulates GICs biology. We then review progress in the understanding of the involvement of Wnt/ β -catenin signalling in the proliferation and invasion of glioma tumor cells.

2. Glioma-Initiating Cells (GICs) and Signalling Pathways in GICs

The existence of brain tumor stem cells was proposed about a decade ago, following advances in the stem cell field and the discovery that neurogenesis persists in the adult brain [15–18]. Glioma-initiating cells (GICs) share the features of neural stem cells that have been identified in GBM, including the expression of CD133 (prominin), the ability to form neurospheres, and the reproduction of tumors [19, 20]. However, the role of CD133+ and CD133– GIC subpopulations in tumor initiation is not clear. CD133– cells from the C6 glioma cell line showed clonogenic, self-renewal, and tumorigenic capacities [21]. Nonetheless, CD133– GICs isolated from primary GBM were as capable of producing tumors as CD133+ cells [22]. Individual GBM may contain CD133+ and CD133– GICs that represent different stages of differentiation [23]. Furthermore, multipotent CD133+ GICs contain a CD144+ (vascular endothelial cadherin positive) subpopulation that can give rise to tumor endothelial cells [24].

Signalling by several morphogens and cytokines (including leukemia inhibitory factor (LIF), fibroblast growth factor (FGF) and members of the Wnt, transforming growth factor- β (TGF- β)/bone morphogenetic proteins (BMP) families) maintains the self-renewal capacity of embryonic stem cells and supports cancer stem cell growth [25]. Thus, TGF- β signalling through the induction of LIF and the JAK-STAT pathway promotes the self-renewal of patient-derived GICs [26]. Seoane and coworkers recently identified a population of CD44 high/Id1 high GICs in GBM that locates in the perivascular niche. Depletion of this cell population by TGF- β inhibitors prevents tumor initiation and recurrence. This work identifies CD44 and Id1 levels as prognosis markers in GBM and shows that TGF- β signalling is key to maintain this GIC population [27]. Aberrant activation of sonic hedgehog signaling (another morphogen involved in embryogenesis and brain development) in committed cerebellar granule neuron precursors is responsible for aggressive medulloblastoma, a pediatric cerebellar tumor [28–30]. Hedgehogs signal through Gli transcription factors,

with Gli1 and Gli2 acting as activators and Gli3 as a repressor factor. Consistent with the isolation of Gli1 from glioma cells, activation of the Hedgehog-Gli1 pathway is reported in GBM, which is required for the clonogenicity and formation of secondary neurospheres of CD133+ GICs [31].

Wnt factors are a family of secreted glycoproteins (19 members exist in humans) that regulate embryonic patterning and play different roles throughout development of the nervous system [32, 33]. Wnts signal through at least three different pathways [11, 33], the best known being the Wnt/ β -catenin canonical pathway (Figure 1). In the absence of Wnt, the Ser/Thr kinase glycogen-synthase kinase (Gsk-3 β), adenomatosis polyposis coli (APC), Axin and β -catenin) phosphorylates β -catenin, which is then targeted for proteasomal degradation. Upon Wnt binding to Frizzled (Fz) (of which there are 11 family members in humans) and low-density-lipoprotein-related protein (LRP)5/6 receptors, the scaffolding protein Dishevelled (Dvl) and LRP5/6 become phosphorylated by Gsk-3 and Casein-Kinase 1 γ . Consequently, the destruction complex components are recruited instead to the receptor complex, leading to β -catenin stabilization [34]. The protooncogene Frat/GBP further prevents the phosphorylation and degradation of β -catenin because it competes with Axin to bind Gsk-3 and removes it from the destruction complex. Stabilized β -catenin translocates to the nucleus, where it binds to lymphoid enhancer factor-1 Lef-1/T-cell factor (Tcf) transcription factors and regulates expression of Wnt target genes. In the absence of nuclear β -catenin, Tcf/Lef factors suppress the expression of target genes through their binding to members of the Groucho/transducin-like enhancer of split (TLE) family of transcriptional corepressors. β -catenin does not have a DNA binding domain but it has a potent transcription activation domain. Conversely, Lef/Tcf transcription factors do not have a strong transcription activation domain, but they do have a good DNA binding/bending domain [35]. Thus, when β -catenin binds to a Lef/Tcf protein, a potent transcription regulatory complex is formed. Nuclear translocation of β -catenin converts Tcf proteins into potent transcriptional activators by displacing Groucho/TLE and recruiting an array of coactivator proteins, including CBP, TBP, BRG1, BCL9/PYGO, Legless, Mediator, and Hyrax [36] (Figure 1).

Canonical Wnt/ β -catenin signalling is crucially involved in embryonic development and controls stem cell biology, thus inducing self-renewal properties in embryonic stem (ES) cells and regulating adult stem cells [11, 14, 33, 41–45]. Nanog and Oct-4, two of the four transcription factors required to generate the pluripotency and self-renewal of ES cells, are Tcf3 targets [46, 47]. Interestingly, the ES signature characterized by the expression of Nanog, Oct-4, Sox-2, and c-Myc also associates with aggressive tumors, including poorly differentiated GBM [37]. As aberrant activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway is a hallmark of many tumors [12, 14], these findings suggest that Wnt-regulated genes may contribute to the stem cell-like phenotypes displayed by brain tumors. Furthermore, the novel protooncogene *PLAG2* is amplified in GBM and promotes GICs proliferation and gliomagenesis. *PLAG2* increases

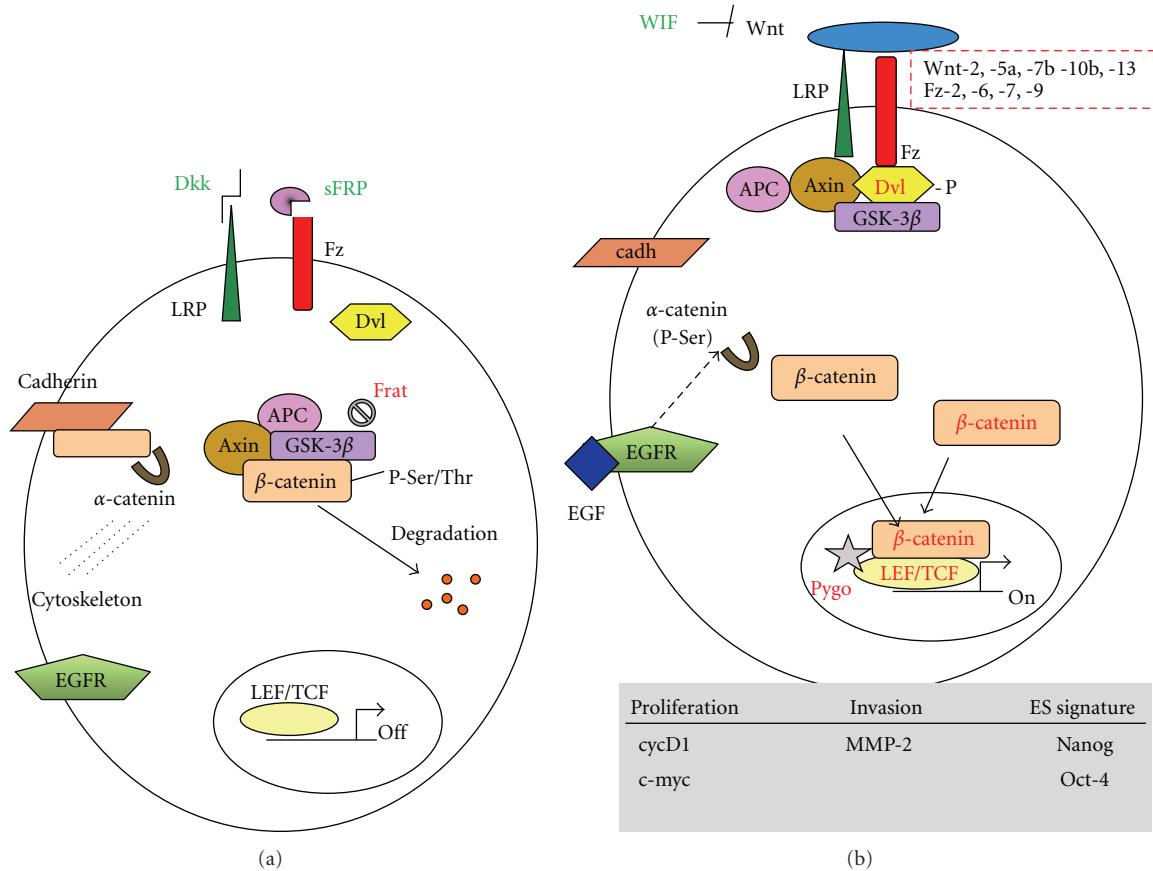


FIGURE 1: Wnt/ β -catenin signalling and β -catenin role in adhesion in glioma cells. (a) In the absence of Wnt ligands or in the presence of Wnt antagonists Dkk and sFRP that bind to the respective Wnt receptors Fz and LRP5/6, β -catenin is in a complex together with Axin, APC, and Gsk-3 β . Here, β -catenin is phosphorylated by Gsk-3 β in key Ser and Thr residues and is thus targeted for proteasomal degradation. Frat prevents the phosphorylation of β -catenin. Transcription by Lef/Tcf is off due to the binding of repressors. In the absence of growth factor signaling, a pool of β -catenin is engaged in the cadherin/ β -catenin/ α -catenin complex that is linked to the cytoskeleton. (b) Following Wnt binding, the Fz-LRP5/6 complex is formed upon Dvl phosphorylation that recruits Gsk-3 β , Axin, and APC to the membrane. This results in free β -catenin that accumulates in the cytosol and translocates to the nucleus, where it binds to Tcf and recruits transcriptional activators (including Pygo). Lef/Tcf transcriptional activation results in the regulation of Wnt target genes. The box shows Wnt target genes implicated in proliferation and invasion of glioma cells or conferring ES cell signature to GICs that might be related to aggressive growth and recurrence [37–39]. EGF signalling through EGFR, ERK1/2, and CK2 results in the phosphorylation of α -catenin and promotes β -catenin transactivation [40]. Whether the Wnt-induced and growth factor-induced β -catenin nuclear pools collaborate in glioma cells remains to be studied. Text in red indicates Wnt pathway components that are overexpressed and green indicates Wnt antagonists repressed in high-grade astrocytomas and GBM. Wnt factors and Fz that have been reported to be upregulated in high-grade astrocytomas and GBM are shown (see references in the text).

the expression of Wnt-6, Fz-9, and Fz-2, inhibits differentiation, and increases proliferation of neural progenitors [48]. It is worth noting that *PLAG2* amplification correlates with increased β -catenin levels in GBM samples. These results indicate that *PLAG2* imparts stem-cell properties to glioma cells by regulating Wnt signalling. Another gene regulating Wnt signalling in glioma is *PEG3* (paternally expressed gene 3), an imprinted gene with a tumor suppressor activity. Hypermethylation of *PEG3* promoter in glioma decreases *PEG3* mRNA expression and correlates with high-grade gliomas [49]. In turn, low *PEG3* expression increases β -catenin that promotes the proliferation of CD133+ GICs [49]. Finally, the interaction between the transcription factor Forkhead box M1 and β -catenin that promotes β -catenin nuclear localization in tumor cells and maintains

GIC self-renewal has been recently described [50]. Novel therapeutic interventions for GBM could inhibit Wnt/ β -catenin signalling in GICs to decrease GIC proliferation and stop glioma growth, while increasing GICs differentiation.

3. Targeting GIC Chemoresistance and Radioresistance Mechanisms as an Approach to Treat GBM Recurrence

Following surgery, chemotherapy, and radiotherapy GBM recurrence is common. Therefore, a particularly relevant feature of the cancer stem cells is their ability to export drugs and develop resistance mechanisms to cytotoxics and irradiation [17]. Current knowledge suggests that resistance

to temozolomide is promoted by enhanced O-6-methylguanine-DNA-methyltransferase- (MGMT-) mediated DNA repair of mismatches [51]. Thus, *MGMT* promoter methylation status improves the benefits of chemotherapy. According to Liu et al., CD133 expression in tumor tissue is higher in recurrent GBM than in newly diagnosed tumors and CD133+ GICs are chemoresistant to temozolomide [52]. However, these findings are inconsistent with a report indicating that CD133+ GICs are depleted after temozolomide treatment [53]. Consequently, at present it is not clear which glioma cells are responsible for the resistance to temozolomide.

Another mechanism of drug resistance is the expression of the ATP-binding cassette (ABC) transporters by cancer stem cells. BCRP1 and MDR1 ABC transporters allow the exclusion of Hoechst 33342 dye, a feature that defines the pluripotential side population (SP) originally reported in haematopoietic stem cells and now used to identify cancer stem cells. Expression of these ABC transporters accounts for the chemoresistance of some cancers and high drug efflux capacity. CD133+ GICs express higher levels of BCRP1 compared to CD133- cells [52]. Consistent with this, a cancer stem-cells cell line (WJ₂) derived from GBM showed increased expression of BCRP1, CD133 and the neural precursor marker Nestin and at the same time maintained Wnt-1 expression [54]. Interestingly, overexpression of MDR1 downstream of Wnt-1/Fz-1 signalling mediates chemoresistance in neuroblastoma cells [55]. This suggests that a similar mechanism could be operating in the chemoresistance mechanisms of gliomas.

As regards radioresistance, the CD133+ stem cell fraction is enriched after glioma radiation [56]. Furthermore, the CD133+ subpopulation is able to repair radiation-induced DNA damage more efficiently than CD133- tumor cells [57]. These results indicate that the CD133+ tumor cell population confers radioresistance to GBM and most likely accounts for glioma recurrence. Wnt-1 ectopic expression triggers DNA damage response in epithelial mammary cells [58], while activation of Wnt/ β -catenin signalling confers radioresistance to mammary progenitor cells through survivin upregulation [59]. In addition, Gsk-3 β inhibition enhances DNA repair of double-strand breaks following radiation of hippocampal neurons [60]. Taken together, these findings suggest that Wnt signalling may be involved in the chemo- and radioresistance mechanisms developed by GICs. Expanding our understanding of the molecular mechanisms supporting GICs resistance to conventional glioma treatment will allow the design of novel therapeutic tools to decrease tumor recurrence and improve patient survival.

4. Wnt/ β -Catenin Signalling in the Proliferation of Glioma Cells

GICs represent a small percentage of the brain tumor mass, which is thought to contain a heterogeneous mixture of tumor cells with limited proliferation capacity. Molecular analysis on whole tumor samples is expected to mainly represent non-GIC cells. Wnt/ β -catenin signalling plays a

role in the proliferation of glioma tumor cells and tumor progression. β -catenin has been proposed as a prognostic marker in GBM, as both mRNA and protein levels increase in high-grade astrocytomas and GBM, thus correlating with malignancy [38, 61, 62]. In addition, the expression of other positive regulators of the Wnt pathway (including Dvl-3, FRAT-1, Pygo-2, Tcf4, and Lef-1) [38, 63, 64] and of Wnt target genes (namely the regulators of cell proliferation *Cyclin D1* and *c-myc*) [38, 62] also increases in high-grade astrocytomas and GBM (see Figure 1). Using immunohistological techniques, a nuclear fraction of β -catenin was observed that associates with high-grade astrocytoma and GBM [62]. This result suggests increased cytoplasmic stabilization of β -catenin that escapes proteasomal degradation, in addition to the elevated β -catenin mRNA levels reported in GBM. Silencing β -catenin, Wnt-2, and Pygo-2 expression demonstrated the involvement of Wnt/ β -catenin signalling in the proliferation of U251 glioma cell line [63, 65]. Together, these findings point to the activation of nuclear β -catenin signalling as a mediator of Wnt-induced proliferation of glioma cells. Moreover, expression of noncanonical Wnt-5a is also upregulated in high grade gliomas, in which Wnt-5a stimulates cell proliferation [66]. Wnt-5a signalling can inhibit canonical Wnt signalling during development [67, 68]. How Wnt canonical and noncanonical pathways interact in glioma cells remains to be studied.

In contrast to other cancers, no mutations have been found in β -catenin exon 3, a hot spot affecting the GSK-3 phosphorylation sites and β -catenin degradation that renders β -catenin active in glioma samples and cell lines [69, 70]. Truncation of APC, a mechanism causing polyposis and predisposing for Wnt/ β -catenin-driven colorectal carcinoma, has not been associated with gliomagenesis (with the exception of Turcot syndrome patients) [71]. These observations suggest the deregulation of the pathway by unbalanced ligand/antagonist expression during tumor initiation and progression. Indeed, in addition to regulation of the expression of Wnt family members, Wnt antagonists often appear repressed in GBM (Figure 1). Expression of the Wnt antagonist and tumor suppressor Wnt inhibitory factor (WIF) decreases with malignancy in astrocytomas, which has been linked to aberrant promoter hypermethylation [72]. Also, hypermethylation of the *secreted-Frizzled-related protein (sFRP)* promoters is a significant event in primary “de novo” GBM, whereas hypermethylation of the promoter of the LRP antagonist *Dickkopf (Dkk)* associates with secondary GBM [70]. Similar epigenetic modifications are common to other Wnt-driven cancers [73, 74]. In addition, a novel mechanism for β -catenin nuclear localization and transcriptional activation (both constitutive and Wnt-induced) that controls Wnt target gene expression and glioma tumorigenesis has been described, which involves the interaction of β -catenin with FoxM1 [50].

5. β -Catenin and Wnt Signalling in Glioma Invasion

As a component of the cell adhesion complex, β -catenin binds to cadherin, thus regulating cell-cell adhesion. Altering

the binding of β -catenin to cadherin or to α -catenin down-regulates cell adhesion, while promoting cell migration and epithelial-mesenchymal transition [75]. However, β -catenin nuclear signalling is not only achieved by Wnt factors in tumor development [76]. Growth factor signalling can induce the phosphorylation of specific tyrosine residues of β -catenin, resulting in increased migration [75, 77–79]. EGFR expression is upregulated in primary GBM correlating with malignancy [15]. EGF/EGFR signalling through extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) and casein kinase-2 (CK2) in glioma cells results in the phosphorylation of α -catenin at serine 641, which correlates with glioma malignancy [40]. Interestingly, α -catenin phosphorylation promotes β -catenin transactivation and glioma cell invasion [40]. These results highlight the involvement of β -catenin signalling not only as a mediator of Wnt but also downstream of growth factor signalling in glioma invasion. On the other hand, enhanced expression of the Fz antagonist sFRP2 reduced glioma invasion by decreasing β -catenin tyrosine phosphorylation and downregulating matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) [39]. However, sFRP2 did not affect β -catenin levels, its cytoplasmic/nuclear distribution, or its serine phosphorylation status [39]. How sFRP2 signalling modulates β -catenin tyrosine phosphorylation requires further investigation.

Noncanonical Wnt-5a, which signals through β -catenin independent pathways (including the planar cell polarity and the calcium pathways [33]), enhances the migration of glioma cells by regulating the expression of MMP-2 [80]. Moreover, silencing the expression of Wnt-2, Wnt-5a, and Fz-2 in the U251 glioma cell line decreases invasion [65, 80]. These findings are consistent with Wnt-5a function in invasion and metastasis in other cancers [11, 81, 82]. Together, these results point to metalloproteinase regulation as important downstream targets of β -catenin and Wnt signalling pathways in glioma invasion [39, 80, 83].

We are accumulating knowledge on the signalling pathways responsible for the maintenance of GICs, sustaining the proliferation of bulk tumor cells and dictating the invasive properties of glioma cells. Current and future research should offer novel opportunities for anticancer drug discovery. Undoubtedly, the cancer stem cell hypothesis has provided a promising framework for investigations into an incurable disease. Future combined therapies including cytotoxics, tumor-targeted drugs, and agents that target GICs should be expected to reduce glioma growth and recurrence, raising hopes for glioma patients.

Acknowledgments

Work in the authors laboratory is supported by funding from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) to L. Medina, J. Herberos and Grups de Recerca Consolidats (Agaur-Generalitat de Catalunya) to L. Medina. M. Nager is funded by ISCIII. D. Bhardawaj is a predoctoral fellow of the Generalitat de Catalunya. The authors thank John Eastham and Theresa Higgins for proofreading the paper.

References

- [1] P. Kleihues, D. N. Louis, B. W. Scheithauer et al., “The WHO classification of tumors of the nervous system,” *Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology*, vol. 61, no. 3, pp. 215–225, 2002.
- [2] D. N. Louis, “Molecular pathology of malignant gliomas,” *Annual Review of Pathology*, vol. 1, pp. 97–117, 2006.
- [3] Y. Zhu and L. F. Parada, “The molecular and genetic basis of neurological tumours,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no. 8, pp. 616–626, 2002.
- [4] E. A. Maher, F. B. Furnari, R. M. Bachoo et al., “Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter,” *Genes and Development*, vol. 15, no. 11, pp. 1311–1333, 2001.
- [5] W. K. A. Yung, “Future directions for temozolomide therapy,” *Seminars in Oncology*, vol. 28, no. 4, pp. 43–46, 2001.
- [6] E. C. Holland, “Glioblastoma multiforme: the terminator,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 12, pp. 6242–6244, 2000.
- [7] S. K. Lim, S. R. A. Llaguno, R. M. McKay, and L. F. Parada, “Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models,” *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, vol. 44, no. 3, pp. 158–164, 2011.
- [8] C. Brennan, H. Momota, D. Hambardzumyan et al., “Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations,” *PLoS ONE*, vol. 4, no. 11, Article ID e7752, 2009.
- [9] R. G. W. Verhaak, K. A. Hoadley, E. Purdom et al., “Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1,” *Cancer Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 98–110, 2010.
- [10] TCGA Network, “Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways,” *Nature*, vol. 455, no. 7216, pp. 1061–1068, 2008.
- [11] R. T. Moon, A. D. Kohn, G. V. de Ferrari, and A. Kaykas, “WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 5, no. 9, pp. 691–701, 2004.
- [12] P. Polakis, “Wnt signaling and cancer,” *Genes and Development*, vol. 14, no. 15, pp. 1837–1851, 2000.
- [13] A. Klaus and W. Birchmeier, “Wnt signalling and its impact on development and cancer,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 5, pp. 387–398, 2008.
- [14] T. Reya and H. Clevers, “Wnt signalling in stem cells and cancer,” *Nature*, vol. 434, no. 7035, pp. 843–850, 2005.
- [15] A. L. Vescovi, R. Galli, and B. A. Reynolds, “Brain tumour stem cells,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 6, pp. 425–436, 2006.
- [16] T. N. Ignatova, V. G. Kukekov, E. D. Laywell, O. N. Suslov, F. D. Vrionis, and D. A. Steindler, “Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro,” *GLIA*, vol. 39, no. 3, pp. 193–206, 2002.
- [17] J. E. Visvader and G. J. Lindeman, “Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 10, pp. 755–768, 2008.
- [18] D. C. Lie, H. Song, S. A. Colamarino, G. L. Ming, and F. H. Gage, “Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases,” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 44, pp. 399–421, 2004.
- [19] S. K. Singh, I. D. Clarke, T. Hide, and P. B. Dirks, “Cancer stem cells in nervous system tumors,” *Oncogene*, vol. 23, no. 43, pp. 7267–7273, 2004.
- [20] S. K. Singh, I. D. Clarke, M. Terasaki et al., “Identification of a cancer stem cell in human brain tumors,” *Cancer Research*, vol. 63, no. 18, pp. 5821–5828, 2003.

- [21] D. Beier, P. Hau, M. Proescholdt et al., "CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles," *Cancer Research*, vol. 67, no. 9, pp. 4010–4015, 2007.
- [22] P. O. Sakariassen, L. Prestegarden, J. Wang et al., "Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 44, pp. 16466–16471, 2006.
- [23] R. Chen, M. C. Nishimura, S. M. Bumbaca et al., "A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma," *Cancer Cell*, vol. 17, no. 4, pp. 362–375, 2010.
- [24] R. Wang, K. Chadalavada, J. Wilshire et al., "Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium," *Nature*, vol. 468, no. 7325, pp. 829–833, 2010.
- [25] N. Takebe, P. J. Harris, R. Q. Warren, and S. P. Ivy, "Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 8, no. 2, pp. 97–106, 2011.
- [26] A. Bruna, R. S. Darken, F. Rojo et al., "High TGF β -Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene," *Cancer Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 147–160, 2007.
- [27] J. Anido, A. Sáez-Borderías, A. González-Juncà et al., "TGF- β receptor inhibitors target the CD44^{high}/Id1^{high} glioma-initiating cell population in human glioblastoma," *Cancer Cell*, vol. 18, no. 6, pp. 655–668, 2010.
- [28] L. V. Goodrich, L. Milenković, K. M. Higgins, and M. P. Scott, "Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants," *Science*, vol. 277, no. 5329, pp. 1109–1113, 1997.
- [29] U. Schüller, V. M. Heine, J. Mao et al., "Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form shh-induced medulloblastoma," *Cancer Cell*, vol. 14, no. 2, pp. 123–134, 2008.
- [30] Z. J. Yang, T. Ellis, S. L. Markant et al., "Medulloblastoma can be initiated by deletion of patched in lineage-restricted progenitors or stem cells," *Cancer Cell*, vol. 14, no. 2, pp. 135–145, 2008.
- [31] V. Clement, P. Sanchez, N. de Tribolet, I. Radovanovic, and A. Ruiz i Altaba, "HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity," *Current Biology*, vol. 17, no. 2, pp. 165–172, 2007.
- [32] C. Y. Logan and R. Nusse, "The Wnt signaling pathway in development and disease," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 20, pp. 781–810, 2004.
- [33] L. Ciani and P. C. Salinas, "WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 6, no. 5, pp. 351–362, 2005.
- [34] K. M. Cadigan and Y. I. Liu, "Wnt signaling: complexity at the surface," *Journal of Cell Science*, vol. 119, no. 3, pp. 395–402, 2006.
- [35] M. L. Waterman, "Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 23, no. 1-2, pp. 41–52, 2004.
- [36] N. Barker and H. Clevers, "Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 5, no. 12, pp. 997–1014, 2006.
- [37] I. Ben-Porath, M. W. Thomson, V. J. Carey et al., "An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors," *Nature Genetics*, vol. 40, no. 5, pp. 499–507, 2008.
- [38] G. R. Sareddy, M. Panigrahi, S. Challa, A. Mahadevan, and P. P. Babu, "Activation of Wnt/ β -catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas," *Neurochemistry International*, vol. 55, no. 5, pp. 307–317, 2009.
- [39] W. Roth, C. Wild-Bode, M. Platten et al., "Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells," *Oncogene*, vol. 19, no. 37, pp. 4210–4220, 2000.
- [40] H. Ji, J. Wang, H. Nika et al., "EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of α -catenin from β -catenin and transactivation of β -catenin," *Molecular Cell*, vol. 36, no. 4, pp. 547–559, 2009.
- [41] P. Wend, J. D. Holland, U. Ziebold, and W. Birchmeier, "Wnt signaling in stem and cancer stem cells," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 21, no. 8, pp. 855–863, 2010.
- [42] E. M. Toledo, M. Colombres, and N. C. Inestrosa, "Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation," *Progress in Neurobiology*, vol. 86, no. 3, pp. 281–296, 2008.
- [43] M. D. David, C. Canti, and J. Herreros, "Wnt-3a and Wnt-3 differently stimulate proliferation and neurogenesis of spinal neural precursors and promote neurite outgrowth by canonical signaling," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 88, no. 14, pp. 3011–3023, 2010.
- [44] N. Sato, L. Meijer, L. Skaltsounis, P. Greengard, and A. H. Brivanlou, "Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 1, pp. 55–63, 2004.
- [45] N. C. Inestrosa and E. Arenas, "Emerging roles of Wnts in the adult nervous system," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 11, no. 2, pp. 77–86, 2010.
- [46] M. F. Cole, S. E. Johnstone, J. J. Newman, M. H. Kagey, and R. A. Young, "Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells," *Genes and Development*, vol. 22, no. 6, pp. 746–755, 2008.
- [47] L. Pereira, F. Yi, and B. J. Merrill, "Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, no. 20, pp. 7479–7491, 2006.
- [48] H. Zheng, H. Ying, R. Wiedemeyer et al., "PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas," *Cancer Cell*, vol. 17, no. 5, pp. 497–509, 2010.
- [49] X. Jiang, Y. Yu, H. W. Yang, N. Y. R. Agar, L. Frado, and M. D. Johnson, "The imprinted gene PEG3 inhibits Wnt signaling and regulates glioma growth," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 11, pp. 8472–8480, 2010.
- [50] N. Zhang, P. Wei, A. Gong et al., "FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis," *Cancer Cell*, vol. 20, no. 4, pp. 427–442, 2011.
- [51] M. Bredel and J. Zentner, "Brain-tumour drug resistance: the bare essentials," *Lancet Oncology*, vol. 3, no. 7, pp. 397–406, 2002.
- [52] G. Liu, X. Yuan, Z. Zeng et al., "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma," *Molecular Cancer*, vol. 5, no. 67, 2006.
- [53] D. Beier, S. Röhrli, D. R. Pillai et al., "Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma," *Cancer Research*, vol. 68, no. 14, pp. 5706–5715, 2008.
- [54] J. Wang, X. Wang, S. Jiang et al., "Partial biological characterization of cancer stem-like cell line (WJ 2) of human glioblastoma multiforme," *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 28, no. 7, pp. 991–1003, 2008.
- [55] M. Flahaut, R. Meier, A. Coulon et al., "The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through

- activation of the Wnt/ β -catenin pathway," *Oncogene*, vol. 28, no. 23, pp. 2245–2256, 2009.
- [56] K. Tamura, M. Aoyagi, H. Wakimoto et al., "Accumulation of CD133-positive glioma cells after high-dose irradiation by γ knife surgery plus external beam radiation," *Journal of Neurosurgery*, vol. 113, no. 2, pp. 310–318, 2010.
- [57] S. Bao, Q. Wu, R. E. McLendon et al., "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response," *Nature*, vol. 444, no. 7120, pp. 756–760, 2006.
- [58] A. Ayyanan, G. Civenni, L. Ciarloni et al., "Increased Wnt signaling triggers oncogenic conversion of human breast epithelial cells by a Notch-dependent mechanism," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 10, pp. 3799–3804, 2006.
- [59] W. A. Woodward, M. S. Chen, F. Behbod, M. P. Alfaro, T. A. Buchholz, and J. M. Rosen, "WNT/ β -catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 2, pp. 618–623, 2007.
- [60] E. S. Yang, S. Nowsheen, T. Wang, D. K. Thotala, and F. Xia, "Glycogen synthase kinase β 3 inhibition enhances repair of DNA double-strand breaks in irradiated hippocampal neurons," *Neuro-Oncology*, vol. 13, no. 5, pp. 459–470, 2011.
- [61] X. Liu, L. Wang, S. Zhao, X. Ji, Y. Luo, and F. Ling, " β -Catenin overexpression in malignant glioma and its role in proliferation and apoptosis in glioblastoma cells," *Medical Oncology*, vol. 28, no. 2, pp. 608–614, 2011.
- [62] C. Liu, Y. Tu, X. Sun et al., "Wnt/ β -Catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations," *Clinical and Experimental Medicine*, pp. 1–8, 2010.
- [63] Z. X. Wang, Y. Y. Chen, B. A. Li et al., "Decreased pygopus 2 expression suppresses glioblastoma U251 cell growth," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 100, no. 1, pp. 31–41, 2010.
- [64] G. Guo, X. Mao, P. Wang et al., "The expression profile of FRAT1 in human gliomas," *Brain Research*, vol. 1320, pp. 152–158, 2010.
- [65] P. Pu, Z. Zhang, C. Kang et al., "Downregulation of Wnt2 and β -catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth," *Cancer Gene Therapy*, vol. 16, no. 4, pp. 351–361, 2009.
- [66] J. M. Yu, E. S. Jun, J. S. Jung et al., "Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells," *Cancer Letters*, vol. 257, no. 2, pp. 172–181, 2007.
- [67] A. Mikels, Y. Minami, and R. Nusse, "Ror2 receptor requires tyrosine kinase activity to mediate Wnt5A signaling," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 44, pp. 30167–30176, 2009.
- [68] A. J. Mikels and R. Nusse, "Purified Wnt5a protein activates or inhibits β -catenin-TCF signaling depending on receptor context," *PLoS biology*, vol. 4, no. 4, Article ID e115, 2006.
- [69] P. Polakis, "The oncogenic activation of β -catenin," *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 9, no. 1, pp. 15–21, 1999.
- [70] S. Gotze, M. Wolter, G. Reifenberger, O. Muller, and S. Sievers, "Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas," *International Journal of Cancer*, vol. 126, no. 11, pp. 2584–2593, 2010.
- [71] S. Sarin and A. Bernath, "Turcot syndrome (glioma polyposis): a case report," *Southern Medical Journal*, vol. 101, no. 12, pp. 1273–1274, 2008.
- [72] Z. Yang, Y. Wang, J. Fang et al., "Expression and aberrant promoter methylation of Wnt inhibitory factor-1 in human astrocytomas," *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 29, p. 26, 2010.
- [73] H. Suzuki, D. N. Watkins, K. W. Jair et al., "Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer," *Nature Genetics*, vol. 36, no. 4, pp. 417–422, 2004.
- [74] J. Roman-Gomez, A. Jimenez-Velasco, X. Agirre et al., "Transcriptional silencing of the Dickkopf-3 (Dkk-3) gene by CpG hypermethylation in acute lymphoblastic leukaemia," *British Journal of Cancer*, vol. 91, no. 4, pp. 707–713, 2004.
- [75] W. J. Nelson and R. Nusse, "Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways," *Science*, vol. 303, no. 5663, pp. 1483–1487, 2004.
- [76] Z. Lu and T. Hunter, "Wnt-independent β -catenin transactivation in tumor development," *Cell Cycle*, vol. 3, no. 5, pp. 571–573, 2004.
- [77] J. Heuberger and W. Birchmeier, "Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 2, no. 2, Article ID a002915, 2010.
- [78] J. Lilien and J. Balsamo, "The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of β -catenin," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 17, no. 5, pp. 459–465, 2005.
- [79] M. D. David, A. Yeramian, M. Dunach et al., "Signalling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential β -catenin phosphorylation," *Journal of Cell Science*, vol. 121, no. 16, pp. 2718–2730, 2008.
- [80] M. Kamino, M. Kishida, T. Kibe et al., "Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2," *Cancer Science*, vol. 102, no. 3, pp. 540–548, 2011.
- [81] T. Pukrop, F. Klemm, T. Hagemann et al., "Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 14, pp. 5454–5459, 2006.
- [82] A. T. Weeraratna, Y. Jiang, G. Hostetter et al., "Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma," *Cancer Cell*, vol. 1, no. 3, pp. 279–288, 2002.
- [83] H. C. Crawford, B. M. Fingleton, L. A. Rudolph-Owen et al., "The metalloproteinase matrilysin is a target of β -catenin transactivation in intestinal tumors," *Oncogene*, vol. 18, no. 18, pp. 2883–2891, 1999.

Nuclear phosphorylated Y142 β -catenin accumulates in astrocytomas and glioblastomas and regulates cell invasion

Mireia Nàger¹, Maria Santacana², Deepshikha Bhardwaj¹, Joan Valls², Isidre Ferrer³, Pere Nogués⁴, Carles Cantí¹, and Judit Herreros^{1,*}

¹Departments of Basic Medical Sciences & Experimental Medicine; University of Lleida & IRBLleida; Lleida, Spain; ²Immunohistochemical and Biostatistics and Epidemiology Units; IRBLleida; Lleida, Spain; ³Institute of Neuropathology; Hospital de Bellvitge-IDIBELL; Barcelona, Spain; ⁴Neurosurgery Unit; Hospital Arnau de Vilanova; Lleida, Spain

Keywords: c-Met, glioblastoma, hepatocyte growth factor, invasion, β -catenin

Abbreviations: β -cat, β -catenin; CK2, Casein kinase-2; EGF, Epidermal Growth Factor; EMT, Epithelial mesenchymal transition; ERK, Extracellular-regulated kinase; FBS, foetal bovine serum; Fox M1, Forhead box M1; Fz, Frizzled; GBM, Glioblastoma multi-forme; GSK, Glycogen Synthase Kinase; HGF, Hepatocyte Growth Factor; LEF, Lymphocyte Enhancer Factor; PBS, Phosphate Buffer Saline; PFA, paraformaldehyde; PY142 β -catenin, phosphorylated Y142 β -catenin; RTK, Receptor tyrosine kinase; SDS, sodium dodecyl sulfate; TCF, T-cell factor; TMA, tissue microarray; WT, wild-type

Glioblastoma multiforme (GBM) is a fast growing brain tumor characterized by extensive infiltration into the surrounding tissue and one of the most aggressive cancers. GBM is the most common glioma (originating from glial-derived cells) that either evolves from a low grade astrocytoma or appears *de novo*. Wnt/ β -catenin and Hepatocyte Growth Factor (HGF)/c-Met signaling are hyperactive in human gliomas, where they regulate cell proliferation, migration and stem cell behavior. We previously demonstrated that β -catenin is phosphorylated at Y142 by recombinant c-Met kinase and downstream of HGF signaling in neurons. Here we studied phosphoY142 (PY142) β -catenin and dephospho S/T β -catenin (a classical Wnt transducer) in glioma biopsies, GBM cell lines and biopsy-derived glioma cell cultures. We found that PY142 β -catenin mainly localizes in the nucleus and signals through transcriptional activation in GBM cells. Tissue microarray analysis confirmed strong nuclear PY142 β -catenin immunostaining in astrocytoma and GBM biopsies. By contrast, active β -catenin showed nuclear localization only in GBM samples. Western blot analysis of tumor biopsies further indicated that PY142 and active β -catenin accumulate independently, correlating with the expression of Snail/Slug (an epithelial-mesenchymal transition marker) and Cyclin-D1 (a regulator of cell cycle progression), respectively, in high grade astrocytomas and GBMs. Moreover, GBM cells stimulated with HGF showed increasing levels of PY142 β -catenin and Snail/Slug. Importantly, the expression of mutant Y142F β -catenin decreased cell detachment and invasion induced by HGF in GBM cell lines and biopsy-derived cell cultures. Our results identify PY142 β -catenin as a nuclear β -catenin signaling form that downregulates adhesion and promotes GBM cell invasion.

Introduction

β -catenin is a structural component of adherent junctions and a key effector of Wnt canonical signaling.¹ In the cell-cell adhesion complex, β -catenin interacts with cadherins and α -catenin that links the complex to the actin cytoskeleton. Downregulation of cell adhesion is in part achieved by phosphorylation of β -catenin, which promotes the release of β -catenin from the adhesion complex and activates β -catenin nuclear signaling.² Several cytoplasmic tyrosine kinases and growth factor-activated receptor tyrosine kinases (RTK) phosphorylate β -catenin, thus promoting a migratory phenotype.³⁻⁵ Dynamic regulation by tyrosine phosphatases

counteracts β -catenin phosphorylation.^{1,2} In addition, β -catenin is a transducer of Wnt signaling that plays central roles in development, the balance of cell proliferation/differentiation and cancer.^{5,6} In the absence of Wnt ligands, β -catenin assembles into a complex containing Glycogen Synthase Kinase (GSK)-3 β and additional Wnt pathway components. The S/T kinase GSK-3 β phosphorylates β -catenin at its N-terminal domain, which favors its proteasomal degradation. Upon Wnt binding to Frizzled (Fz) and LRP5/6 receptors, β -catenin escapes degradation, accumulates in the cytoplasm and translocates to the nucleus, where it interacts with Lymphoid Enhancer Factor (LEF)/T-cell factor (TCF) to regulate transcription of target genes.⁷⁻⁹

*Correspondence to: Judit Herreros; Email: j.herreros@cmb.udl.cat
Submitted: 07/31/2015; Revised: 09/24/2015; Accepted: 09/29/2015
<http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1104443>

Glioblastoma multiforme (GBM; grade IV, World Health Organization) is an aggressive brain tumor that develops *de novo* (primary GBM; accounting for 90% of the cases) or evolves from a previous low grade astrocytoma (secondary GBM). GBM is the most common malignant glioma, displaying uncontrolled proliferation, angiogenesis, necrosis, resistance to apoptosis and profuse infiltration into the brain parenchyma. Average survival of the patients is of 12–14 months despite treatment. RTK-activated pathways are hyperactive in GBM, including Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor and c-Met signaling.^{10–12} Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its receptor c-Met are both overexpressed in GBM, contributing to tumor growth invasion, angiogenesis and conferring a stem-like phenotype and poor prognosis.^{10,13–16} Although activating mutations of β -catenin have not been identified in GBM¹⁷, overexpression of β -catenin and other Wnt pathway components (including Fz¹⁸) together with epigenetic regulation of Wnt inhibitors results in Wnt/ β -catenin activation in GBM.^{19–21} Overexpression of the Forkhead box M1 (FoxM1) transcription factor represents a critical mechanism further contributing to β -catenin signaling in GBM.²² FoxM1 promotes β -catenin nuclear accumulation and together they form a complex with TCF4 required for glioma stem cell self-renewal and gliomagenesis.^{22,23} Crosstalk between EGFR, c-Met and Wnt/ β -catenin is well documented in cancer cells, thereby linking β -catenin signaling and cell migration induced by growth factors.^{24–29} Thus, stimulation of epithelial cells with EGF or HGF through the phosphorylation of cell adhesion proteins diminishes cell adhesion while promoting epithelial-mesenchymal transition (EMT). Phosphorylation of Y142 β -catenin by c-Met affects β -catenin interaction with α -catenin³⁰ and promotes a β -catenin switch from adhesive to transcriptional functions that facilitates promigratory phenotypes.^{31,32} Moreover, EGFR signaling involving Extracellular-regulated kinase (ERK) and Casein kinase 2 (CK2) results in α -catenin phosphorylation, β -catenin transactivation and GBM cell invasion.³³

Here we studied the role of β -catenin phosphorylated at Y142 (PY142) in cell invasion in GBM, a tumor in which total and dephospho S/T β -catenin (a classical Wnt transducer; hereon active β -catenin) have already received some attention.^{20,34,35} We used GBM biopsies, cell lines and cell cultures established from tumoral tissue. Our findings identify a nuclear pool of PY142 β -catenin in GBM cells. β -catenin activity assay confirms that PY142 β -catenin signals through transcriptional regulation. Western blot and tissue microarray (TMA) analysis of astrocytoma (grade II and III) and GBM (grade IV) biopsies indicates that PY142 β -catenin and active β -catenin accumulate independently in grade III astrocytoma and GBM (grade IV) samples, correlating with Snail/Slug and Cyclin D1, respectively. GBM cells stimulated with HGF increase PY142 β -catenin and Snail/Slug levels. Interestingly, mutant Y142F β -catenin decreases GBM cell detachment and invasion in GBM cell lines and biopsy-derived primary cultures. Together, these results indicate that PY142 β -catenin signaling contributes to GBM progression by regulating cell invasion.

Results

We performed an immunocytochemical study of β -catenin forms in U251MG and U87MG GBM cell lines and primary cultures established from astrocytoma (grade II) and GBM (grade IV) biopsies. Immunostaining for total β -catenin revealed a nuclear pool in GBM cell lines, primary astrocytoma and GBM cultures, in addition to its presence at cell-cell and cell-substrate contacts (Fig. 1). Immunostaining for PY142- β -catenin revealed a readily detectable PY142- β -catenin fraction in basal culture conditions, uncovering relatively high and stable levels of this β -catenin form. PY142- β -catenin immunostaining pattern displayed a diffuse cytoplasmic and nuclear localization in U251MG cells, and a predominantly nuclear localization in U87MG cells. Similar results were obtained in primary GBM cultures, showing increased PY142 β -catenin cytoplasmic and nuclear immunoreactivity in GBM cells compared to astrocytoma grade II cells (Fig. 1). Immunostaining for dephosphorylated S/T β -catenin (active β -catenin) also revealed a nuclear localization in GBM cultures, in addition to a cytoplasmic and plasma membrane localization. In contrast, active β -catenin was markedly cytoplasmic and perinuclear in astrocytoma grade II cells (Fig. 1). Together, primary glioma cultures and GBM cell lines exhibit a prominent nuclear β -catenin pool, consistent with the presence of nuclear PY142 β -catenin in astrocytomas and GBMs, and of nuclear active β -catenin in GBM cells.

Next, we analyzed active and PY142 β -catenin forms in tissue homogenates obtained from human control brain samples, grade II and III astrocytomas and GBM (grade IV) biopsies. Active β -catenin was detected in one control and increased in grade II astrocytoma and some grade III and IV samples, where it appears to correlate with total β -catenin levels (Fig. 2). PY142 β -catenin was detected in the majority of grade III astrocytoma and grade IV GBM biopsies, whereas it was undetectable or showed low levels in grade II astrocytomas. These results indicate a stronger presence of PY142 β -catenin in high grade astrocytoma and GBM biopsies (Fig. 2). Interestingly, PY142 β -catenin levels accumulated independently of active or total β -catenin in astrocytoma grade III and GBM biopsies.

To further evaluate the levels and the subcellular localization of β -catenin forms in gliomas, we performed immunohistochemical studies using tissue microarrays (TMAs) including astrocytoma (grade II and III) and GBM (grade IV) biopsies. Active β -catenin immunostaining was cytoplasmic in grade II and III astrocytomas and GBM samples (Fig. 3). Histoscore analysis indicated that active β -catenin was localized in the nucleus in 71% of GBM samples, whereas nuclear immunostaining was not observed in astrocytoma samples ($p < 0,00001$; Pearson; Table 1A). On the other hand, nuclear immunostaining for PY142 β -catenin was found in grade II and III astrocytomas and GBM biopsies (Fig. 3). Immunoreactivity for nuclear PY142 β -catenin was 37 % higher in astrocytomas compared to GBMs (Fig. 3; Table 1B). Thus, in agreement with results obtained from cell cultures, PY142 β -catenin showed a nuclear localization in astrocytomas and GBMs, while active β -catenin was nuclear only in GBM biopsies. These findings demonstrate that active

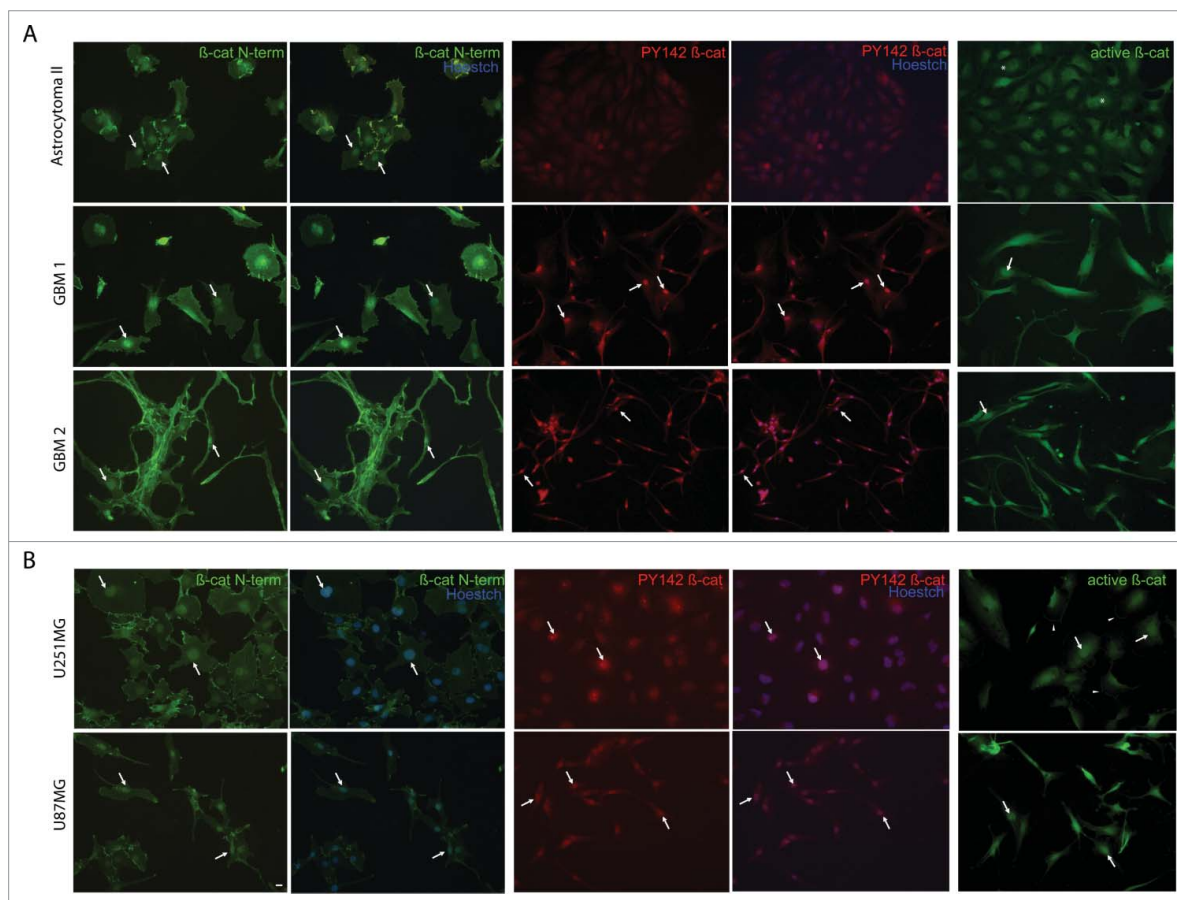


Figure 1. Distinct nuclear β -catenin pools are found in GBM cell lines and primary astrocytoma and GBM cultures. (A) Astrocytoma grade II and GBM (grade IV) cultures established from 2 GBM biopsies or **(B)** U251MG and U87MG (grade IV) cell lines were immunostained for total β -catenin (N-terminal epitope; N-term), PY142 β -catenin or active β -catenin and co-stained for Hoechst. Arrows indicate immunoreactivity in nuclei. Asterisks indicate perinuclear immunostaining and negative nuclei in astrocytoma grade II cells immunostained for active β -catenin. Bar = 15 μ m.

and PY142 β -catenin are distinct β -catenin forms that differently accumulate in the nucleus during astrocytoma to GBM progression.

c-Met, a receptor tyrosine kinase that phosphorylates β -catenin at Y142³¹, is hyperactive in GBM^{10,15,36,37} and associates with recurrence.³⁶ We investigated whether c-Met activation is related to PY142 β -catenin levels in glioma biopsies. We studied total c-Met and PY1234/5 active c-Met in tissue homogenates obtained from astrocytomas and GBMs. Western blot for PY1234/5 c-Met confirmed that active c-Met is commonly found in high grade astrocytomas and GBMs (Fig. 2). However, PY1234/5 c-Met and PY142 β -catenin levels did not consistently correlate. Immunohistochemical analysis of the TMA showed a predominantly nuclear expression of c-Met in glioma biopsies (Fig. 3A), as observed in biopsy-derived cell cultures (Supplementary Fig. 1). Statistical analysis demonstrates that nuclear c-Met increases astrocytomas of grade III compared to astrocytomas of grade II (Fig. 3B). In addition, we observed a significant correlation between nuclear c-Met and nuclear PY142 β -catenin immunostainings (Pearson; $p = 0,04$) in high grade astrocytomas.

We also evaluated possible targets regulated by active β -catenin and PY142 β -catenin in glioma biopsies. Cyclin D1 and Cdc25a were assessed as β -catenin targets involved in cell cycle progression, which deregulation associates with tumorigenesis.^{38,39} Snail/Slug was studied as a pro-invasive marker regulated by HGF/c-Met and Wnt signaling.⁴⁰⁻⁴² Western blot analysis shows that high levels of Cdc25a and Cyclin D1 correlated with active and total β -catenin levels in grade III and IV gliomas (Fig. 2B). However, in contrast to Cdc25a, Cyclin D1 was not detected in control brain and grade II astrocytoma samples (Fig. 2B). Interestingly, high levels of Snail/Slug are found in grade III astrocytomas and GBMs (grade IV) biopsies displaying the highest levels of PY142 β -catenin (Fig. 2B). Furthermore, immunohistochemical analysis of biopsies showed a predominantly nuclear localization for Snail/Slug in astrocytomas and GBMs (higher in astrocytomas) (Fig. 3; Table 1B). Together, results from glioma biopsies link active β -catenin levels and Cyclin D1 expression, and suggest a relationship between PY142 β -catenin and Snail/Slug in high grade astrocytomas and GBMs.

TCF transcription factors collaborate with β -catenin in Wnt signaling.⁴³ We analyzed TCF-1 and TCF-4 levels in tissue

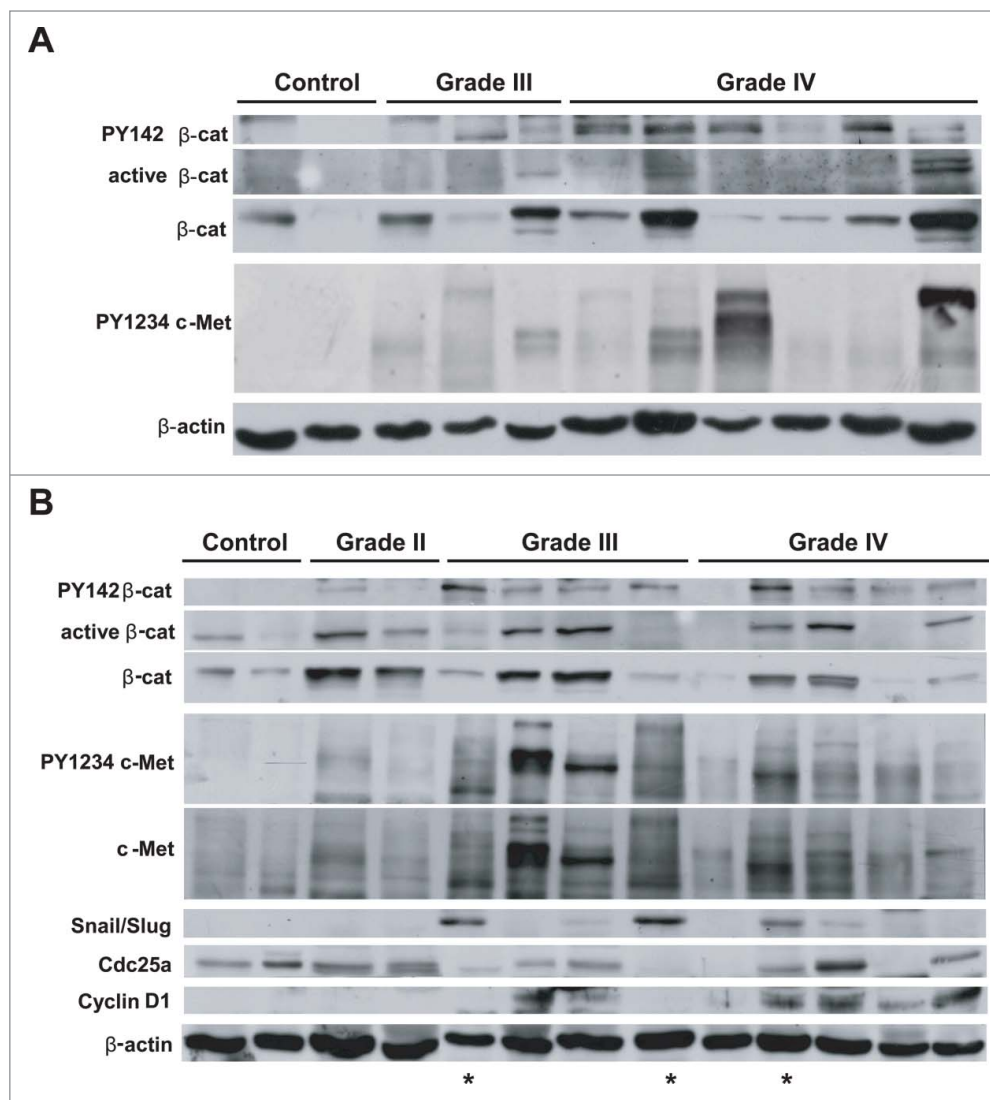


Figure 2. PY142 β-catenin increases in grade III astrocytoma and GBM (grade IV) biopsies, correlating with Snail/Slug expression. Western blot of tissue homogenates from control brain, grade II and III astrocytoma or GBM (grade IV) biopsies were analyzed for PY142, active and total β-catenin (**A and B**), c-Met and/or PY1234/5 active c-Met (**A and B**) and possible target genes (Snail/Slug, Cyclin D1 and Cdc25a (**B**)). β-actin was used as a loading control (**A and B**). PY142 β-catenin is detectable in grade II astrocytomas and increases in grade III astrocytoma and GBM samples, where it seems to distribute differently to active β-catenin. PY1234 and total c-Met increase in grade III astrocytoma and GBM samples. Snail/Slug expression is found in grade III and IV cases displaying high levels of PY142 β-catenin, whereas Cyclin D1 and Cdc25a correlate with active β-catenin among the different samples (except for control brain and grade II astrocytomas, in which Cyclin D1 is not detected). Asterisks refer to the same samples run in **Fig. 4** (showing high levels of TCF-4 and TCF-1).

homogenates from glioma biopsies of different histopathological grade. TCF-1 was detected in grade II, III and IV samples (**Fig. 4A**). High levels of TCF-4 and TCF-1 were found in biopsies of grade III and IV that displayed high PY142 β-catenin levels (**Fig. 4A**). This observation suggests that PY142 β-catenin involves transcriptional regulation. To address this point, a TOP-Flash plasmid that reports β-catenin transcriptional activation was co-expressed together with wild-type (WT), mutant Y142F or Y654F β-catenin in U87MG cells. Whereas expression

of WT or mutant Y654F β-catenin produced significant transcriptional activation at comparable levels, expression of mutant Y142F β-catenin potently blocked (>80%) β-catenin transcriptional activity (**Fig. 4B**). This result demonstrates that PY142 β-catenin signals through transcriptional regulation in GBM cells.

Next, we aimed at investigating the relationship between c-Met, PY142 β-catenin and migration markers in GBM cells. U87MG cells were stimulated with the ligand of c-Met. Treatment with HGF (100 ng/ml) increased PY142 β-catenin, Snail/Slug and N-cadherin levels (**Fig. 5A**). Quantification of PY142 β-catenin indicates that HGF produced an increase of PY142 β-catenin peaking at about a 3-fold increase, compared to untreated cells, at 25 min of treatment (**Fig. 5B**). Snail/Slug levels also increased significantly after stimulation with HGF (**Fig. 5B**). The c-Met inhibitor, SU11274 (2 μM), potently reduced PY1234/5 c-Met (active Met) levels and GBM cell invasion (Supplementary **Fig. 2**). However, treating U87MG cells with HGF and SU11274 did not reduce PY142 β-catenin levels (**Fig. 5A**). Our results suggest that HGF signaling increases PY142 β-catenin and Snail/Slug in GBM. The lack of effect of a c-Met inhibitor on PY142 β-catenin levels may indicate that other kinases, in addition to c-Met, regulate β-catenin phosphorylation at this site downstream of HGF signaling, or it

may be explained by c-Met active fragments (see Discussion).

Phosphorylation of β-catenin at Y residues increases cell migration and decreases cell adhesion.¹ We studied the involvement of PY142 β-catenin in GBM cell invasion and migration in Transwell and cell spreading assays, respectively, using a mutant Y142F β-catenin. U87MG cells expressing Y142F β-catenin showed a decrease of 30% in the number of cells that migrated across the Transwell and invaded the Matrigel layer, compared to cells expressing WT β-catenin (used as control; **Fig. 6A**). The

c-Met inhibitor SU11274 together with HGF reduces the migration of GBM cells (Supplementary Fig. 2). In line with this, U87MG cells expressing WT or Y142F β -catenin treated with SU11274 showed a significant reduction in the number of cells that invaded the Matrigel, compared to untreated cells expressing WT β -catenin (Fig. 6A). We next addressed whether mutant Y142F β -catenin affects cell adhesion and migration in a cell spreading assay,⁴⁴ in which round, loosely adherent (poorly spread, i.e. highly migratory) cells are counted. U87MG cells expressing DsRed alone or together with WT β -catenin showed an increase of 20% in the number of round cells upon treatment with HGF compared to untreated cells (Fig. 6B), in agreement with the role of HGF inducing cell migration. Interestingly, Y142F β -catenin-expressing cells showed a decrease of 20% in the number of round (loosely adherent/migratory) cells compared to WT β -catenin-expressing cells, indicating that mutant Y142F β -catenin increases cell adhesion. Furthermore, in contrast to WT β -catenin-expressing cells, HGF treatment did not increase the number of round cells in Y142F-expressing cells (the number of round cells in Y142F-expressing cells untreated or treated with HGF was not significantly different; Fig. 6B). These results indicate that PY142 β -catenin is required for cell detachment and migration of U87MG cells induced by HGF.

Invasion experiments were also performed in 2 primary GBM cultures, C65 and C18. HGF increased the invasion of GBM cells expressing WT β -catenin compared to untreated control cells in both GBM cultures. However, in cells expressing mutant Y142F β -catenin, the effect of HGF was blocked and the number of migratory cells remained below control values (Fig. 6C and 6D), suggesting that HGF signaling involves PY142 β -catenin. Treatment with HGF and the c-Met inhibitor reduced the number of migratory cells both in WT and Y142F β -catenin-expressing cells (45%-60% below control; Fig. 6C and 6D). These results demonstrate the involvement of PY142 β -catenin in GBM invasion downstream of HGF signaling.

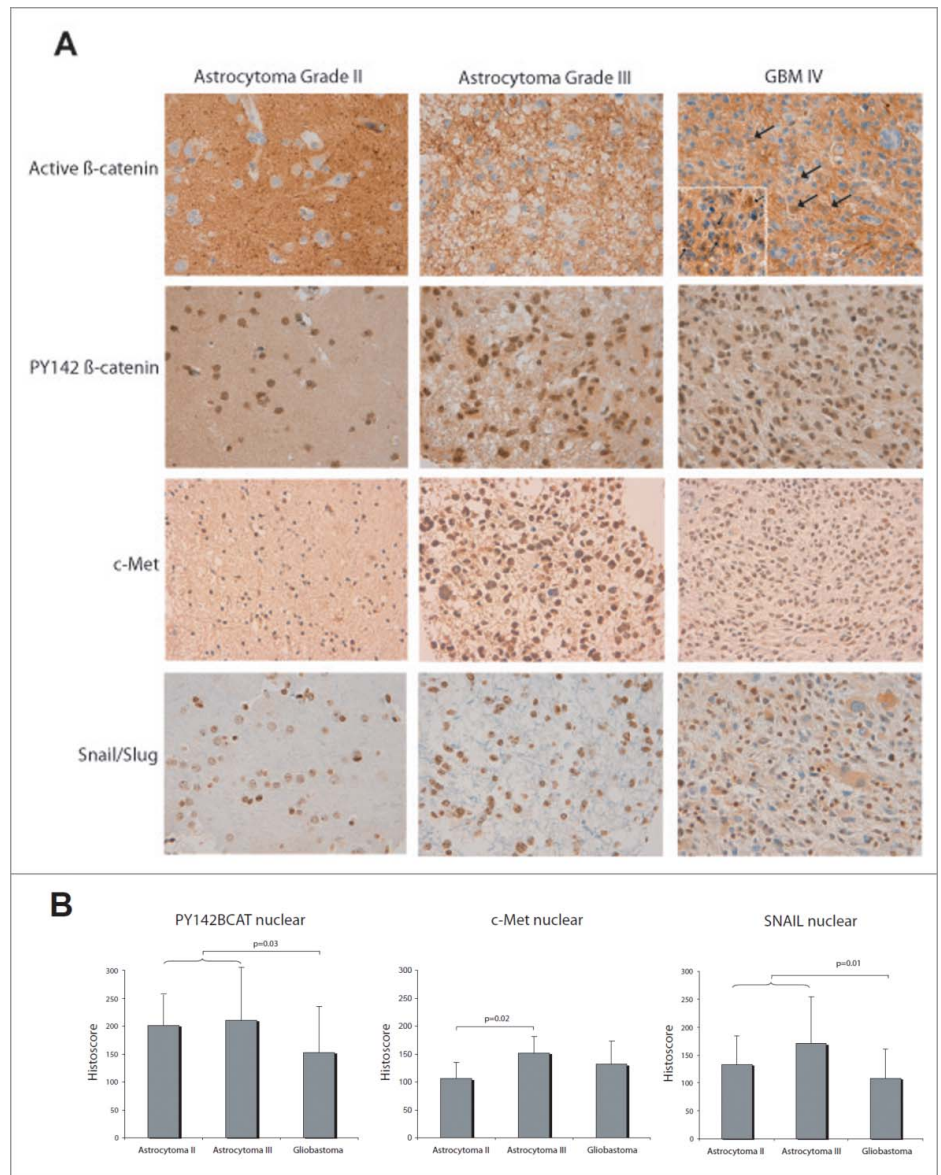


Figure 3. Nuclear PY142 β -catenin, Snail/Slug and c-Met are present in astrocytoma and GBM biopsies. (A) Representative immunostainings for active β -catenin, PY142 β -catenin, Snail/Slug and c-Met of selected grade II, III and IV samples from the TMAs. Nuclei are counterstained by haematoxylin. Although active β -catenin cytoplasmic immunostaining is present from grade II to grade IV samples, it concentrates in the nucleus only in grade IV (arrows). PY142 β -catenin immunoreactivity is detected in the cytoplasm and nuclei from grade II to IV samples, and its levels increase in the nuclei of astrocytomas grade III cells, similarly to c-Met and Snail/Slug. **(B)** Statistical analysis of the Histocore data obtained from the TMA indicates that nuclear PY142 β -catenin and nuclear Snail/Slug immunostainings increase in astrocytomas vs GBM ($p=0,01$ and $0,03$, respectively). Nuclear c-Met (center) immunoreactivity is higher in astrocytomas of grade III compared to astrocytomas of grade II ($p=0,02$). Bars represent mean immunostaining levels and segments one standard deviation. P-values were obtained from a Mann-Whitney test.

Discussion

β -catenin is a transducer of Wnt signaling that plays key roles in physiology and disease. As a component of adhesive contacts, β -catenin controls cell adhesion and migration. High β -catenin

Table 1. Statistical analysis of immunohistochemical studies using the TMA. (A) Association between positivity/negativity in nuclear active β -catenin in gliomas (astrocytomas vs. GBMs). Absolute frequency (and percentage) is shown for each glioma type. P-value from a Fisher test is shown to assess the significance of the association. (B) Differential immunostaining of c-Met, Snail, PY142 β -catenin (β -cat) and active β -catenin in astrocytomas grade II, III and GBMs (grade IV). Mean and standard deviation shown for astrocytomas (globally or separately according to histopathological classification) and GBMs. P-values from a Mann-Whitney test provided assess the differences between astrocytomas (grade II vs. III) and between astrocytomas and GBMs (P-values indicating significant differences are in bold).

| | | Nuclear active β -catenin | | | p-value | |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------------|----------|-----------|------------------------|---------------------|
| | | Negative | Positive | Total | Astrocytomas II vs III | Astrocytomas vs GBM |
| Astrocytomas | | 15 (100%) | 0 (0%) | 15 (100%) | | |
| GBMs | | 16 (29%) | 39 (71%) | 55 (100%) | | |
| p-value < 0,00001 | | | | | | |
| | | n | mean | SD | p-value | |
| | | | | | Astrocytomas II vs III | Astrocytomas vs GBM |
| c-Met cytosolic | Astrocytomas | 16 | 108,44 | 11,21 | 0,21 | 0,74 |
| | Astrocytoma II | 7 | 145,71 | 35,05 | | |
| | Astrocytoma III | 7 | 120,71 | 29,78 | | |
| | GBMs | 55 | 110,74 | 34,10 | | |
| c-Met nuclear | Astrocytomas | 16 | 131,88 | 36,82 | 0,02 | 0,97 |
| | Astrocytoma II | 7 | 105,71 | 30,06 | | |
| | Astrocytoma III | 8 | 151,25 | 30,06 | | |
| | GBMs | 54 | 131,59 | 41,06 | | |
| Snail nuclear | Astrocytomas | 16 | 157,03 | 70,29 | 0,27 | 0,01 |
| | Astrocytoma II | 7 | 132,50 | 52,22 | | |
| | Astrocytoma III | 8 | 171,25 | 83,28 | | |
| | GBMs | 56 | 108,26 | 51,86 | | |
| PY142 β -cat nuclear | Astrocytomas | 16 | 209,69 | 75,88 | 0,41 | 0,03 |
| | Astrocytoma II | 7 | 200,00 | 56,43 | | |
| | Astrocytoma III | 8 | 210,00 | 95,33 | | |
| | GBMs | 25 | 152,53 | 82,44 | | |
| PY142 β -cat cytosolic | Astrocytomas | 8 | 115,63 | 46,40 | 0,15 | 0,48 |
| | Astrocytoma II | 3 | 75,00 | 47,70 | | |
| | Astrocytoma III | 4 | 135,00 | 26,50 | | |
| | GBMs | 11 | 138,64 | 47,75 | | |
| Active β -cat cytosolic | Astrocytomas | 15 | 133,67 | 32,65 | 0,21 | 0,25 |
| | Astrocytoma II | 7 | 145,71 | 35,05 | | |
| | Astrocytoma III | 7 | 120,71 | 29,78 | | |
| | GBMs | 55 | 116,95 | 41,26 | | |

expression was observed in gliomas, including astrocytomas and GBMs.²⁰ Furthermore, Wnt/ β -catenin signaling is regulated by PLAGL2 and FoxM1 proto-oncogenes during gliomagenesis.^{18,22} Here, we identified PY142 β -catenin as a nuclear β -catenin form that signals through transcriptional regulation in GBM. PY142 β -catenin is different from classical active β -catenin: PY142 β -catenin accumulates in the nucleus already in astrocytoma (grade II and III) samples and correlates with high levels of the migration marker Snail/Slug in tumor biopsies. In contrast, active β -catenin localizes to the nucleus in GBMs but not in astrocytomas, and appears to correlate with Cyclin D1 levels. PY142 β -catenin is regulated by HGF signaling in glioma cells. High invasion abilities are remarkable features of astrocytoma and GBM cells contributing to the extensive brain infiltration

and to the tumor recurrence after treatment.⁴⁵ Importantly, studies using a Y142F β -catenin mutant indicate that HGF promotes cell migration and invasion through PY142 β -catenin in GBM cell lines and biopsy-derived GBM cultures.

Phosphorylation of β -catenin at Y142 is regulated *in vitro* by cytosolic tyrosine kinases Fer and Fyn and by RTK c-Met.^{4,30,31,46} c-Met interacts with β -catenin⁴⁷ and PY142 β -catenin is increased in developing hippocampal neurons stimulated with HGF.³¹ We report here that PY142 β -catenin levels are detected in GBM biopsies and cell cultures (under basal conditions), which increase upon treatment with HGF in U87MG cells. U87MG cell line expresses HGF and c-Met^{29,37,48}, suggesting that autocrine or paracrine HGF/c-Met signaling could be responsible for the basal PY142 β -catenin levels found in GBM.

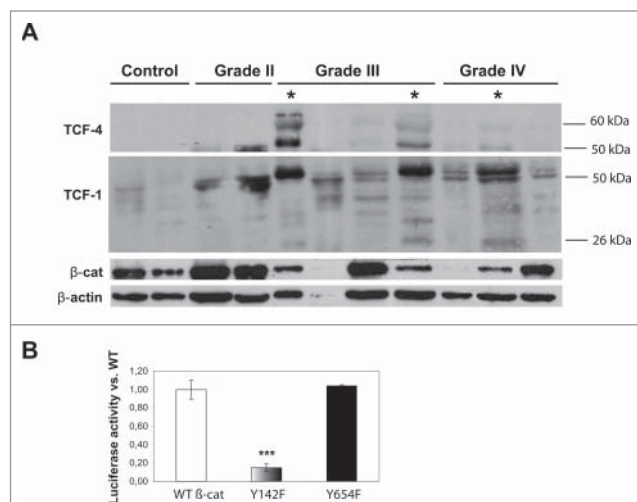


Figure 4. PY142 β -catenin signals through transcriptional regulation in GBM. (A) Western blot analysis of TCF-4 and TCF-1 in tissue homogenates from control brain, astrocytomas of grades II and III and GBM (grade IV) biopsies, together with β -catenin and β -actin (loading control). Bands of 60–80 kDa were detected using anti-TCF-4 antibodies especially in grade III samples. A prominent band at around 50 kDa was immunodetected by anti-TCF-1 antibodies and additional bands in the 30–50 kDa range. TCF1 immunoreactive bands increased in grade II, III and IV tumor samples compared to control brain. Asterisks indicate the grade III and IV samples displaying high expression of TCF factors, low total β -catenin and high PY142 β -catenin levels (shown in Fig. 2B). **(B)** Luciferase assay reporting β -catenin transcriptional activity. U87MG cells were co-transfected with WT, Y654F or Y142F β -catenin together with the TOP-Flash plasmid. Whereas cells expressing WT or Y654F β -catenin show similar luciferase activity values, expression of mutant Y142F β -catenin strongly reduced β -catenin transcriptional activation in GBM cells (*** $p \leq 0,001$; T test).

Although active and total *c*-Met levels increase in grade III astrocytoma and grade IV GBM biopsies (compared to control and grade II astrocytomas) as observed for PY142 β -catenin, a correlation between *c*-Met and PY142 β -catenin could not be confirmed by Western blot in all the biopsies. Importantly, however, HGF decreases cell adhesion and stimulates cell migration and invasion, which are inhibited by mutant Y142F β -catenin in GBM-biopsy derived cultures. These results indicate that HGF signaling promotes GBM migration and invasion by regulating cell detachment through PY142 β -catenin.

Treatment with the *c*-Met inhibitor SU11274 does not affect PY142 β -catenin levels, while significantly reducing cell invasion in GBM cell lines and primary GBM cultures. These results confirm a key role of *c*-Met in GBM progression.^{29,48-51} The lack of regulation of PY142 β -catenin by a *c*-Met inhibitor does not allow us to conclude if *c*-Met is phosphorylating this β -catenin site in GBM cells and rather suggests the involvement of other kinases. The proteolytic processing of *c*-Met is well described and nuclear *c*-Met has been linked to invasive cancers.⁵²⁻⁵⁴ Proteolytic fragments of *c*-Met could explain the nuclear *c*-Met immunostaining observed in astrocytoma/GBM biopsies included in the TMA and in cell cultures. Catalytically active

fragments of *c*-Met (unable to interact with SU11274) could regulate PY142 β -catenin in GBM, putatively explaining PY142 β -catenin basal levels and the lack of regulation by SU11274. This suggestion is supported by the correlation observed between nuclear PY142 β -catenin and nuclear *c*-Met in high grade astrocytomas.

Active β -catenin levels correlate with the expression of *Cdc25a* and *Cyclin-D1*, 2 well known regulators of the cell cycle and *Wnt*/ β -catenin targets.^{39,55} These findings are in agreement with a classical role of *Wnt* signaling in cell proliferation.⁵⁵ *Snail/Slug* proteins induce a pro-mesenchymal phenotype (typically working as transcriptional repressors) and control cell migration downstream of different signaling pathways.^{40,56} *Snail/Slug* proteins have already been involved in GBM invasion.^{57,58} We demonstrate the regulation of *Snail/Slug*, in parallel to increased PY142 β -catenin, upon stimulation of GBM cells with HGF. Statistical studies indicate that both nuclear *Snail/Slug* and nuclear PY142 β -catenin peak in astrocytomas of grade II. By Western blot, grade III astrocytoma and grade IV GBM biopsies show higher amounts of PY142 β -catenin than control and grade II samples. Interestingly, higher PY142 β -catenin is found in samples with the highest levels of *Snail/Slug*, further linking PY142 β -catenin and cell migration abilities. PY142 β -catenin may be considered a GBM biomarker conferring high invasion properties. Because different β -catenin forms are involved in GBM progression further studies on β -catenin are warranted to evaluate its possible therapeutic targeting in GBM.

Materials and Methods

Human biopsies

Tumor samples were obtained from Hospital Universitari Arnau de Vilanova (HUAV; Lleida) and Institute of Neuropathology (Hospital of Bellvitge, Barcelona) after obtaining specific informed consents from the patients. Control brain samples were obtained from autopsies (Institute of Neuropathology, Hospital of Bellvitge, Barcelona) within maximum 7 hours from death. The study was approved by the local Ethics Committee of Human Experimentation.

Reagents and antibodies

Most biochemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland) unless otherwise stated. Cell culture reagents were obtained from Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA). Antibodies were obtained from: β -catenin, *Cyclin D1* (DCS-6) from BD Bioscience (New Jersey, USA); PY142 β -catenin (Ab27798) and *Snail/Slug* (Ab6337) from Abcam (Cambridge, UK); *c*-Met (sc10 and sc161) and *cdc25a* (sc97) from Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA); PY1234/5 *c*-Met (3126), β -catenin N-terminal (9581) and TCF-1 (C46C7) from Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA); active β -catenin (8E7) from Merck-Millipore (Massachusetts, USA); TCF-4 from Upstate (California, USA), and β -actin (A5441) from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland).

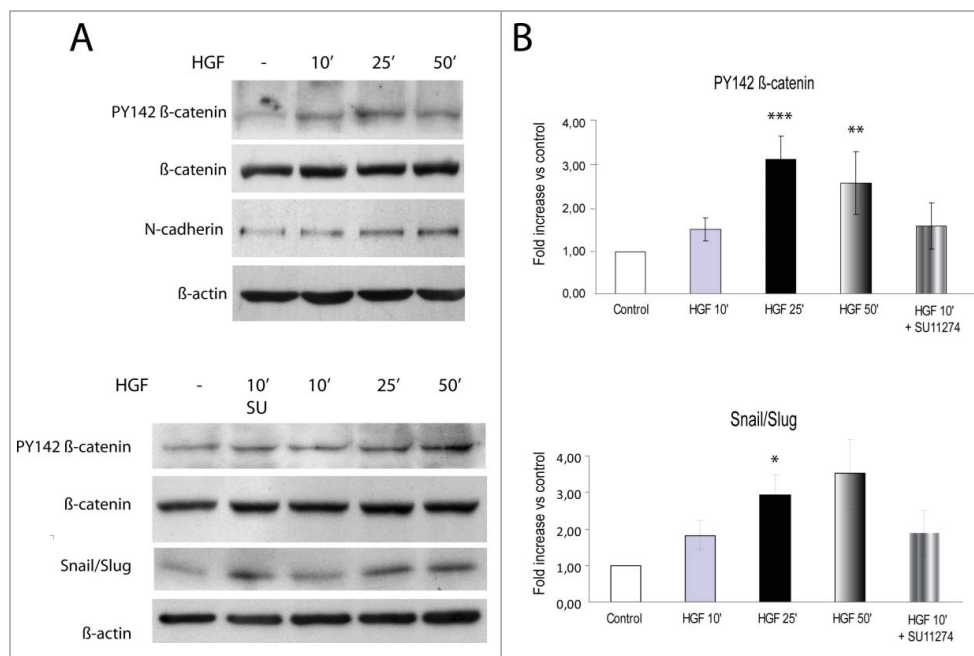


Figure 5. HGF signaling regulates PY142 β-catenin and Snail/Slug in GBM cells. (A) Cell lysates of U87MG cells deprived of serum and treated with HGF (100 ng/ml) and SU11274 (2 μM, overnight) as indicated. HGF treatment increased PY142 β-catenin levels. N-cadherin and Snail/Slug levels also increased upon HGF treatment. β-actin was used as a loading control. **(B)** Quantification of PY142 β-catenin (top) and Snail/Slug (bottom) levels normalized against the levels of β-actin. Quantification results are shown as fold increase vs. control (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; T test).

Tissue microarrays, immunohistochemistry and statistical analysis

Two tissue microarrays (TMA) were constructed including a total of 74 brain tissue samples, for which formalin-fixed paraffin-embedded blocks were available. The first TMA was constructed from 17 samples of astrocytoma tissue (7 grade II and 10 grade III). The second TMA was composed of 57 GBM samples. A Tissue Arrayer device (Beecher Instrument; Maryland, USA) was used to construct the TMAs. Briefly, all the samples were histologically reviewed and representative areas were marked in the corresponding paraffin-blocks. Two selected cylinders (0.6 mm in largest diameter) from 2 different areas were included in each case.

TMA blocks were sectioned at a thickness of 3 μm, dried for 1 h at 65° before pre-treatment procedure of deparaffinization, rehydration and epitope retrieval in the Pre-Treatment Module, PT-LINK (DAKO; Glostrup, Denmark) at 95°C for 20 min in 50x Tris/EDTA buffer, pH 9 or citrate buffer, pH 6.1. Before staining the sections, endogenous peroxidase was blocked. Antibodies used were rabbit polyclonal PY142 β-catenin (1:100 dilution), mouse monoclonal active-β-catenin (1:200 dilution), rabbit polyclonal c-Met (1:200 dilution; sc-161) and rabbit polyclonal Snail/Slug (1:200 dilution). The reaction was visualized with the EnVision FLEX Detection Kit (DAKO; Glostrup, Denmark) using diaminobenzidine chromogen as a substrate. Sections were counterstained with haematoxylin.

Immunohistochemical results were evaluated by following uniform pre-established criteria. Immunoexpression was graded semi-quantitatively by considering the percentage and intensity of the staining. A histological score was obtained from each sample, which ranged from 0 (no immunoreactivity) to 300 (maximum immunoreactivity). The score was obtained by applying the following formula, Histotocore = 1X (% light staining) + 2X (% moderate staining) + 3X (% strong staining). The reliability of such score for interpretation of immunohistochemical staining has been shown previously⁵⁹⁻⁶¹. Since each TMA included 2 different tumor cylinders from each case, immunohistochemical evaluation was done after examining both samples. Data are presented as mean (and standard deviation) or absolute frequency (and percentage) as convenient for quantitative or qualitative variables, respectively. Association of positivity with glioma histological type was assessed with a Fisher test. Differential immunostaining in the selected biomarkers with regards to histological type was assessed with a Mann-Whitney test. Relationship between biomarkers was assessed using Pearson correlation. All analyses were performed using R statistical package, setting the threshold for significance at 5% ($\alpha = 0.05$).

Association of positivity with glioma histological type was assessed with a Fisher test. Differential immunostaining in the selected biomarkers with regards to histological type was assessed with a Mann-Whitney test. Relationship between biomarkers was assessed using Pearson correlation. All analyses were performed using R statistical package, setting the threshold for significance at 5% ($\alpha = 0.05$).

Tissue homogenates

Brain samples from control brain and glioma biopsies were homogenized in a glass homogenizer in 1 ml of homogenizer buffer containing 5 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% Igepal CO-630, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) and Complete protease inhibitor cocktail (Roche; Basel, Switzerland) plus phosphate inhibitors (25 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate and 40 mM β-glycerophosphate). Homogenates were then centrifuged (15.000 g, 5 min, 4°C) and pellets were discarded. The protein concentration of the resulting supernatants was determined using the BCA protein assay reagent (Thermo Scientific; Massachusetts, USA) and bovine serum albumin as standard.

Cell culture

Tumor biopsies were obtained from HUAV (Lleida) and processed before 30 min from surgical dissection. All patients signed specific informed consents prior to collection of

specimens. To establish adherent GBM cultures⁶², tissue was washed with phosphate buffer saline (PBS), cut into small pieces (2 mm²) and incubated (2 h, 37°C under shaking) in PBS containing 155 U/ml of collagenase (Worthington; Ohio, USA) and 12 µg/ml of DNase-I. Samples were filtered through a 70 µm cell strainer (BD; New Jersey, USA) and the cell suspension was washed twice with PBS. Cells were plated in DMEM media containing 10% FBS. Media was changed every 2 d.

Glioma cell lines U251MG and U87MG were obtained CLS Cell Lines Service (Eppelheim, Germany). Cells were maintained in MEM media containing 10% foetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, L-glutamine, aminoacids and sodium pyruvate at 37°C and 5% CO₂ atmosphere and subcultured by trypsinization 1:3 twice a week.

Western blot

After the appropriate treatments (HGF 100 ng/ml, Preprotech, New Jersey, USA; SU11274 2 µM, Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland), cells were washed with PBS and lysed in Tris 62,8 mM pH 6,8 and 2% SDS. Cell lysates were resolved in 8 or 10% acrylamide-polyacrylamide gels and transferred to a PVDF membrane. Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin or milk and incubated overnight with primary antibodies. Blots were developed using Enhanced Chemiluminescence (ECL, Thermo Scientific; Massachusetts, USA) or Luminata Forte horseradish peroxidase substrate from Merck-Millipore (Massachusetts, USA), kits. Band intensities were quantified with respect to β-actin (used as loading control) using Image J software.

Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA; 20 min, room temperature), washed with PBS and blocked and permeabilized in PBS containing 5% FBS, 5% horse serum, 0.2% glycine and 0.1% Triton X100 before incubation with primary antibodies. Secondary antibodies were coupled to

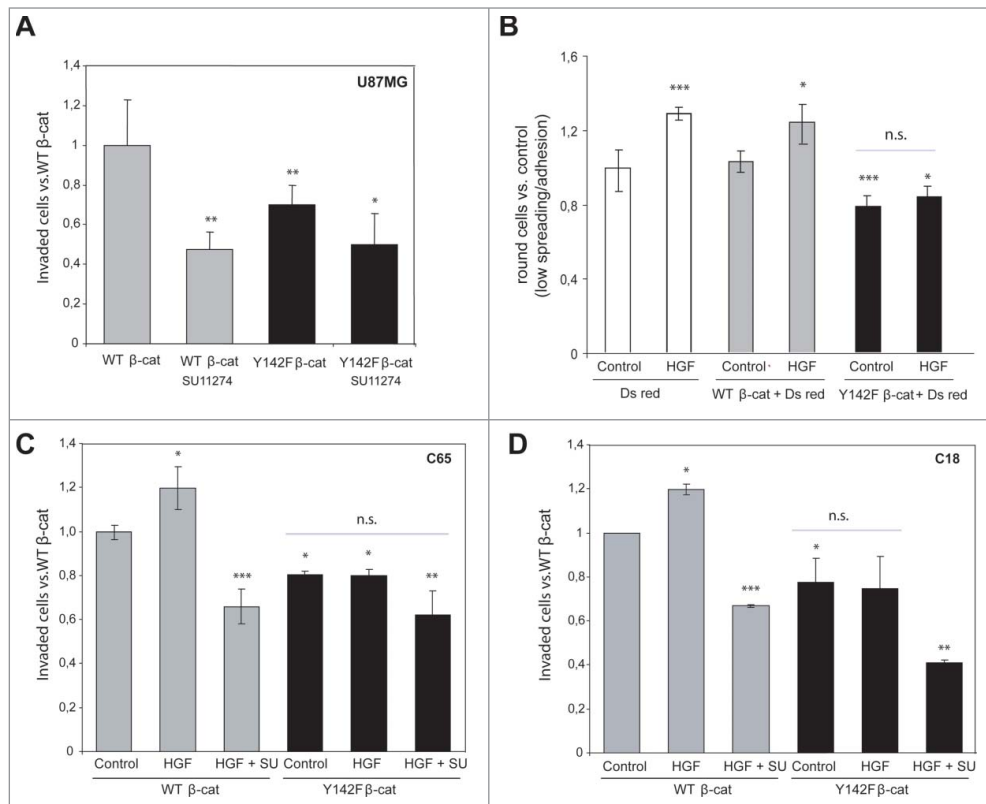


Figure 6. PY142 β-catenin increases cell detachment and promotes GBM cell migration and invasion. (A) Transwell assay of U87MG cells expressing WT or Y142F β-catenin, untreated or following preincubation with SU11274 (2 µM, overnight). Y142F β-catenin-expressing cells showed reduced invasion compared to WT β-catenin-expressing cells. c-Met inhibition diminished invasion compared to untreated cells in a similar manner in WT and Y142F β-catenin-expressing cells. Plot represents values normalized to untreated cells expressing WT β-catenin. (B) Cell spreading assay performed in U87MG cells expressing Ds red (control), Ds red and WT or Y142F β-catenin. Cells were treated with HGF (100 ng/ml) where indicated. Plot represents the number of round cells (displaying low spreading/adhesion; high migration) normalized to control Ds red-expressing cells. HGF increased the number of round (pro-migratory) cells in Ds red and WT β-catenin-expressing cells, but not in cells expressing mutant Y142F β-catenin. Cells expressing Y142F β-catenin (untreated and treated with HGF) showed round cells numbers below those of control condition, indicating that the Y142F β-catenin mutant increases cell adhesion. (C and D) Transwell assays of C65 (C) and C18 (D) primary GBM cultures. GBM cells expressing WT or Y142F β-catenin were left untreated or treated with HGF and/or SU11274. Y142F β-catenin-expressing cells showed reduced invasion compared to WT β-catenin-expressing cells in both GBM cases. HGF significantly increased invasion of WT β-catenin-expressing cells, but not in cells expressing Y142F β-catenin. HGF together with c-Met inhibitor SU11274 reduced invasion vs. untreated cells expressing WT β-catenin (* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001; T-test).

Alexa Fluor488 or Alexa Fluor594 (Thermo Scientific; Massachusetts, USA). Coverslips were mounted on Mowiol. Micrographs were obtained using an inverted Olympus IX70 microscope (10x, 0.3 NA or 10x, 0.4 NA; Pennsylvania, USA) equipped with epifluorescence optics and a camera (Olympus OM-4 Ti). Images were acquired using DPM Manager Software.

Transfection

Glioma cell lines and primary cultures were transfected with WT, Y142F or Y654F β-catenin expression vectors (a kind gift of M. Duñach, UAB, Barcelona, Spain). Cells were plated the

day before transfection at 80% of confluence. 50 μ l of Optimem containing the DNAs were mixed with 50 μ l of Optimem containing 1,5 μ l of Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific; Massachusetts, USA). The mix was incubated (10 min, room temperature) and added dropwise to the cells for 4 h, when media was removed and complete media added.

Transwell invasion assay

To mimic 3-dimensional extracellular environment and investigate the infiltrative potential of the cells, the external face of Transwell polycarbonate membrane inserts (8.0 μ m pore size; BD Biosciences; New Jersey, USA) was coated with Matrigel (BD Biosciences; New Jersey, USA). After 30 min at 37°C the Matrigel solidified and served as an extracellular matrix for invasion analysis. After 48 h of transfection, cells were trypsinized and resuspended in 200 μ l of media containing 10% FBS without or with HGF (100 ng/ml). Cells (20.000 cells/well) were placed on top of the inserts and the bottom chambers were filled with serum-containing media. For c-Met inhibition, cells were pre-incubated overnight with 2 μ M SU11274. Cells were incubated for 8 h at 37°C and then fixed with 4% PFA. Non-migrating cells were removed from the upper face of the insert using cotton swabs. Cell invasion into the Matrigel-coated lower side of the membrane was detected by Hoechst staining. Experiments were performed in duplicates. Six random fields were pictured under an epifluorescence microscope and nuclei counted. Results were expressed as fold increase vs. the number of nuclei found in the Matrigel layer in control conditions. Statistical significance was calculated by T-test.

Spreading assay

Cells were co-transfected with DsRed (0,2 μ g) and WT or Y142F β -catenin (0,8 μ g) expression vectors. Transfected cells were incubated for 48 h and treated with HGF (100 ng/ml, 1 h) and with SU11274 (2 μ M, for the last 16 h) as required. Cells were then trypsinized and seeded on plates coated with 10 μ g/ml fibronectin. After 30–45 min cells were fixed with 2% PFA and washed with PBS. Phase contrast and DsRed fluorescence pictures were taken. Spread cells (displaying DsRed fluorescence) were counted. Round bright cells under phase contrast microscopy were considered not spread (displaying low adherence and high migration abilities).⁴⁴

References

- Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004; 303:1483-7; PMID:15001769; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1094291>
- Lilien J, Balsamo J. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17:459-65; PMID:16099633; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccb.2005.08.009>
- Birchmeier W. Cell adhesion and signal transduction in cancer. Conference on cadherins, catenins and cancer. *EMBO Rep* 2005; 6:413-7; PMID:15864290; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400409>
- Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Targeting the beta-catenin nuclear transport pathway in cancer.

- Semin Cancer Biol* 2014; 27:20-9; PMID:24820952; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.012>
- Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J* 2012; 31:2714-36; PMID:22617422; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.150>
- Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13:11-26; PMID:23258168; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3419>
- Cadigan KM, Liu YL. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 2006; 119:395-402; PMID:16443747; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02826>
- Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Mahmoudi T, et al. Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex.

- Cell* 2012; 149:1245-56; PMID:22682247; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.002>
- MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17:9-26; PMID:19619488; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:915-25; PMID:14685170; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1261>
- Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R, Stegh AH, Bradner JE, Ligon KL, Brennan C, et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* 2007; 318:287-90; PMID:17872411; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1142946>

Luciferase activity

To determine β -catenin transcriptional activation status, luciferase assay was performed following transfection of the TOP-Flash plasmid (1,4 μ g) that carries a synthetic promoter containing 3 copies of the TCF-4 binding site upstream of a firefly luciferase reporter gene. U87MG cells were plated at a density of 200 cells/mm² and transfected with Lipofectamine 2000 on the day after plating. When indicated, cells were co-transfected with TOP-Flash (0,7 μ g) and β -catenin (0,7 μ g) DNAs. Treatments (HGF 50 ng/ml; Wnt-3a 100 ng/ml; SU11274 2 μ M) were applied for 24 h following transfection. After 48 hours of transfection, cells were lysed in lysis buffer 25 mM glycylglycine, pH 7.8, 15 mM Mg₂SO₄, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA) and rocket on ice for 15 minutes. Luciferase activity in the cell lysates was determined in Luciferase Buffer (25 mM glycylglycine, 15 mM KHPO₄, pH 7,8, 15 mM Mg₂SO₄, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 2 mM ATP, 100 mM acetyl-coenzymeA and 100 mM luciferin) using a microplate fluorescent reader FLX 800 (Biotek Instruments; Vermont, USA). Luciferase activity was normalized against protein concentration in each condition.

Acknowledgments

We thank Mireia Dunach (Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain) for the gift of WT, Y654F and Y142F β -catenin plasmids.

Funding

This work was funded by grants of Instituto de Salud Carlos III with the support of Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) to J.H. (PI080790 and PI1301980). M.N. is a predoctoral fellow of UdL and D.B. was a predoctoral fellow of Agaur-Generalitat de Catalunya. IRBLleida Biobank is supported by Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC), IRBLleida Biobank (B.0000682) and Plataforma Biobancos PT13/0010/0014.

Supplementary Material

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

12. Furnari FB, Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nat Rev Cancer* 2015; PMID:25855404
13. Pillay V, Allaf L, Wilding AL, Donoghue JF, Court NW, Greenall SA, Scott AM, Johns TG. The plasticity of oncogene addiction: implications for targeted therapies directed to receptor tyrosine kinases. *Neoplasia* 2009; 11:448-58, 2 p following 58; PMID:19412429; <http://dx.doi.org/10.1593/neo.09230>
14. Laterra J, Nam M, Rosen E, Rao JS, Lamszus K, Goldberg ID, Johnston P. Scatter factor/hepatocyte growth factor gene transfer enhances glioma growth and angiogenesis in vivo. *Lab Invest* 1997; 76:565-77; PMID:9111517
15. Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF. Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* 1997; 57:5391-8; PMID:9393765
16. Li Y, Li A, Glas M, Lal B, Ying M, Sang Y, Xia S, Trageser D, Guerrero-Cazares H, Eberhart CG, et al. c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:9951-6; PMID:21628563; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1016912108>
17. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14:1837-51.
18. Zheng H, Ying H, Wiedemeyer R, Yan H, Quayle SN, Ivanova EV, Paik JH, Zhang H, Xiao Y, Perry SR, et al. PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas. *Cancer Cell* 2010; 17:497-509; PMID:20478531; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.020>
19. Nager M, Bhardwaj D, Canti C, Medina L, Noguez P, Herreros J. beta-Catenin Signalling in Glioblastoma Multiforme and Glioma-Initiating Cells. *Chemother Res Pract* 2012; 2012:192362; PMID:22400111
20. Sareddy GR, Panigrahi M, Challa S, Mahadevan A, Babu PP. Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas. *Neurochem Int* 2009; 55:307-17; PMID:19576519; <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2009.03.016>
21. Gotze S, Wolter M, Reifenberger G, Muller O, Sievers S. Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 2010; 126:2584-93; PMID:19847810
22. Zhang N, Wei P, Gong A, Chiu WT, Lee HT, Colman H, Huang H, Xue J, Liu M, Wang Y, et al. FoxM1 Promotes beta-Catenin Nuclear Localization and Controls Wnt Target-Gene Expression and Glioma Tumorigenesis. *Cancer Cell* 2011; 20:427-42; PMID:22014570; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.016>
23. Gong AH, Wei P, Zhang S, Yao J, Yuan Y, Zhou A, Lang FF, Heimberger AB, Rao G, Huang S. FoxM1 drives a feed-forward STAT3 activation loop that promotes self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Res* 2015
24. Huang FI, Chen YL, Chang CN, Yuan RH, Jeng YM. Hepatocyte growth factor activates Wnt pathway by transcriptional activation of LEF1 to facilitate tumor invasion. *Carcinogenesis* 2012; 33:1142-8; PMID:22436613; <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgs131>
25. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:89-103; PMID:22270953; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3205>
26. Yang W, Xia Y, Ji H, Zheng Y, Liang J, Huang W, Gao X, Aldape K, Lu Z. Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* 2011; 480:118-22; PMID:22056988; <http://dx.doi.org/10.1038/nature10598>
27. Boon EM, van der Neut R, van de Wetering M, Clevers H, Pals ST. Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; 62:5126-8; PMID:12234972
28. Kim KH, Seol HJ, Kim EH, Rhee J, Jin HJ, Lee Y, Joo KM, Lee J, Nam DH. Wnt/beta-catenin signaling is a key downstream mediator of MET signaling in glioblastoma stem cells. *Neuro Oncol*; 15:161-71
29. Garnett J, Chumbalkar V, Vaillant B, Gururaj AE, Hill KS, Latha K, Yao J, Priebe W, Colman H, Elferink LA, et al. Regulation of HGF expression by DeltaEGFR-mediated c-Met activation in glioblastoma cells. *Neoplasia* 2013; 15:73-84; PMID:23359207; <http://dx.doi.org/10.1593/neo.121536>
30. Piedra J, Miravet S, Castano J, Palmer HG, Heisterkamp N, Garcia de Herreros A, Dunach M. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* 2003; 23:2287-97; PMID:12640114; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.23.7.2287-2297.2003>
31. David MD, Yeramian A, Dunach M, Llovera M, Canti C, de Herreros AG, Comella JX, Herreros J. Signalling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential beta-catenin phosphorylation. *J Cell Sci* 2008; 121:2718-30; PMID:18664491; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.029660>
32. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 2004; 18:2225-30; PMID:15371335
33. Ji H, Wang J, Nika H, Hawke D, Keezer S, Ge Q, Fang B, Fang X, Fang D, Litchfield DW, et al. EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated dissociation of alpha-Catenin from beta-Catenin and transactivation of beta-Catenin. *Mol Cell* 2009; 36:547-59; PMID:19941816; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.034>
34. Shi Z, Qian X, Li L, Zhang J, Zhu S, Zhu J, Chen L, Zhang K, Han L, Yu S, et al. Nuclear translocation of beta-catenin is essential for glioma cell survival. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7:892-903; PMID:22415719; <http://dx.doi.org/10.1007/s11481-012-9354-3>
35. Kim KH, Seol HJ, Kim EH, Rhee J, Jin HJ, Lee Y, Joo KM, Lee J, Nam DH. Wnt/beta-catenin signaling is a key downstream mediator of MET signaling in glioblastoma stem cells. *Neuro Oncol* 2012; 15:161-71; PMID:23258844; <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/nos299>
36. Liu W, Fu Y, Xu S, Ding F, Zhao G, Zhang K, Du C, Pang B, Pang Q. c-Met expression is associated with time to recurrence in patients with glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 2011; 18:119-21; PMID:20832323; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2010.05.010>
37. Xie Q, Bradley R, Kang L, Koeman J, Ascierio ML, Worschech A, De Giorgi V, Wang E, Kefene L, Su Y, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) autocrine activation predicts sensitivity to MET inhibition in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 109:570-5; PMID:22203985; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1119059109>
38. Yamashita Y, Kasugai I, Sato M, Tanuma N, Sato I, Nomura M, Yamashita K, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T, et al. CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples. *J Neurooncol* 2010; 100:43-9; PMID:20217459; <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-010-0147-3>
39. Vijayakumar S, Liu G, Rus IA, Yao S, Chen Y, Akiri G, Grumolato L, Aaronson SA. High-frequency canonical Wnt activation in multiple sarcoma subtypes drives proliferation through a TCF/beta-catenin target gene, CDC25A. *Cancer Cell* 2011; 19:601-12; PMID:21575861; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.03.010>
40. Barralolo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 2005; 132:3151-61; PMID:15983400; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01907>
41. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehenbre F. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *Embo J* 2006; 25:3534-45; PMID:16858414; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601213>
42. Garcia de Herreros A, Baulida J. Cooperation, amplification, and feed-back in epithelial-mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1825:223-8; PMID:22306657
43. Cadigan KM, Waterman ML. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4; PMID:23024173
44. Li Z, Wang C, Jiao X, Lu Y, Fu M, Quong AA, Dye C, Yang J, Dai M, Ju X, et al. Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling. *Mol Cell Biol* 2006; 26:4240-56; PMID:16705174; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.02124-05>
45. Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol* 2006; 1:97-117.
46. Chang SF, Chen LJ, Lee PL, Lee DY, Chien S, Chiu JJ. Different modes of endothelial-smooth muscle cell interaction elicit differential beta-catenin phosphorylations and endothelial functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:1855-60; PMID:24449884; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1323761111>
47. Monga SP, Mars WM, Peditakis P, Bell A, Mule K, Bowen WC, Wang X, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Res* 2002; 62:2064-71; PMID:11929826
48. Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K. A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6144-52; PMID:17062691; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1418>
49. Boccaccio C, Comoglio PM. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:637-45; PMID:16862193; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1912>
50. Gnessouf F, Zhang Y, diPierro C, Marcinkiewicz L, Sarkaria J, Schiff D, Buchanan S, Abounader R. An orally bioavailable c-Met kinase inhibitor potently inhibits brain tumor malignancy and growth. *Anticancer Agents Med Chem* 2010; 10:28-35; PMID:20015006; <http://dx.doi.org/10.2174/1871520611009010028>
51. Navis AC, Bourgonje A, Wesseling P, Wright A, Hendriks W, Verrijp K, van der Laak JA, Heerschap A, Leenders WP. Effects of dual targeting of tumor cells and stroma in human glioblastoma xenografts with a tyrosine kinase inhibitor against c-MET and VEGFR2. *PLoS One* 2013; 8:e58262
52. Matteucci E, Bendinelli P, Desiderio MA. Nuclear localization of active HGF receptor Met in aggressive MDA-MB231 breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2009; 30:937-45; PMID:19357348; <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgp080>
53. Ancot F, Leroy C, Muharram G, Lefebvre J, Vicogne J, Lemiere A, Kherrouche Z, Foveau B, Poutier A, Melnyk O, et al. Shedding-generated Met receptor fragments can be routed to either the proteasomal or the lysosomal degradation pathway. *Traffic* 2012; 13:1261-72; PMID:22672335; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01384.x>
54. Ancot F, Foveau B, Lefebvre J, Leroy C, Tulasne D. Proteolytic cleavages give receptor tyrosine kinases the gift of ubiquity. *Oncogene* 2009; 28:2185-95; PMID:19421148; <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.88>
55. Niehrs C, Acebron SP. Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *Embo J* 2012; 31:2705-13; PMID:22617425; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.124>

56. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007; 7:415-28; PMID:17508028; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2131>
57. Han SP, Kim JH, Han ME, Sim HE, Kim KS, Yoon S, Baek SY, Kim BS, Oh SO. SNAI1 is involved in the proliferation and migration of glioblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31:489-96; PMID:21225336; <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-010-9643-4>
58. Yang HW, Menon LG, Black PM, Carroll RS, Johnson MD. SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas. *BMC Cancer* 2010; 10:301; PMID:20565806; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-10-301>
59. Pallares J, Martinez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X. Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2004; 204:569-77; PMID:15481028; <http://dx.doi.org/10.1002/path.1666>
60. Pallares J, Santacana M, Puente S, Lopez S, Yeramian A, Eritja N, Sorolla A, Llobet D, Dolcet X, Matias-Guiu X. A review of the applications of tissue microarray technology in understanding the molecular features of endometrial carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2009; 31:217-26; PMID:19736869
61. Pallares J, Velasco A, Eritja N, Santacana M, Dolcet X, Cuatrecasas M, Palomar-Asenjo V, Catusas L, Prat J, Matias-Guiu X. Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 2008; 21:691-9; PMID:18469797; <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2008.38>
62. Anido J, Saez-Borderias A, Gonzalez-Junca A, Rodon L, Folch G, Carmona MA, Prieto-Sanchez RM, Barba I, Martinez-Saez E, Prudkin L, et al. TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 2010; 18:655-68; PMID:21156287; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.023>

INHIBITION OF WNT/ β -CATENIN SIGNALLING UPREGULATES p62 AND SENSITIZES GLIOBLASTOMA CELLS TO AUTOPHAGY BLOCKERS

Nager M, Sallán MC[§], Visa A[§], Santacana M[#], Macià A, Cantí C[§] & Herreros J*

Departments of Basic Medical Sciences and Experimental Medicine[§], University of Lleida, IRBLleida. Immunohistochemistry Unit[#], IRBLleida. Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain.

*Corresponding author: j.herreros@cmb.udl.cat; phone: 00-34-973702950

Mireia Nager, Department of Basic Medical Sciences, University of Lleida, IRBLleida. Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain (mireia.nager@cmb.udl.cat).

Marta Crespi Sallán, Department of Experimental Medicine, University of Lleida, IRBLleida, Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain (marta.crespi@mex.udl.cat).

Anna Visa, Department of Experimental Medicine, University of Lleida, IRBLleida, Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain (annavisa@mex.udl.cat).

Maria Santacana, Immunohistochemistry Unit, IRBLleida. Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain (msantacana@irblleida.cat).

Anna Macià, Department of Experimental Medicine, University of Lleida, IRBLleida, Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain (anna.macia@mex.udl.cat).

Carles Cantí, Department of Experimental Medicine, University of Lleida, IRBLleida, Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain (c.canti@mex.udl.cat).

Judit Herreros, Department of Basic Medical Sciences, University of Lleida, IRBLleida. Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Spain (j.herreros@cmb.udl.cat).

Note: The authors declare no conflict of interests.

ABSTRACT

Wnt/ β -catenin signalling promotes cancer cell proliferation and stemness. Furthermore, recent evidence indicates that autophagy regulates Wnt signalling. Here we investigated the impact of inhibiting Wnt signalling on autophagy in glioblastoma (GBM), a devastating brain tumour.

Inhibiting or silencing TCFs or silencing β -catenin upregulated p62 in GBM at transcriptional and protein levels and, in turn, autophagy. Treatment with Dickkopf, a canonical Wnt receptor antagonist, also induced autophagic flux. Importantly, TCF inhibition regulated autophagy through mTOR inhibition and dephosphorylation and nuclear translocation of TFEB, a master regulator of lysosomal biogenesis and autophagy. TCF inhibition/silencing additionally affected GBM cell proliferation and migration.

Autophagy induction followed by its blockade can promote cancer cell death. In agreement with this notion, halting both TCF/ β -catenin and autophagy pathways decreased cell viability and induced apoptosis of GBM cells through a p62-dependent mechanism involving caspase-8. *In vivo* experiments further underline the therapeutic potential of such dual targeting in GBM.

Keywords: Wnt, TCF, autophagy, glioblastoma, p62, TFEB.

Running title: Wnt signalling inhibition triggers autophagy

INTRODUCTION

Gliomas are primary brain tumours classified into different malignancy grades (World Health Organization, WHO): diffuse astrocytoma (grade II), anaplastic astrocytoma (grade III) and glioblastoma multiforme (GBM; grade IV) (1,2). GBMs are the most common and aggressive gliomas, presenting a poor prognosis and median survival below 14 months (3). GBM features are a high infiltrative/invasive capacity, apoptosis resistance, necrosis and angiogenesis (4). Standard treatment consists of extensive surgery, followed by radiotherapy and chemotherapy with the alkylating agent temozolomide. Despite treatment, GBM recurrence is unfortunately very common. Therefore, there is an urgent need of novel therapies for this non-curable disease (5).

Canonical Wnt signalling has important functions in development and in cell proliferation. Aberrant activation of Wnt signalling is therefore linked to tumorigenesis (6,7). The main effector of the Wnt canonical pathway is β -catenin (8), which acts together with transcription factors of the TCF/LEF (T Cell-specific Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor) families to control expression of Wnt target genes. In the absence of Wnt ligands, β -catenin associates with the destruction complex that includes Glycogen Synthase Kinase (GSK)-3 β , a Ser/Thr kinase that phosphorylates β -catenin, leading to its proteasomal degradation. Upon Wnt binding to Frizzled and Lipoprotein-Related Protein (LRP)5/6 receptors, the destruction complex destabilizes. Unphosphorylated β -catenin then escapes from degradation and translocates to the nucleus (8). Wnt antagonists, such as the extracellular antagonist of LRP5/6 Dickkopf (DKK), control Wnt signalling. Unlike other cancers, β -catenin mutations are infrequent in GBM and Wnt signalling activation appears to occur by upregulation of Wnt ligands (9) or epigenetic regulation of Wnt inhibitors (2,10). Additional mechanisms include control by upstream protooncogenes (11), overexpression of the scaffold protein Dishevelled2 (Dvl) (12) and activation of β -catenin nuclear signalling (10,13).

Macroautophagy (referred to as autophagy) is a conserved adaptive response that recycles cellular components to provide nutrients under metabolic cell stress. During autophagy, double membrane vesicles, autophagosomes, engulf damaged proteins and organelles. These then fuse with lysosomes, where the cargo is degraded, providing biosynthetic and energy precursors, thus contributing to the survival of

tumour cells in unfavourable conditions (14). Autophagy in cancer plays a dual role. In early stages of tumourigenesis, it acts as a tumour suppressor preventing accumulation of damaged proteins/organelles. However, in advanced stages, autophagy provides tolerance against metabolic stress under nutrient deprivation and confers resistance to radio and chemotherapy (15). Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) regulates cell growth, proliferation and anabolic processes and its inhibition is central to autophagy induction (16).

Interestingly, autophagy and Wnt/ β -catenin signalling appear inversely regulated in cancer. The Wnt pathway component Dvl maintains GBM cell proliferation through canonical and non-canonical Wnt signalling (12). In turn, autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dvl (17) and β -catenin degradation (18). Furthermore, the TCF/ β -catenin complex represses p62/SQSTM1 (18), an autophagosome protein responsible for binding to LC3 (a microtubule-associated protein that, once lipidated, associates with autophagosomes) and cargo recognition (19). Finally, Wnt signalling (involving GSK-3 inhibition) activates mTOR and protein translation (20).

Here we sought to elucidate the effects of inhibiting Wnt/ β -catenin signalling on autophagy in GBM cell lines and biopsy-derived cell cultures. To this end, we inhibited TCF/ β -catenin using the pharmacological inhibitor FH535, silencing TCF4 or β -catenin by shRNA/siRNA or challenging the cells with the Wnt receptor antagonist DKK. We found that inhibition of Wnt signalling in GBM upregulates p62 and consequently, autophagic flux through mTOR inhibition and nuclear translocation of Transcription Factor EB (TFEB), a master regulator of autophagosome/lysosome biogenesis (21,22). Moreover, our data show that autophagy induction renders GBM cells more sensitive to cell death by autophagy blockers, which could be exploited in future therapies.

RESULTS

p62 levels increase in GBM and inversely correlate with β -catenin

To test p62 protein levels in diffuse astrocytoma, anaplastic astrocytoma and GBM (grade IV) samples, we performed an immunohistochemical analysis in tissue microarrays (TMAs). p62 was detectable in grade II astrocytomas and its levels increased in GBMs (8.78 fold, GBM vs. astrocytomas; $p=0.003$) (Figs. 1A and 1D). Further analysis using the GlioVis platform (23) confirmed the increase of p62 mRNA levels in GBMs compared to non-tumour or astrocytoma samples ($p<0.001$; Fig. 1B).

Previous studies in colorectal carcinoma cells (18) described an inverse relationship between p62 and β -catenin. Data obtained from GlioVis platform confirmed this observation in GBM (Fig. 1C; $p=0.01$), which was corroborated in GBM biopsy-derived cell cultures and established cell lines (Fig. 1D). A comparison of autophagic markers and the levels of β -catenin or CyclinD1 (a Wnt/ β -catenin target) indicated an inverse relationship in several GBM cases (Fig. 1E), further suggesting a negative association between Wnt/ β -catenin signalling and autophagy or vice versa.

Wnt/ β -catenin signalling regulates p62 through TCF transcriptional regulation

To investigate how Wnt/ β -catenin signalling modulates p62, GBM cell lines were treated with Wnt3a to activate Wnt/ β -catenin signalling or with FH535 (a TCF inhibitor that affects β -catenin recruitment (24)) to inhibit it. Wnt3a decreased p62 mRNA in the A172 cell line (Fig. 2A and see below). On the contrary, p62 expression (at both the mRNA and protein levels) increased after treatment with FH535 in U251-MG and U87-MG cell lines and in GBM primary cultures (Figs. 2A and 2B). We confirmed that Wnt3a and FH535 activate or inhibit Wnt signalling, respectively, by the TOP-Flash assay and expression of the target gene CyclinD1 (Supp. Fig. 1). A172 cells displayed higher p62 protein levels than U251-MG or U87-MG cells (Supp. Fig. 2), which may explain why p62 could not be further increased by FH535, but significantly decreased upon treatment with Wnt3a. To validate the results obtained using a pharmacological inhibitor of TCF, we transduced cells with lentiviruses carrying a shRNA targeting TCF4. Cells expressing the shRNA against TCF4 showed a 60-80% decrease in TCF4 mRNA, compared to cells expressing a scrambled shRNA (Fig. 2C). Parallel to this, cells expressing the shRNA of TCF4 presented an increase in p62 mRNA (1.8-2.3 fold vs.

scrambled; Fig. 2C) and protein (Fig. 2D) levels, consistent with FH535 results. Thus, TCF inhibition or silencing raises p62 expression in GBM cells.

Since β -catenin acts together with TCF, we next investigated the role of β -catenin in p62 regulation. First, we transfected GBM cells with siRNAs against β -catenin or GAPDH (used as control). We observed decreased β -catenin and increased p62 levels in U251-MG and U87-MG cells upon transfection of the β -catenin siRNA (Fig. 2E). By contrast, cells expressing a stabilized mutant form of β -catenin (S37Y) that is not degraded, presented lower levels of p62 compared to cells transfected with wild type (WT) β -catenin (Fig. 2F). Together, these results confirm that β -catenin/TCF signalling transcriptionally represses p62 in GBM.

Inhibition of Wnt/ β -catenin signalling increases the autophagic flux in GBM

Next, we aimed to understand the functional implications of the p62 regulation by Wnt/ β -catenin signalling. As p62 acts as a cargo receptor of autophagosomes, we studied the autophagic flux upon inhibition of Wnt signalling. First, we reduced the activity of TCF with FH535. Analysis of autophagy markers showed an increase of LC3-II in treated cells, indicative of increased autophagosome numbers. These results were paralleled by lower levels of polyubiquitinated proteins in GBM cells treated with FH535 (Fig. 3A), suggesting an enhancement of autophagy. To confirm whether the deregulation observed corresponds to an induction of autophagic flux, we used BafilomycinA1 (Baf), which prevents autophagosome–lysosome fusion and blocks autophagic flux. Increased autophagic flux would elevate LC3-II upon addition of Baf. If the increase in LC3-II in treatment plus Baf is higher than that of Baf alone, results should be interpreted as autophagic flux induction. Instead, LC3-II levels unaltered by Baf should be interpreted as autophagy blockade and accumulation of autophagosomes (25). We treated GBM cells with or without FH535 for 24h together with Baf (last 2h). Treatment with FH535 and Baf showed higher levels of LC3-II compared to Baf alone (Fig. 3B), indicating autophagy induction by FH535. Importantly, similar results were obtained in GBM primary cultures (Fig. 3B). These results showed that autophagic flux is augmented by inhibition of TCF in GBM.

To assess the involvement of Wnt signalling in autophagy regulation at an upstream level of the Wnt/ β -catenin pathway, we treated GBM cell lines with DKK (a Wnt

antagonist acting at the Wnt receptor level). We treated cells with DKK alone or together with Baf. Results showed increased LC3-II levels in cells co-treated with DKK and Baf compared to cells treated with Baf alone (Fig. 3C), showing that DKK induced autophagy.

The regulation of autophagy by inhibition of Wnt signalling was additionally addressed by transfecting a tandem-tagged LC3 plasmid (ptLC3/mRFP-EGFP)(26). Autophagosomes that incorporated ptfLC3 appear yellow (as a result of the co-localization of mRFP and EGFP fluorescences), which distinguished them from autophagolysosomes (presenting a red fluorescence due to quenching of EGFP in the lysosomes). Rapamycin, an autophagy inducer that inhibits mTOR, increased the number of red puncta (Fig. 3D). In contrast, treatment with the autophagy blocker chloroquine (CQ) elevated the number of yellow puncta (Fig. 3D). FH535 or DKK produced a red puncta pattern, similar to that obtained with Rapamycin, demonstrating increased numbers of autophagolysosomes and autophagy induction (Fig. 3D).

Finally, we used immunocytochemistry against p62 and LC3 proteins to study autophagy regulation upon TCF inhibition. Immunostainings from cells treated with FH535 were compared to those achieved after treatment with the autophagy inducer rapamycin or with the blockers, CQ and Baf. Rapamycin moderately increased the number of LC3 and p62 puncta, as a result of elevated autophagolysosome numbers caused by autophagy induction. Furthermore, CQ or Baf produced a huge increase in LC3 and p62 puncta, and these appeared bigger, suggesting that they corresponded to the fusion of autophagosomes caused by autophagy blockade. Interestingly, FH535 moderately increased the number of p62 and LC3 puncta, similarly to rapamycin (Supp. Fig. 3). To demonstrate that the increase in p62 and LC3 puncta is due to an induction of autophagy, we also performed the LC3 and p62 immunostainings under FH535 and CQ combined treatments. Results showed higher increases in the numbers of LC3 and p62 puncta when comparing the increase in FH535 and CQ co-treatment vs. CQ alone with that obtained in FH535 vs. control (Fig. 4). Together, our results demonstrate that inhibition of Wnt/ β -catenin signalling, through DKK or TCF inhibition, promotes autophagic flux in GBM.

Inhibition of TCF diminishes mTOR signalling and produces TFEB nuclear translocation

Ser/Thr kinase mTOR occupies a central position integrating positive and negative stimuli that trigger autophagy (16,27). We asked whether TCF inhibition leads to autophagy via inhibition of mTOR. U251-MG and U87-MG cells treated with FH535 showed reduced phosphorylation of p70S6K (an established mTOR substrate) (Fig. 5A), indicating that mTOR is inhibited upon FH535 treatment. Similar results were obtained by treating the cells with the mTOR inhibitor rapamycin, which abolished p70S6K phosphorylation (Fig. 5A). AKT and ERK proteins positively regulate the activity of mTOR by phosphorylating and inhibiting TSC1/2 (16). Thus, inhibition of AKT and ERK decreases mTOR activity and promotes autophagy. In line with this, FH535 decreased the phosphorylation of AKT and ERK in U87-MG cells, but not in the U251-MG cell line (Fig. 5A). These results suggest that TCF inhibition decreases mTOR activity to induce autophagy, through AKT and ERK in U87-MG cells.

TFEB is a master regulator that controls lysosomal biogenesis by upregulating genes of the Coordinated Lysosomal Expression and Regulation (CLEAR) network and autophagy, including p62 (27,28). When nutrients are present, TFEB co-localizes with mTOR complex on the lysosomal membrane and phosphorylation of TFEB by mTOR inhibits TFEB activation. Nutrient starvation or pharmacological inhibition of mTOR activates TFEB (dephosphorylated TFEB) by promoting its nuclear translocation (27,29,30). We hypothesized that the mechanism by which TCF inhibition induces autophagy could involve TFEB nuclear translocation and, subsequently, p62 upregulation. To investigate the effect of TCF inhibition on TFEB, we analyzed lysates of cells treated with FH535 or deprived of serum. In basal conditions, TFEB immunoblot showed two bands that correspond to phosphorylated (upper band) and unphosphorylated (lower band) forms (29,30). Under deprivation the lower unphosphorylated form prevails, as expected (Fig. 5B). Interestingly, GBM cells treated with FH535 mostly displayed the TFEB lower band, similarly to the deprivation condition. These results suggested that TCF inhibition reduces mTOR activity and promotes TFEB dephosphorylation, which has been linked to its activation (21,28,29). We next examined whether TFEB dephosphorylation associated with its nuclear translocation. We observed that under control conditions TFEB localized in the

cytoplasm. However, interestingly, after deprivation or FH535 treatments, TFEB was nuclear in both GBM cell lines and primary cultures (Fig. 5C). Together, these results indicate that inhibition of TCF induces autophagy through mTOR inhibition and TFEB activation. As TFEB activation controls p62 expression, these results suggest a mechanism for p62 upregulation by FH535 leading to increased autophagy.

TCF inhibition decreases GBM cell proliferation and migration

Autophagy and cell proliferation are subject to a complex regulation, whereby mTOR links both processes by positively regulating cell growth and proliferation and negatively affecting autophagy. Furthermore, oncogenic Wnt/ β -catenin signalling is involved in cell proliferation and increases mTOR activity (12,20,31). We examined the effects of TCF inhibition or autophagy blockade on cell proliferation by treating GBM cell lines with FH535, Baf or CQ. Trypan Blue exclusion counting indicated that all treatments decreased the number of live cells (Fig. 6A). Next, immunostaining against the proliferation marker Ki67 further showed a decrease in cell proliferation by the three treatments, compared to control cells (Supp. Fig. 4A). Furthermore, we studied the effects of TCF4 gene silencing on U87-MG cell proliferation in a series of lentiviral-driven shRNA experiments. Both Trypan blue assays (Fig. 6B) and Ki67 immunostaining (Supp. Fig. 4B) showed a significant decrease in proliferation in shRNA-TCF4 cells compared to control (scrambled shRNA) cells, in agreement with the results obtained with FH535. In addition, clonogenic assays showed a significant decrease in the capacity to form colonies of TCF4-silenced cells compared to control (scrambled shRNA) U87-MG cells (Fig. 6C).

The effect of FH535 on GBM cell migration was also explored based on the well-known involvement of Wnt signalling in this process (32). The effects of FH535 were compared to those of Baf and CQ in wound-healing assays. FH535 reduced cell migration into the wound area by approximately 50% and 30% in U251-MG cells and U87-MG cells, respectively, vs. controls (Supp. Fig. 5A). Consistently, similar results were obtained in TCF4-silenced U87-MG cells (Supp. Fig. 5B). However, treatment with Baf or CQ did not significantly affect cell migration. Together, our results indicate that FH535 reduces GBM cell proliferation and migration.

Dual inhibition of TCF and autophagy promotes GBM cell apoptosis by a p62-dependent caspase-8 activation

TCF inhibition led to autophagy induction accompanied by decreased cell proliferation. Upregulating and then blocking autophagy can induce cell death in cancer cells. In GBM cells, treatment with FH535 or with autophagy blockers (Baf or CQ) alone had only modest effects on cell proliferation or viability (Figs. 6D, 6E and Supp. Fig. 4C). Interestingly, combined treatment using FH535 and autophagy blockers reduced cell viability to approximately 50% compared to controls (Figs. 6D and 6E). Similar results were obtained when TCF4-silenced U87-MG cells were treated with autophagy blockers (Fig. 6F). We next sought to determine whether this decrease in cell viability was due to cell proliferation or cell death effects. We performed Annexin V/propidium iodide (PI) assays to assess cell death in GBM cells treated with FH535 or with autophagy blockers alone or in combination. Whereas single treatments did not induce major effects, the combined treatments (FH535 and Baf or CQ) notably increased the percentage of cells in late apoptosis and reduced the number of live cells (Fig. 7A and Supp. Fig. 6A). These results were confirmed by Hoechst staining that demonstrated the presence of condensed nuclei in combined treatments, but not in single treatments (FH535 or Baf/CQ alone; Fig. 7B). Autophagy plays a role on caspase-8 activation and apoptosis (33,34). To elucidate whether apoptosis induced by the dual FH535 plus Baf/CQ treatment was mediated by caspase-8, cell lysates from single or dual treatments were immunoblotted for caspase-8. As expected, a band compatible with a caspase-8 cleavage product (p18) was obtained in combined but not in single treatments (Fig. 7C). To further elucidate the involvement of caspase-8, U87-MG glioma cells were transduced with a lentivirus carrying a shRNA targeting caspase-8. Interestingly, caspase-8-silenced cells treated with FH535 and Baf showed a reduction of the percentage of apoptotic cells compared to cells expressing caspase-8. These results suggest that, in part, caspase-8 mediates the apoptotic cell death caused by the dual treatment with FH535 and Baf (Fig. 7D, Supp. Fig. 6B). A role for p62 in the activation and cleavage of caspase-8 in autophagosomes has been previously described (33). To investigate whether p62 is required for cell death, we performed Annexin V/PI staining in control and p62-silenced GBM cells treated with the different drugs. As expected, FH535 plus Baf caused apoptosis in control cells. However,

importantly, the apoptotic population was absent in p62-silenced cells, indicating that p62 is needed for apoptosis induction (Fig. 7E and Supp. Fig. 6C). These results indicate that, by upregulating p62 and autophagy, FH536 sensitizes GBM cells to autophagy blockers induced cell death. Furthermore, apoptosis is mediated by the accumulation of active caspase-8 fragments and depends on p62.

Silencing TCF4 together with CQ administration reduces tumour growth *in vivo*

We finally investigated the effect of TCF4-silencing together with CQ treatment *in vivo*. First, we evaluated the anti-tumoural effects of silencing TCF4 in xenograft tumour growth. Control or TCF4-silenced U87-MG cells were xenografted into SCID mice. TCF4-silenced cells formed tumours significantly smaller than control cells, demonstrating the important role of TCF4 in tumour growth (Fig. 8A). Ki67 immunostaining showed decreased numbers of Ki67-positive cells in TCF4-silenced tumours compared to controls (Fig. 8C). Furthermore, p62 immunostaining presented higher cytoplasmic p62 immunoreactivity in TCF4-silenced tumours than in controls, confirming *in vitro* results (Fig. 8C). Next, we assessed the synergic anti-tumoural effects of silencing TCF4 and blocking autophagy by CQ treatment. Once tumours were formed, xenografted SCID mice were injected intraperitoneally either with CQ or vehicle. CQ treatment did not significantly affect growth of control tumours. However, CQ produced synergic anti-tumoural effects in TCF4-silenced tumours (Fig. 8B), in agreement with our *in vitro* results. Ki67 immunostaining did not show differences with CQ treatment (Fig. 8C). Immunostaining against p62 in CQ-treated control tumours showed a marked punctate pattern, indicating autophagosome accumulation. Interestingly, p62 immunostaining in TCF4-silenced tumours treated with CQ showed strong cytoplasmic and punctate staining (Fig. 8C). Altogether, these results demonstrate that targeting TCF4 and autophagy flux reduces tumour growth, probably through cell death induction mediated by the upregulation of p62.

DISCUSSION

Since aberrant activation of Wnt/ β -catenin signalling was linked to cancer, designing small molecules and strategies to target this pathway has been the focus of pharmaceutical and research teams (6,7,35). FH535 was identified as a TCF/ β -catenin inhibitor with anti-proliferative actions (24). Here we have addressed whether TCF inhibition could halt GBM progression. Moreover, the reported repression of *p62* (a key autophagy gene) by TCF/ β -catenin (18) prompted us to evaluate the consequences of inhibiting TCF in autophagy. Our work shows that inhibiting Wnt signalling (either using the pharmacological inhibitor FH535 or by silencing TCF4 or β -catenin) upregulates *p62* in GBMs. A stabilizing mutation of β -catenin, on the contrary, reduces *p62* expression. Therefore, autophagic flux increases upon TCF/ β -catenin inhibition because of *p62* upregulation (36). Furthermore, inhibition of TCF/ β -catenin signalling associates with decreased mTOR activity and promotes the nuclear translocation of TFEB, further enhancing autophagy. Importantly, enhancing autophagic flux by means of TCF/ β -catenin inhibition sensitizes GBM cells to autophagy blockers. Thus, dual targeting of TCF and autophagy induces GBM cell death and reduces tumour growth.

p62 is an essential protein in the autophagic process, acting as a cargo receptor in autophagosomes. Because *p62* is degraded by autophagy, its levels often inversely relate with autophagic flux (37). However, multiple pathways regulate *p62* expression (38,39) which hinders the interpretations of *p62* levels. *p62* increases in GBM cell lines, GBM biopsies and patient-derived cell cultures compared to low grade gliomas. These results suggest that autophagy is higher in GBM than in astrocytoma and normal CNS tissue (40). Similarly, Gao et al. (17) reported higher *p62* levels in late-stage colon cancer compared to early stages of the disease. In addition, *p62* and Dvl correlated, indicating that autophagy negatively regulates Wnt signalling through the Dvl and β -catenin clearance (17,18,41). Our results suggest a similar scenario in GBMs; high levels of CyclinD1 are present in GBMs displaying low *p62* and/or Beclin1. By de-repressing *p62* using FH535 (which affects the TCF/ β -catenin interaction) or by silencing either TCF4 or β -catenin, both *p62* expression and autophagic flux increase. This conclusion is attained by the use of Baf in the analysis of *p62* and LC3 and by flux experiments with a tandem LC3 construct. Remarkably, autophagic flux is also enhanced by DKK-1, indicating that interfering with Wnt canonical receptors positively

affects autophagy. Interestingly, DKK-3 was identified as a biomarker elevated in supernatants of highly-autophagic melanoma cell lines and in patient serums (49). Together, our results demonstrate that inhibiting Wnt signalling triggers autophagy while, conversely, autophagy reduces Wnt signaling (17,18). This cross-regulation illustrates a complex involvement of both Wnt signalling and autophagy in tumour initiation, progression and recurrence.

We have examined the mechanism involved in autophagy elevation by TCF/ β -catenin inhibition by analyzing mTOR activation. Wnt signalling through GSK3 activates the mTOR pathway to stimulate protein translation (20). Consequently, inhibition of TCF decreases mTOR signalling, as indicated by the phosphorylation of its target, p70S6. TFEB has recently emerged as a master regulator of autophagy and lysosomal biogenesis, promoting the expression of p62 and Lamp1 among other targets (21,22,27,42). Under starvation, mTOR inactivation on the surface of the lysosomal membrane, triggers TFEB activation (dephosphorylation) and its nuclear translocation (30,43). Herein, we demonstrate that autophagy induction by FH535 (like that promoted by serum deprivation) involves the dephosphorylation and nuclear translocation of TFEB in GBM cell lines and biopsy-derived cultures. These findings provide mechanistic insights into autophagy upregulation through Wnt/ β -catenin signalling inhibition.

Inhibiting/silencing TCFs reduces GBM cell proliferation and cell colony growth, in agreement with the pro-proliferative role of Wnt/ β -catenin pathway (31). Importantly, these results are confirmed in xenografted mice. Tumours formed by TCF4-silenced GBM cells are smaller and display lower numbers of Ki67-positive cells than those originated by control cells. In addition to the impact on cell proliferation, inhibiting TCF function reduces GBM cell migration in a wound-healing assay. GBM patients present poor prognosis, in part due to likely recurrences that originate from highly invasive cells. Together, our findings suggest that interfering with TCF function using molecules that pass the blood-brain barrier could help controlling GBM growth and progression. However, they also indicate that targeting Wnt signalling alone in GBM could favour pro-survival/adaptative responses that underlies resistance and recurrence.

Dual inhibition of TCF and autophagy induces GBM cell death. In agreement with this finding, autophagy induction by temozolomide sensitizes to GBM cell death by

autophagy blockers (44–46). The autophagosomal membrane can serve as a platform to mediate caspase-8 activation and to initiate the cascade of caspases leading to apoptosis (34). Here we find that the dual treatment results in caspase-8 cleavage. Furthermore, using p62 or caspase-8 silenced cells, we demonstrate that the cell death mechanism involves the cleavage of caspase-8, likely located in autophagosomes, in turn mediated by increased p62 (33) that result from TCF/ β -catenin inhibition. Thus, cells silenced for p62 expression under the combined treatment with the TCF inhibitor and Baf remain protected from cell death. *In vivo* xenografts experiments further illustrate the critical regulation of p62. Tumours formed by TCF4-silenced cells display strong p62 cytosolic immunostaining, denoting p62 upregulation. Tumours formed by TCF4-silenced cells and treated with CQ show dotted p62 immunostaining, due to the blockade of a robust autophagic flux. Furthermore, tumours from TCF4-silenced cells exposed to CQ are smaller than their controls.

Taking all data together, we propose that TCF/ β -catenin inhibition acts in two possible ways to increase p62 and autophagy flux in GBM: de-repression of p62 and mTOR inhibition leading to TFEB activation (Fig. 8D). According to shRNA experiments, p62 upregulation appears as a key step to promote GBM cell death by autophagy blockers. Thus, combined inhibition of TCF/ β -catenin and autophagy could provide novel therapeutic approaches for GBM.

Acknowledgements. We thank the Neurosurgery Unit (Hospital Universitari Arnau de Vilanova-Lleida) for collecting GBM biopsies. This work was funded by Instituto de Salud Carlos III/FEDER (“Una manera de hacer Europa”; PI13/01980 to JH). MN, MCS and AV were UdL predoctoral fellows. MN was funded by IRBLleida and AM by Marató-TV3 (151/C/2013). Work supported by IRBLleida-Biobank (B.0000682) and Plataforma Biobancos PT13/0010/0014. This article received a grant for linguistic revision from the UdL Language Institute (2016 call).

Materials and Methods

Reagents and antibodies

Most biochemical reagents were from Sigma-Aldrich: rapamycin (R8781), puromycin (P7255), CQ (C6628) and FH535 (F5682); Wnt3a (315-20) and DKK-1 (120-45) were from Peprotech and Baf (sc-201550) from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies were: β -catenin (610153), CyclinD1 (DCS-6; 556470) and ERK (610124) from BD Biosciences; p62 (NBP1-48320), Beclin (NB110-87318) and LC3 (NB100-2331) from Novus Biologicals; TFEB (A303-673A) from Bethyl Laboratories; pAKT (9271S), pERK (9107) and phosphorylated p70S6K (2055) from Cell Signalling; AKT (sc-1618) from Santa Cruz Biotechnology; Caspase-8 (AM46) from Calbiochem and β -actin (A5441) from Sigma.

Cell culture

Tumour biopsies were obtained from Hospital Universitari Arnau de Vilanova (Lleida, Spain) and processed within 30 min from surgery. All patients signed informed consents prior to biopsy collection and the study was approved by the local Ethics Committee of Human Experimentation. Primary GBM cultures were established as described (13). Briefly, tissue was washed and digested in phosphate buffered saline (PBS) containing 155 U/ml of collagenase I (Worthington; LS004194) and 12 mg/ml of DNase-I (Sigma DN25). Cell suspension was filtered and washed before plating in Dulbecco's Minimal Essential Medium (Lonza BE12-741F) media containing 10% foetal bovine serum (FBS; Gibco 10270098).

GBM cell lines A172, U251-MG and U87-MG were obtained from CLS Cell Lines Service (Eppelheim, Germany). Cells were maintained in Minimal Essential Medium (Lonza BE12-125F) media containing 10% FBS, penicillin/streptomycin (Gibco 15140-122), L-glutamine (Gibco 25030-081), 1% aminoacids (Gibco 11140-035) and 1% sodium pyruvate (Gibco 11360-039) at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere.

Transfection, LC3 tandem construct and luciferase assay

GBM cells were plated the day before transfection at 80% of confluency. For knockdown with siRNA sequences, RNAimax Lipofectamine was used. Briefly, 25 μ l of Optimem (Gibco 31985-047) containing siRNA (80 nM; Sigma VPDSIRNA2D for β -catenin and PDSIRNA2D for GAPDH) were mixed with 25 μ l of Optimem plus 1 μ l of

RNAimax Lipofectamine (Invitrogen 13778075). The mix was incubated for 15 min at room temperature (RT) and added dropwise to cells for 6h. Then media was changed for complete media (MEM including FBS). For transfection of tandem-tagged LC3 (ptLC3) or TOP-Flash plasmids using Lipofectamine-2000 (Invitrogen 11668-027), the procedure was as described previously (13).

The ptfLC3 plasmid, a kind gift from Dr. T. Yoshimori (University of Osaka, Japan (26)), is an LC3 tandem tagged construct that contains the green fluorescent protein pEGFP-LC3 and the red fluorescent protein mRFP-LC3. After 24h of transfection, cells were treated with 10 μ M FH535, 25 μ M CQ or 500nM rapamycin for 24h. At 48h (after 24h of transfection), cells were pictured under an epifluorescence microscope and analyzed for co-localization of green and red puncta. Quantification was performed using ImageJ software.

To determine β -catenin transcriptional activation status, luciferase assay was performed following transfection of the TOP-Flash plasmid that carries a synthetic promoter containing 3 copies of the TCF-4 binding site upstream of a firefly luciferase reporter gene, as described elsewhere (13).

Western blot

Cells were washed with PBS and lysed in Tris 62,8 mM pH 6,8 and 2% SDS. Cell lysates were resolved in 10 to 15% SDS-PAGE gels and transferred to a PVDF membrane (Merck-Millipore IPVH00010). Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (Fisher Scientific; BP9701-100) or milk and incubated overnight with primary antibodies. Blots were developed using Enhanced Chemiluminescence (ECL; Thermo Scientific 32106) or Luminata Forte horseradish peroxidase substrate (Merck-Millipore WBLUF0100). Band intensities were normalized against β -actin (used as loading control) using ImageJ software.

Immunofluorescence

Cells were cultured on poly-D-lysine (Sigma P7280) glass coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma P-1213; 15 min, RT), washed with PBS, blocked and permeabilized in PBS containing 5% FBS, 5% horse serum, 0.2% glycine and 0.1% Triton X100 (or 0.3% in the case of TFEB immunostaining) before incubation with primary

antibodies. Secondary antibodies were coupled to Alexa-Fluor488 (Life technologies; A11001 or A11008) or Alexa-Fluor594 (Life technologies; A21207 or A11005). Hoechst (Sigma B2261) was included with the secondary antibodies mix to stain nuclei. Coverslips were mounted on Mowiol (Merck 475904). Micrographs were obtained using an inverted Olympus IX70 microscope (10x, 0.3 NA or 10x, 0.4 NA) equipped with epifluorescence optics and a camera (Olympus OM-4 Ti). Images were acquired using DPM Manager Software.

shRNA-induced gene silencing by lentiviral infection

Lentiviral-based vectors for RNA interference-mediated gene silencing were pLKO.1-puro (Mission-RNA, Sigma-Aldrich), containing a shRNA of TCF4 (TRCN0000015037; a kind gift of A. Yeramian) or p62 (TRCN0000007237), and FSV vector containing a shRNA of caspase-8 (47). Lentiviral particles were produced in HEK293T (human embryonic kidney) cells for 72h upon transfection of the shRNA vectors together with psPAX2 and pMD2G plasmids using polyethylamine, Medium was then centrifuged (2500 rpm) and filtered through 0,45 μm . Cells were incubated with medium containing lentiviral particles for 24h. Then, medium was replaced to allow the knockdown for 4 or more days. pLKO.1-puro vectors contain a puromycin resistance site. Puromycin (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to the media to select for resistant cells and to generate stable target-deficient GBM cell lines.

Real time PCR

RNA was isolated using a Nucleospin RNA isolation kit (Macherey-Nagel, 74095550). 1 μg of mRNA was reverse transcribed to cDNA (25 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ for 1h and 95 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min) using Superscript II reverse transcriptase (Applied Biosystems 4308228). 1 μl of cDNA was analyzed by quantitative PCR (qPCR; ABI Prism 7000HT, Applied Biosystems). Assays were based on TaqMan hydrolysis probes labeled with FAM. Gene-specific probes for p62 (Hs00177654_m1), TCF4 (Hs00162613_m1) and GAPDH (as control, Hs99999905_m1) were selected from Applied Biosystems. Samples were assayed in triplicate for each gene and relative expression calculated by the $\Delta\Delta\text{C}_\tau$ method (Applied Biosystems).

Wound healing assay

GBM cells were plated in 24-well plates and cultured to 100% confluency. A wound was created by scrapping the cell monolayer with a 200 μ l pipette tip. Cells were then treated as indicated. Cell migration into the wound area was recorded by picturing the wound area at 0 and 24h in 6 selected microscopic fields for each condition and time point. The distance travelled by cells was calculated by measuring the wound width using ImageJ.

Cell viability assay

Cell viability was measured by the WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate; Roche 05015944001) colorimetric assay. Cells were plated on 96-well plates (5000 cells/well), treated for 48h and then incubated for 60–120 min with 0.5 mg/ml WST-1. Absorbance was measured at 440 nm using a reference filter at 620 nm wavelength in a microplate reader (Bio-Rad Laboratories). Viability assays were performed in at least three independent experiments, using triplicate measurements per condition.

Clonogenic assays

For clonogenic assays, 500 cells/well were plated in 6-well plates. Cells were incubated for 10 days and stained with MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, 0.5 mg/ml; Sigma M2128). Colony numbers were counted using the Cell Counter ImageJ plugin.

Apoptosis analysis

For nuclear staining, cells were incubated with Hoechst (5 μ g/ml, 15 min) and condensed nuclei counted under an epifluorescence microscope. For Annexin V/PI staining, cells were trypsinized, washed in PBS and centrifuged. Cells were stained (15 min, RT) with Annexin V-FITC or -APC (Immunotools; 31490013 or 31490016) and PI (0.02 mg/ml; Sigma P4170). The % of apoptotic cells was evaluated using FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). 20.000 cells were recorded per condition in three independent experiments.

Xenografts

Severe Combined Immunodeficient (SCID) mice (12 week old; 20-25 g; maintained in Specific Pathogen Free conditions in the Animal House of UdL-IRBLleida) were subcutaneously injected with TCF4-deficient or control (scrambled shRNA) U87-MG cells (3×10^6 cells) suspended in 50 μ l of PBS. The study was approved by the local Ethics Committee of Animal Experimentation. Tumours were allowed to grow for 30 days. Xenografted mice were treated with intraperitoneal daily injections of CQ (25mg/kg) or vehicle (PBS; approx. 150 μ l) during two consecutive weeks and tumours measured every two days using a caliper. Tumour size was calculated using the formula: tumour weight (mg) = $(D \times d^2)/2 = \text{mm}^3$.

Immunohistochemistry

Two Tissue microarrays (TMAs) were constructed (13) including a total of 74 brain tissue samples: 7 samples of grade II astrocytomas, 10 samples of grade III astrocytomas and 57 samples of GBMs, which were formalin fixed and paraffin embedded. Samples were obtained with support by IRBLleida-Biobank (B.0000682) and Plataforma Biobancos (PT13/0010/0014).

Animal and human paraffin blocks were sectioned and slides prepared for immunohistochemistry. The procedure of deparaffinization, rehydration, epitope retrieval, and staining was performed as described (13). The primary antibodies used were against p62 (1:3000 dilution, 48320, Novus Biologicals) and Ki67 (Ready to Use, IR626, DAKO). Immunoexpression was graded semi-quantitatively by considering the percentage and intensity of the staining. A histological score was obtained from each sample, ranging from 0 (no immunoreaction) to 300 (maximum immunoreactivity) (13,48).

Gliovis and statistical analysis

Glioma expression data of the REMBRANDT and TCGA dataset were analyzed through the Gliovis portal (<http://gliovis.bioinfo.cnio.es>) (23).

All experiments are represented as mean \pm s.e.m. Student's t-test was performed. * indicates $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Abbreviations

β -act β -actin

β -cat β -catenin

Baf Bafilomycin

CQ Chloroquine

DKK Dickkopf

Dvl Dishevelled-2

ERK Extracellular-signal regulated kinase

FBS Foetal bovine serum

GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GBM Glioblastoma Multiforme

GSK-3 Glycogen synthase kinase-3

LRP Lipoprotein-related protein

mTOR mammalian Target of Rapamycin

MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

PBS Phosphate buffered saline

PI Propidium iodide

SCID Severe combined immunodeficient

TCF T-cell factor

TFEB Transcription factor EB

TMA Tissue microarray

WST-1 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate

WT wild-type

References

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007; 114(2):97–109.
2. Nager M, Bhardwaj D, Cantí C, Medina L, Nogués P, Herreros J. β -Catenin Signalling in Glioblastoma Multiforme and Glioma-Initiating Cells. *Chemother Res Pract.* 2012: 192362.
3. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007; 21(21):2683–710.
4. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61(3):215-25-9.
5. Morokoff A, Ng W, Gogos A, Kaye AH. Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J Clin Neurosci.* 2015; 22(8):1219–26.
6. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8:387–98.
7. Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(12):997–1014.
8. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012; 149(6):1192–205.
9. Kaur N, Chettiar S, Rathod S, Rath P, Muzumdar D, Shaikh ML, et al. Wnt3a mediated activation of Wnt/beta-catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma. *Mol Cell Neurosci.* 2013; 54:44–57.
10. Zhang N, Wei P, Gong A, Chiu WT, Lee H Te, Colman H, et al. FoxM1 Promotes β -Catenin Nuclear Localization and Controls Wnt Target-Gene Expression and Glioma Tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2011; 20(4):427–42.
11. Zheng H, Ying H, Wiedemeyer R, Yan H, Quayle SN, Ivanova E V., et al. PLAGL2 Regulates Wnt Signaling to Impede Differentiation in Neural Stem Cells and Gliomas. *Cancer Cell.* 2010; 17(5):497–509.
12. Pulvirenti T, Van Der Heijden M, Droms LA, Huse JT, Tabar V, Hall A. Dishevelled

- 2 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity in human gliomas. *Cancer Res.* 2011; 71(23):7280–90.
13. Nágér M, Santacana M, Bhardwaj D, Valls J, Ferrer I, Nogués P, et al. Nuclear phosphorylated Y142 β -catenin accumulates in astrocytomas and glioblastomas and regulates cell invasion. *Cell Cycle.* 2015; 14(22):3644–55.
 14. Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16(8):461–72.
 15. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 2015; 34(7):856–80.
 16. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009; 122(Pt 20):3589–94.
 17. Gao C, Cao W, Bao L, Zuo W, Xie G, Cai T, et al. Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(8):781–90.
 18. Petherick KJ, Williams AC, Lane JD, Ordóñez-Morán P, Huelsken J, Collard TJ, et al. Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk. *EMBO J.* 2013; 32(13):1903–16.
 19. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007; 282(33):24131–45.
 20. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, et al. TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell.* 2006; 126(5):955–68.
 21. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Arencibia MG, Vetrini F, Erdin S, et al. TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. *Science.* 2011; 332(6036):1429–33.
 22. Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina D, Valenza M, Gennarino A, et al. A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. *Science.* 2009; 325:473–7.
 23. Bowman, R.; Wang, Q; Carro, A; Verhaak R; Squatrito M. Gliovis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. *Neuro Oncol.* 2016; 19(1):139–141.

24. Handeli S, Simon JA. A small-molecule inhibitor of Tcf/ β -catenin signaling down-regulates PPAR α and PPAR γ activities. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7(3):521–9.
25. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Arozana AA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016; 12(1):1-122.
26. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the Autophagosome Maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent tagged LC3. *Autophagy.* 2007; 3(5):452–60.
27. Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci.* 2013; 126(Pt 8):1713–9.
28. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14(5):283–96.
29. Martina JA, Chen Y, Gucek M, Puertollano R. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy.* 2012; 8(6):903–14.
30. Rocznik-Ferguson A, Petit CS, Froehlich F, Qian S, Ky J, Angarola B, et al. The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci Signal.* 2012; 5(228):ra42.
31. Niehrs C, Acebron SP. Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J.* 2012; 31(12):2705–13.
32. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(3):178–96.
33. Huang S, Okamoto K, Yu C, Sinicrope FA. P62/sequestosome-1 Up-regulation promotes ABT-263-induced caspase-8 aggregation/activation on the autophagosome. *J Biol Chem.* 2013; 288(47):33654–66.
34. Young MM, Takahashi Y, Khan O, Park S, Hori T, Yun J, et al. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2012; 287(15):12455–68.
35. Dihlmann S, Von Knebel Doeberitz M. Wnt/ β -catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. *Int J Cancer.* 2005; 113(4):515–24.

36. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 2005; 171(4):603–14.
37. Jiang P, Mizushima N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods.* 2015; 75:13–8.
38. Puissant A, Fenouille N, Auberger P. When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res.* 2012; 2(4):397–413.
39. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell.* 2009; 137(6):1001–4.
40. Jennewein L, Ronellenfitsch MW, Antonietti P, Ilina EI, Jung J, Stadel D, et al. Diagnostic and clinical relevance of the autophago-lysosomal network in human gliomas. *Oncotarget.* 2016; 7(15):20016–32.
41. Ma B, Liu B, Cao W, Gao C, Qi Z, Ning Y, et al. The Wnt signaling antagonist dapper1 accelerates dishevelled2 degradation via promoting its ubiquitination and aggregate-induced autophagy. *J Biol Chem.* 2015; 290(19):12346–54.
42. Napolitano G, Ballabio A. TFEB at a glance. *J Cell Sci.* 2016; 129(13):jcs.146365.
43. Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Erdin S, et al. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* 2012; 31(5):1095–108.
44. Lee SW, Kim HK, Lee NH, Yi HY, Kim HS, Hong SH, et al. The synergistic effect of combination temozolomide and chloroquine treatment is dependent on autophagy formation and p53 status in glioma cells. *Cancer Lett.* 2015; 360(2):195–204.
45. Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 2004; 11(4):448–57.
46. Golden EB, Cho H-Y, Jahanian A, Hofman FM, Louie SG, Schönthal AH, et al. Chloroquine enhances temozolomide cytotoxicity in malignant gliomas by blocking autophagy. *Neurosurg Focus.* 2014; 37(6):E12.
47. Llobet D, Eritja N, Encinas M, Llecha N, Yeramian A, Pallares J, et al. CK2 controls TRAIL and Fas sensitivity by regulating FLIP levels in endometrial carcinoma cells.

- Oncogene. 2008; 27(18):2513–24.
48. Pallares J, Martínez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, Palacios J, et al. Abnormalities in the NF- κ B family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol.* 2004; 204(5):569–77.
 49. Kraya AA, Piao S, Xu X, Zhang G, Herlyn M, Gimotty P, et al. Identification of secreted proteins that reflect autophagy dynamics within tumor cells. *Autophagy.* 2015; 11 (1): 60-74.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. p62 levels increase in GBMs and inversely correlate with β -catenin. (A) Representative immunostainings for p62 from astrocytoma grade II and GBM (grade IV) biopsies from the TMAs. Nuclei were counterstained by haematoxylin. Bar= 100 μ m. (B) mRNA p62 levels in non-tumour, astrocytomas (grade II and III) and GBM tumours as analyzed by Gliovis platform. *** $p < 0,001$ (Turkey's statistics). (C) β -catenin and p62 expression correlation as analyzed by Gliovis in GBM samples (Pearson correlation). (D) Primary cultures from astrocytoma grade II and GBMs grade IV, and GBM cell lines were analyzed for p62 and β -catenin by WB. (E) Different GBM (grade IV) primary cultures were immunoblotted for autophagic markers, β -catenin and the Wnt target CyclinD1. β -catenin or cyclinD1 levels inversely relate with autophagic markers (p62, Beclin1 or LC3-II) in a number of cases. β -actin (β -act) was used as loading control.

FIGURE 2. Wnt/ β -catenin signalling transcriptionally upregulates p62 in GBM. (A) GBM cell lines were treated with Wnt3a 100 ng/ml and FH535 10 μ M for 24h. p62 mRNA levels were analyzed by qPCR and data represented as fold induction vs. control normalized to GAPDH. Values are mean \pm s.e.m of triplicate measurements of three independent experiments. (B) p62 immunoblotting analysis in A172, U251-MG and U87-MG GBM cell lines and C17 and C65 primary GBM cultures treated with FH535 (10 μ M, 24h). β -actin was used as loading control. (C) TCF4 and p62 mRNA levels were examined by qPCR in control (scrambled shRNA; Scr) or TCF4-silenced (shRNA TCF4) U251-MG and U87-MG cell lines. (D) p62 protein levels in controls cells (Scr) or TCF4-silenced GBM cell lines. (E and F) A172, U251-MG and U87-MG cells were transfected with β -catenin or control (GAPDH) siRNAs (E) or with WT and S37Y β -catenin plasmids and analyzed for p62 and β -catenin after 48h. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

FIGURE 3. Inhibition of Wnt/ β -catenin signalling increases the autophagic flux in GBM. (A) Total cell lysates from A172, U251-MG and U87-MG cells untreated or incubated with FH535 (10 μ M, 24h) were immunoblotted for LC3 and ubiquitinated (Ub) proteins. (B and C) U251-MG and U87-MG GBM cell lines and C17 and C65 primary GBM cultures (B) were treated with FH535 as above (B) or with 50ng/ml DKK

(C) for 24h plus Baf 5 nM for the last 2h. Cell lysates were immunoblotted for LC3. Values indicate the fold increase of LC3-II vs. untreated control cells. β -actin was used as loading control. (D) Representative images from U87-MG cells transfected with the ptfLC3 plasmid and treated with the indicated drugs. Cells with red and green co-localizing (orange) fluorescent LC3 puncta show autophagosomes, whereas only red fluorescent LC3 dots indicates autophagolysosomes. Bar= 50 μ m. The number of green and red puncta/cell was calculated and shown as a bar graph. Data are mean \pm s.e.m of at least 40 different cells from 10 different fields from three independent experiments. *** p<0.001.

FIGURE 4. TCF inhibition increases p62 and LC3 puncta in GBM. p62 (A) and LC3 (B) immunostainings in U87-MG GBM cell line. Cells were treated in absence or presence of FH535 (10 μ M, 24h) and CQ (25 μ M, last 2h). The number of puncta was counted using ImageJ. Plots show the increase in the number of LC3 (A) and p62 (B) puncta when comparing the FH535 and CQ doubly treated cells vs. CQ-treated cells to the number of puncta obtained in FH535-treated cells vs. untreated cells. **p<0.01. Bars= 20 μ m.

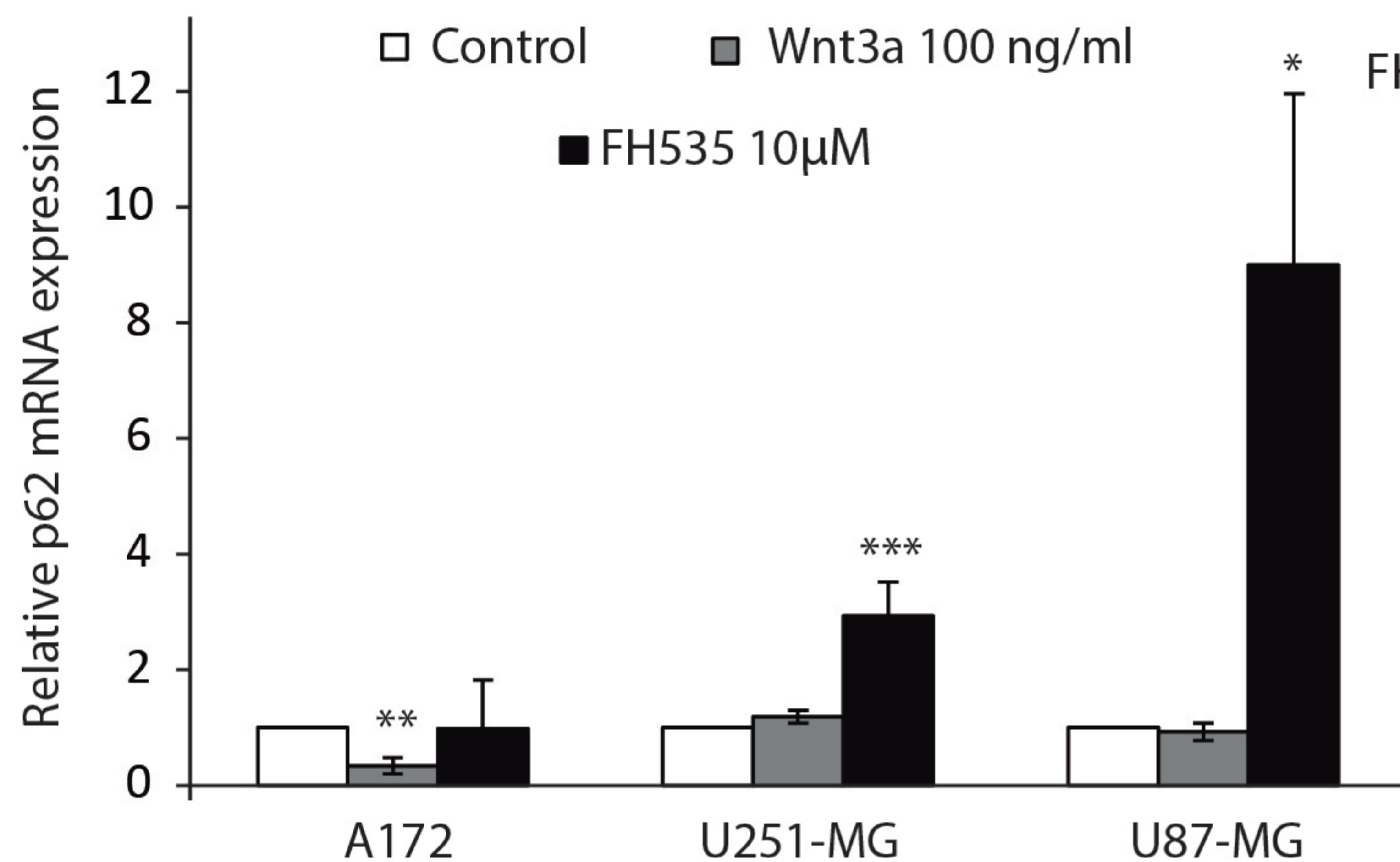
FIGURA 5. Inhibition of TCF diminishes mTOR signalling and promotes TFEB nuclear translocation. (A) U251-MG and U87-MG cells were treated with 10 μ M, 20 μ M FH535 or 5 μ M rapamycin for 24h. Phosphorylated (Thr389) p70S6K, (Ser473) AKT and (Tyr202/204) ERK were analyzed and compared to total AKT and ERK levels. (B) Immunoblot for TFEB from U251-MG and U87-MG untreated cells, treated with FH535 or deprived from serum for 24h. TFEB upper band corresponds to phosphorylated/inactive TFEB form, whereas the lower band corresponds to unphosphorylated and active TFEB, as indicated by the deprivation condition. β -actin was used as loading control. (C) TFEB immunostaining in U251-MG and U87-MG cell lines and C65 primary GBM cells upon treatment with FH535 or serum deprivation compared to control conditions. Boxes display TFEB immunostaining together with Hoechst staining for selected areas. Note that in all conditions, except control, TFEB immunostaining co-localizes with Hoechst. Bar= 50 μ m.

FIGURE 6. TCF inhibition decreases GBM cell proliferation. (A) U251-MG and U87-MG cells were treated with FH535 10 μ M, Baf 5nM and CQ 15 μ M. After 24 and 48h of treatment, cells were counted using Trypan blue staining. (B) Control (shRNA scr) and TCF4-silenced (shRNA TCF4) U87-MG cells were counted after 24, 48 and 72h of plating. (C) Control (scr shRNA) and TCF4-deficient U87-MG cells were grown in colony-forming assays and colony numbers counted. Representative images are shown. (D) U251-MG and U87-MG cells were treated with the single or dual treatments for 48h before cell counting. (E) U251-MG and U87-MG cell viability was measured using WST-1 reagent. Treatments were performed alone or in combination for 48h at the indicated concentrations. * p-value compares to FH535 alone, and # p-value compares to the autophagy blocker (Baf or CQ) treatment alone; * or # $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$. (D and E). (F) Control and TCF4-deficient U87-MG cells were treated with autophagy blockers (Baf and CQ) for 48h and cells subjected to WST-1 viability assay. * indicates p-value comparing control and TCF-4 deficient U87-MG cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

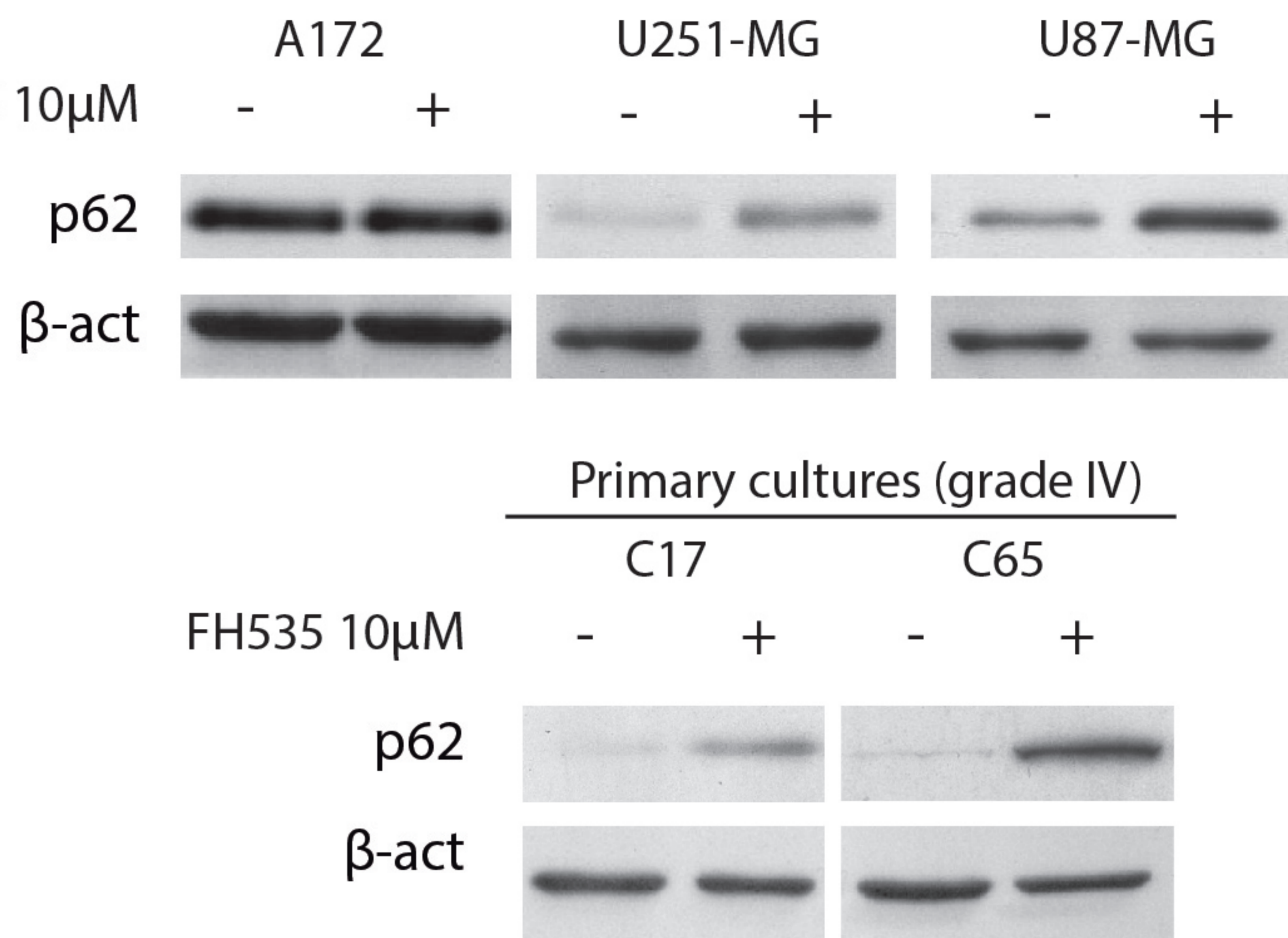
FIGURE 7. Dual inhibition of TCF and autophagy sensitizes to cell death. (A) U251-MG and U87-MG cells were analyzed by AnnexinV/PI assay to calculate live, early and late apoptotic and necrotic cell populations. Cells were treated as indicated for 48h. * $p < 0.05$. (B) U251-MG cells incubated with single or dual treatments as above and stained with Hoechst. Condensed apoptotic nuclei are observed after dual treatment with TCF inhibitor and CQ. Bar= 50 μ m. (C) Immunoblot for caspase-8 in U87-MG cells shows an active cleaved-caspase-8 (p18) fragment upon FH535 and Baf double treatment. p43 corresponds to a caspase8 fragment (34). β -actin was used as loading control. (D) AnnexinV/PI assay performed in control (empty vector) or in caspase-8-silenced cells treated with FH535 and Baf for 48h. (E) AnnexinV/PI assay from control U87-MG cells (scr shRNA) or shRNA p62 cells treated as indicated for 48h (n.s., non significant). (F) Silencing of caspase-8 (casp-8; top) and p62 (bottom) through expression of specific shRNAs in U87-MG cells.

FIGURE 8. Dual inhibition of TCF and autophagy *in vivo* reduces tumour growth. (A) Representative pictures of mice xenografts formed by control or TCF4-silenced U87-MG cells. Tumours were allowed to grow for 30 days. Upon mice sacrifice, tumours were collected and prepared for immunostaining. Left, graph of tumour growth over time of mice xenografts formed by U87-MG cells (control or TCF4-silenced). Right, representative images of tumours from each condition. (B) SCID mice were injected with control or TCF-4 silenced U87-MG cells and once tumours were formed, animals were treated daily intraperitoneally with CQ (25mg/kg) or PBS for 15 days. Left, graph of tumour growth over time. Results are mean \pm s.e.m. Right, representative images of tumours. (C) Immunostaining against Ki67 and p62 from control or TCF4-silenced U87-MG xenografted tumours treated with CQ or vehicle. Bar= 100 μ m. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (D) Model for the induction of autophagy upon Wnt signalling inhibition and GBM cell death by combined targeting of TCF and autophagy. Interfering with TCF/ β -catenin (β -cat) function de-represses *p62*, which increases autophagic flux and decreases proliferation. DKK also increases autophagy flux, suggesting that autophagy can be regulated from the Wnt receptor level. Elevated autophagic flux associates with decreased mTOR activity and nuclear translocation of unphosphorylated TFEB that can transcribe more *p62*. Wnt-dependent GSK-3 inhibition leads to mTOR activation (20); however, the mechanism by which TCF/ β -cat inhibition reduces mTOR activity is unknown (dashed arrow). Increased autophagy resulting from TCF inhibition elicits GBM cell death by autophagy blockers, through a mechanism that requires p62 and caspase-8 cleavage, probably in autophagosomes.

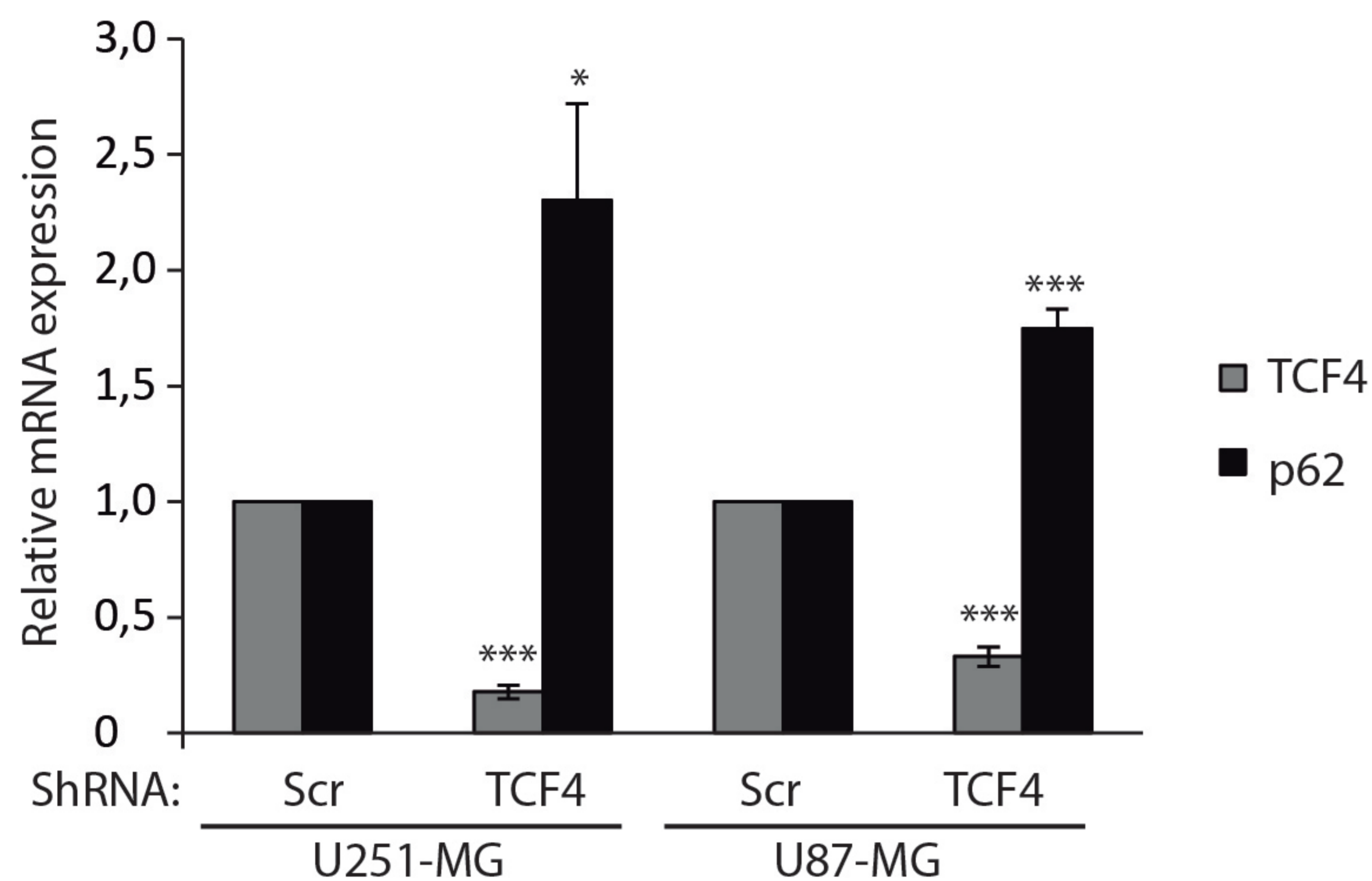
A



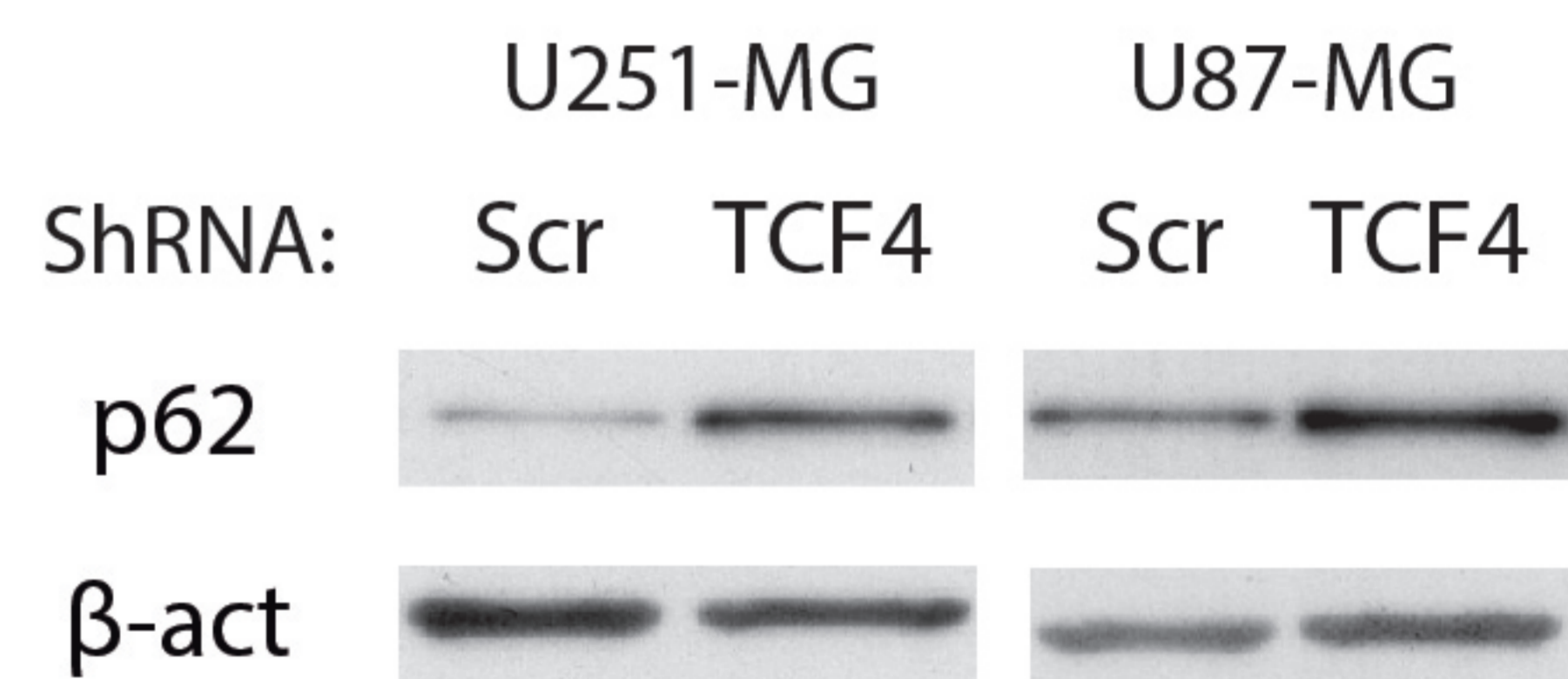
B



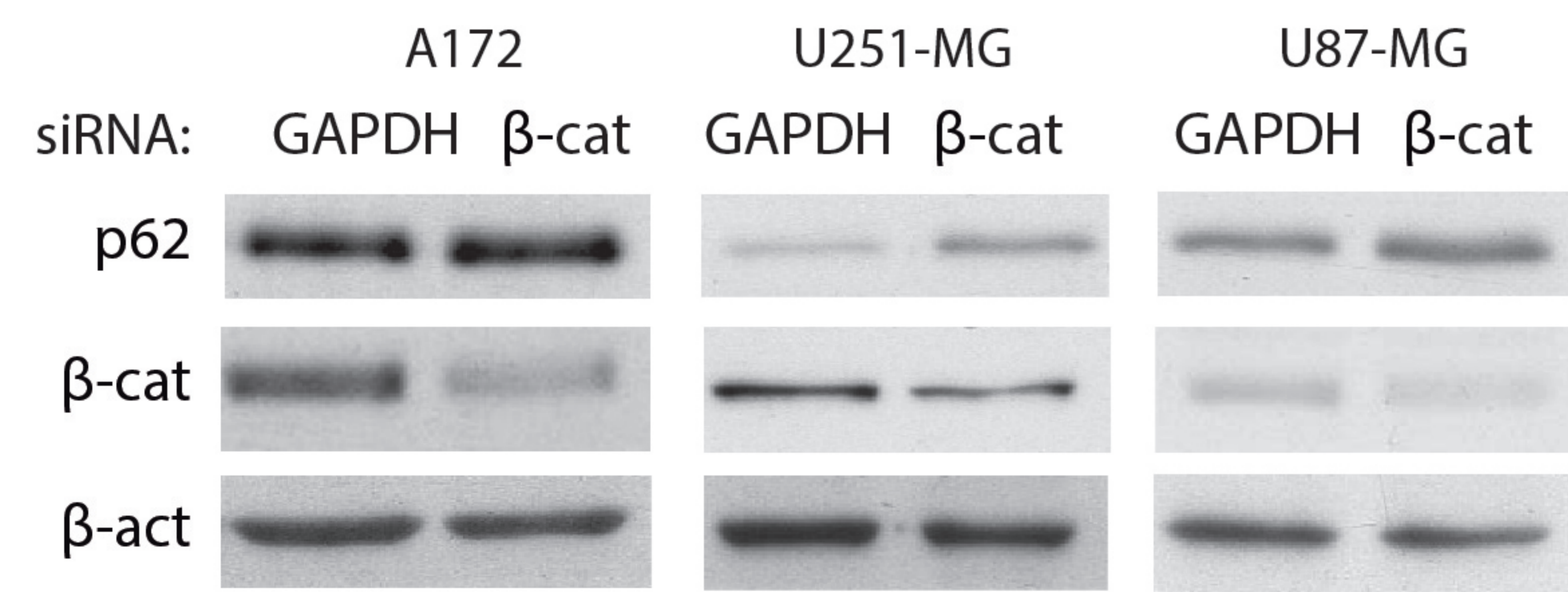
C



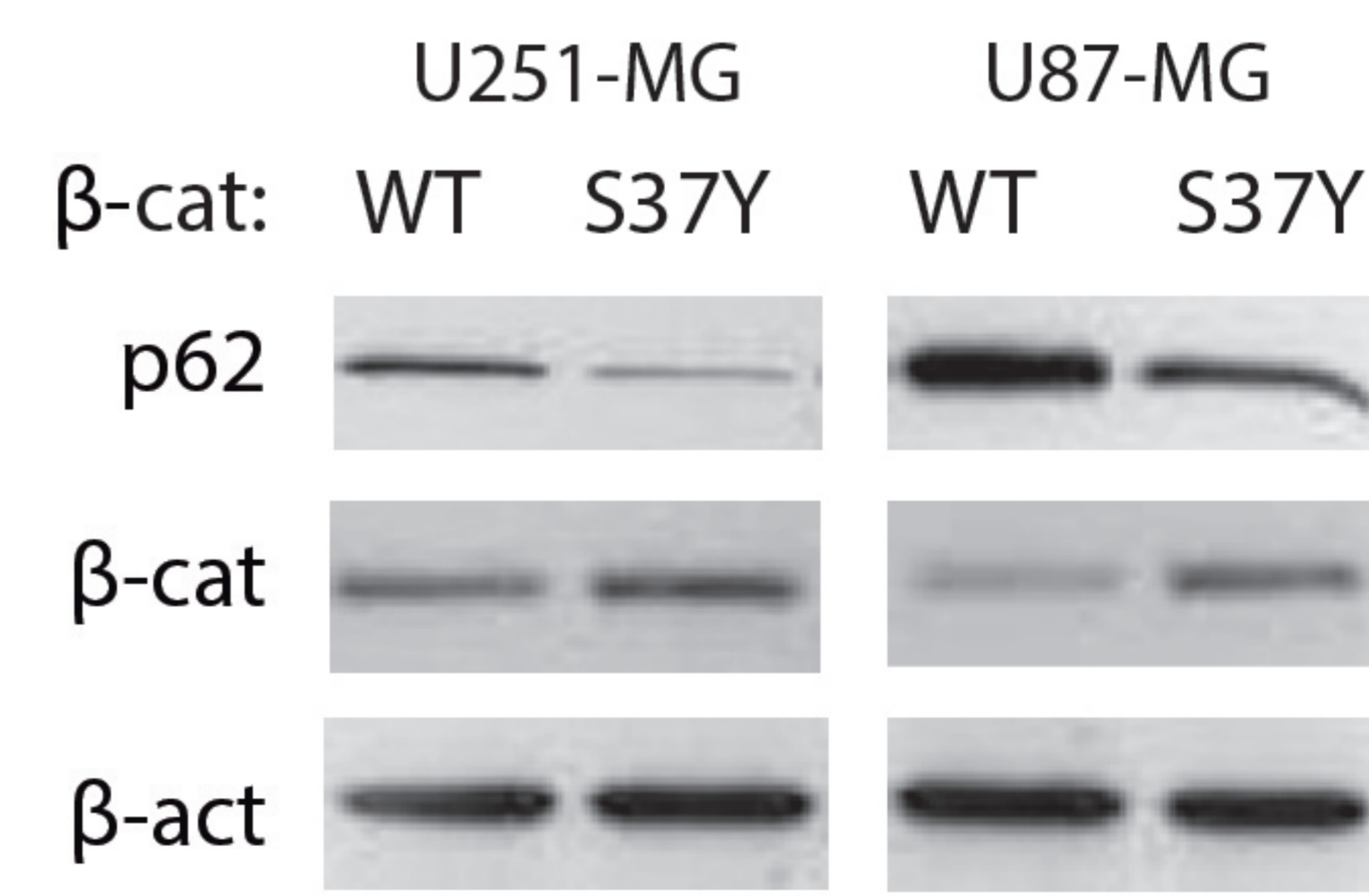
D



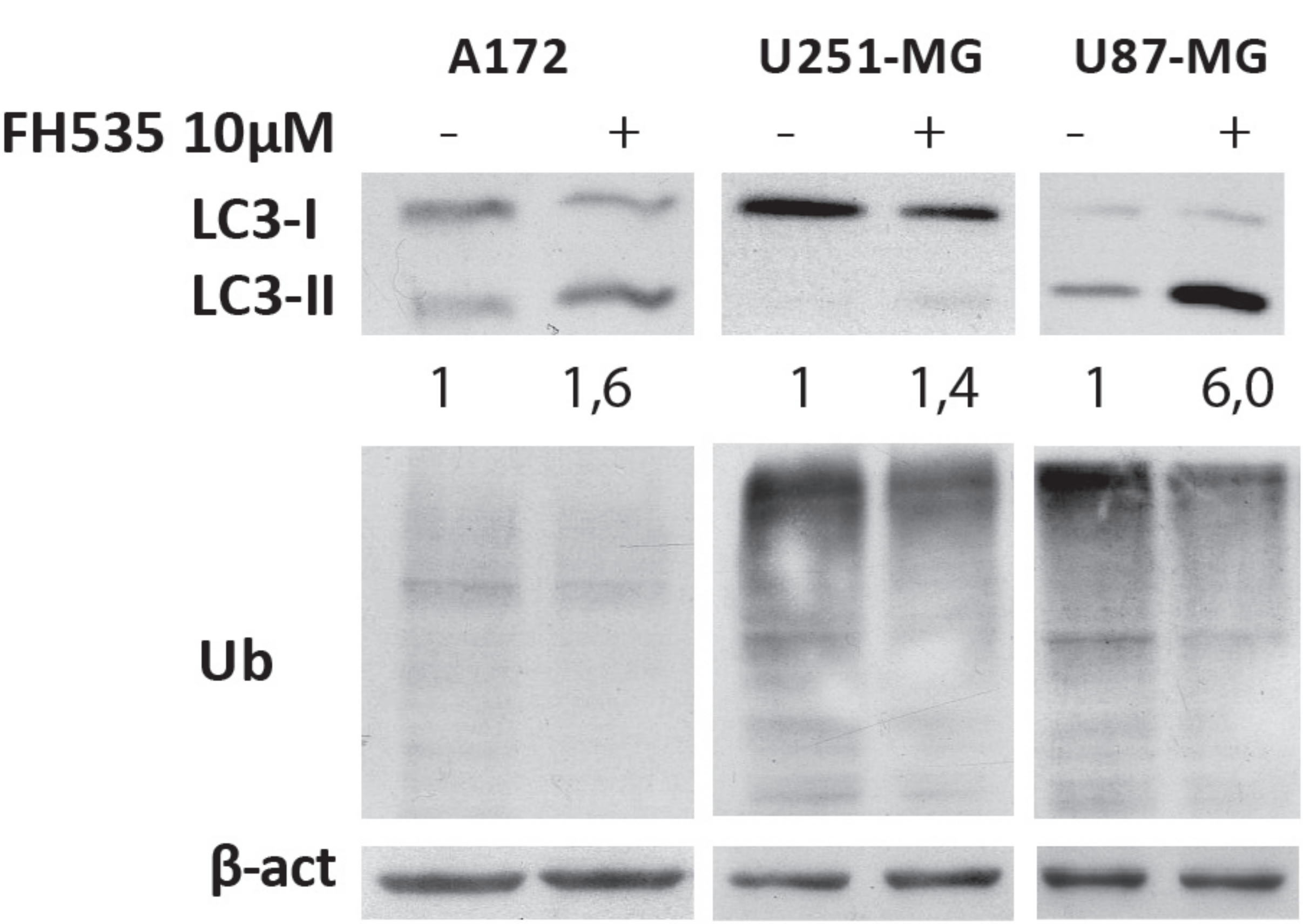
E



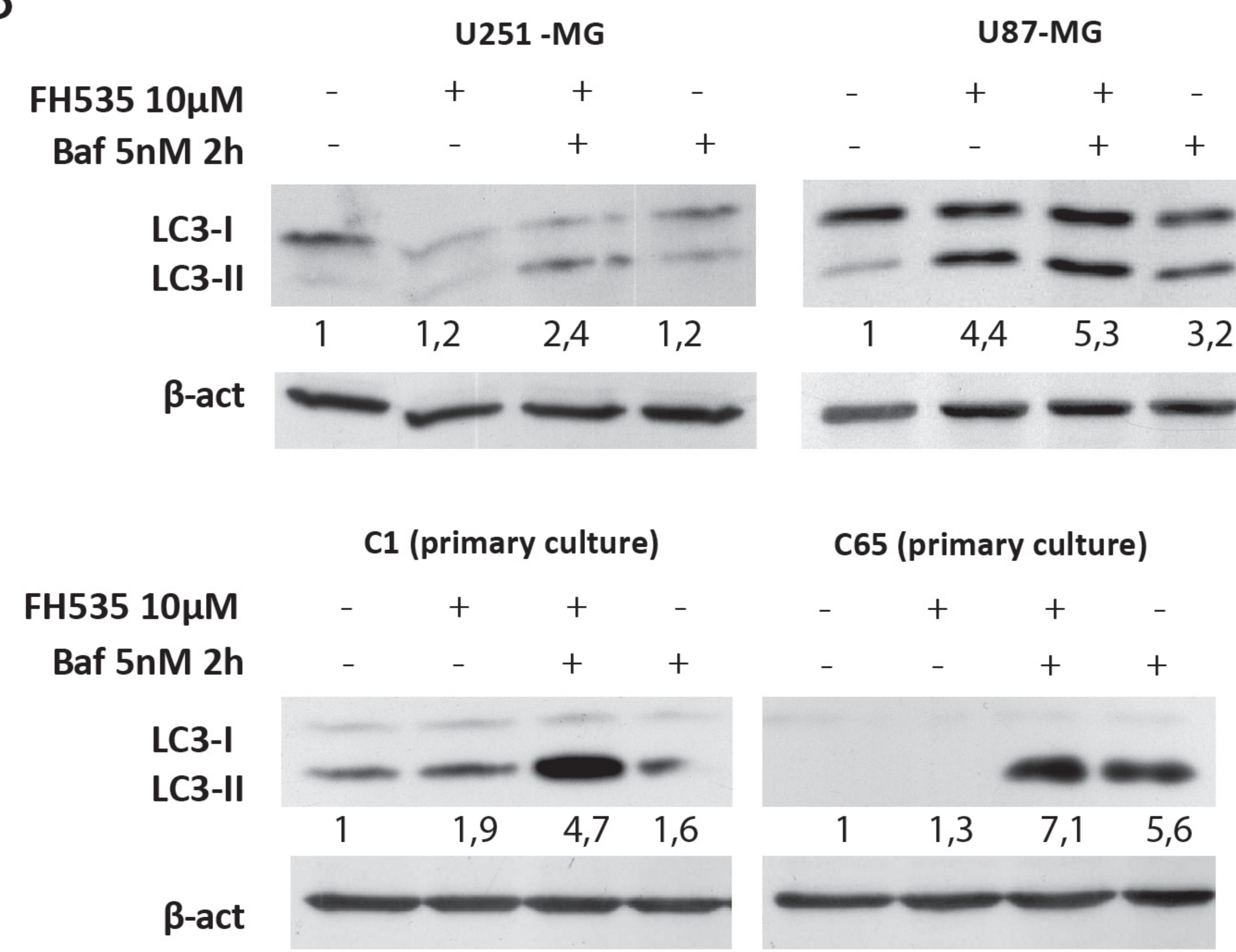
F



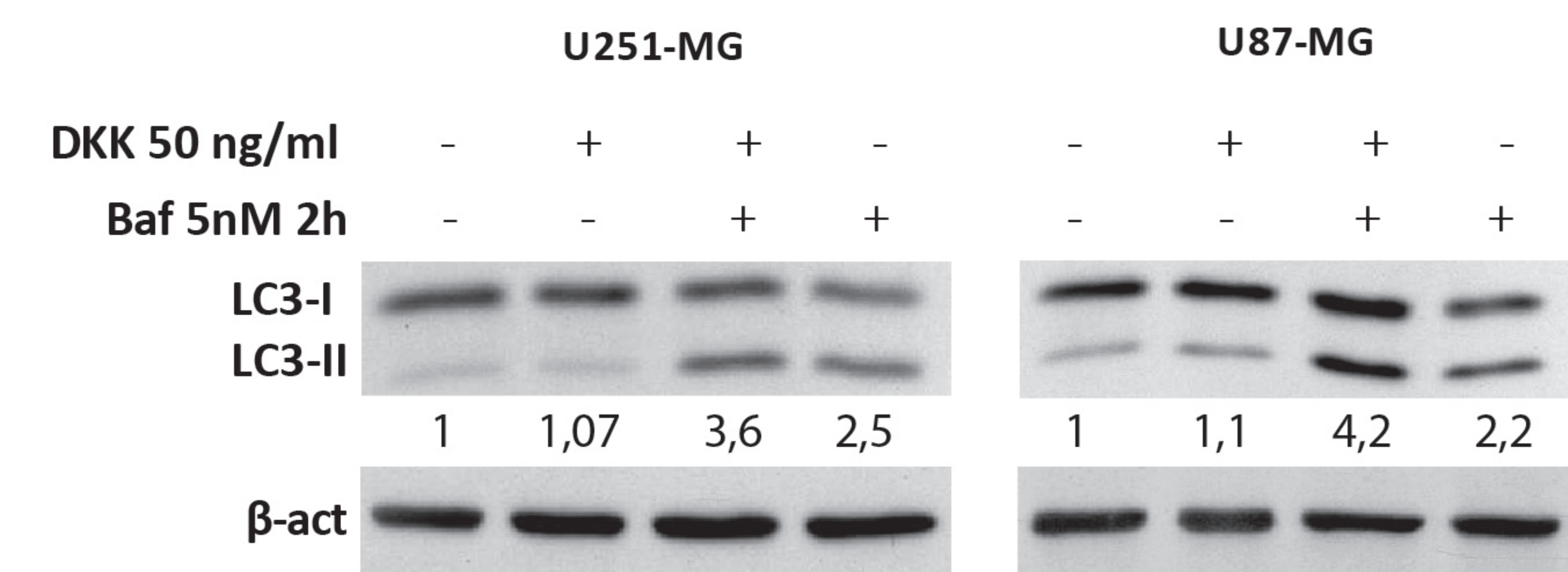
A



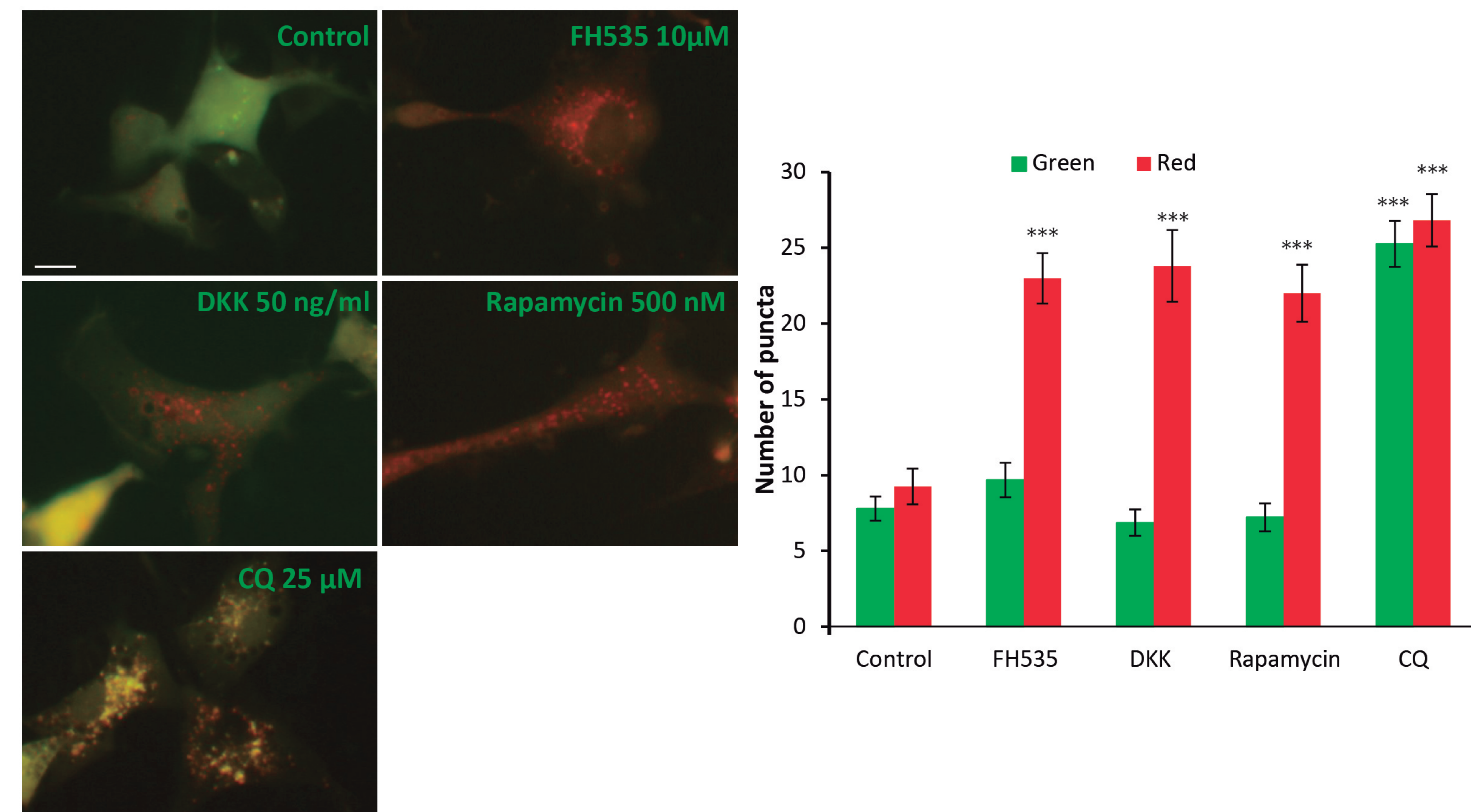
B



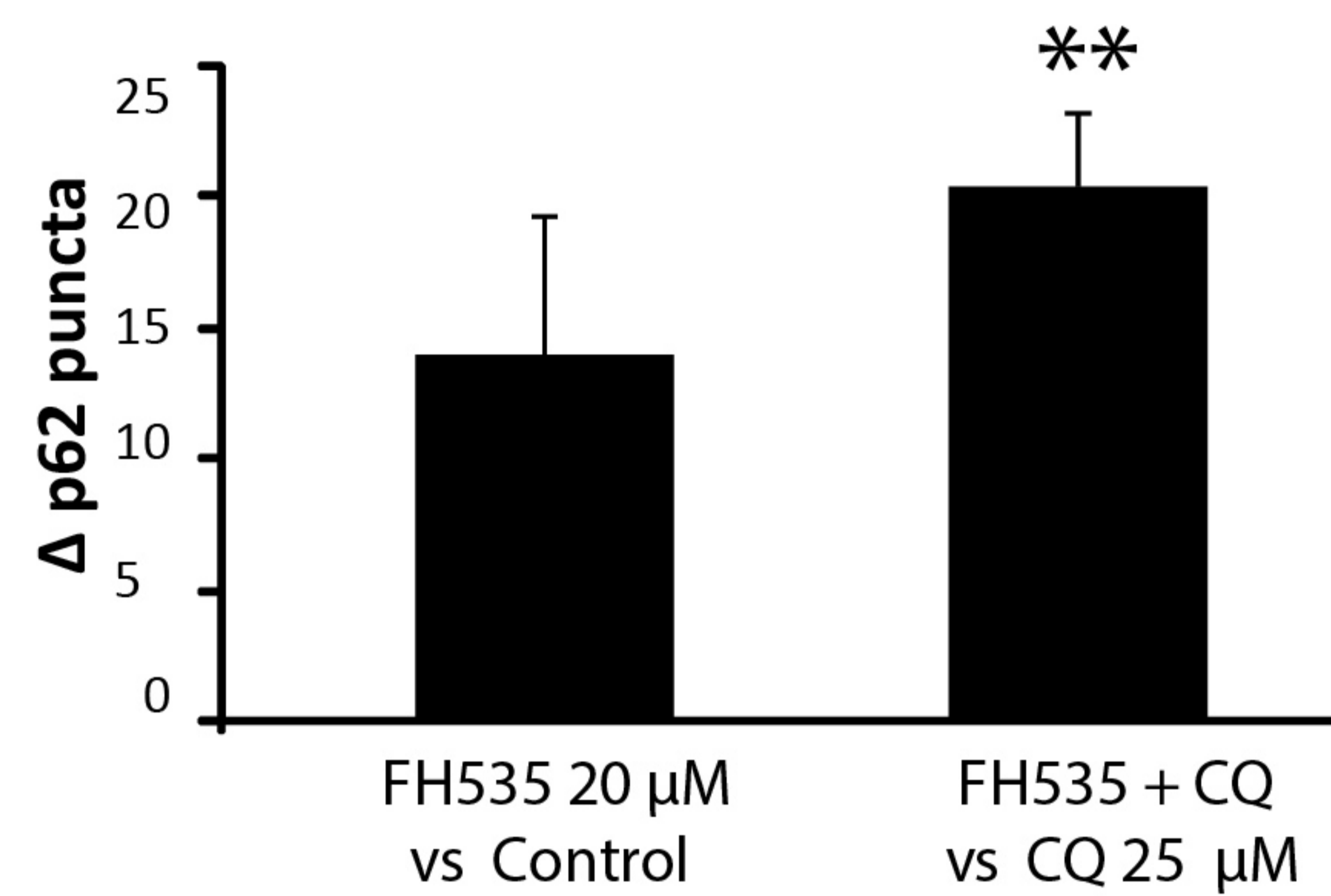
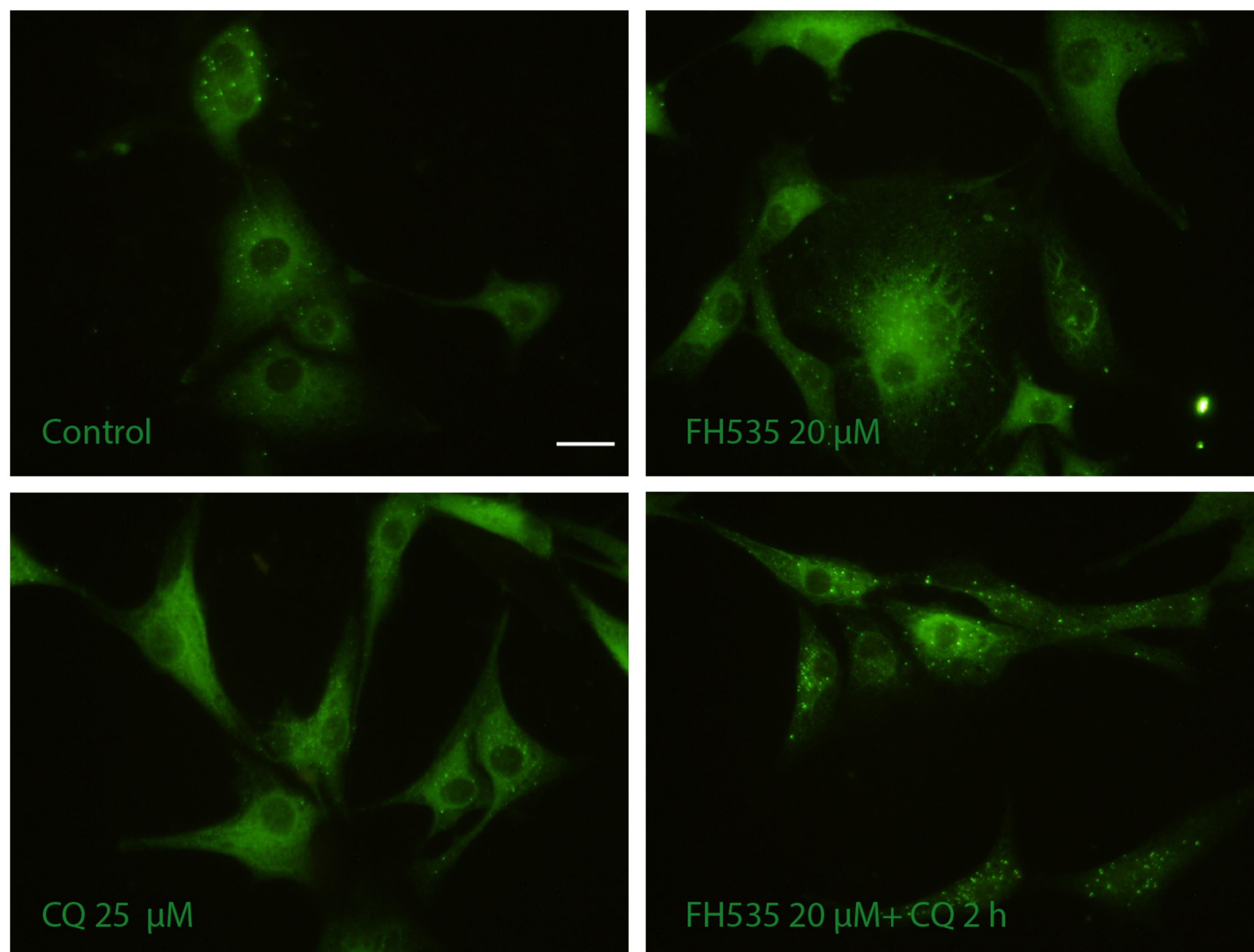
C



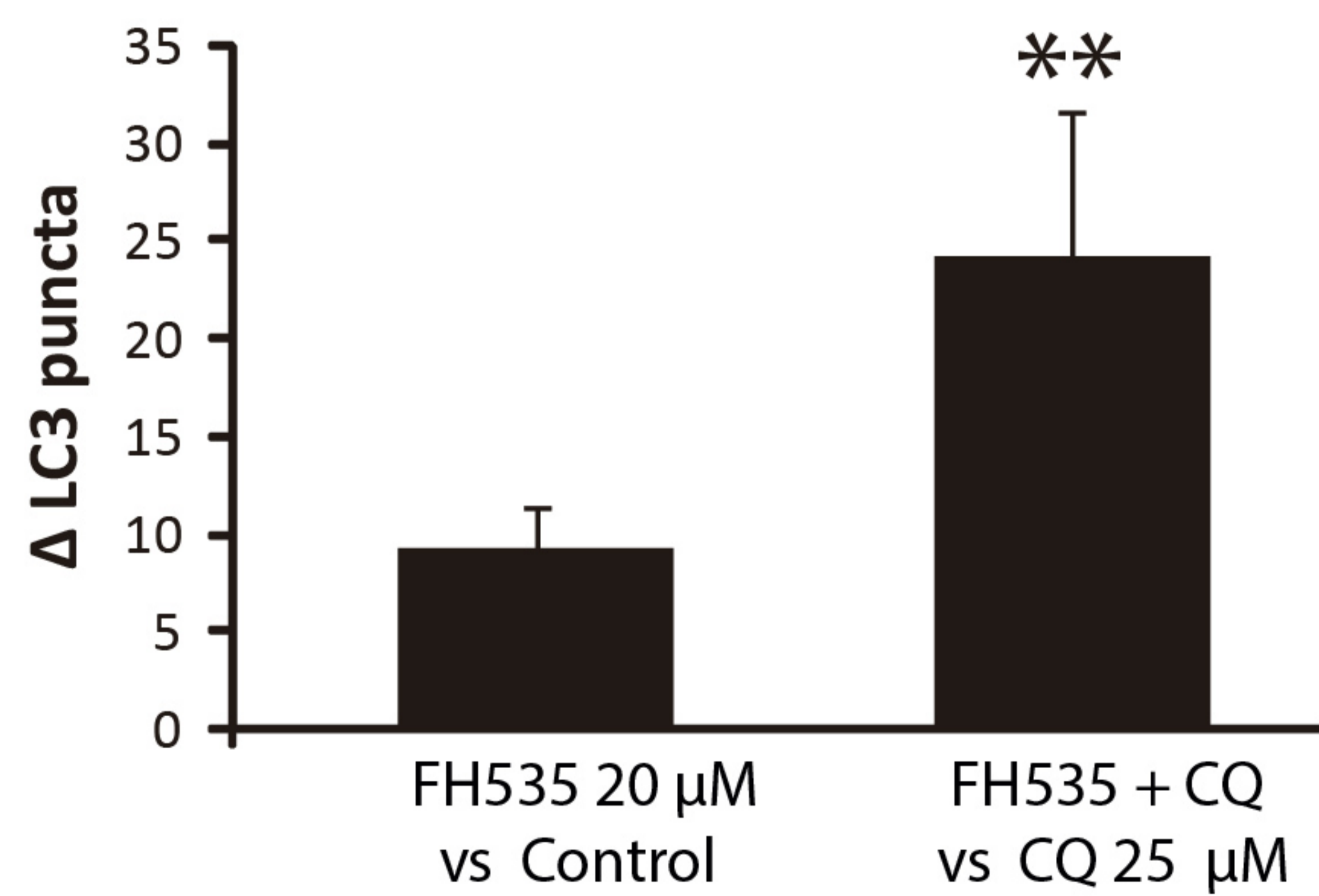
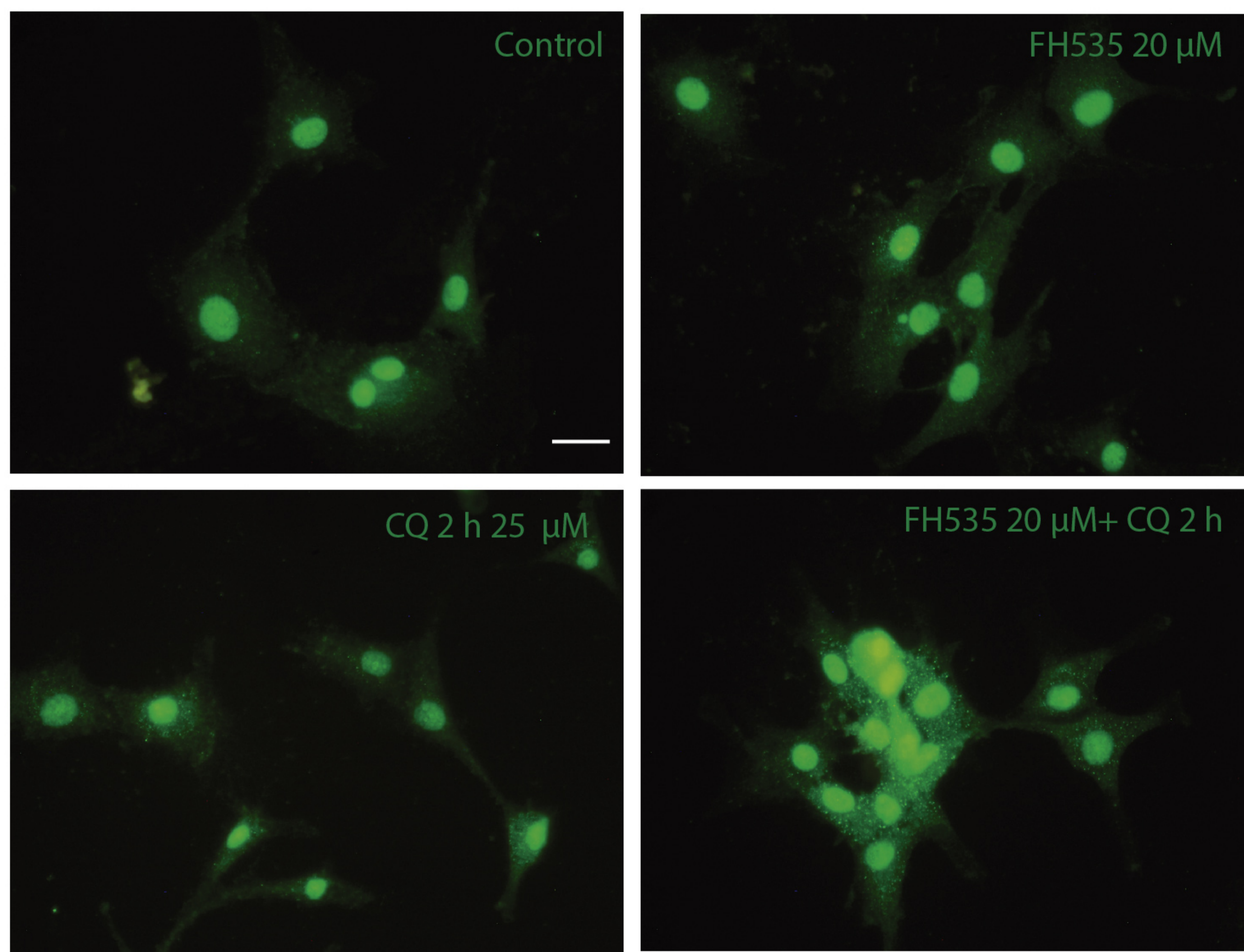
D



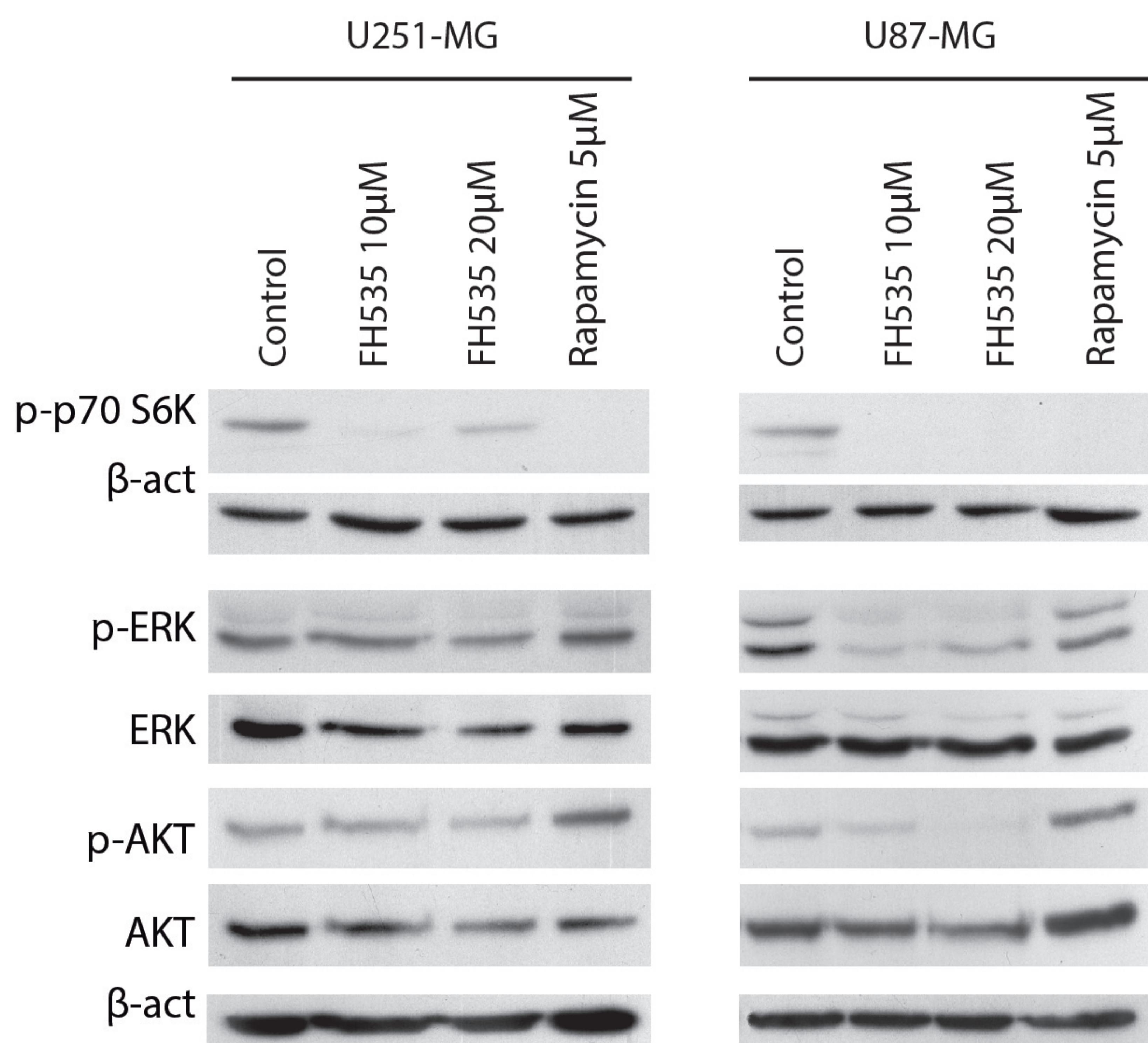
A



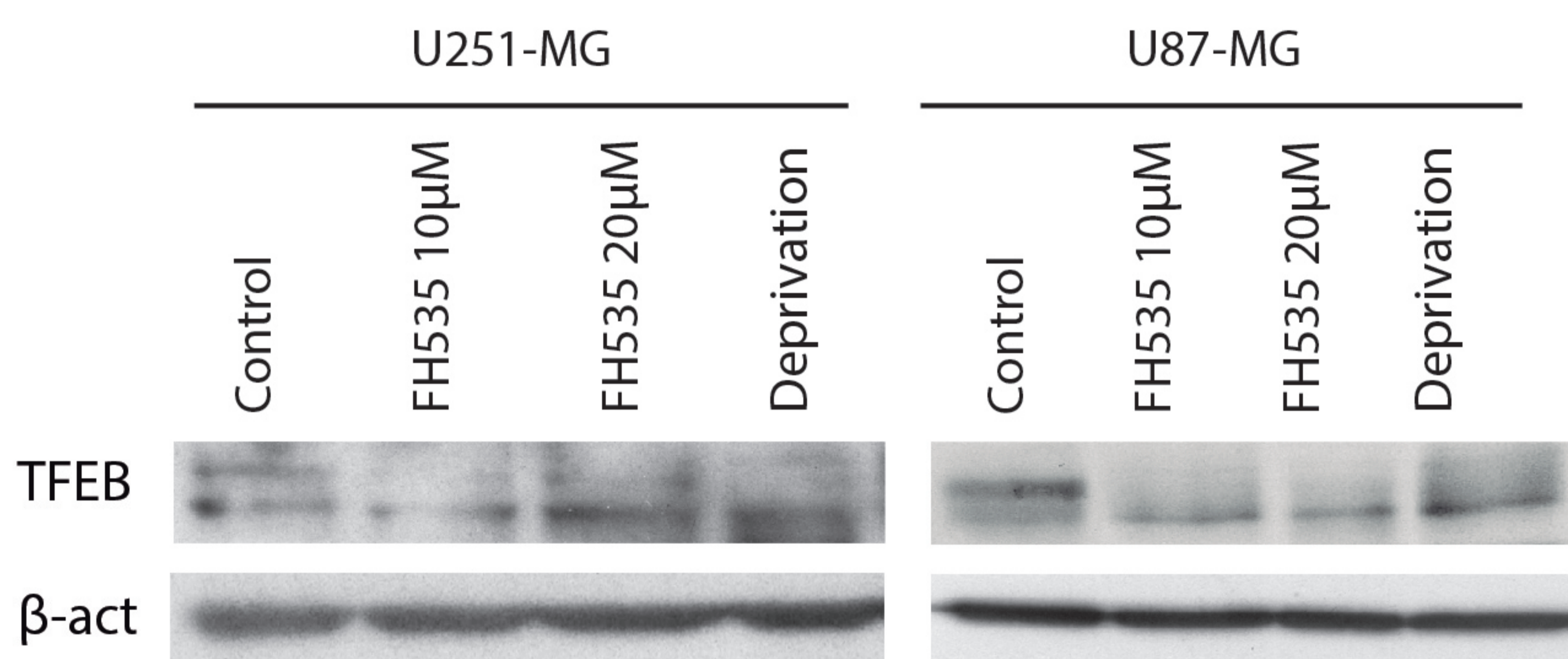
B



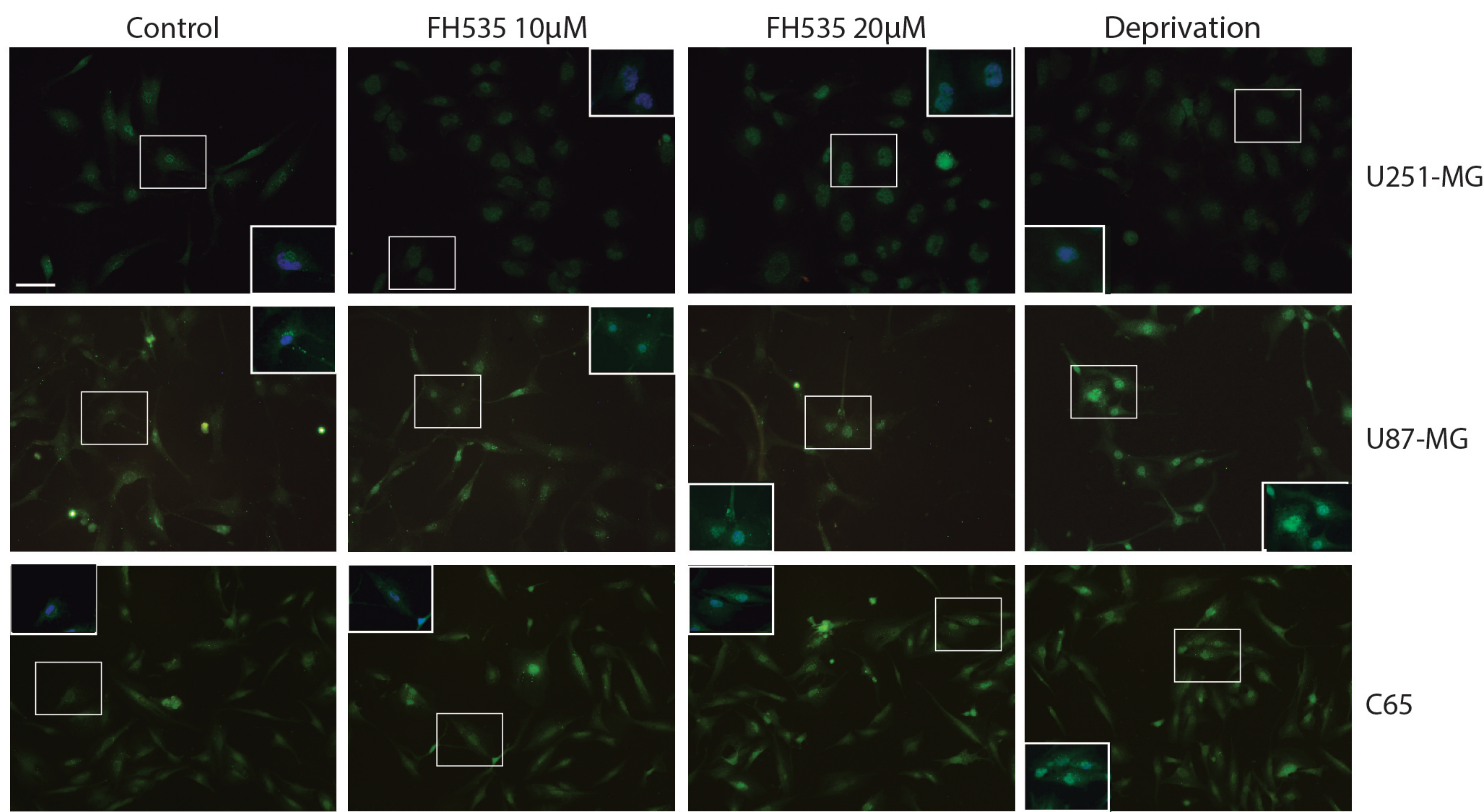
A



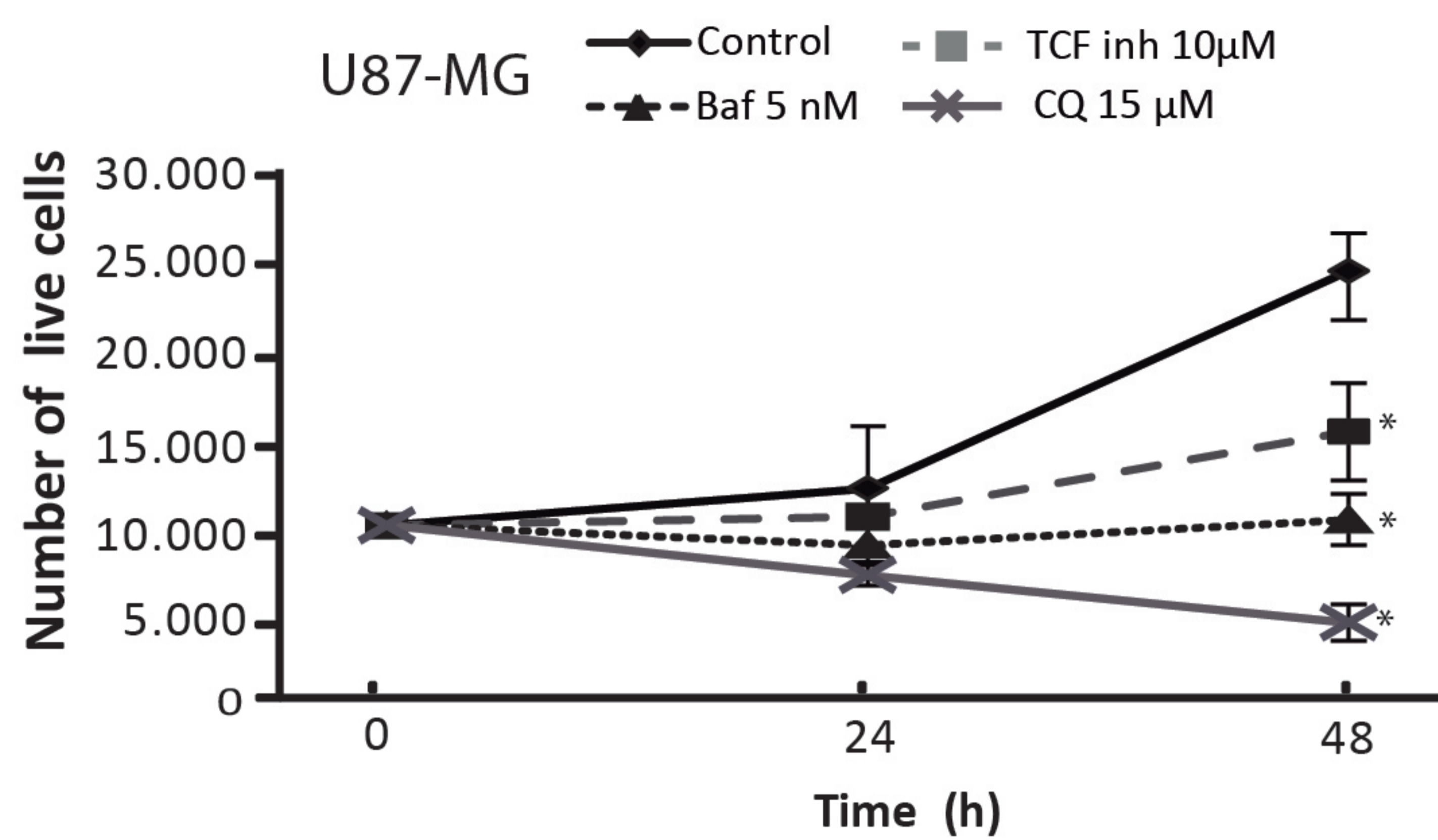
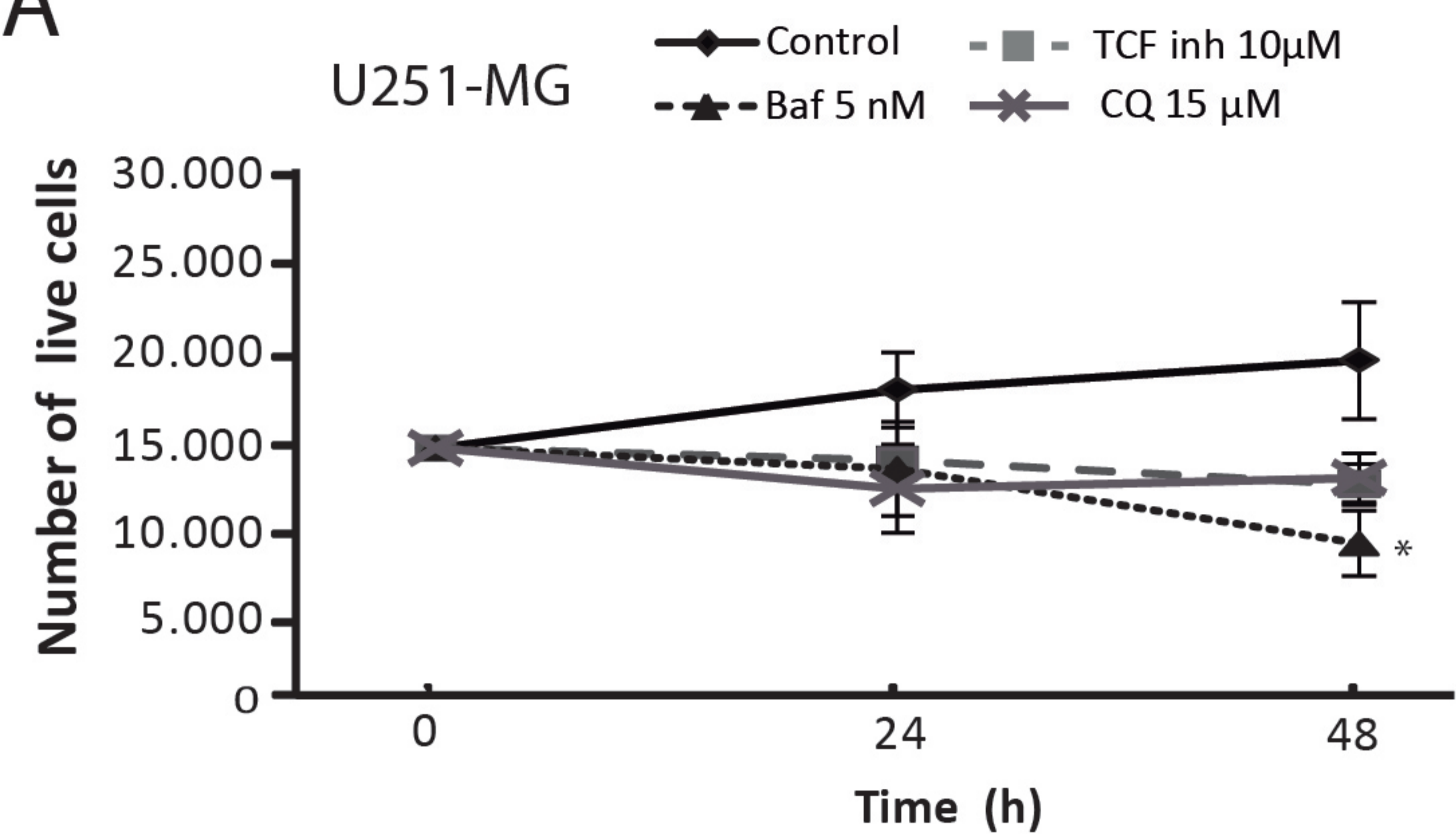
B



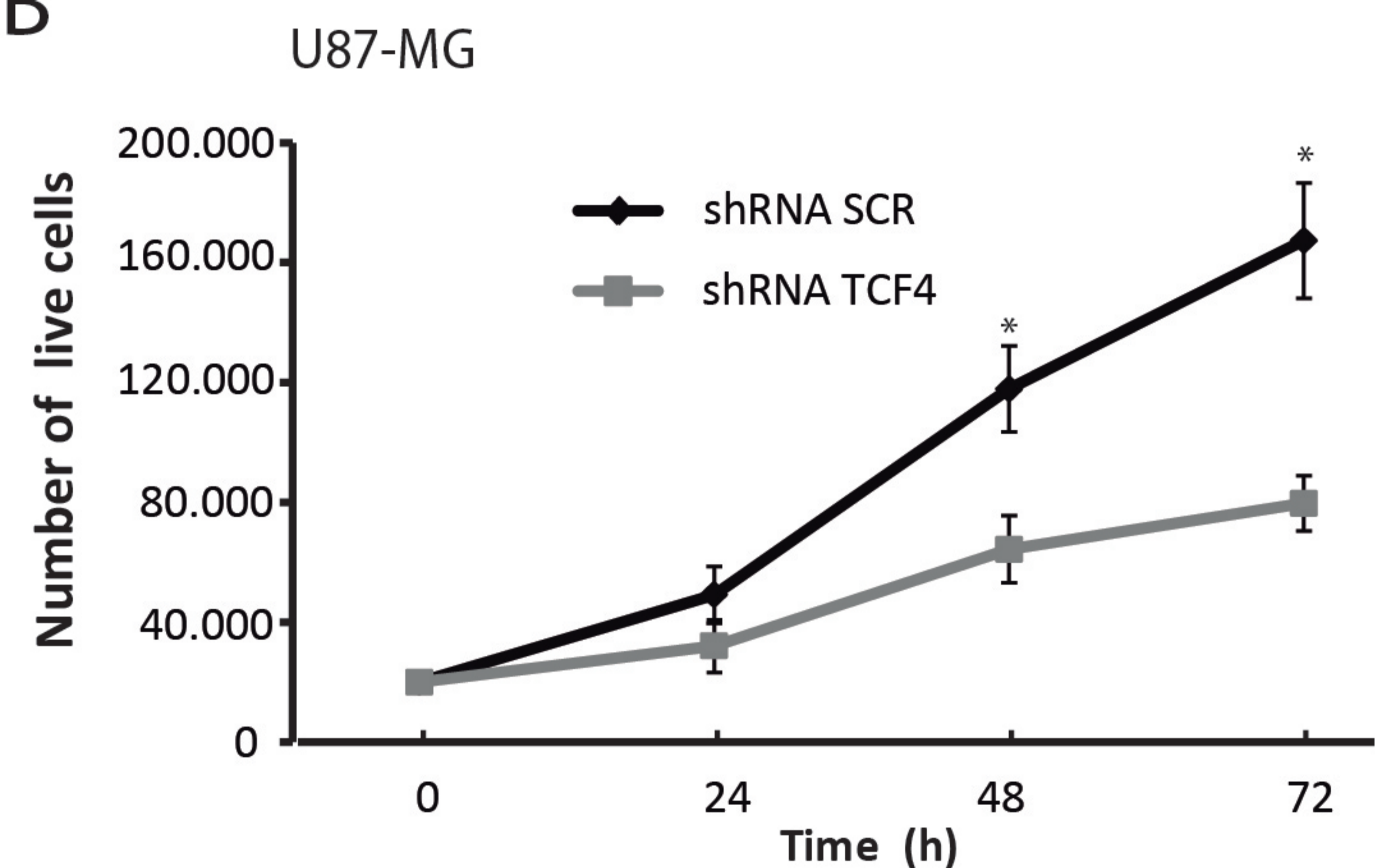
C



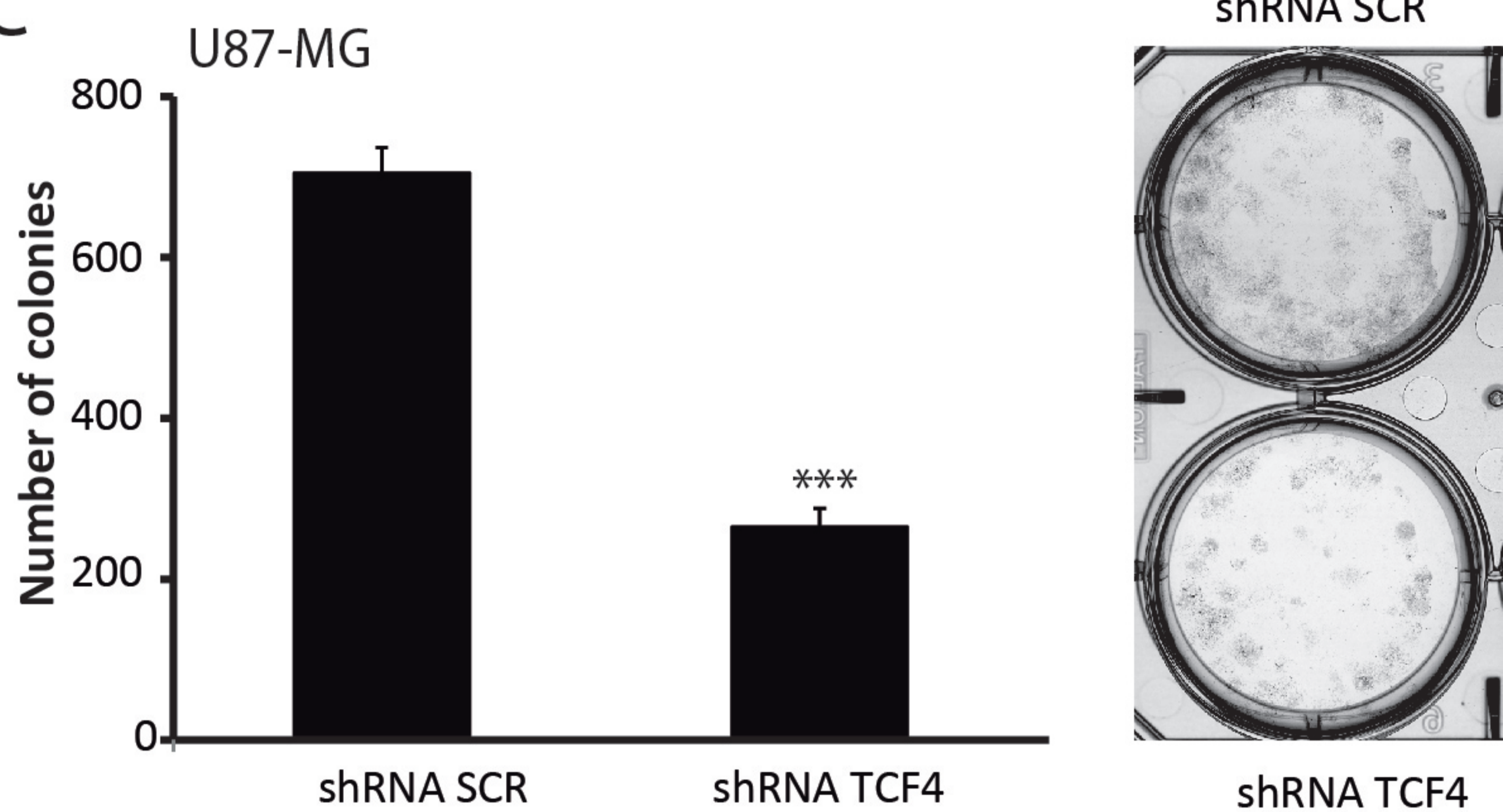
A



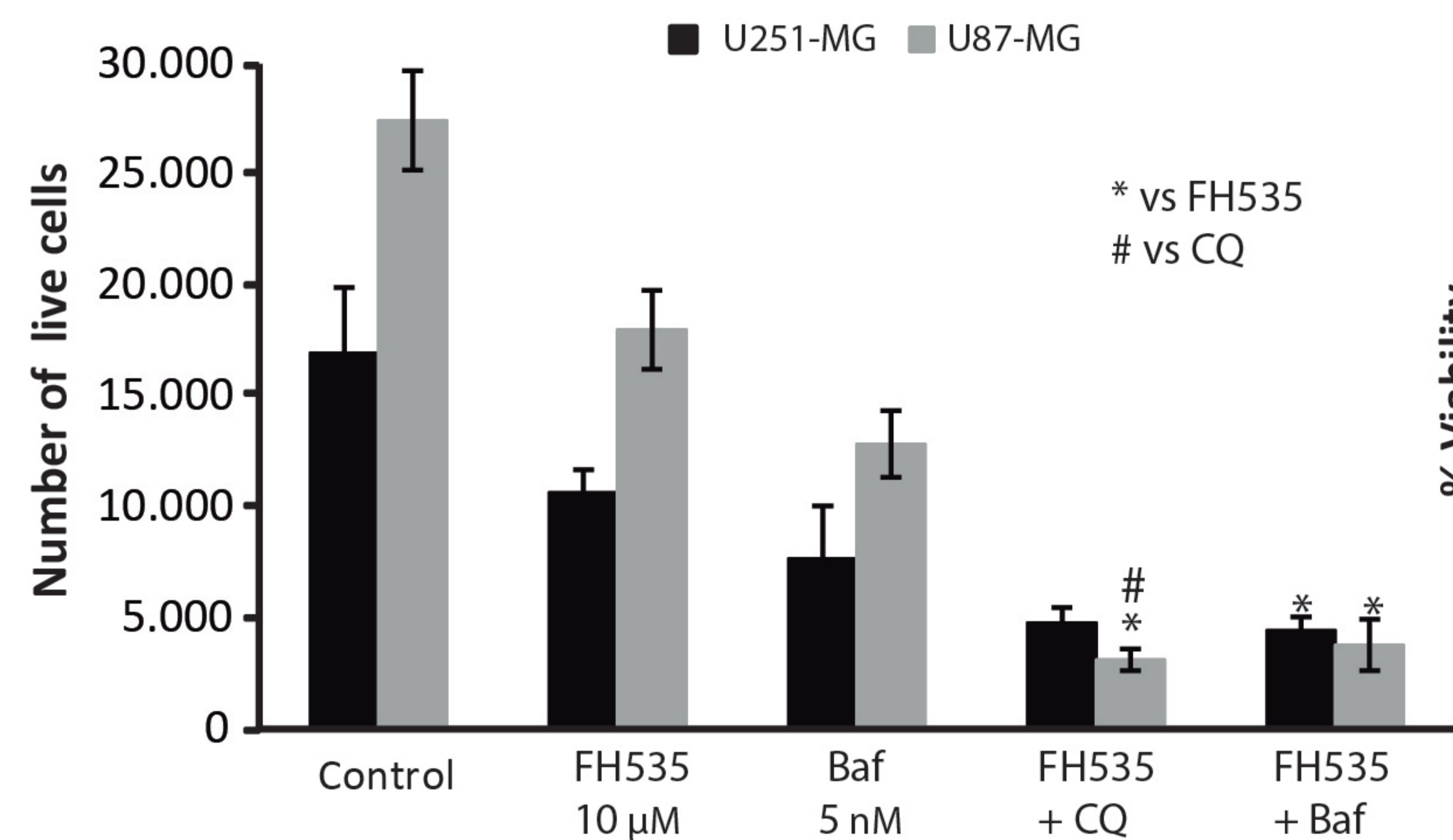
B



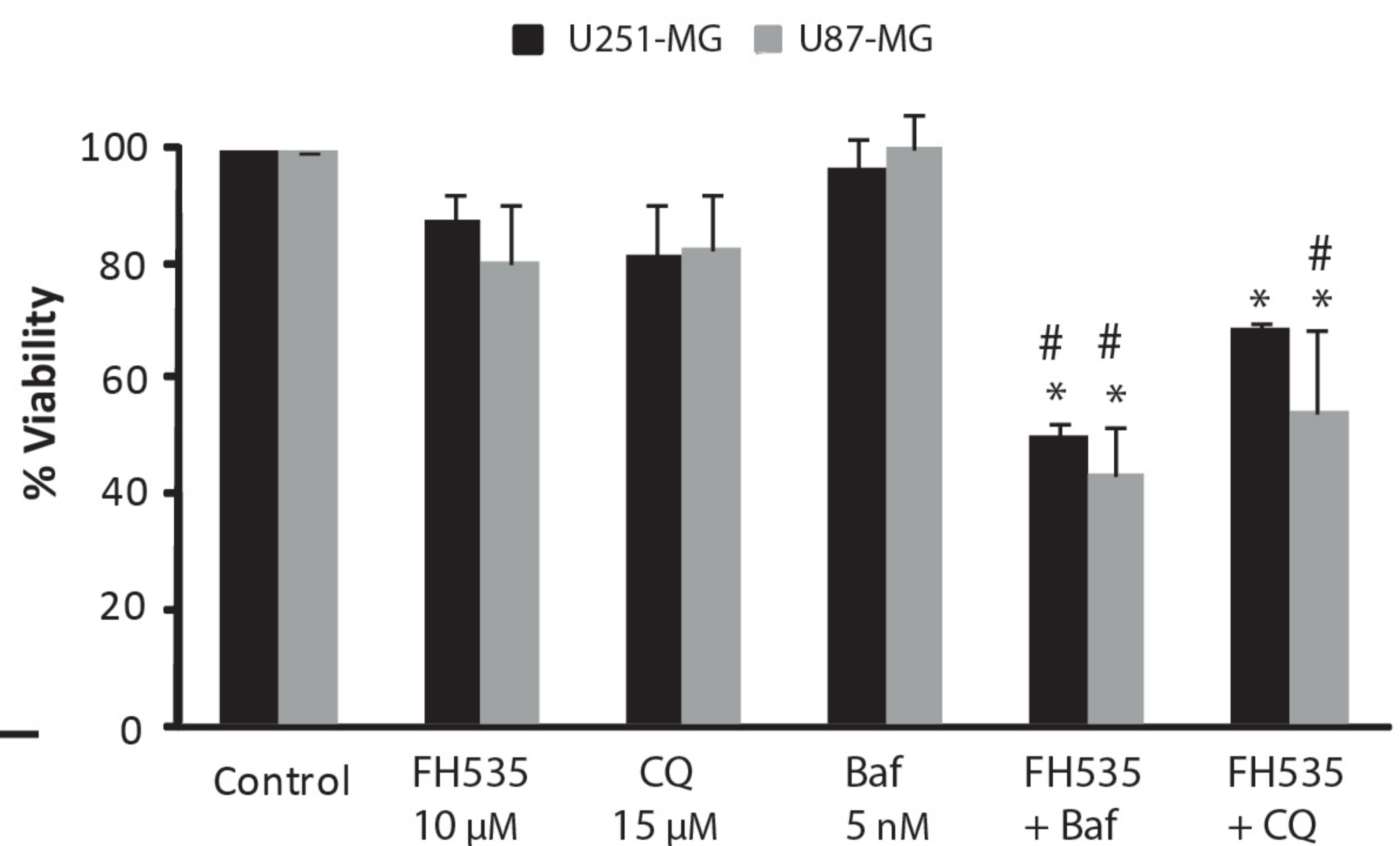
C



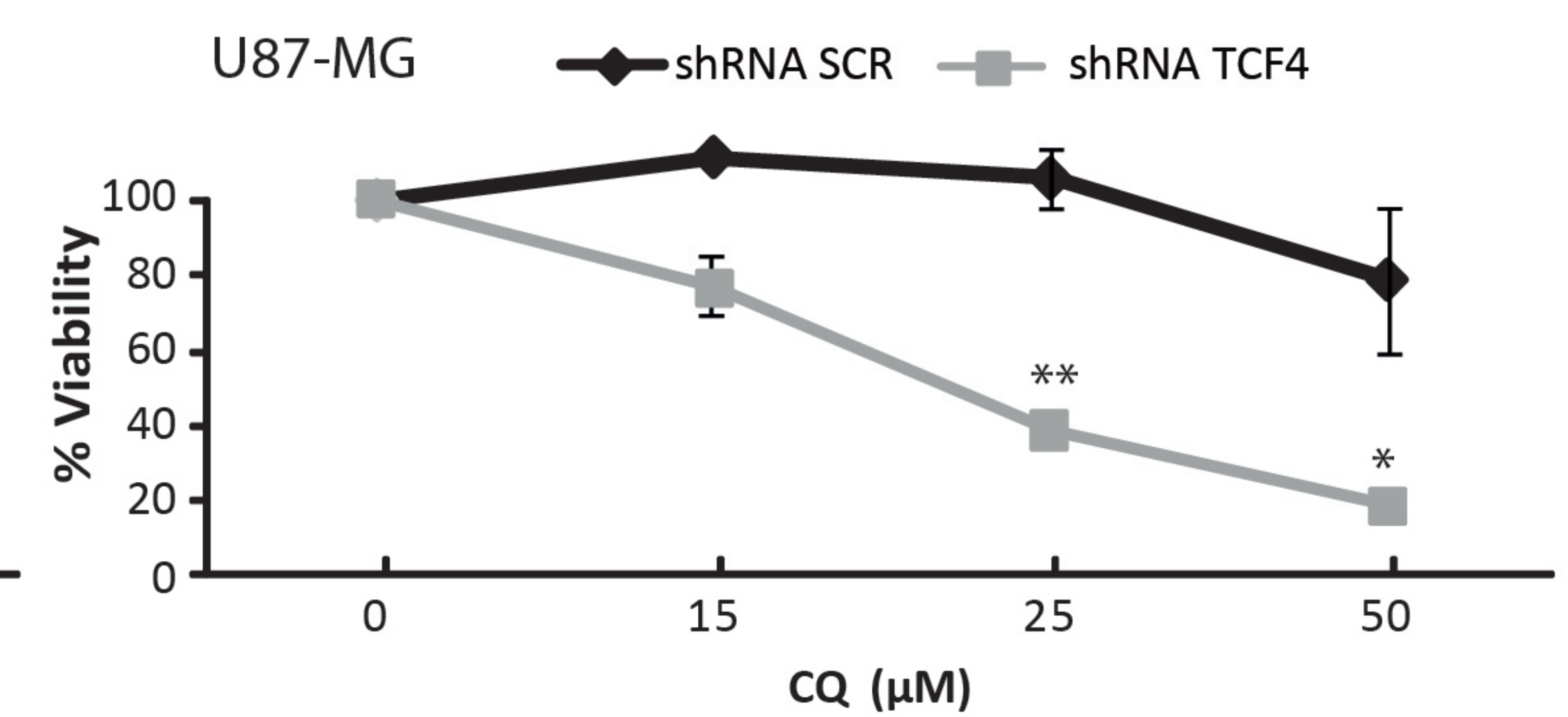
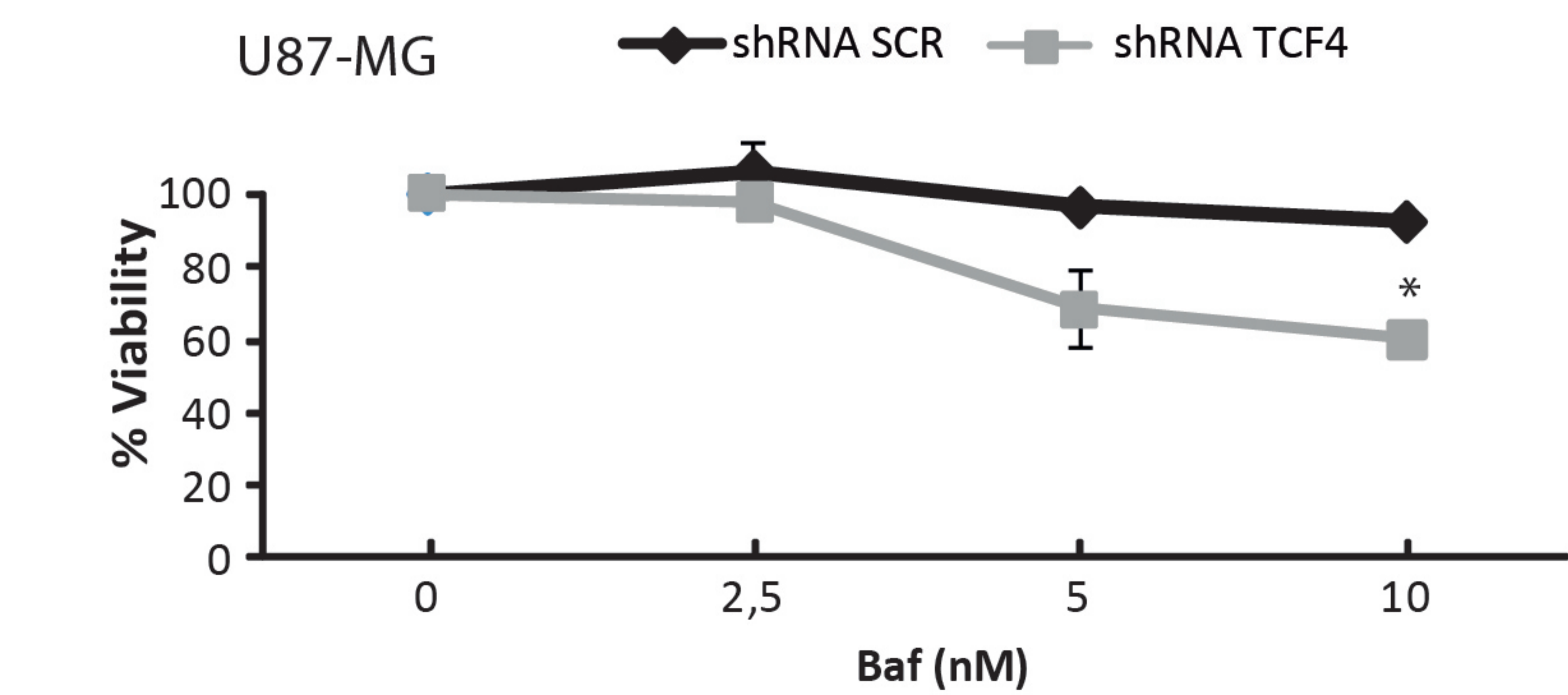
D

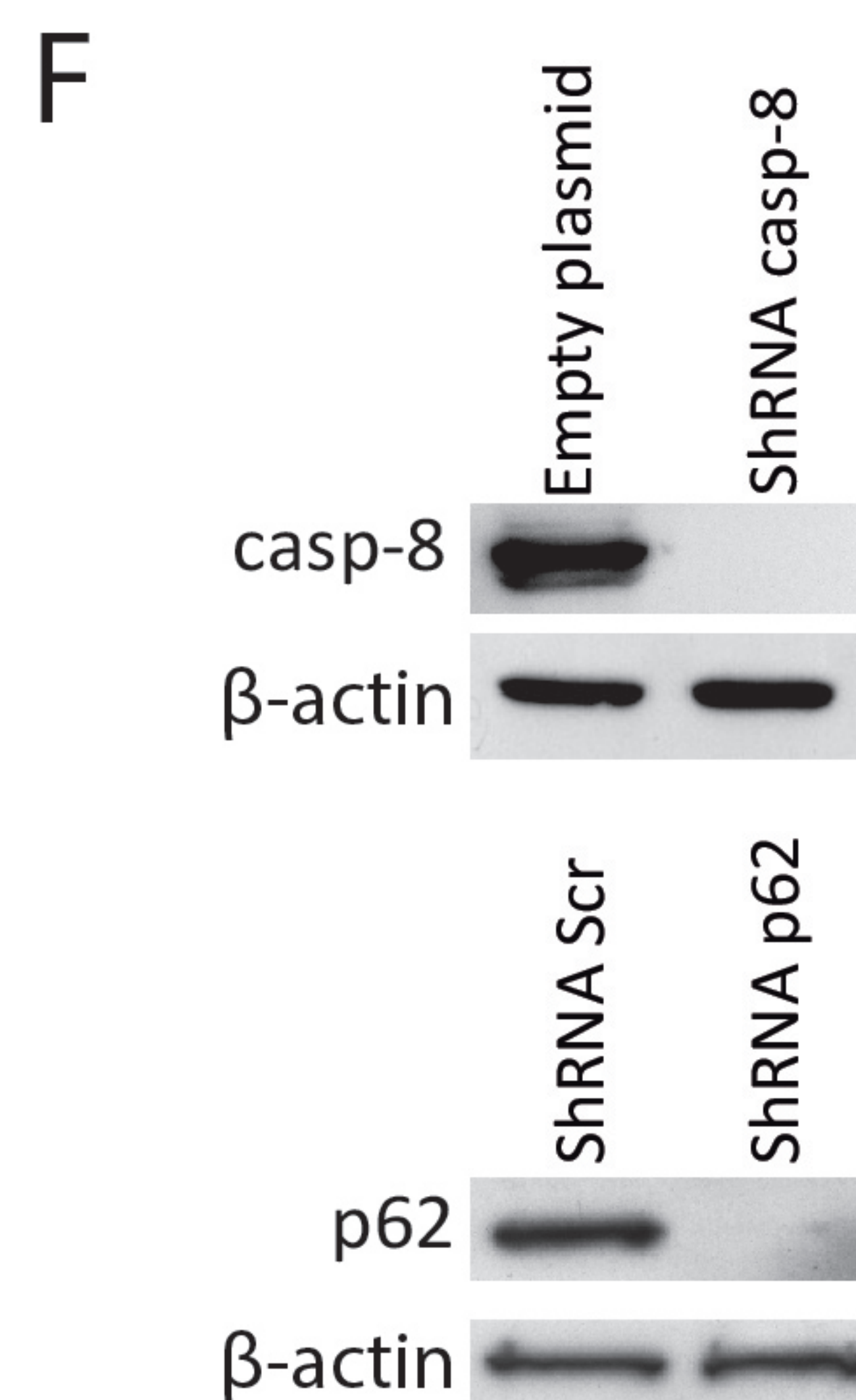
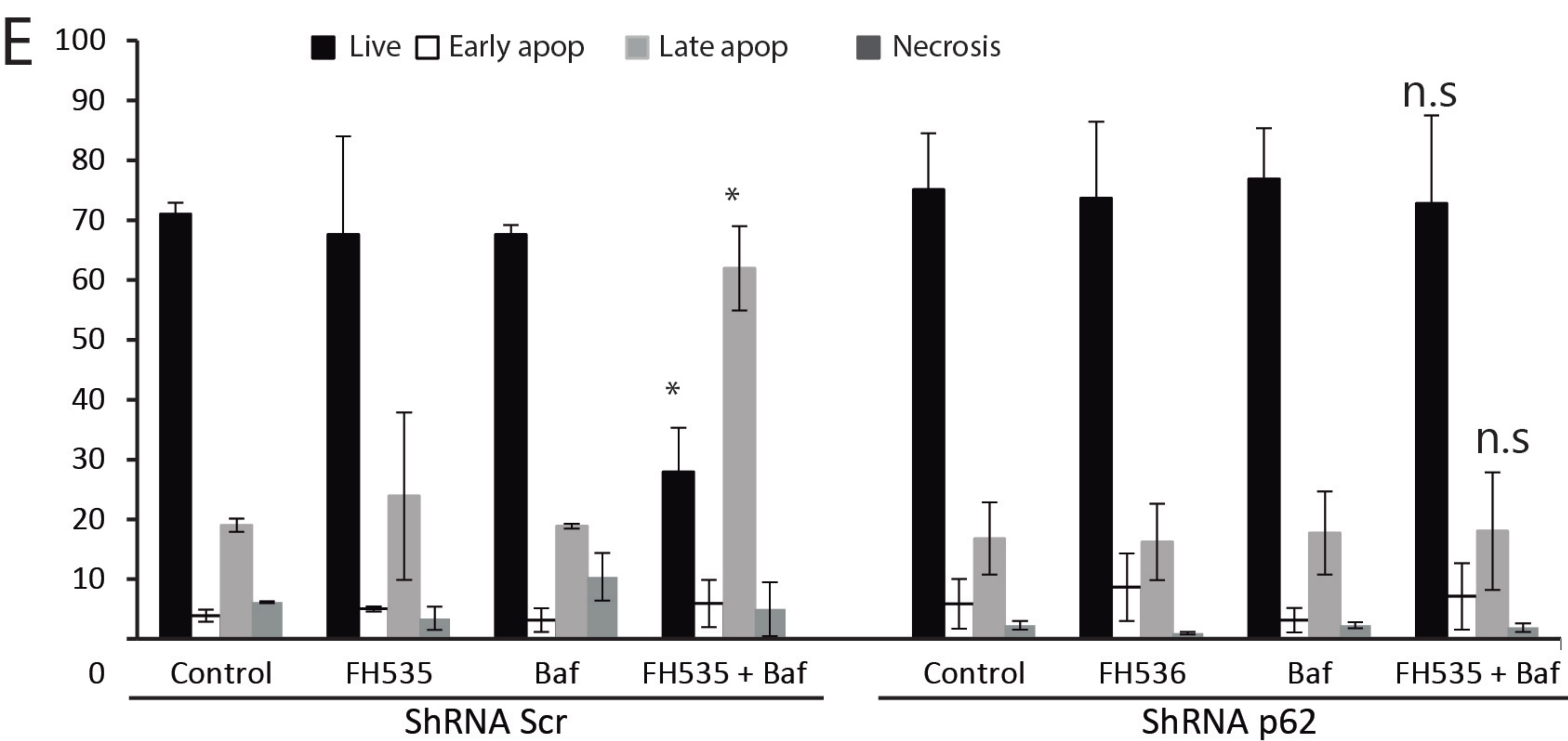
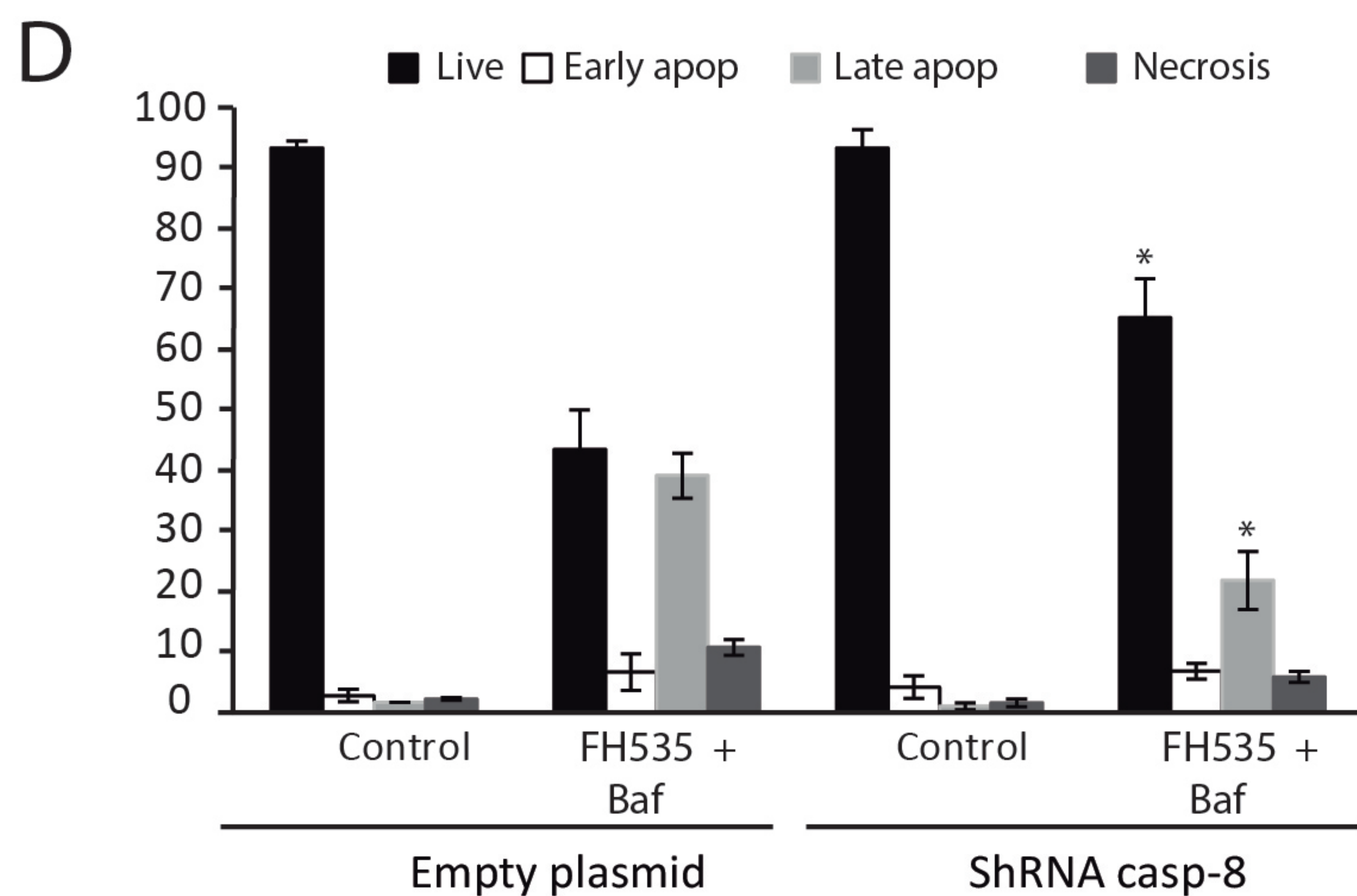
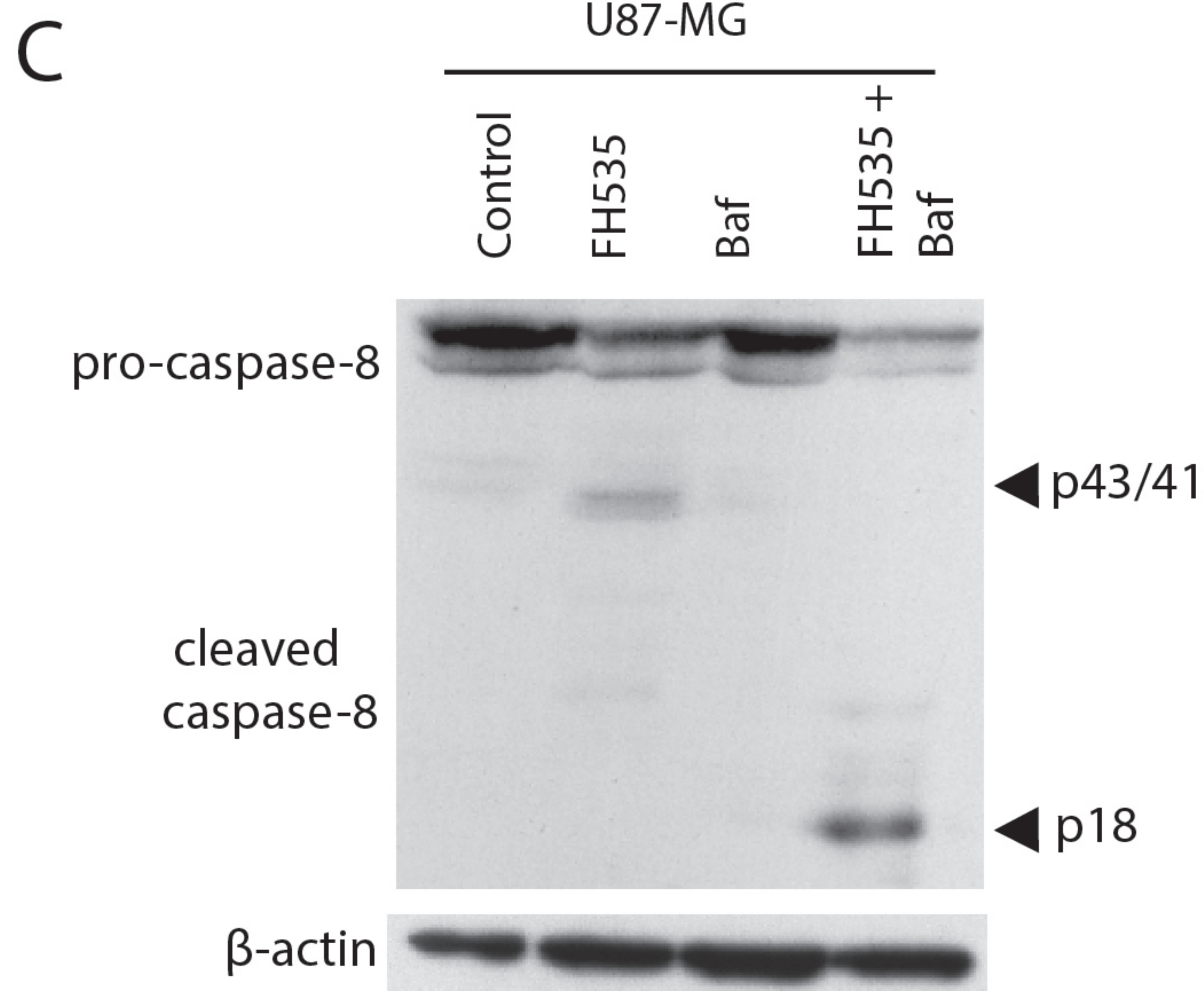
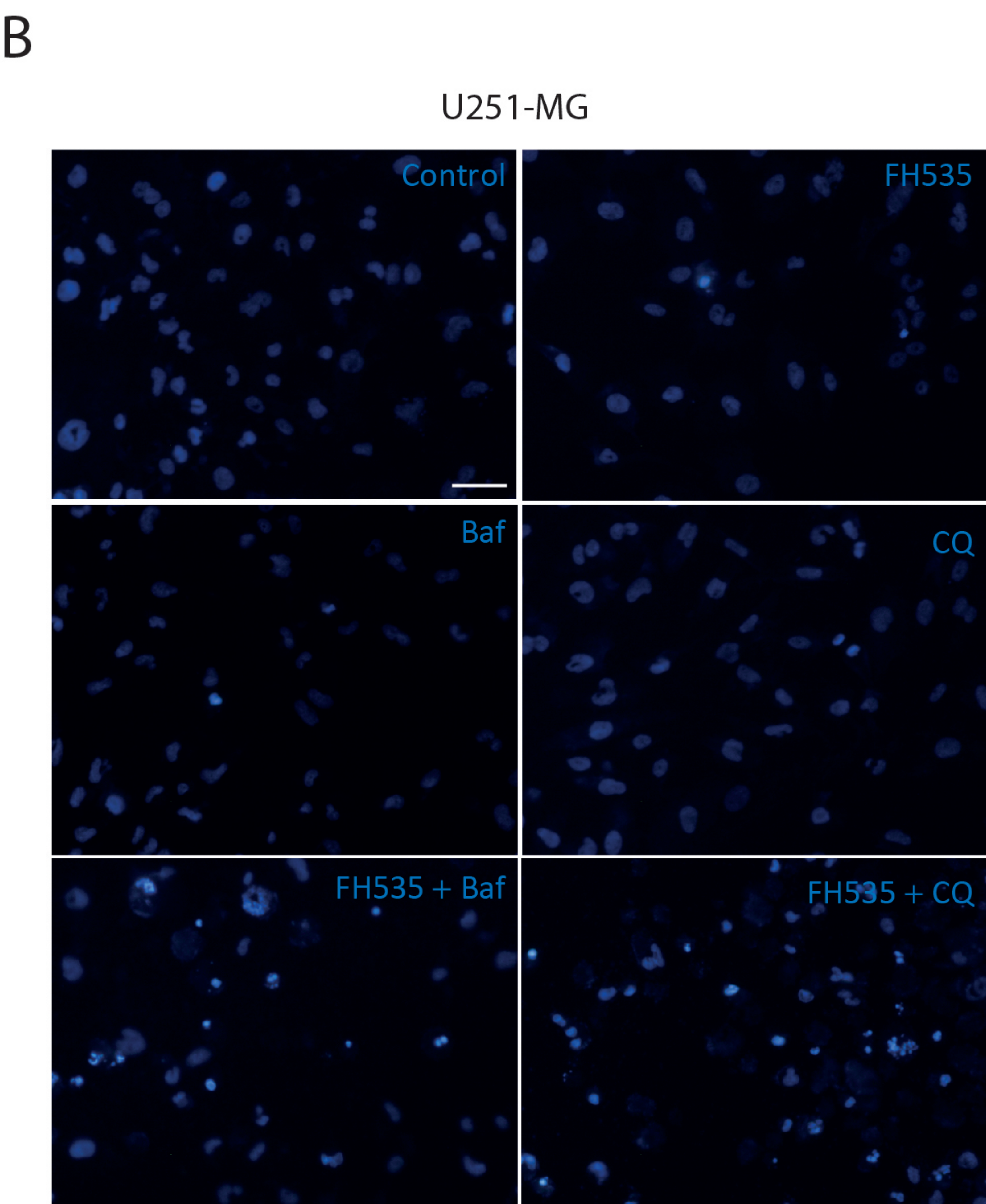
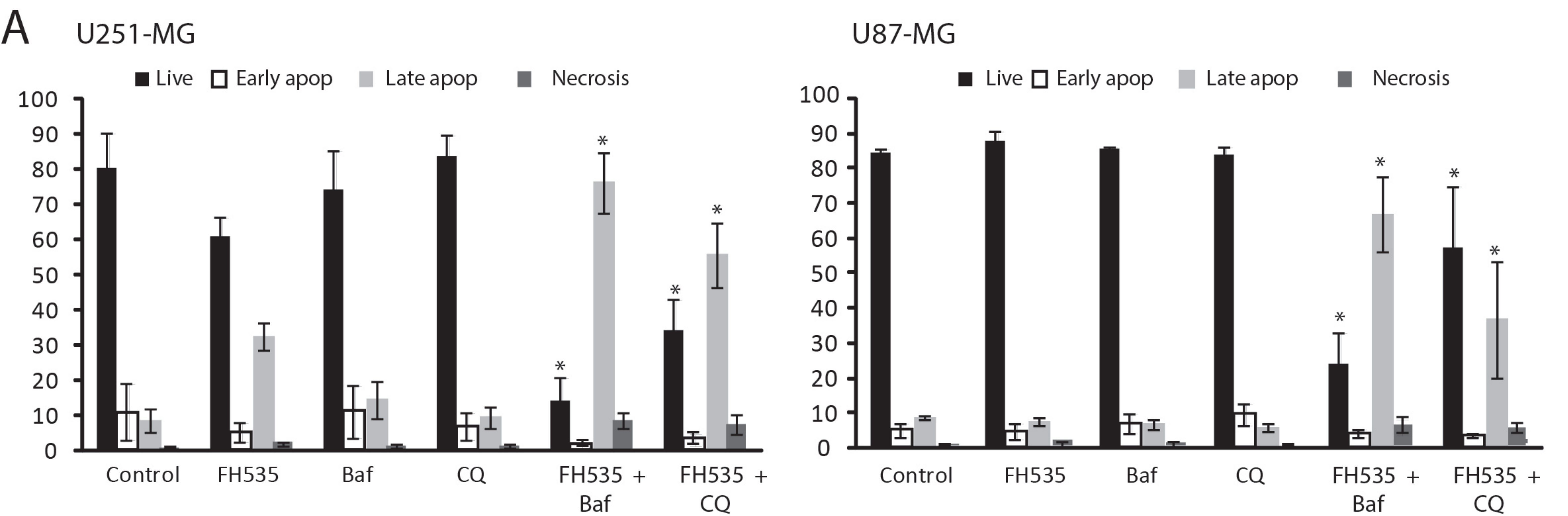


E

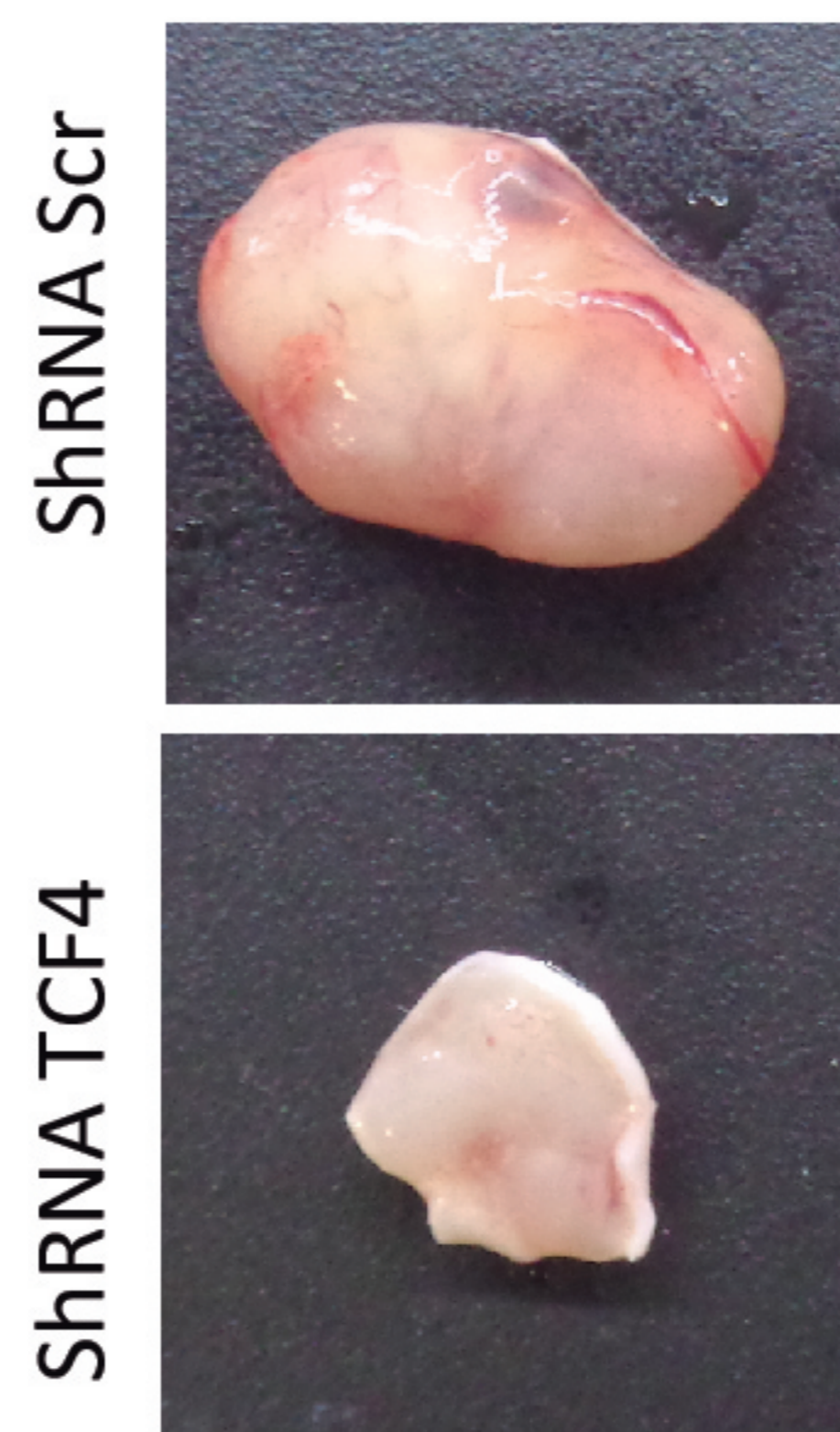
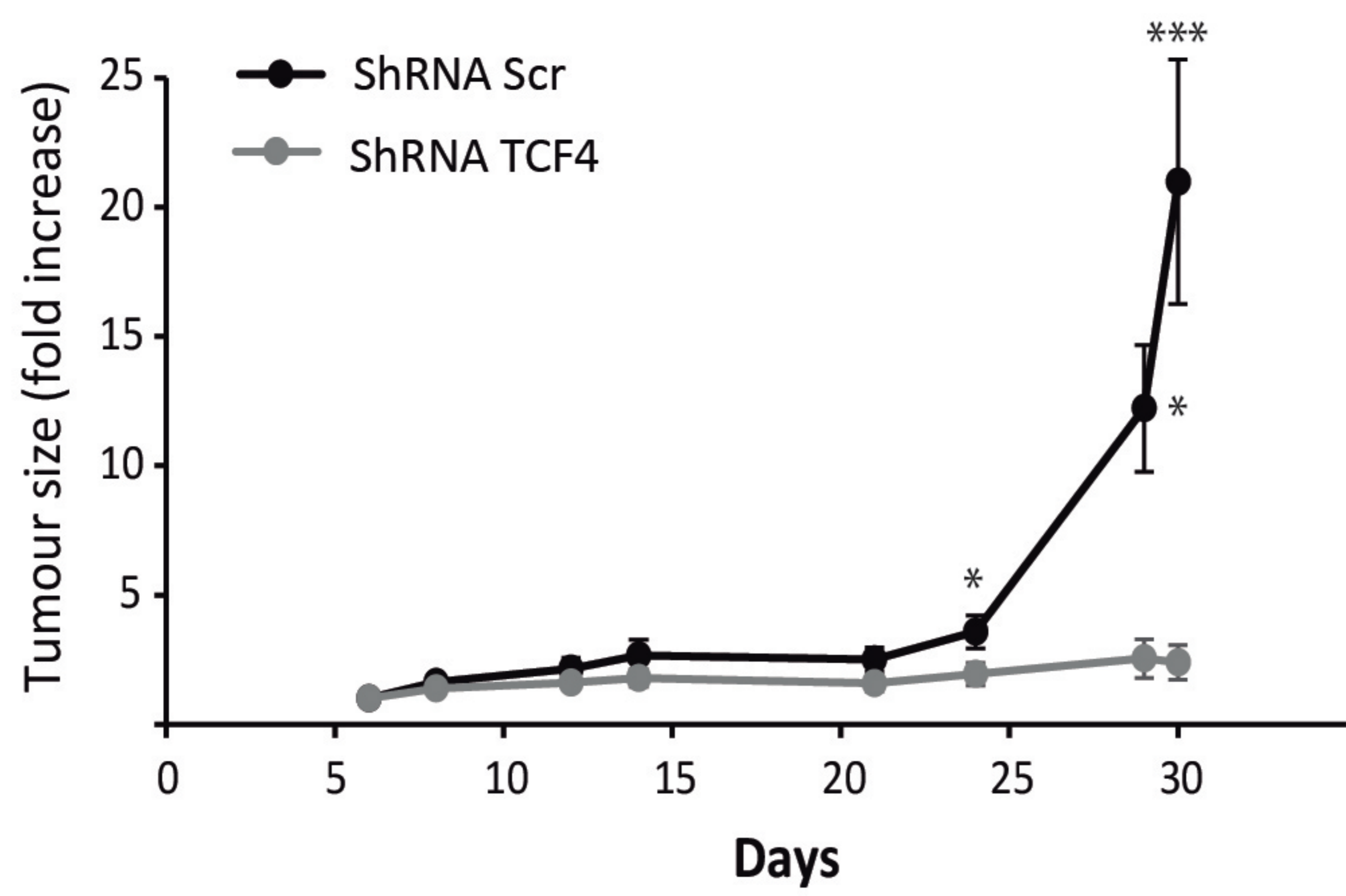


F

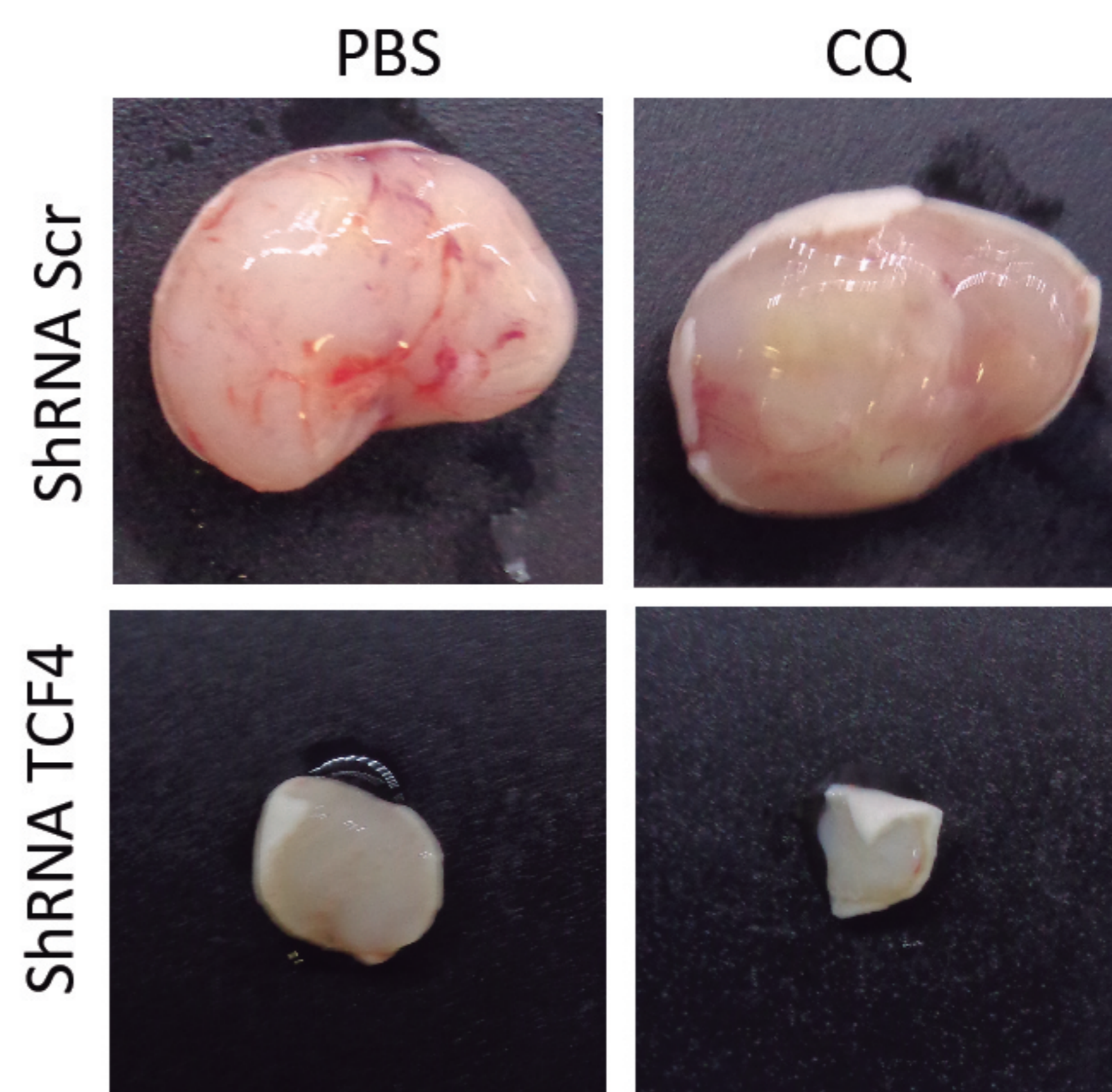
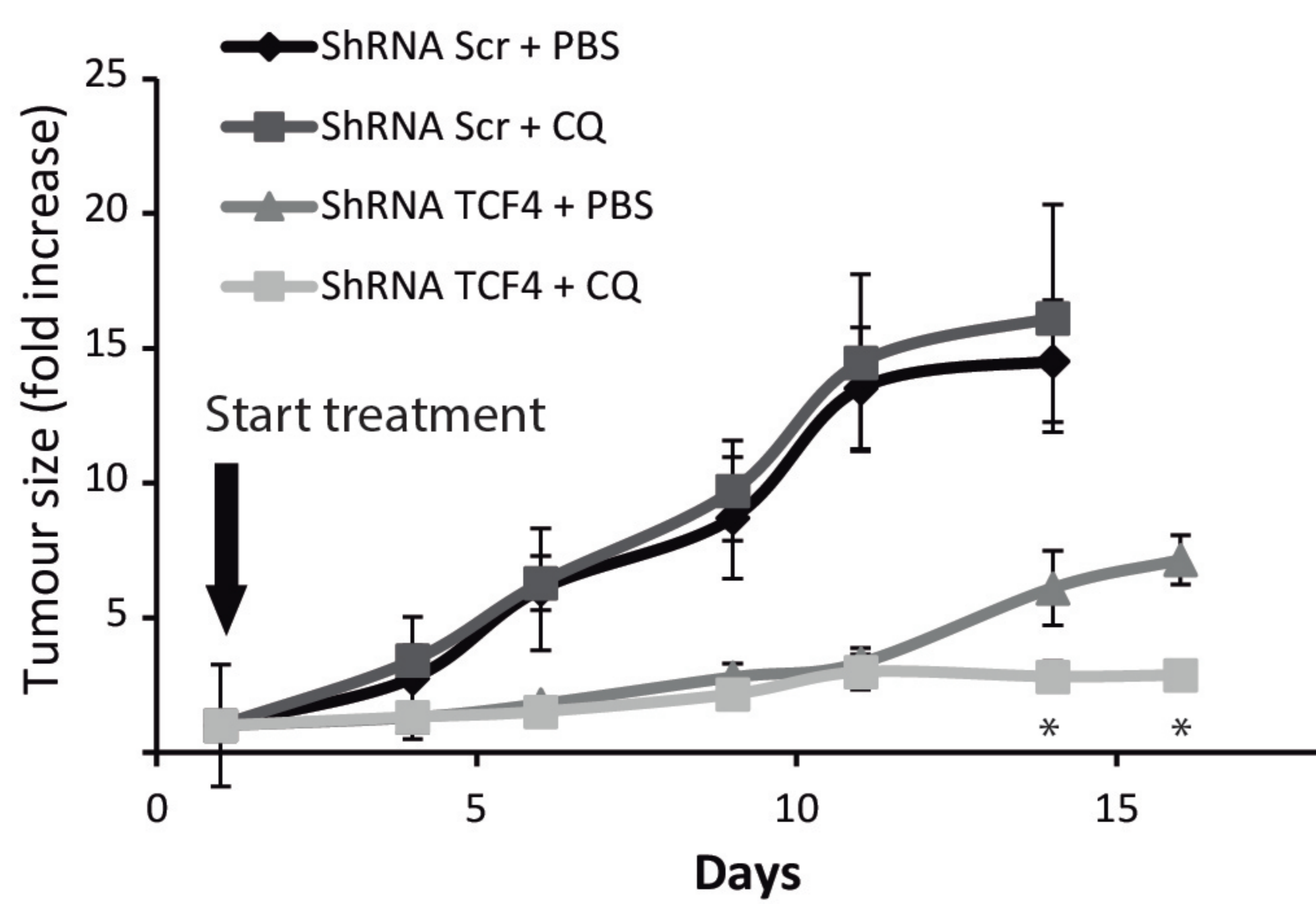




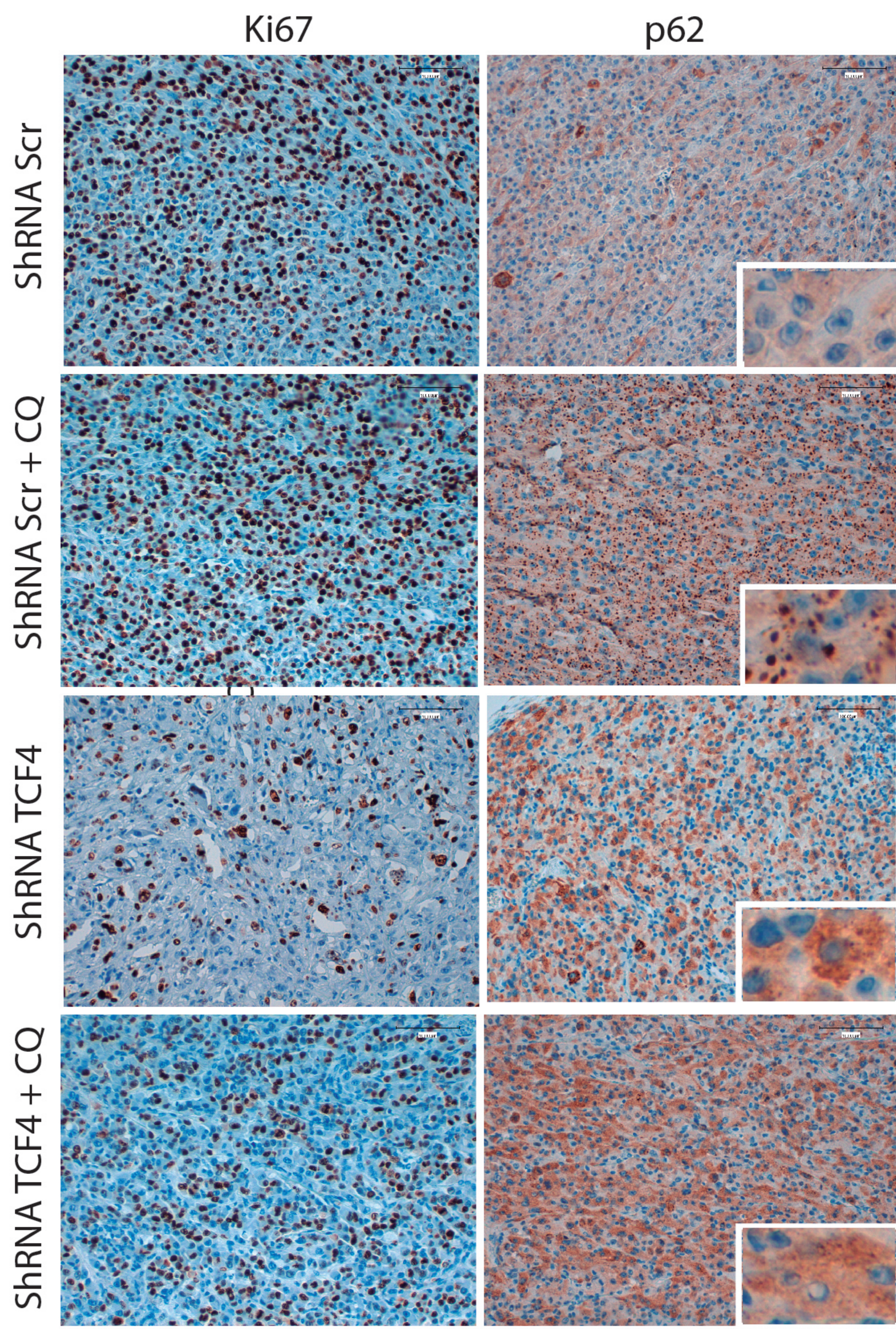
A



B



C



D

